

UNIVERZITA KARLOVA

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Pavčina Ptáčková

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE CHIMERICKÝCH ANTIGENNÍCH RECEPTORŮ

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION
OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1. dubna 2021

Pavčina Ptáčková

Identifikační záznam:

PTÁČKOVÁ, Pavlína. *Příprava a charakterizace chimerických antigenních receptorů (Construction and characterization of chimeric antigen receptors)*. Praha, 2021. Počet stran 190, počet příloh 2+5. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav hematologie a krevní transfuze. Školitel: Otáhal, Pavel.

Poděkování

Je mou milou povinností poděkovat MUDr. Pavlu Otáhalovi, Ph.D. za obrovskou příležitost naučit se mnoha novým metodám a získání nových poznatků, odborné vedení a možnost podílet se na jeho projektech.

Můj velký dík patří Mgr. Vojtěchovi Šrollerovi, Ph.D. nejen za přečtení velké části této práce a připomínky k ní, ale i za jeho neutuchající zájem o moji práci a podporu.

Děkuji i kolegům z Oddělení imunologie, zejména pak RNDr. Janu Musilovi, Ph.D. za jeho neuvěřitelnou trpělivost při vysvětlování principů průtokové cytometrie, pomoc při měření a jeho velmi kritické připomínky, které byly však inspirativní a člověka posouvaly vpřed...

Obsah

SOUHRN	8
SUMMARY.....	10
SEZNAM NEJČASTĚJI POUŽÍVANÝCH ZKRATEK	12
1. ÚVOD	15
2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....	16
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	18
3.1 Buněčná imunoterapie	18
3.2 Struktura receptorů TCR a CAR.....	21
3.3 Rozdělení CAR receptorů podle jejich struktury	23
3.3.1 CAR receptory první generace	23
3.3.2 CAR receptory druhé generace.....	24
3.3.3 CAR receptory třetí generace	24
3.3.4 CAR receptory čtvrté generace.....	25
3.3.5 CAR receptory páté generace	26
3.3.6 Extracelulární domény CAR receptorů.....	26
3.4 Cílové molekuly CAR-T buněčné terapie	28
3.5 Mechanismus působení CAR-T buněk.....	29
3.6 Výroba CAR-T lymfocytů.....	31
3.6.1 Zdroj T-lymfocytů.....	31
3.6.2 Aktivace T-buněk	32
3.6.3 Genové modifikace T-lymfocytů CAR receptory	33
3.6.4 Expanze CAR-T buněk	40
3.6.5 Kontrola výroby CAR-T buněk pro klinické účely	41
3.7 Vedlejší účinky terapie CAR-T buňkami	41
3.7.1 Syndrom cytokinové bouře (CRS, Cytokine Release Syndrome).....	41
3.7.2 Neurotoxicita	42
3.7.3 Syndrom nádorového rozpadu (TLS, Tumor lysis syndrome)	43

3.7.4	Toxicita způsobená poškozením zdravé tkáně	44
3.7.5	Genotoxicita	44
3.7.6	Imunogenicita	44
3.8	Nové přístupy v konstrukci CAR receptorů pro překonání toxicity.....	45
3.8.1	Využití sebevražděných genů.....	45
3.8.2	Zkrácené membránové receptory	46
3.8.3	CAR receptory nové generace	47
3.8.4	mRNA	49
3.9	Léčba CAR-T lymfocyty	50
3.9.1	Hematologická nádorová onemocnění.....	50
3.9.2	Solidní nádory	57
3.10	Příčiny selhání terapie pomocí CAR-T lymfocytů	63
3.11	Výhled do budoucna	64
4.	MATERIÁL A METODY	65
4.1	Práce s primárními buňkami a buněčnými liniemi	65
4.1.1	Kultivační média a aditiva	65
4.1.2	Buněčné linie	65
4.1.3	Izolace mononukleárních buněk z periferní krve (PBMCs)	66
4.1.4	Počítání buněk, viabilita.....	66
4.1.5	Transfekce adherentních buněk	66
4.1.6	Příprava primárních lidských T-buněk exprimujících CAR receptory.....	67
4.1.7	Průtoková cytometrie	71
4.1.8	Funkční testy.....	73
4.2	Práce s DNA.....	75
4.2.1	Plazmidy.....	75
4.2.2	Elektroforéza DNA	75
4.2.3	Izolace DNA.....	75
4.2.4	Stanovení koncentrace DNA	76
4.2.5	Klonování	76
4.3	Práce s bakteriemi.....	79
4.3.1	Bakteriální kmeny	79
4.3.2	Média pro kultivaci bakterií	80

4.3.3	Příprava kompetentních bakterií	80
4.3.4	Transformace bakterií.....	80
4.4	Pokusy se zvířaty	81
4.5	Statistické vyhodnocení	82
5.	VÝSLEDKY	83
5.1	Bispecifické CAR receptory pro léčbu hematologických malignit	83
5.1.1	Konstrukce bispecifických CAR receptorů	83
5.1.2	Příprava lentivirů	84
5.1.3	Příprava T-buněk exprimujících bispecifické CAR receptory	86
5.1.4	Funkční charakterizace bispecifických CAR-T lymfocytů	87
5.2	CAR receptory modifikované pro sekreci IL-21	93
5.2.1	Vektory pro CD19 CAR receptory a sekreci IL-21.....	93
5.2.2	Konstrukce vektoru PSMA CAR s inducibilní expresí IL-21	101
5.3	CAR receptory obsahující multi-epitopy	104
5.3.1	Konstrukce vektorů pro CAR receptory s vloženými multi-epitopy.....	105
5.3.2	Ověření exprese PSMA CAR receptorů s multi-epitopy a vazby protilátek na epitopy	108
5.3.3	Stimulace CAR-T buněk protilátkou trastuzumab přes mimotop H98.....	112
5.3.4	Deplece CAR-T buněk <i>in vitro</i> pomocí trastuzumabu přes mimotop H98	115
5.3.5	Deplece CAR-T buněk <i>in vivo</i> pomocí trastuzumabu přes mimotop H98	116
5.3.6	Stimulace expanze CAR-T buněk zprostředkovaná ostatními protilátkami.....	119
5.3.7	Ověření exprese ostatních CAR receptorů s multi-epitopy a vazby protilátek	120
6.	DISKUZE	123
7.	ZÁVĚR	140
7.	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	142
8.	SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ.....	156
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ	157
10.	PŘÍLOHY.....	183

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 oblastí 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 inducibilní 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 infiltruujících 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

SUMMARY

Background:

The CD19 chimeric antigen receptor (CAR) adoptive T-cell therapy for B-cell leukemia is a promising treatment for relapsed or refractory malignities. The overall response rate of CD19 CAR-T cells in clinical trials was greater than 80% for patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL). However, CAR-T cell therapy of leukemias and solid tumors has been limited by a lot of factors such as antigen loss of tumor escape variants, reduced proliferation, persistence and tumor-infiltration of CAR-T cells *in vivo*, immunosuppressive tumor environment, absence of ideal antigens and on-target, off-tumor toxicities. Therefore, new strategies improving the safety and efficacy of CAR-T cells, including further T-cell modification to overcome the immune suppression, are tested.

Aims:

(i) Bispecific CARs designed to express two antigen-binding domains prevent of antigen escape. (ii) T-cells were genetically modified to express CAR along with an inducible IL-21 gene cassette driven by NFAT-responsive promoter. IL-21 directly enhances CAR-T cell activity and anti-tumor effects. (iii) Applying suicide epitope modification in CAR enables significantly increasing the therapeutic safety of CAR-T cells.

Methods:

CARs were constructed by using molecular biology methods. Stable CAR expression in primary T-cells was achieved by using lentiviral vectors or PiggyBac transposon system for efficient transgene transfer. Two CD19 and CD20 targeted bispecific CARs were designed and further the anti-tumor efficacy *in vitro* assessed. CD19 or PSMA CAR-T cells with inducible or constitutive IL-21 expression in all-in-one construct were generated. IL-21 secreted by CARs upon antigen stimulation was tested. Short peptide tags incorporated into extracellular part of CARs were compared and tested.

Results:

The *in vitro* experiments revealed specific activation of biCAR-T lymphocytes by cells overexpressing CD19 and/or CD20. Cytokine release and cytolytic activity of biCAR-T cells were comparable or improved to the responses of single CAR-T cells. T-cells modified to

produce IL-21 in NFAT promoter-controlled manner respond to CAR or TCR stimulation. Multi-epitope based CARs allowed positive activation of CAR-T cell expansion, easy cell detection and enrichment of CAR-T cells during manufacturing by magnetic bead-based selection. Furthermore, these constructs have the potential for antibody-based selection upon CAR-T cell infusion *in vivo*.

Conclusions:

Here, we report the successful design and construction of various vectors for CAR-T cell therapy. BiCAR-T cells, those promote *in vitro* anti-tumor efficacy against both CD19 and CD20 antigens, may reduce the rate of relapse in treatment of B-ALL and non-Hodgkin's lymphoma. Induced IL-21 increased the number of infiltrating T-cells in tumor models *in vitro* and *in vivo*. CARs based on multi-epitope switching represent a promising strategy that could improve manufacturing procedure and clinical safety of CAR-T cells.

Keywords: chimeric antigen receptor, CAR-T cells, adoptive immunotherapy, PiggyBac transposon system, lentiviral transduction, bispecific CARs, IL-21, multi-epitope switching

SEZNAM NEJČASTĚJI POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam	Anglický překlad
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AICD	aktivací indukovaná buněčná smrt	Activation Induced Cell Death
AK	aminokyselina	
ALL	akutní lymfoblastická leukémie	Acute lymphoblastic leukemia
AML	akutní myeloidní leukémie	Acute myeloid leukemia
APC	buňka prezentující antigen	Antigen-presenting cell
APRIL	ligand indukující proliferaci	Proliferation-inducing ligand
BAFF	faktor atkivující B-buňky	B-cell activating factor
BCMA	antigen pro zrání B-buněk	B-cell maturation antigen
BCR	buněčný receptor B-buňky	B-cell receptor
biCAR	bispecifický chimerický antigenní receptor	Bispecific chimeric antigen receptor
bp	počet párů bazí	Base pair
CAR	chimerický antigenní receptor	Chimeric antigen receptor
CDC	cytotoxicita závislá na komplementu	Complement dependent cytotoxicity
CDR	oblast určující komplementaritu	Complementary determining region
CFSE	karboxyfluorescein sukcinimidyl ester	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CGA	nádorový zárodečný antigen	Cancer germline antigen
CML	chronická myeloidní leukémie	Chronic myeloid leukemia
CpG	oblasti DNA s dinukleotidy CG, které mohou být metylovány	Cytosine phosphate guanine
CRS	syndrom cytokinové bouře	Cytokine Release Syndrome
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	dendritické buňky	Dendritic cell
dcCAR	dvouřetězcový chimerický antigenní receptor	Dual chain Chimeric antigen receptor
DLBCL	difuzní velkobuněčný B lymfom	Diffuse large B-cell lymphoma
DR	přímé repetice	Direct Repeats
EGFR	receptor pro epidermální růstovýfaktor	Epidermal growth factor receptor
EMA	Agentura pro léčivé přípravky	European Medicines Agency
FACS	v textu zkráceně označovaná analýza buněk pomocí průtokového cytometru	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv	Food and Drug Administration
GCV	ganciklovir, syntetický analog 2-deoxy-guanozinu	Ganciclovir
GFP	zelený fluoresceční protein	Green fluorescent protein
GMP	správná výrobní praxe	Good manufacturing practice

GvHD	reakce štěpu proti hostiteli	Graft versus host disease
GVL	reakce štěpu proti leukémii	Graft versus leukemia
HER2	lidský epidermální receptor 2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIV	vir lidské imunitní nedostatečnosti	Human immunodeficiency Virus
HLA	lidský leukocytární antigen	Human leukocyte antigen
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk	Hematopoietic stem-cell transplantation
HSV-TK	tymidin kináza viru herpes simplex	herpes simplex virus thymidine kinase
ICANS	neurotoxická asociovaná s imunitními efektorovými buňkami	Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome
iCasp9	indukovatelný sebevražedný genový systém kaspázy 9	Inducible caspase-9 suicide gene system
IL	interleukin	
INF-γ	Interferon gama	
IR	invertované repetice	Inverted Repeats
IS	imunologická synapse	Immunological synapse
ITAM	konzervovaná aktivační sekvence s motivem tyrozinového typu	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kbp	počet párů kilobází	Kilobase pair
LDH	laktát dehydrogenáza	Lactate dehydrogenase
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě	Low density lipoprotein
LTR	dlouhé repetitivní sekvence	Log terminal repeats
LV	lentivirový	Lentiviral
mCAR	maskovaný CAR receptor	Masked Chimeric Antigen Receptor
MCL	lymfóm z plášťových buněk	Mantle cell lymphoma
MHC	molekuly hlavního histokompatibilního komplexu	Major histocompatibility complex
MLV	virus způsobující leukémii u myši	Murine leukemia virus
MM	mnohočetný myelom	Multiple myeloma
NFAT	transkripční faktor regulující aktivaci T-lymfocytů	Nuclear factor of activated T-cells
NHEJ	mechanismus opravy DNA spojováním nehomologních konců	Non-homologous end joining
NHL	ne-Hodgkinův lymfóm	Non-Hodgkin lymphoma
NK	NK buňka, přirozený zabijec	Natural killer cell
NKT	NK T-lymfocyty	Natural killer T-cells
NSG	imunodeficientní laboratorní myš	NOD scid gamma mouse
NY-ESO1	antigen exprimovaný buňkami spinocelulární karcinomu jícnu	New York esophageal squamous cell carcinoma 1
OFP	oranžový fluoresceční protein	Orange fluorescent protein

PB	DNA transpozon PiggyBac	piggyBac
PB	vazaný na plastik	Plastic binding
PBMCs	mononukleární buňky periferní krve	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	fosfátový pufr	Phosphate Buffered Saline
PG	Protein G	Protein G
PI	propidium jodid	Propidium iodide
PRE	vazebné elementy rozpoznávané proteinem Rev	Rev responsive element
PSMA	prostatický specifický membránový antigen	Prostate-specific membrane antigen
r/r	relabující nebo refrakterní	Relapsed/Refractory
RCR	replikačně kompetentní retrovir	Replication-competent retroviruses
SB	DNA transpozon Sleeping Beauty	Sleeping Beauty
SBase	transpozáza Sleeping Beauty	Sleeping Beauty transposase
scFv	jednoduchý řetězec variabilní oblasti	Single-chain variable fragment
SCID	těžká kombinovaná imunodeficiencie	Severe Combined Immunodeficiency Disease
SIN	samoinaktivující vektor	Self-Inactivating Vector
synNotch	syntetický Notch, receptor umožňující transkripční aktivaci závislou na vazbě specifického ligandu	
TA	dinukleotid thymin adenin	Thymin-Adenin
TAA	antigen asociovaný s nádorem	Tumor-associated antigen
T_{CM}	centrální paměťové lymfocyty	Central memory T-cells
TCR	buněčný receptor T-buňky	T cell receptor
TE	transpozibilní elementy	Transposable element
tEGFR	zkrácený receptor pro epidermální růstový faktor	Truncated epidermal growth factor receptor
TIL	lymfocyty infiltrující nádor	Tumor Infiltrating Lymphocyte
TIR	koncové invertované repetice	Terminal inverted repeats
TNF	faktor nádorové nekrózy, kachektin	Tumor necrosis factor
TNFR	receptor pro tumor nekrotizující faktor	Tumor necrosis factor receptor
T_{regs}	regulační T-lymfocyty	Regulatory T-cells
TRUCK	typ CAR-T buněk sekretující cytokin	T cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing
TSA	nádorově specifický antigen	Tumor-specific antigen
T_{SCM}	paměťové kmenové buňky, resp. lymfocyty schopné sebeobnovy	Stem cell-like memory T-cells
ÚHK	Ústav hematologie a krevní transfuze	
VH	variabilní část těžkého řetězce protilátky	Heavy chain variable region
VL	variabilní část lehkého řetězce protilátky	Light chain variable region

1. ÚVOD

Ústav hematologie a krevní transfuze, kde byla dizertační práce vypracovaná, je odborným pracovištěm spojující specializovanou léčebnou péči, diagnostiku a výzkumnou činnost v oboru hematologie. Pro své pacienty s nádorovými onemocněními typu leukémie či myelodysplastického syndromu, tak pro nemocné se vzácnými poruchami krevní srážlivosti, ústav zajišťuje komplexní péči vycházející z nejnovějších poznatků a trendů v hematologii. Jedním z nových a velmi nadějných přístupů v léčbě leukemií je adoptivní imunoterapie pomocí T-lymfocytů exprimujících chimerické antigenní receptory (CAR). Jde o poslední léčebnou možnost pro pacienty, u kterých dosavadní standardní léčba selhala, a s kterou bylo v klinických studiích probíhajících ve světě dosaženo výborných výsledků.

V posledních letech je velká snaha implementovat tuto terapeutickou metodu do klinické praxe i v ÚHKT a přímo v ústavu připravovat CAR-T lymfocyty pro imunoterapii pacientů.

V rámci dizertační práce byla mimo jiné připravena celá řada CAR receptorů, které byly částečně dále charakterizovány, a které by v budoucnu mohly být právě využity v klinice pro potřeby ústavu.

2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem práce bylo připravit několik vektorů pro chimerické antigenní receptory, těmito vektory pak geneticky modifikovat primární T-lymfocyty a následně ověřit jejich expresi, popř. ověřit protinádorové účinky CAR-T lymfocytů.

Práce byla rozdělena na tři části podle typu konstruovaných CAR receptorů, dílčími cíli bylo:

- (i) Pomocí lentivirů vnést do primárních T-buněk bispecifické CAR receptory, které jsou namířené proti maligním buňkám vycházejících z B-lymfocytární řady. Jako cílové antigeny byly vybrány molekuly CD19 a CD20, které jsou exprimovány na prekurzorových a zralých B-buňkách.
- (ii) Zkonstruovat CAR receptory se sekretovaným transgenem pro IL-21 a pomocí transpozonového systému vektory vnést do T-lymfocytů. Ověřit, že aktivované CAR-T lymfocyty IL-21 produkují.
- (iii) Do stávajících CAR receptorů zaklonovat multi-epitopy specifické pro různé protilátky.

Hypotézy, z kterých vycházely cíle práce, byly definovány takto:

- (i) Bispecifické CAR receptory zvýší protinádorový účinek CAR-T lymfocytů, protože zabrání maligním klonům uniknout buněčné smrti v případě, že přestanou exprimovat jeden z antigenů. Tyto CAR-T buňky mohou při použití v terapii B-akutní lymfoblastické leukémie nebo B-buněčných lymfomů snížit počet relapsů, zejména těch CD19 negativních, které se nyní vyskytují u 30-60% pacientů po léčbě monospecifickými CD19 CAR-T lymfocyty.
- (ii) CAR-T lymfocyty, které sekretují IL-21 samy, si udrží *in vivo* nízkou sérovou koncentraci tohoto cytokinu. IL-21 zvýší efektorovou funkci, podpoří expanzi cytotoxických CD8+ CAR-T buněk a zachová jejich naivní/paměťový fenotyp. Zároveň IL-21 aktivuje v místě působení další buňky imunitního systému (NK, NKT), a tím dojde k eliminaci nádorových buněk, které nejsou CAR-T lymfocyty

rozeznávány. Naopak IL-21 potlačí buňky T_{regs}. Použitím tohoto systému CAR receptoru se výrazně zlepši terapeutický účinek CAR-T buněk.

- (iii) Začleněním krátkých peptidů do extracelulární části CAR receptorů dovolí aktivaci expanze CAR-T buněk při jejich výrobě, purifikaci buněk, jednoduché monitorování buněk, ale i snadnou depleci buněk *in vivo* v případě potřeby.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Buněčná imunoterapie

Buněčná imunoterapie, nebo také adoptivní buněčná terapie, představuje novou éru personalizované léčby a nabízí naději na léčebnou odpověď u pacientů s vážným onemocněním. Buňkami zprostředkovaná imunita může účinně eradikovat nádorovou biomasu a docílit tak trvalé remise onemocnění. Molekulární biologie a genetické inženýrství umožnily imunitním buňkám získat řadu výhodných vlastností pro lepší rozpoznání nádorových buněk a větší účinnost jejich eliminace. Zároveň tyto nově získané vlastnosti dovolují imunitním buňkám zůstat bezpečné pro pacienta.

T-buňky představují preferovaný buněčný typ pro imunoterapii kvůli jejich antigenní specifitě a schopnosti migrovat do maligních tkání. Zároveň mají schopnost vyvinout imunologickou paměť pro kontrolu relapsu. Buněčná imunoterapie využívá jejich přirozené schopnosti a zaměřuje se zejména na využití:

- terapie pomocí lymfocytů infiltrující nádor (TIL, Tumor-Infiltrating Lymphocyte)
- terapie pomocí T-buněk s geneticky upravenými T-buněčnými receptory (TCR)
- terapie pomocí T-buněk s chimérickými antigenními receptory (CAR)
- terapie pomocí přirozených zabíječů (NK, Natural Killer)
- terapie pomocí gama delta T-lymfocytů ($\gamma\delta$ T-lymfocyty)

T-lymfocyty infiltrující nádory, nádorově specifické T-lymfocyty

Pacienti s rakovinou mají přirozeně se vyskytující T-buňky, které jsou schopné cílit na nádorové buňky. Jde o jedny z „nejsilnějších“ imunitních buněk, zejména tzv. zabijácké T-buňky jsou schopné velmi přesně rozpoznávat a eliminovat rakovinné buňky. Samotná přítomnost těchto buněk v těle nemusí být dostačující. K účinné protinádorové odpovědi je nutné dvou základních předpokladů. Za prvé, tyto buňky se musí nejprve aktivovat, aby byly schopné zabíjet, a poté musí tuto aktivitu udržet po dostatečně dlouhou dobu. Za druhé, tyto T-buňky musí být v dostatečném počtu.

Terapie pomocí TIL lymfocytů se snaží těchto předpokladů dosáhnout. Jde o přístup, kdy se přirozeně vyskytující T-buňky vyizolují z biopsií nádorů, *ex vivo* se expandují v přítomnosti cytokinů (většinou v přítomnosti interleukinu 2) a následně se vrátí pacientovi. Alternativně lze T-buňky odebrat z periferní krve a *ex vivo* reaktivovat pomocí antigenně specifických peptidů, namnožit a vrátit pacientovi. Tento druhý přístup ale už předpokládá populaci buněk reagujících na použité peptidy. Obě terapeutické strategie vyžadují přítomnost vysoko-

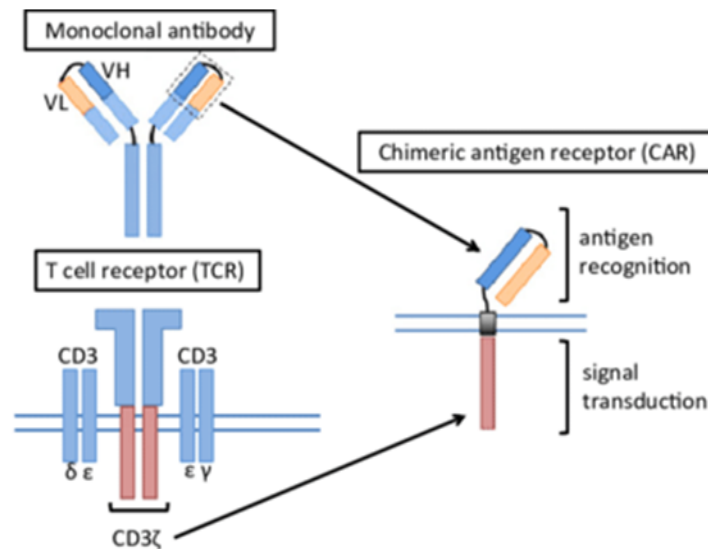
afinitních T-buněčných receptorů [1-4]. V dnešní době je adoptivní přenos TIL lymfocytů pravděpodobně nejúčinnější léčbou chirurgicky neřešitelného melanomu [5, 6].

T-lymfocyty s geneticky upravenými TCR receptory

Tento přístup také zahrnuje odběr T-buněk z periferní krve pacientů, ale není omezen na pouhou aktivaci a namnožení. Buňky jsou nově vybaveny TCR receptorem, který jim umožňuje cílit na specifické nádorové antigeny. Toho je dosaženo tak, že řetězce α a β TCR receptoru jsou izolovány z klonů jednotlivých T-buněk a vloženy do retrovirových vektorů. T-buňky izolované z periferní krve jiného pacienta pak mohou být tímto vektorem modifikovány, aby nesly požadované specifické sekvence $\alpha\beta$ TCR. Buňky jsou posléze expandovány *in vitro* na dostatečný počet a vráceny infuzí zpět pacientovi. Úspěch těchto studií poskytl například základ pro klinické zkoušky s použitím T-buněk s upravenými TCR receptory rozpoznávající antigen NY-ESO1, který je overexprimován buňkami karcinomu spinocelulárních buněk [7-9].

T-buňky s chimérickým antigenním receptorem

Výše dva zmíněné přístupy buněčné imunoterapie pomocí TIL lymfocytů a lymfocytů s geneticky upravenými TCR receptory cílí na nádorové buňky, které prezentují antigeny na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Nedávné pokroky v buněčné imunoterapii umožnily překonat toto omezení díky T-buňkám vybaveným syntetickými receptory, tzv. chimérickými antigenními receptory (CAR). Jde o uměle připravené proteiny, které rozpoznávají povrchové nádorové antigeny v jejich přirozeném, nativním stavu. CAR receptory se skládají ze tří částí: ektodomény vázající antigen, který je tzv. spacerem spojen s transmembránovou doménou a endodoménou [10]. Ektodoména je nejčastěji tvořena jednořetězcovou variantou fragmentu (scFv) odvozeného od protilátky a je zodpovědná za rozpoznání příslušného antigenu. Základem intracelulární aktivační domény je pak řetězec zeta molekuly CD3 T-buněk (CD3 ξ) (**Obr. 1**).



Obr. 1: Struktura chimérického antigenního receptoru

Je tvořen jednořetězcovou variabilní doménou odvozenou z monoklonální protilátky, transmembránové domény a signální domény CD3 ζ odvozené od TCR receptoru. Zkratky: *VH*, heavy chain variable region; *VL*, light chain variable region. Obrázek převzat z publikace [11].

NK buňky

V poslední době se adoptivní buněčná terapie věnuje buňkám vrozené imunity, tzv. přirozeným zabijedům neboli NK buňkám. NK buňky mají velký potenciál v imunoterapii nádorových onemocnění, ale i zlepšují účinek štěpu proti leukémii (GvL) během transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Nejen celkový počet NK buněk podaných pacientovi, ale i jejich schopnost regulovat imunitní systém, mají silný účinek GvL bez vyvolání reakce štěpu proti hostiteli. NK buňky byly primárně zaměřené na léčbu akutní myeloidní leukémie (AML), ale jsou zkoušeny k léčbě jiných hematologických onemocnění, sarkomů, karcinomů a nádorů mozku [12, 13].

V buněčné imunoterapii se většinou používají alogenní NK buňky izolované z periferní krve dárců, které jsou opět *ex vivo* expandovány v přítomnosti interleukinů a podpůrných buněk a posléze podány pacientovi.

Relativně novým přístupem je genetická modifikace NK buněk chimérickými antigenními receptory [14].

Gama delta T lymfocyty

Gama delta T-lymfocyty představují minoritní skupinu T-lymfocytů (v periferní krvi <10%) s odlišnou strukturou receptoru. TCR receptor je tvořen řetězci γ a δ . Jde o buňky na „pomezí“ mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Rozpoznávají antigen nezávisle na MHC. Jsou

totiž aktivovány mikrobiálními pyrofosforečnany nebo endogenními pyrofosforečnany, které produkují nádorové buňky. Dále $\gamma\delta$ T-lymfocyty exprimují aktivační receptory, které se nacházejí na NK buňkách. Tyto receptory vážou molekuly, které chybí na zdravých buňkách, ale často se vyskytují na buňkách nádorových. V kombinaci s terapeutickými monoklonálními protilátkami vykazují $\gamma\delta$ T-buňky velmi silnou protinádorovou odpověď. Při transplantaci kostní dřeně usnadňují přijetí štěpu hostitelem. Rovněž $\gamma\delta$ T-lymfocyty se zkouší modifikovat CAR receptory [15, 16].

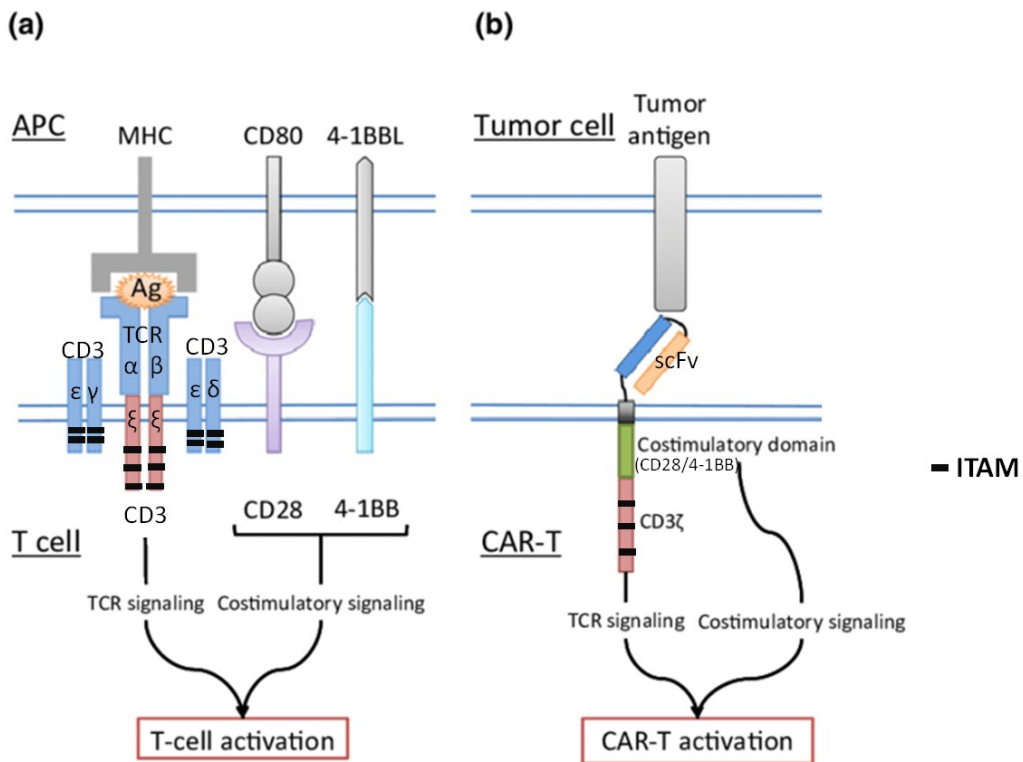
3.2 Struktura receptorů TCR a CAR

Struktura CAR receptoru je z velké části založena na složkách odvozených od komplexu T-buněčného receptoru, přesto CAR-T buňky a konvenční T-lymfocyty se liší ve způsobu rozpoznání antigenu a následné aktivaci. V $\alpha\beta$ T-buňkách tvoří TCR receptor heterodimer skládající se z jednoho alfa a jednoho beta řetězce, přičemž každý obsahuje variabilní a konstantní doménu. Prostřednictvím oblastí určujících komplementaritu (CDR, complementary determining region) ve variabilních částech TCR se zprostředkovává rozpoznání krátkých peptidů prezentovaných na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) [17]. Naproti tomu extracelulární část CAR receptoru je nejčastěji tvořena jednořetězcovou variantou fragmentu (scFv) odvozené od protilátky, která umožňuje vazbu na antigen nezávisle na MHC. CAR receptor umožní T-buňce rozpoznání jakéhokoliv antigenu na buněčném povrchu (proteiny, sacharidy, glykolipidy), proti kterému je k dispozici monoklonální protilátka [18].

Protože α a β řetězce TCR receptoru postrádají signální domény, pro signalizaci jsou nezbytné molekuly CD3 (heterodimery CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 ϵ a homodimer CD3 ζ) asociované s TCR receptorem. Molekuly CD3 obsahují konzervované sekvence s motivem tyrozinového typu, tzv. ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Aktivované kinázy rodiny Src fosforylují tyrozin v těchto motivech, což umožní následnou vazbu dalších proteinů [19]. Kinázy Src jsou dále spojeny s koreceptory CD4 nebo CD8, které určují vazbu komplexu TCR na molekuly MHCI nebo MHCII. K úplné aktivaci T-buněk je zapotřebí druhého signálu, který je zprostředkováván kostimulačními receptory CD28 a 4-1BB (**Obr. 2**). Ukončení aktivace T-buněk je dosaženo prostřednictvím inhibičních koreceptorů CTLA-4 nebo PD-1 [17].

Naproti tomu, intracelulární část CAR receptoru zprostředkovává první i druhý signál, protože je kombinovaná doménami z CD3 molekuly a z kostimulačních receptorů. Základem

signalizace přes CAR receptor je tedy doména CD3 ζ , která může být rozšířena o jednu nebo více kostimulačních domén (ty pak klasifikují jednotlivé generace CAR receptorů, bude blíže popsáno v kapitole 3.3).

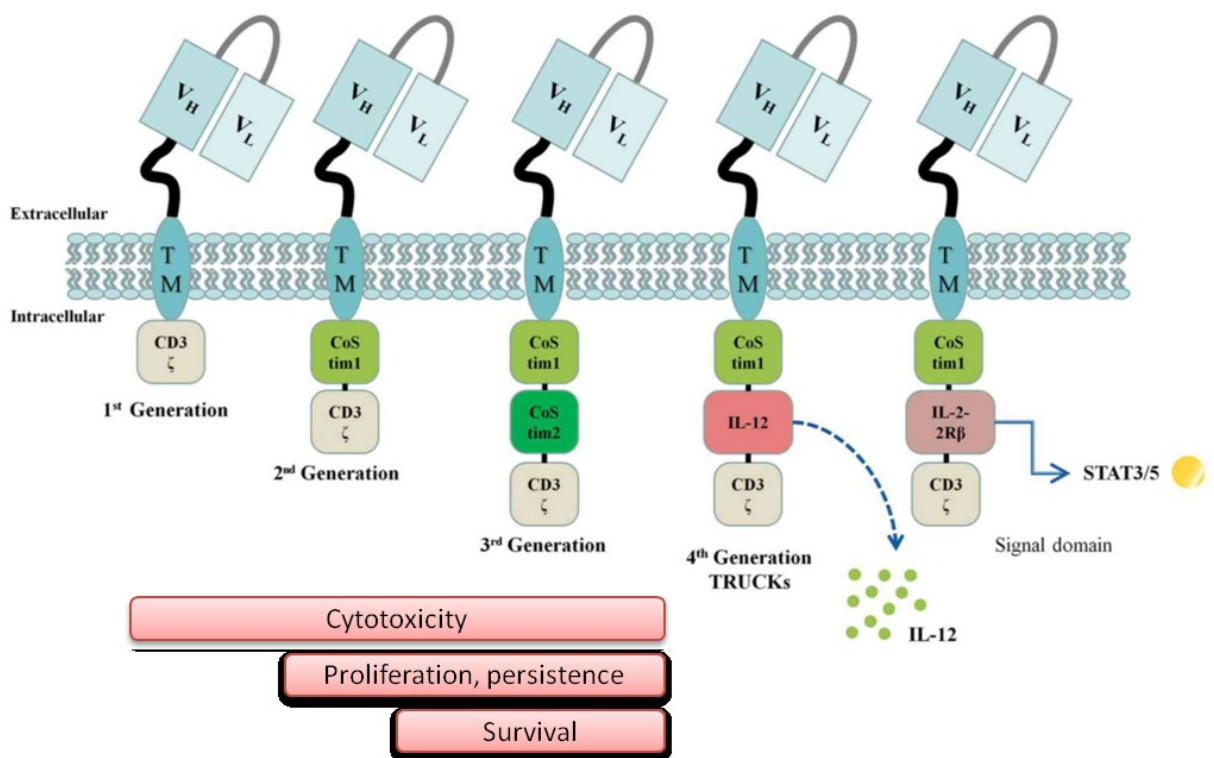


Obr. 2: Srovnání struktury receptorů TCR a CAR

- (a) TCR je specifický pro peptid prezentovaný na molekule MHC. TCR je v komplexu s několika molekulami, které se rovněž podílí na rozpoznání MHC a přenosu signálu. Řetězce alfa a beta TCR receptoru cytotoxických T-buněk jsou asociovány s molekulou CD8, která váže molekuly MHC I. S TRC receptorem jsou dále spojeny molekuly CD3 obsahující fosforylační místa ITAM pro transdukcii signálu. Molekula CD8 potom tento signál dále zesiluje. Aktivace naivních T-buněk vyžaduje druhý signál, který je transdukován molekulou CD28 po navázání na CD80 nebo CD86 na povrchu buněk prezentující antigen (APC). Aktivované T-buňky upregulují expresi dalších kostimulačních receptorů (např. 4-1 BB), které přispívají k jejich efektorové funkci, přežití a proliferaci.
- (b) CAR receptor je odvozený od komplexu TCR a protilátky specifické na antigen. CAR je jednořetězcový, kombinuje doménu pro vazbu antigenu a signální domény. Obrázek převzat z publikace [11] a upraven.

3.3 Rozdělení CAR receptorů podle jejich struktury

První T-buňky s chimérickou molekulou byly připraveny už v roce 1989 v Izraeli imunology Zeligem Esharem a Gideonem Grossem [20]. Tyto CAR-T buňky nebyly sice klinicky účinné, ale v následujících třiceti letech byly imunologicky a technologicky propracovány natolik, že se jejich protinádorová aktivita výrazně zvýšila, zlepšila se nejen jejich schopnost proliferace a odolnost vůči apoptóze, ale zejména jejich perzistence *in vivo*. Podle struktury endodomény jsou CAR receptory rozděleny do pěti generací (Obr. 3).



Obr. 3: Dělení chimérických antigenních receptorů podle struktury endodomény

Intracelulární část receptoru 1. generace obsahuje jednu aktivační doménu CD3 ζ . Receptory 2. a 3. generace jsou obohaceny o jednu nebo dvě kostimulační signální domény (CD28, CD27, OX-40 (CD134) a 4-1BB (CD137)). Receptory 4. generace, tzv. TRUCK, jsou geneticky modifikovány tak, že nesou gen pro cytokin pod indukovatelným promotorem. Receptory 5. generace mají navíc vloženou kostimulační doménu pro aktivaci specifických signálních drah. Převzato z publikace [21].

3.3.1 CAR receptory první generace

Tyto receptory obsahují jednu intracelulární signalizační doménu, jde buď o řetězec Fc ϵ R1 γ vysokoafinitního receptoru pro IgE nebo CD3 ζ z komplexu TCR/CD3. Řetězce obsahují konzervované sekvence s motivem tyrozinového typu tzv. ITAM poskytující signály potřebné pro aktivaci T-buněk [22]. Více studií bylo provedeno s CAR receptorem obsahující CD3 ζ než s Fc ϵ R1 γ , důvodem je asi to, že CD3 ζ obsahuje oproti Fc ϵ R1 γ více motivů ITAM a

zároveň buňky exprimující tento typ řetězce jsou účinnější v zabíjení nádorových buněk [23, 24]. Na druhé straně buňky *in vitro* vykazovaly nižší hladinu exprese CAR receptorů [25]. Protinádorový účinek CAR-T lymfocytů první generace byl značně limitován *in vivo*. Buňky neprodukovaly dostatečné množství interleukinu 2 (IL-2) k efektivnímu zničení nádorových buněk, proto bylo nutné podávat exogenní IL-2 [26]. Zároveň buňky měly sníženou proliferaci a předčasně přecházely do apoptózy [27].

3.3.2 CAR receptory druhé generace

Pro účinnou aktivaci lymfocytů kromě předložení antigenu buňkami prezentující antigen (APC) musí lymfocyt od těchto buněk obdržet kostimulační signál. Totéž platí i pro CAR-T lymfocyty. V souladu s tím byly v další generaci receptorů přidány do endodomény signální podjednotky z různých kostimulačních receptorů - CD28, CD137 (4-1BB) a CD134 (OX-40). Tím se zlepšila proliferace, cytotoxicita, trvalá odpověď i prodloužení životnosti CAR-T buněk [28-31]. Kostimulace pomocí molekuly CD28 vede k silné proliferativní odpovědi a hraje klíčovou roli v diferenciaci efektorových paměťových buněk. Stimulace přes 4-1BB indukuje zase progresivní reakci a je pravděpodobně zodpovědná za zvýšenou perzistenci CAR-T buněk a zároveň jejich diferenciaci v centrální paměťové buňky [32, 33]. Na druhou stranu stimulace přes 4-1BB může vyvolat časně vyčerpání lymfocytu, a tím snížit protinádorovou účinnost. Kostimulace přes molekulu OX-40 udržuje proliferaci buněk a posiluje produkci IL-2. Stimulace přes CD27 zvyšuje expanzi CAR-T buněk, navíc jsou odolnější vůči apoptóze a v porovnání s CD28 se zvýšila i perzistence buněk *in vivo* [30]. V praxi se uplatnily kostimulační molekuly CD28 a 4-1BB. Řada klinických studií potvrdila zvýšenou proliferaci, produkci cytokinů a antiapoptických proteinů u CAR-T buněk 2. generace.

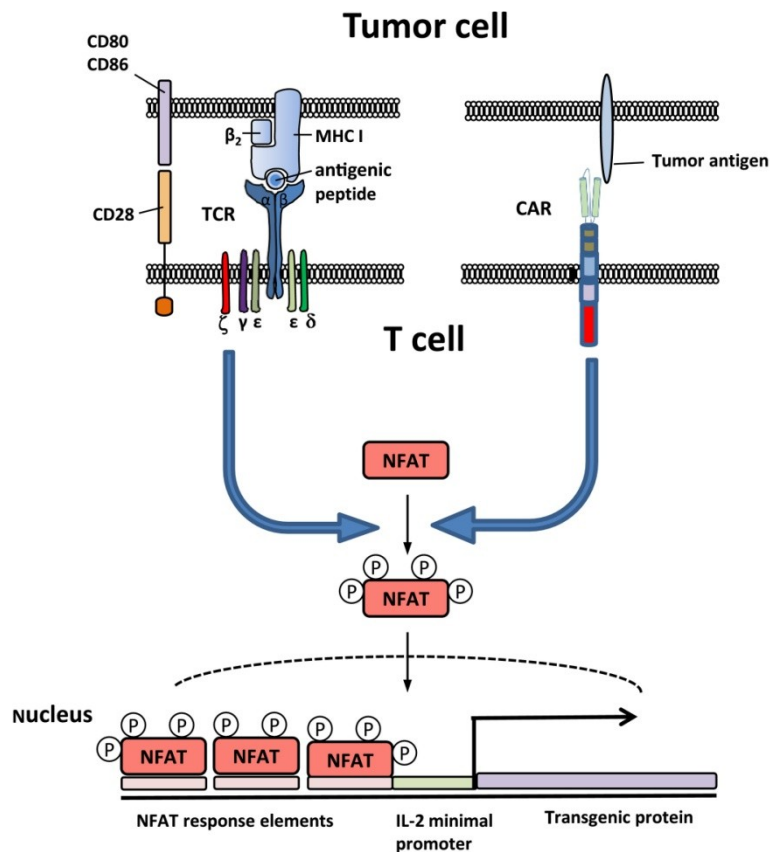
3.3.3 CAR receptory třetí generace

Pro další zlepšení účinku CAR-T buněk byly zkonstruovány receptory s kombinací více signálních domén (CD28 OX40 CD3 ξ nebo CD28 4-1BB CD3 ξ) se snahou dosáhnout zvýšení produkce cytokinů a zvýšit protinádorový účinek. V práci Wilkie *et al.* bylo však ukázáno, že nedošlo k žádnému významnému rozdílu v protinádorové cytotoxicitě po začlenění další signální domény do CAR receptoru 2. generace, i když CAR-T buňky byly schopny sekretovat větší množství interferonu gama (INF- γ) [34].

Rovněž například ve dvou klinických studiích, kdy byly podány anti-CD20 CD28-CD137-CD3 ζ -CAR-T a anti-HER2 CD28-CD137-CD3 ζ -CAR-T lymfocyty při léčbě lymfomu a rakoviny tlustého střeva, se neprokázalo zlepšení účinnosti ve srovnání s CAR-T buňkami 2. generace [35, 36].

3.3.4 CAR receptory čtvrté generace

Jde o receptory, které zahrnují dva samostatné transgeny. Vychází z receptorů 2. generace, které byly obohaceny o gen pro cytokin. Exprese tohoto cytokinu je řízena transkripčním faktorem, k jehož aktivaci dojde až poté, kdy dojde k aktivaci CAR receptoru, resp. k navázání antigenu na receptor (**Obr. 4**).



Obr. 4: Mechanismus fungování CAR receptoru 4. generace

Signalizací přes TCR i CAR receptor se aktivuje fosforylace transkripčního faktoru NFAT, který je následně transportován do jádra, kde aktivuje řadu genů a zároveň nasedá na syntetický promotor transgeny. Promotor tvoří většinou 3 nebo 6 regulačních oblastí, které jsou rozeznávány faktorem NFAT, tzv. NFAT-response elements, v kombinaci s minimálním promotorem pro IL-2. Obrázek převzat z publikace [37].

Prvním cytokinem, který byl zabudován do CAR receptoru 4. generace, byl interleukin 12 (IL-12). CAR-T buňky po aktivaci začnou do okolí vylučovat vysoké hladiny IL-12, které moduluji nádorové mikroprostředí a zároveň zmírňují systémové vedlejší účinky. Cytokin v místě působení přitahuje další buňky vrozené imunity, které mohou následně eliminovat i nádorové buňky negativní na cílový antigen a tím se zvyšuje protinádorový účinek [37, 38]. CAR receptory 4. generace jsou označovány jako „TRUCK“ (T cells redirected for antigen unrestricted cytosine initiated killing). V dnešní době je zkoumán panel různých cytokinů, včetně IL-7, IL-15, IL-18, IL-23 a jejich vzájemná kombinace [37].

3.3.5 CAR receptory páté generace

CAR receptory páté generace vycházejí z receptorů 2. generace, ale obsahují navíc zkrácený beta řetězec cytoplazmatického receptoru pro IL-2 s vazebným místem pro transkripční faktor STAT3. Aktivace CAR receptoru vyvolaná vazbou antigenu spouští současně signalizaci prostřednictvím domén CD3 ζ , CD28 a signalizaci přes dráhu JAK-STAT3/5. Tyto tři aktivované synergické signály pak plně aktivují T-buňky [39].

3.3.6 Extracelulární domény CAR receptorů

Pro rozpoznání antigenu se nejčastěji vkládá do CAR receptorů jednořetězcový variabilní fragment (scFv). Ten je tvořen variabilními částmi těžkého a lehkého řetězce imunoglobulinu, které jsou k sobě fúzované přes flexibilní linker. Nejběžněji používaným motivem linkeru je (Gly₄Ser)₃. Spojení scFv a transmembránové domény zajišťuje tzv. spacer (nebo též označovaný jako hinge). Nejčastěji jde o pantovou oblast IgG₁ nebo IgG₄. Spacer výrazně ovlivňuje fungování CAR receptoru, protože mu poskytuje flexibilitu. Záleží i na jeho délce. To vše může ovlivnit „dosažení“ CAR-T buňky na antigen a jeho navázání [40].

Dostupnost řady monoklonálních protilátek umožnilo připravit CAR receptory pro rozpoznání antigenů s různou afinitou, obvykle řádově vyšší než je samotná interakce TCR-peptid MHC [41]. V posledních letech se zkouší upravit specifita scFv nebo připravit jiné antigen vazebně specifické ektodomény, jako jsou duální řetězce, nativní receptory nebo receptory založené na ligandech.

3.3.6.1 Afinitně vyladěné scFv

Tradičně se výzkum CAR-T buněk věnoval využití vysokoafinitních fragmentů scFv. Některé studie ale naznačují, že zacílení antigenu pomocí scFv s nejvyšší afinitou nemusí nutně vést

k optimálnímu výsledku [42, 43]. Například v práci Chmielewski *et al.* se věnovali srovnání CAR receptorů o různé afinitě ($3,2 \times 10^{-7}$ až $1,5 \times 10^{-11}$ K_d) k lidskému receptoru pro epidermální růstový faktor 2 (HER2). Prokázali, že aktivační práh CAR-T buněk nepřímo koreluje s afinitou scFv [44]. V klinické studii věnované metastatickému karcinomu tlustého střeva a jeho léčbě pomocí CAR-T buněk s vysokoafinitním scFv proti HER2 došlo i k napadení zdravých plicních epiteliálních buněk (slabě totiž exprimují antigen HER2), což způsobilo cytokinovou bouři s následnou smrtí pacienta [36]. V jiné klinické studii fáze I se potvrdilo, že zacílení na antigen HER2 pomocí scFv s nižší afinitou je daleko bezpečnější [45]. Modulace afinity scFv fragmentů má tedy zásadní význam při navrhování nových CAR receptorů zaměřených zejména na nádorově asociované antigeny (TAA), které mohou být exprimovány i na zdravých tkání.

3.3.6.2 Dvouřetězcové CAR receptory (dcCAR, dual chain CAR)

Protílátka v ektodoméně tohoto receptoru se nachází v její přirozené formě, v heterodimeru. Lehký i těžký řetězec imunoglobulinu jsou exprimovány současně a jsou spojeny prostřednictvím endogenních disulfidických vazeb s jejich konstantními oblastmi. Tyto dvouřetězcové CAR receptory vážou s vysokou afinitou cílový antigen [46]. Navíc v buněčných liniích dcCAR receptor vytvářel velmi stabilní heterodimery, což by mohlo naznačovat i zvýšenou stabilitu samotného receptoru oproti variantě s scFv [46]. Zavedením dcCAR receptorů se dále rozšiřuje paleta cílových antigenů, pro které není dosud k dispozici sekvence scFv.

3.3.6.3 CAR receptory založené na vazbě receptor-ligand

Jde o receptory, kdy fragment scFv je nahrazen extracelulární doménou nativního receptoru nebo ligandu [47]. Tento přístup je poměrně nový, přesto se už zkouší v několika klinických studiích. Jako příklad lze uvést CAR receptor fúzovaný se zkráceným interleukinem-13 (IL-13), který se jako ligand váže na specifický receptor IL13R α 2. Více dávek CAR-T buněk exprimující receptor s tímto ligandem byly v rámci slibné klinické zkoušky fáze I podávány 1 pacientovi, který dosáhl kompletní regrese všech intrakraniálních a spinálních rekurentních multifokálních glioblastomů (bohužel 7,5 měsíce po ukončení terapie u něho došlo k relapsu) [48]. V následující tabulce jsou uvedeny další příklady CAR receptorů založené na vazbě ligand-receptor.

	CAR (based on receptor)	Target (ligand)	Costimulatory domains	Indication	Phase of development
CARs based on natural receptors	NKp30	B7116, BAG6, Gal3	CD28.CD3z	Liquid and solid tumors	Preclinical
	NKG2D	MICA, MICB, ULBP 1-6	CD3z/Dap1O assoc	Liquid and solid tumors	Clinical
	DNAM-1	PVR and Nectin-2	CD28.CD3z	Solid tumors	Preclinical
	CD27	CD70	41BB.CD3z	Liquid and solid tumors	Clinical
	CD16	Fc region of Abs	41BB.CD3z	Liquid and solid tumors	Clinical
CARs based on receptor-binding domain of ligands	GM-CSF	CD116	CD28.CD3Z	Liquid tumors	Preclinical
	Adnectin	EGFR	CD28.41BB.CD3z	Solid tumors	Preclinical
	IL-13	IL-13R α 2	41BB.CD3z	Solid tumors	Clinical
	IL-11	IL-11R α	CD28.CD3z	Solid tumors	Preclinical
	FSH	FSHR	CD28.CD3Z	Solid tumors	Preclinical
	T1E	ErbB family	CD28.CD3z	Solid tumors	Clinical

Tab. 1: Příklady nově vyvíjených CAR receptorů založených na vazbě receptor-ligand. Tabulka převzata z publikace [47].

3.4 Cílové molekuly CAR-T buněčné terapie

Jedním z nejdůležitějších faktorů pro úspěšnou terapii CAR-T lymfocyty je výběr cílového antigenu. Vhodná cílová molekula by měla být rovnoměrně exprimována pouze na povrchu nádorových buněk, a nikoliv na zdravých buňkách. V ideálním případě jde proteiny exprimované mutovanými geny nádorových buněk. Dalším vhodným antigenem je ten, který je sdílen s neesenciální tkání, jako je např. CD19, oblíbený antigen v cílení na B-buněčné malignity (viz kapitola 3.9.1.2). Vhodnými targety mohou být i proteiny se změnou post-translační modifikací (glykosylace) či dokonce lipidy.

Nádorově specifické antigeny (TSAs, Tumor Specific Antigens)

Antigeny jsou exprimovány výhradně na maligních buňkách. Buď jde o změněné proteiny v důsledku mutací, které jsou prezentovány na povrchu prostřednictvím MHC molekul, jako je IDH1 R132H prezentovaný gliomovými buňkami na HLA-A2 [49]. Patří sem i antigeny se specifickou glykolizací, jako je membránový mucin TnMUC1 u adenokarcinomu, proti kterému byly zkonstruované CAR-T buňky [50], rovněž tak povrchové proteiny s nádorově specifickými mutacemi, jako je EGFRvIII [51], či špatně složené proteiny, příkladem opět nesprávně složený EGFR [52].

Antigeny asociované s nádorem (TAAs, Tumor Associated Antigens)

Jde o antigeny, které jsou exprimované jak v nádorových, tak i v zdravých buňkách. Hladina exprese je však v nádorových buňkách zvýšena. Příkladem takového antigenu je receptor pro epidermální růstový faktor 2 (HER2). Normální tkáň mají nízkou hladinu HER2, naopak zvýšenou expresi HER2 vykazuje 20% nádorů prsu, ale i některé nádory vaječníku a žaludku

[53]. Na rozdíl od TSA, cílení na TAA je častěji doprovázeno nežádoucími účinky, kdy dochází k napadení a poškození zdravé tkáně CAR-T lymfocyty (viz kapitola 3.7.4).

Nádorové zárodečné antigeny (CGAs, Cancer Germline Antigens)

U zdravých jedinců jsou tyto antigeny exprimovány pouze v zárodečných tkáních, u dospělých je exprese většinou omezena pouze na varlata nebo vaječníky. Jsou tedy ideálním cílem genové imunoterapie kvůli omezenému výskytu v somatických tkáních. Příkladem takového antigenu je α -2 podjednotka receptoru pro interleukin 13 (IL-13R α 2), který je overexprimován v řadě nádorů, jako jsou nádory pankreatu, vaječníků, melanomy a maligní gliomy.

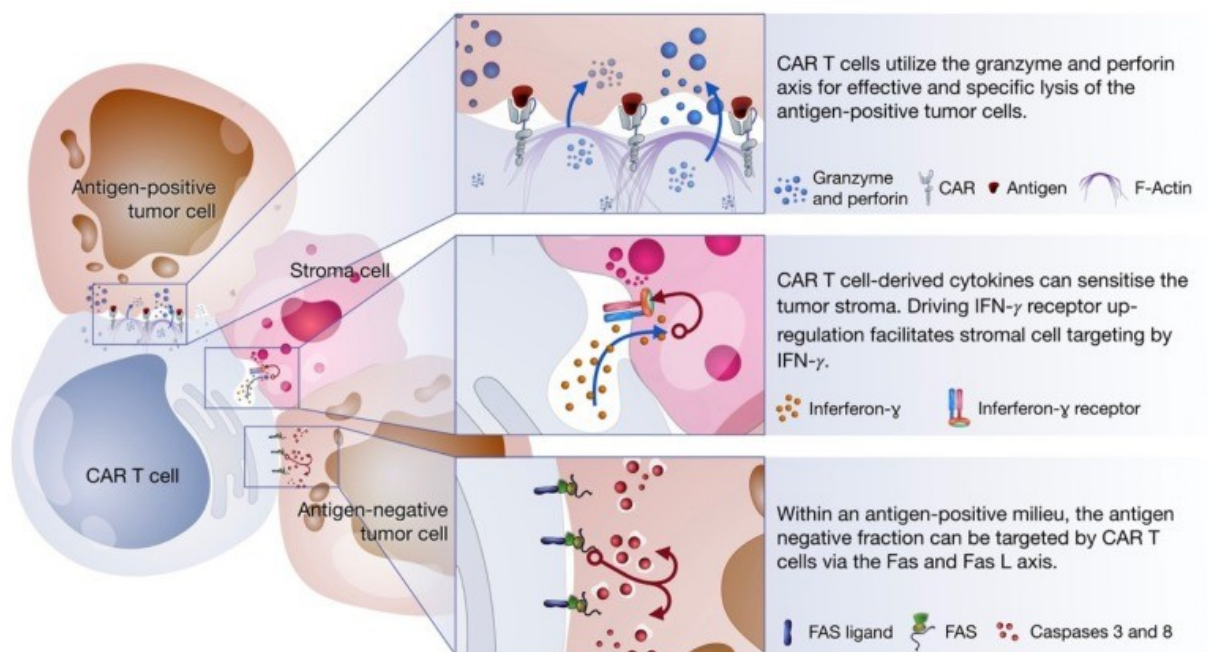
CD19, CD20, CD22	B-buněčné malignity	Lewis Y	Akutní myeloidní leukémie
CAIX	Nádory ledvin	CD30	CD30+ lymfomy
PSCA	Rakovina pankreatu, žaludku, prostaty	CEA	Rakovina prsu, vaječníku, žaludku, pankreatu
HER2	Rakovina prsu	ErbB	Různé solidní nádory
EGFRvIII	Glioblastom	FR α	Rakovina vaječníku
GD2	Neuroblastom	IL13R α 2	Glioblastom
PSMA	Rakovina prostaty	MUC16	Rakovina vaječníku
Mesothelin	Pleurální mezoteliom	CD171	Retinoblastom, neuroblastom

Tab. 2: Přehled antigenů, proti kterým byly připraveny CAR-T lymfocyty s různým úspěchem, účinností a bezpečností. Většina markerů je exprimovaná i zdravými buňkami. Data převzata z publikací [54, 55] a upravena.

3.5 Mechanismus působení CAR-T buněk

Na rozdíl od konvenčních efektorových T-lymfocytů, CAR-T buňky rozeznají nádorovou buňku nezávisle na hlavním histokompatibilním komplexu molekul MHC. Tím jsou rozpoznány i buňky se sníženou expresí MHC. Jakým přesným mechanismem jsou pak nádorové buňky zabity, není stále objasněno. Předpokládá se, že CAR receptory obsahující transmembránovou doménu CD3 ζ mohou tvořit komplex s endogenním TCR, který by pak mohl řídit optimální aktivaci CAR-T buněk [25]. Uvažuje se tedy, že dimerizací nebo multimerizací receptorů, ke kterým dojde po vazbě antigenu, se spojí cytoplazmatické signální domény, ke kterým se pak připojují kinázy, jako je např. Lck [56]. Následná forforylace tyrosinů v motivech ITAM dovolí připojení adaptorových proteinů, jako je ZAP-70. Tím dojde ke stimulaci aktivačních drah [29]. Po navázání antigenu na CAR receptor se vytvoří imunologická synapse (IS). Vznik tohoto stabilního spojení je důležitým předpokladem pro indukci smrti nádorových buněk. V práci Davenporta *et al.* [57] bylo ukázáno, že časový interval mezi vytvořením IS a jejím uvolněním po lýze je kratší u CAR-T

buněk ve srovnání s TCR T-lymfocyty. Čili signalizace iniciovaná CAR-T buňkami je kratší, přesto síla signálu je u nich silnější. V této práci byly popsány i odlišnosti v samotné struktuře IS oproti konvenčním lymfocytům. Po aktivaci T-buněk zprostředkované CAR receptorem a vytvoření IS dochází k uvolňování cytotoxických molekul (jako jsou perforiny nebo granzymy), k expresi proapoptických ligandů, jako je ligand FasL a TRAIL¹, nebo k sekreci prozánětlivých cytokinů (IL-2, INF- γ nebo TNF- α). V důsledku toho jsou nádorové buňky eliminovány přímo CAR-T lymfocyty nebo dalšími imunitními buňkami, které jsou do okolí nádoru atrahovány působením CAR-T buněk (**Obr. 5**) [10, 58].



Obr. 5: CAR-T lymfocyty zabíjí nádorové buňky třemi hlavními mechanismy

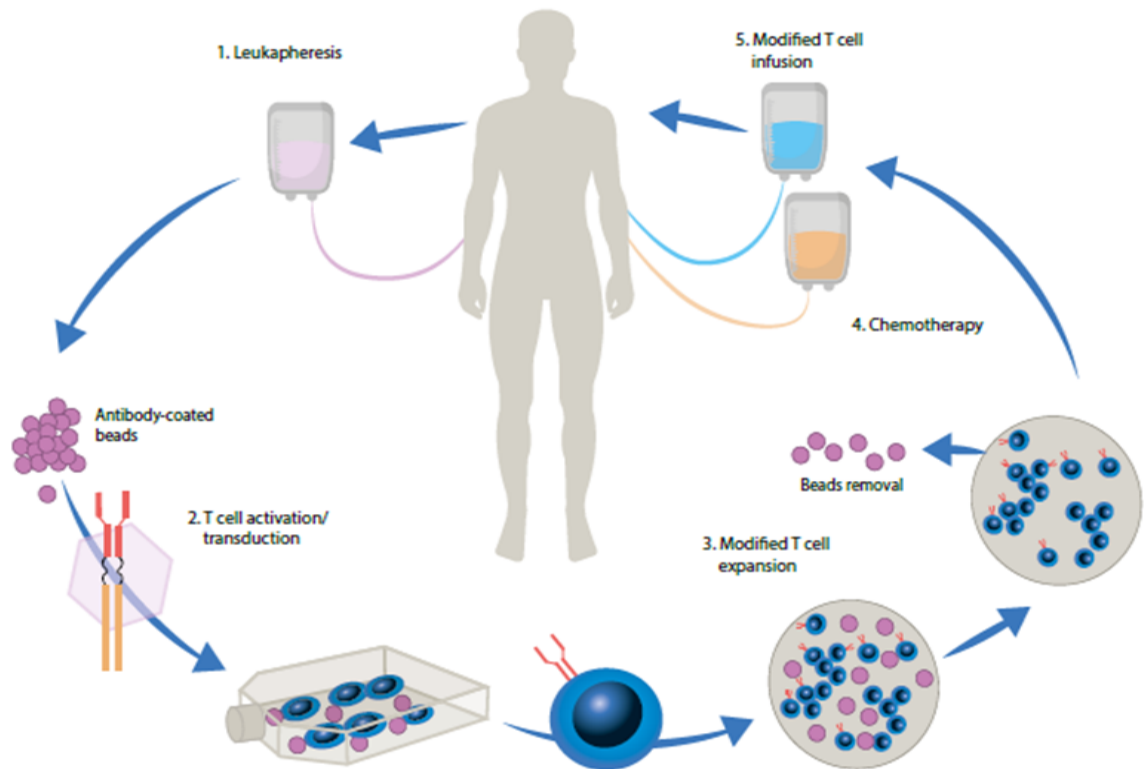
- (1) Uvolněný perforin a granzym způsobí lýzi cílových buněk pozitivních na antigen.
- (2) Cytokiny sekretované CAR-T buňkami aktivují další buňky imunitního systému.
- (3) Pomocí dráhy Fas-FasL jsou zasaženy nádorové buňky negativní na antigen.

Obrázek převzat z publikace [58].

¹ TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand)

3.6 Výroba CAR-T lymfocytů

Samotná příprava CAR-T buněk v laboratoři tak i jejich výroba pro klinické podání pacientovi je prakticky totožná. Při výrobě buněčných produktů CAR-T pro klinické využití je ovšem kladen vysoký důraz na vysokou kvalitu a reprodukovatelnost každého výrobního kroku. Současné protokoly se řídí pokyny správné výrobní praxe (GMP) pro testování bezpečnosti, čistoty, sterility a účinnosti [59, 60].



Obr. 6: Výroba autologních CAR-T lymfocytů

Zahrnuje následující kroky: Odběr krve pacienta; izolace T-lymfocytů z periferní krve procesem leukaferézy; transdukce buněk vektorem obsahující gen kódující CAR receptor; expanze CAR-T buněk *in vitro*; podání CAR-T buněk pacientovi. Obrázek převzat z internetového zdroje (1).

3.6.1 Zdroj T-lymfocytů

V drtivé většině případů jde o buněčnou terapii, která je založená na autologních buňkách. Pacientovi jsou pomocí leukaferézy z periferní krve odebrány mononukleární buňky. V rámci daného léčebného režimu se pokud možno vybere vhodné časové okno, aby byla zajištěna přítomnost dostatečného počtu T-lymfocytů. Produkt aferézy je následně zpracován tak, aby z něj byly odstraněny případné krevní kontaminanty, tj. červené krvinky a destičky. Většinou se využívají různé komerční systémy založené na frakcionaci podle velikosti buněk, kdy dojde zároveň i k depleci monocytů (systémy Elutra, Sepax II) [61]. Systémy typu CliniMacs

Prodigy umožňují i obohacení produktu o konkrétní podskupiny T-buněk (CD4+, CD8+, CD45RA+ nebo CD62L+) na základě selekce pomocí magnetických kuliček s navázanými specifickými protilátkami [62].

3.6.2 Aktivace T-buněk

Pro *ex vivo* expanzi T-buněk je zapotřebí specifického signálu prostřednictvím TCR receptoru a dalších kostimulačních signálů přes molekuly CD28, 4-1BB nebo Ox40. Aktivace T-buněk je rovněž potřebná pro transdukcii CAR cDNA prostřednictvím retrovirových vektorů.

Aktivace pomocí magnetických kuliček s navázanou protilátkou

Příkladem jsou superparamagnetické kuličky Dynabeads s kovalentně vázanými protilátkami anti-CD3 a anti-CD28. Výhodou použití těchto kuliček je selekce pomocí magnetu a zároveň aktivace T-buněk v jednom kroku. Obdobně fungují i kuličky firmy Miltenyi konjugované s biotinylovanou protilátkou CD3, CD28 a monoklonální protilátkou proti biotinu. Na konci výrobního procesu je nutné magnetické kuličky z produktu odstranit [63].

Nanočástice potažené protilátkou

Příkladem je produkt TansAct CD3/28 firmy Miltenyi. Jde o polymerní nanomatrix konjugovaný s monoklonální protilátkou anti-CD3 a anti-CD28. Výhodou použití těchto kuliček je, že jsou biologicky odbouratelné a proto nevyžadují odstranění na konci výrobního postupu [63].

Aktivace pomocí expamerů

Expamery jsou polymerní rozpustné proteinové komplexy, na které jsou navázané fragmenty Fab nízkoafinitních monovalentních protilátek anti-CD3 a anti-CD28. Díky solubilitě mohou pokrýt celý povrch buňky. Tyto komplexy pak dodávají aktivační signál multivalentní vazbou na molekuly TCR a CD28 [64].

Solubilní protilátky

Solubilní protilátka anti-CD3 v přítomnosti IL-2 stimuluje T-lymfocyty navázáním po celém povrchu buněk. Používá se klon protilátky OKT3 [65].

3.6.3 Genové modifikace T-lymfocytů CAR receptory

Terapeutické využití CAR-T buněk závisí na účinném, stabilním a bezpečném vnesení transgenů do buněk. Cílem genových manipulací je dosažení vysoké exprese receptorů bez nežádoucích toxických a onkogenních zásahů do buněk. V současné klinické praxi jsou pro přenos využívány virové a nevirové metody.

3.6.3.1 Virové vektory

Retroviry jsou dnes nejčastěji používané vektory v genové terapii. Jejich hlavní výhodou je schopnost stabilně integrovat genetický materiál do hostitelského genomu.

Gama retrovirové vektory

Vůbec první genová terapie, která se dostala do klinické zkoušky, byla založena na přenosu genů právě pomocí γ -retrovirů. V ní byl využit modifikovaný virus způsobující leukémii u myši (MLV, murine leukemia virus) k přenosu genu pro podjednotku cytokinového receptoru γ_c do T a NK buněk, které pak byly podány 11 dětem s těžkou kombinovanou imunodeficiencí vázanou na chromozóm X (SCID-X1) [66]. Zatímco SCID byla u těchto malých pacientů úspěšně „opravena“, u významného počtu dětí se časem vyvinula leukemie, kterou vyvolala inserční mutace způsobena virovou transdukcí v hematopoetických progenitorech. Výsledky, které byly na jednu stranu velmi povzbudivé, na straně druhé poukázaly na potřebu rozvíjet vektory s výrazně nižším onkogenním potenciálem.

Vektory jsou založeny na vložení transgenů místo kódujících sekvencí gama retroviru. Pro úspěšné zabalení transgenů do virových částic je ještě nutná exprese virových genů *gag*, *pol* a *enc*, které kódují kapsidové proteiny, replikační enzymy a obalové glykoproteiny. Tyto geny jsou transkribovány *trans* z pomocných vektorů. Oddělením kódujících sekvencí a regulačních sekvencí do 2 molekul DNA omezuje remobilizaci způsobené retroviry, čímž se zvyšuje bezpečnost [67, 68]. Celogenomové analýzy ukázaly, že gama retroviry se přednostně integrují do místa startu transkripce a CpG ostrovů [69]. Tato preference zvyšuje onkogenní transformaci buněk. Buněčnou expresi pak může ovlivnit samotný silný virový promotor či zkrácení genových transkriptů. Problémem může být i virový enhancer působící na aktivaci promotoru protoonkogenu. Tato aktivace je nezávislá na orientaci vložení a může být ovlivněna do vzdálenosti až několika kilobází [70]. Výše popsané typy inserční mutageny byly pozorovány zejména v genové terapii hematopoetických kmenových buněk. Zralé T-lymfocyty jsou vůči onkogenní transformaci odolnější díky proapoptickým a epigenetickým mechanismům, které brání klonálnímu růstu.

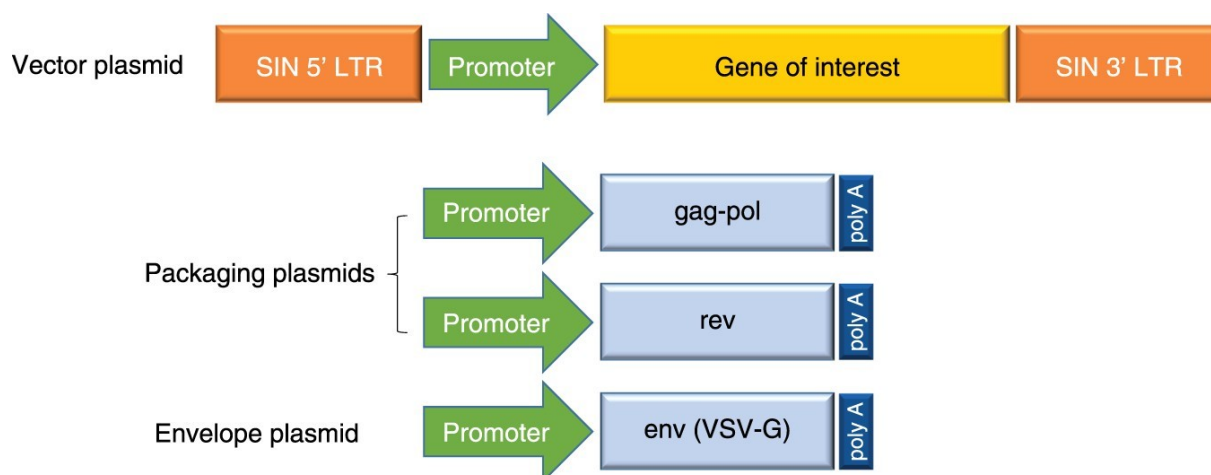
Dnes se γ -retrovirové vektory využívají zhruba v pětina všech klinických studií založených na přenosu genů. Gama retroviróvé vektory byly prvními virovými vektory použitými k přípravě CD19 CAR-T lymfocytů se stabilní expresí chimerického receptoru [71].

Lentivirové vektory

Vektory založené na lentiviru jsou strukturně podobné γ -retrovirovým. Základní virové sekvence jsou opět nahrazeny transgenem pro CAR receptor. Kromě *gag*, *pol* a *env* je navíc zapotřebí transkripce genu *rev* z trans-elementů. Protein Rev vazbou na jím rozpoznávané elementy RRE (rev responsive element) zvyšuje jaderný export transkriptů *gag-pol*. Pro jaderný import jsou zase důležité *cis* sekvence označované jako cPPT-CTS. Po infekci buňky tyto sekvence usnadňují transport preintegračního komplexu do jádra. Dále do lentivirových vektorů první generace byly vloženy geny pro obalové proteiny z jiných virů, nejčastěji VSV-G, který rozpoznává receptor pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL receptor). Na rozdíl od γ -retrovirů proto není lentivirová transdukce závislá na buněčném dělení a pomocí lentivirů lze efektivně transdukovat široké spektrum buněk včetně terminálně diferenciovaných [72, 73].

Nejběžněji používané jsou lentivirové vektory založené na viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV). Odstranění esenciálních virových genů z *cis*-regulačních sekvencí snížily možnost rekombinace a následné remobilizace virových částic. Riziko se ještě více snížilo u 3. generace lentivirových vektorů, kde byl virový genom rozdělen na samostatné plazmidy (viz **obr. 7**). Geny *gag* a *pol* jsou kódované na odlišném plazmidu než geny *rev* nebo *env*. Vektor je tak složený ze tří samostatných plazmidů obsahující nezbytné virové sekvence pro zabalení. Gen *tat* byl navíc nahrazen konstitutivně aktivním promotorem [74]. Nově pak byly do koncových sekvencí LTR (long terminal repeats) vneseny delece za účelem vytvoření samoinaktivujících (SIN) lentivirových vektorů, což narušilo aktivitu promotoru/zesilovače LTR, a tím se opět zvýšila bezpečnost [75]. I tak americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv FDA (Food and Drug Administration) vyžaduje, aby všechny terapeutické produkty byly důkladně otestovány na nepřítomnost replikačně kompetentního retroviru (RCR)², čímž se bezpečnost buněčných produktů ještě zvyšuje.

² požadavky viz internetový zdroj (5)



Obr. 7: Lentivirový vektor třetí generace

Je tvořen dvěma samostatnými plazmidy pro pakážování, jeden kóduje geny *gag* a *pol* a druhý kóduje *rev*. Další plazmid kóduje obalový protein odvozený od VSV-G. Plazmid kódující transgen obsahuje lentivirové sekvenční LTR, které byly změněny na samoinaktivující (SIN), čímž je zabráněno rekombinaci. Zkratky: *LTR*, long terminal repeat; *VSV*, virus vezikulární stomatidy. Obrázek převzat z publikace [75].

Nejnovějším přístupem jsou hybridní lentivirové vektory, které jsou odvozeny od nehumánních lentivirů (opičí, hovězí, kočkovití aj.). Jsou považované za bezpečnější alternativu, protože jejich rodičovské viry jsou u lidí apatogenní, avšak při optimalizaci protokolu mohou velmi účinně lidské buňky transdukovat [76].

Je nutné poznamenat, že většina T-buněk, které cirkulují v periferní krvi, se nachází v G_0 fázi buněčného cyklu a proto jsou odolné vůči lentivirové transdukcii. Pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 jsou nejprve stimulovány k přechodu do fáze G_1 , aby mohly být následně transdukovány [77].

Genová terapie pomocí lentivirových vektorů se ukázala jako slibná terapeutická volba pro řadu onemocnění. První lentivirově transdukováná buněčná terapie, tisagenlecleucel (CTL019, Kymriah), byla schválena ve Spojených státech v srpnu 2017 pro léčbu pediatrických a dospívajících pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) [78]. Několik dalších buněčných terapií založených na buňkách modifikovaných pomocí lentivirového vektoru je v pokročilé fázi vývoje. Zejména lentivirové vektory SIN třetí generace prokázaly bezpečnost při použití k přenosu genů do kmenových buněk i do T-buněk. Ačkoli existuje teoreticky potenciál pro inzerční onkogenezi způsobené lentivirovými vektory, žádné takové případy nebyly zaznamenány [75]. Nicméně je zapotřebí dlouhodobě sledovat pacienty, kteří genovou terapii podstoupili, aby se bezpečnost těchto vektorů potvrdila.

3.6.3.2 Genové modifikace založené na nevirových vektorech

Výše popsané systémy genetických modifikací pomocí virových vektorů mají mnoho výhod, včetně vysoké účinnosti a stability přenosů genů. Nicméně jde o poměrně složitý biologický komplex, který vyžaduje nákladné testování biologické bezpečnosti. Z tohoto důvodu je věnován klinický výzkum vývoji alternativních vektorových systémů nezávislých na virových vektorech.

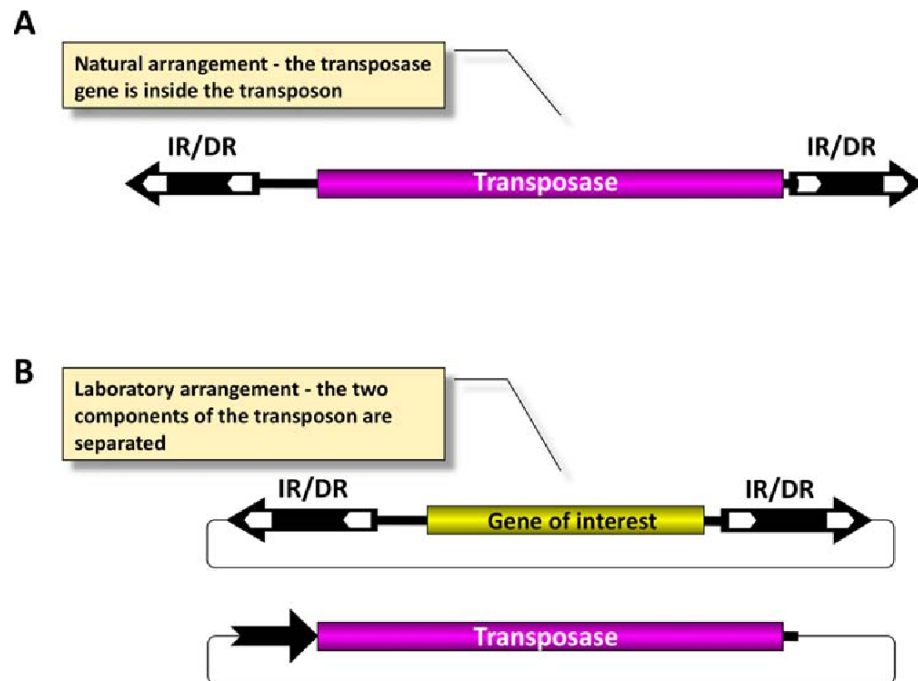
Transpozony

DNA transpozony čili transpozibilní elementy (TE) jsou semiparazitické sekvence DNA, které jsou schopné měnit svou pozici v genomu. Transpozon obsahuje gen pro transpozázu, který je ohraničený invertovanými repeticemi (TIRs, terminal inverted repeats) s vazebným místem pro transpozázu. Transpozáza se naváže na sekvence TIR, štěpí transpozon a vloží je na místo jiné (transpozice) mechanismem „cut and paste“ [79].

Systém Sleeping Beauty (SB)

TE elementy jsou opakující se sekvence, které jsou součástí téměř všech genomů. Jen lidský genom je přibližně z 50% tvořen elementy TE. Drtivá většina TE v průběhu evoluce v sobě nahromadila mutace, které je inaktivovaly. Moderní genové inženýrství dokáže tyto nahromaděné mutace odstranit. Příkladem je první syntetický DNA transpozon pojmenovaný Sleeping Beauty (SB), který byl „probuzen“ z genomu lososovitých ryb (losos obecný a pstruh duhový) [80]. SB představuje první DNA založenou na TE elementech, která je plně aktivní u obratlovců, a zároveň genetický materiál, pro nějž se přirozeně nevyskytuje aktivní kopie anebo nebyla dosud izolována [80]. V současnosti je dostupná hyperaktivní verze SB (SB100x), která patří k neaktivnějším transpozonům u obratlovců [81].

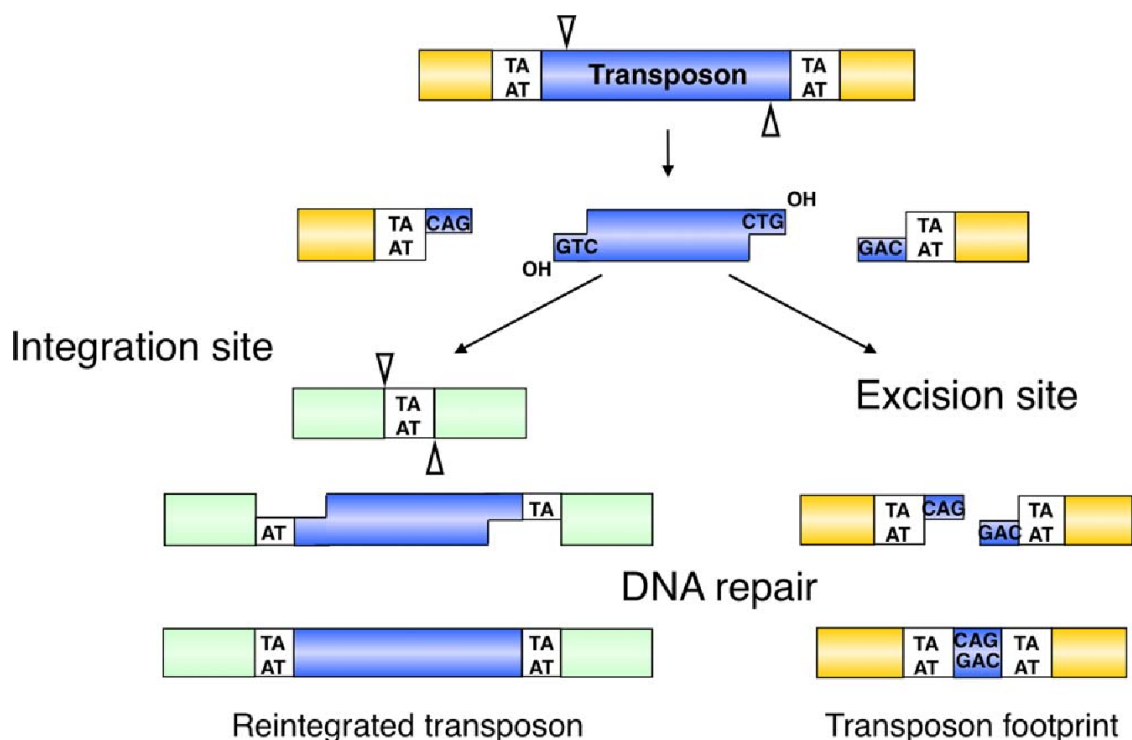
Systém SB se skládá ze dvou komponentů – transpozázy (SBase) a integrační kazety (transpozon). Na koncích transpozonu jsou invertované repetice (IR) o velikosti 210-250 bp a přímé sekvence DNA s opakovanými motivy (DR) na konci každé IR (označované pak jako IR/DR doména) - viz **Obr. 8**.



Obr. 8: Transpozonový systém Sleeping Beauty

- (A) Struktura přirozeného transpozonu. Gen transpozázy je ohraničen invertovanými repeticemi (IR) se sekvencemi s opakujícími se motivy (DR), které obsahují vazebná místa pro transpozázu (bílé šipky).
- (B) Vektorový systém pro integraci transgenů založený na SB. Původní gen transpozázy je nahrazen transgenem. Transpozáza je exprimována ze samostatného plazmidového vektoru. Obrázek převzat z publikace [82].

SB transpozice probíhá mechanismem „cut-and-paste“, během kterého je transponovatelný gen vystřižen transpozázou a integrován do cílového místa DNA. Zjednodušeně, dva monomery transpozázy se navážou na vazebná místa v IR elementech a vytvoří synaptický komplex, ve kterém jsou dva konce transponovatelného elementu spárovány a drženy pohromadě podjednotkami dimeru transpozázy. Ta provede excizi a následnou náhodnou reintegraci do místa s dinukleotidy TA [83, 84] – viz **Obr. 9**.



Obr. 9: Integrace transgenu pomocí transpozázy

Mechanismus „cut-and-paste“, kdy je transpozon vystřižen z jednoho místa a integrován do cílového místa obsahující dinukleotid TA. Po vložení se dinukleotid duplikuje. Jednořetězcové mezery v integračním místě i zlom v dsDNA jsou opraveny reparačním mechanismem hostitelské buňky. Pokud je místo vystřižení opraveno mechanismem nehomologním spojováním konců (NHEJ), vytvoří se tzv. stopa transpozonu. Obrázek převzat z publikace [85].

System PiggyBac (PB)

PiggyBac je TE element původně izolovaný z bakuloviru, kam přeskočil z kultury buněk odvozené od můry kovoletské cizokrajného (*Trichoplusia ni*) [86]. Element je 2.475 bp dlouhý, na konci ohraničený invertovanými repeticemi (TIRs) o velikosti 13 bp a asymetrickými invertovanými repeticemi (13 bp). Jediný otevřený čtecí rámec o velikosti 782 bp kóduje transpozázu [87]. PiggyBac je funkční i v jiných organismech včetně kvasinek, prvoků, rostlin a obratlovců. Cílovým místem inserce tohoto TE je místo s nukleotidy TTAA. System PB je alternativou pro přenos genů k systému SB. Oproti němu má PB větší kapacitu pro přenos genů o větších velikostech. PB transpozony oproti SB mají tendenci integrovat se blíže k místům začátkům transkripce [88].

Použitím transpozonů je stabilně modifikováno asi 10-30% transfekovaných buněk. Množství vstupní DNA ovlivňuje i počet integrovaných kopií na buňku. Transfekcí nízkou dávkou (15-50 ng na 1×10^5 buněk) se přeneše 1 molekula transgenu/genom u 1-10% transfekovaných

buněk. Transfekce s vysokou dávkou (> 500 ng DNA na 1×10^5 buněk) přenesu u systému PB 1-9 kopií transgenu/genom, ale u SB100x dosahuje až 40 integrací/buňku [89]. Výhodou použití transpozonů oproti retrovirovým vektorům je i možnost inserce genů o větší velikosti. Maximální kapacita retrovirových vektorů je asi 6 kb, zatímco SB i PB systémy zprostředkují stabilní transgenní přenos i větších molekul, a to až do velikosti 200 kb [90, 91].

ADVANTAGES	
VECTORS	
Retroviral/Lentiviral	Transposons
High Efficiency Transduction	High level of expression
High Transgene Expression	Stable genomic integration
High Reproducibility	Less immunogenic compared to viral vectors
Well characterized systems	Facilitates implementation of clinical trial
Flexibility of pseudotyping env genes of choice to maximize transduction efficiency	Plasmid DNA is not cost prohibitive and not hazardous to produce
	Nucleofection of whole resting PBMC and subsequent T cells expansion

DISADVANTAGES	
VECTORS	
Retroviral/Lentiviral	Transposons
Tedious work for production, Potentially dangerous	Low to mid/variable transfection efficiency
High cost of production	Possibility of transposase integration
Requirement for packaging cell lines	
Possible oncogene activation	
Pre-activation of lymphocytes	

Tab. 3: Srovnání systémů pro přenos genů pomocí virů a transpozonů. Tabulka převzata z publikace [92].

3.6.3.3 Elektroporace mRNA

Jde o bezpečnější alternativu k předchozím přístupům. Výhodou elektroporace mRNA je to, že není potřeba, aby vstoupila do jádra, jako je tomu u plazmidových DNA. Je možno tak transfekovat buňky klidové nebo buňky, které se pomalu množí. Vzhledem k tomu, že nedochází ke genomové integraci, nehrozí inzerční mutageneze. Na druhou stranu přenos mRNA je nestabilní s relativně krátkou životností, čili kódovaný protein má jen přechodnou expresi. To ovšem může být zase výhodou u některých terapií CAR-T buňkami, které jsou doprovázeny nežádoucími účinky kvůli zkřížené reaktivitě CAR-T buněk a zdravých tkání [93, 94].

3.6.4 Expanze CAR-T buněk

Pro terapeutické dávky CAR-T lymfocytů existuje několik platforem pro jejich expanzi.

Bioreaktor WAVE

Jde o vak umístěný na třepače s houpací základnou. K vaku jsou připojeny sondy a čerpadla pro udržení nafouknutí vaku a přenos plynů, k přidávání čerstvého média a odstranění odpadního média, a k udržení stálé teploty [95].

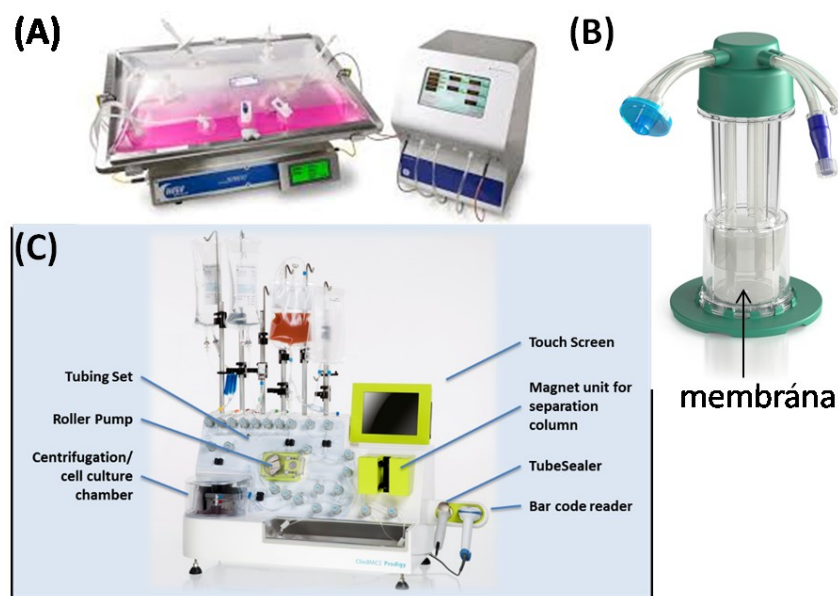
G-Rex

Jde o kultivační nádobu s membránou propustnou pro plyny, která je umístěna na dně nádoby. Tato platforma umožňuje růst buněk o vysoké koncentraci, aniž by byla ohrožena dodávka plynů. Výhodou je pěstování buněk v inkubátoru a přesně stanovený režim výměny média [96].

Systém PRODIGY

Jde o automatický uzavřený systém, který v sobě kombinuje selekci T-buněk na základě magnetické separace, aktivaci buněk, virovou transdukcí a expanzi buněk. Příprava buněk je reprodukovatelná a velmi standardizovaná [97].

Po expanzi jsou buňky kryoprezervovány, než se podají pacientovi.



Obr. 10: Ukázka výrobních systémů pro expanzi CAR-T lymfocytů pro klinické účely

(A) Bioreaktor WAVE. Převzato z internetového zdroje (2).

(B) G-Rex. Převzato z internetového zdroje (3).

(C) PRODIGY. Převzato z internetového zdroje (4).

3.6.5 Kontrola výroby CAR-T buněk pro klinické účely

Jak už bylo zmíněno, veškeré kroky výroby podléhají protokolům správné výrobní praxe a výsledný produkt před podáním pacientovi je testován na řadu parametrů. V následující tabulce jsou uvedeny příklady testů.

Parameter	Release testing for CAR-T introduced by retroviral and lentiviral vector	Release testing for CAR-T introduced by transposon/transposase	Release testing for CAR-T introduced by mRNA electroporation
Safety	<ul style="list-style-type: none"> • Gram stain/sterility • Mycoplasma • Endotoxin level • Copies of transgene insertion • RCR/RCL 	<ul style="list-style-type: none"> • Gram stain/sterility • Mycoplasma • Endotoxin level 	<ul style="list-style-type: none"> • Gram stain/sterility • Mycoplasma • Endotoxin level
Purity	<ul style="list-style-type: none"> • % CD3+ T cells • % CAR-T cells • Residual tumor burden • Residual beads 	<ul style="list-style-type: none"> • % CD3+ T cells • % CAR-T cells • Residual AAPCs 	<ul style="list-style-type: none"> • % CD3+ T cells
Identity	<ul style="list-style-type: none"> • % CAR-T cells 		
Potency	<i>In vitro</i> CTL or IFN- γ secretion		
Reference	25	22	47

AAPC, artificial antigen-presenting cells; CAR, chimeric antigen receptor; CTL, cytotoxic T lymphocyte; IFN, interferon; RCL, replication-competent lentivirus; RCR, replication-competent retrovirus.

Tab. 4: Příklady testů nutných pro uvolnění CAR-T produktů, které byly připraveny různými genetickými modifikacemi. Tabulka převzata z publikace [63].

3.7 Vedlejší účinky terapie CAR-T buňkami

Léčbu pomocí CAR-T lymfocytů můžou doprovázet i vedlejší účinky s různým stupněm závažnosti. Na rozdíl třeba o cytotoxicity spojené s chemoterapií, která je často nespecifická a může způsobit trvalé multiorgánové poškození, cytotoxicita způsobená expanzí CAR-T buněk a jejich protinádorovou aktivitou je často reverzibilní, pokud dojde k vyčerpání lymfocytů nebo k jejich eradikaci.

3.7.1 Syndrom cytokinové bouře (CRS, Cytokine Release Syndrome)

Jde o nejčastější cytotoxicitu spojenou s podáním CAR-T buněk. U většiny pacientů jsou příznaky mírné, jen někteří mají závažný průběh. Prvním příznakem CRS je obvykle horečka. Může se objevit už několik hodin po infuzi buněk, ale i po více než týdnu. Teplota může přesáhnout 40°C a bývá často doprovázená ztuhlostí, malátností, bolestmi hlavy, artralgií a myalgií. CRS může rychle přejít až do stavu ohrožení života spojeného s tachykardií, hypotenzí a hypoxií [98]. S vysokým rizikem závažného průběhu CRS jsou lidé s velkou nádorovou náloží, s komorbiditami a ti, u nichž se CRS vyvine do tří dnů po infuzi.

CRS je systémová zánětlivá odpověď organismu. Po podání pacientovi CAR-T buňky specificky rozpoznají a eliminují nádorové buňky s cílovým antigenem. Takto aktivované CAR-T buňky začnou proliferovat a uvolňovat řadu prozánětlivých cytokinů, které následně aktivují další buňky imunitního systému [98, 99]. Pacienti mají zvýšené laboratorní markery zánětu jako je C-reaktivní protein a feritin. Rovněž u většiny z nich je měřitelná zvýšená hladina cytokinů, ale stupeň jejich zvýšení nemusí korelovat se závažností CRS nebo odpovědí na léčbu. Zvýšená je hladina efektorových cytokinů, jako jsou INF- γ nebo solubilní IL-2, stejně tak cytokinů, které jsou spojovány s aktivací makrofágů, jako jsou IL-6 a IL-10 [98, 100].

K potlačení CRS se volí kortikosteroidy, které jsou díky své účinnosti používány u komplikací způsobených aktivovanými T-lymfocyty, jako jsou reakce štěpu proti hostiteli a různé zánětlivé procesy [101]. Podání kortikosteroidů může mít ale negativní dopad na proliferaci terapeutických lymfocytů. Nicméně v práci Porter *et al.* byl popsán případ, kdy pacient krátce po infuzi CAR-T buněk dostal kortikosteroidy. I po 6-ti měsících u něj CAR-T buňky perzistovaly v krvi ve vysokém množství [102]. Rovněž i v dalších pracích bylo ukázáno, že v některých případech krátkodobé podání kortikosteroidů k léčbě život ohrožujícího CRS nemá vliv na proliferaci nebo účinnost CAR-T buněk [103, 104].

CRS lze zmírnit i přímým zásahem na hladiny cytokinů. Interleukin 6 (IL-6) je prozánětlivý cytokin, který se zapojuje v různých procesech, jak v rámci imunitního procesu, jako je reakce akutní fáze, angiogeneze, diferenciace B-buněk, produkce autoprotilátek. IL-6 je produkován monocyty/makrofágy, dendritickými buňkami, fibroblasty, keratinocyty, endotelovými buňkami, adipocyty, monocyty aj. V roce 2017 byl FDA schválen antagonist receptoru pro IL-6, tocilizumab. Protilátka rychle potlačuje CRS a stala se standardem v péči o pacienty s touto komplikací [105]. Mezi další terapeutické možnosti patří siltuximab, monoklonální anti-IL-6 protilátka, i když není dosud příliš k léčbě CRS používaná [106].

3.7.2 Neurotoxita

Druhou nežádoucí komplikací spojenou s podáním CAR-T buněk je neurologická toxicita. Objevuje se u velké části pacientů léčených CAR-T buňkami (u 67% pacientů s leukémií a 62% pacientů s lymfomem), a pro některé z nich má fatální následky. Dříve se neurotoxita označovala jako encefalopatie spojená s CAR-T buňkami, dnes jako neurotoxita asociovaná s imunitními efektorovými buňkami, tzv. ICANS (Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome). Syndrom ICANS se obvykle objevuje mezi prvním až třetím týdnem po infuzi CAR-T lymfocytů. Často doprovází CRS, ale byly zaznamenány případy,

kdy se vyskytl nezávisle na CRS. Mezi časné projevy syndromu ICANS patří expresní afázie, třes, letargie. Následně se mohou přidat záchvaty, otupělost až kóma. Mírné příznaky vymizí do jednoho týdne po zahájení léčby, ale závažný ICANS může vést až k intracerebrálnímu krvácení a mozkovému edému. Syndrom ICANS je běžný v rámci buněčné terapie pomocí CAR-T buněk cílených na antigen CD19. Naproti tomu nebyl dosud pozorován při léčbě solidních nádorů. Zdá se, že buňky CAR-T s kostimulační doménou CD28 představují vyšší riziko pro rozvoj ICANS [107]. Většina léčebných center podává profylakticky léky proti záchvatům, jako je levetiracetam, první den po infuzi s CAR-T buněk.

Co vyvolává neurotoxicitu, není známo. Neurotoxicita se velmi často objevovala u lidí, kterým byly podány CD19 CAR-T buňky. Zpočátku proto existovaly určité obavy, že by se CD19 mohl exprimovat v centrálním nervovém systému. Jenže neurotoxicita se objevovala i u pacientů s léčbou CD22 a BCMA CAR-T lymfocyty. Navíc klinické studie ukázaly, že syndrom ICANS nekoreluje s infiltrací CAR-T buněk do centrálního nervového systému. Dnes se více přiklání k tomu, že roli při rozvoji neurotoxicity po podání CAR-T buněk hrají myeloidní buňky. Klinická data ukázala, že zvýšené hladiny cytokinů IL-1 a IL-6, které jsou produkovány myeloidními buňkami, korelují s rozvojem ICANS. Analýza mozkomíšního moku pacientů, kteří vyvinuli závažnou neurotoxicitu, prokázala 17x vyšší nárůst infiltrace myeloidních buněk CD14+ v porovnání s pacienty s nízkou neurotoxitou. O aktivaci makrofágů a mikroglíí svědčí i vysoké koncentrace MCP-1, IL-10, IL-6a a IL-8 nalezené u závažných případů ICANS [107-109].

Léčba pacientů se syndromem ICANS zahrnuje podpůrnou léčbu a podávání kortikosteroidů. Dexamethason nebo methylprednisolon jsou voleny k léčbě středně těžkých až těžkých ICANS. Paradoxně podání tocilizumabu může ICANS zhoršit. Jak ukázala studie ZUMA-1, u pacientů, kterým byly podávány CD19 CAR-T buňky a profylakticky tocilizumab, sice došlo ke snížení těžkých stavů CRS, ale zvýšil se výskyt ICANS. Tocilizumab totiž nemůže překonat hematoencefalickou bariéru. V periferní krvi blokuje receptor pro IL-6, a tím i paradoxně brání vychytávání cytokinu IL-6 z bariery [105, 110].

3.7.3 Syndrom nádorového rozpadu (TLS, Tumor lysis syndrome)

Jde o další běžnou toxicitu, zejména u CAR-T terapie hematologických malignit, se symptomy překrývajícími se s CRS. V důsledku rychlého rozpadu nádorové tkáně během terapie se uvolňují intracelulární látky vedoucí k řadě metabolických poruch, jako jsou hyperurikémie, hyperkalémie, hyperfosfatémie, hypokalcémie či metabolická acidóza. Tyto poruchy mohou vést k život ohrožující arytmii nebo akutnímu selhání ledvin [111, 112].

K léčbě se opět používají vysoké dávky kortikosteroidů a tocilizumab. Klinické příznaky může zmírnit podání CAR-T buněk s receptory modifikovanými pro jejich vypnutí (viz kapitola 3.8).

3.7.4 Toxicita způsobená poškozením zdravé tkáně

V anglické odborné literatuře označovaná jako „**On-Target, Off-Tumor Toxicity**“. Je způsobena napadením zdravé tkáně, která má nízkou expresi zacíleného antigenu. Do této skupiny se řadí i aplázie B-buněk s hypogamaglobulinemií způsobená CD19 CAR-T buňkami. Nejde o život ohrožující komplikaci, ale může způsobovat opakované infekční onemocnění. Stav lze zvládnout intravenózním podáním imunoglobulinů [113].

K napadení zdravé tkáně také může dojít v případě, kdy populace CAR-T buněk neočekávaně napadne jiný antigen, na který by měly cílit, nebo se aktivují nezávisle na specifitě k antigenu. V anglické odborné literatuře je označovaná jako „**Off-Target Toxicity**“.

3.7.5 Genotoxicita

Potenciální riziko onkogenní inzerční mutagenese můžou představovat integrace virových vektorů použitých k transdukci T-buněk. Bylo popsáno v kapitole 3.6.3.1.

3.7.6 Imunogenicita

Kromě výše popsaných toxicit existují i další, zmínila bych už jen imunogenicitu. Většina CAR-T receptorů je odvozena od myších protilátek. Ty mohou potencionálně vyvolávat alergické reakce až závažné anafylaxe [114].

3.8 Nové přístupy v konstrukci CAR receptorů pro překonání toxicity

Další strategií pro kontrolu cytotoxicity je začlenění molekulárních mechanismů do CAR receptorů s cílem „deaktivovat“ podle potřeby T-lymfocyty. K těmto mechanismům patří tzv. sebevražedné geny či spínače pro vypnutí.

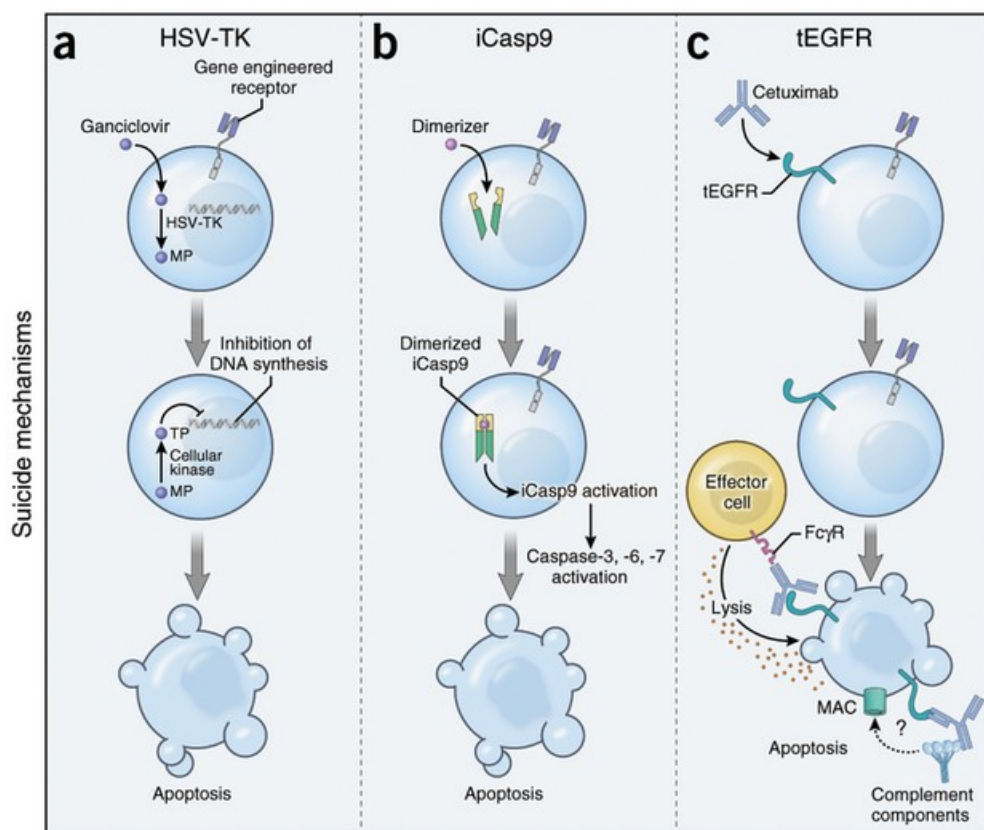
3.8.1 Využití sebevražedných genů

Nejvíce známým sebevražedným genem je gen pro tymidin kinázu viru herpes simplex (HSV-TK). Tymidin kináza fosforyluje ganciklovir (GCV), což je syntetický purinový analog. Po zabudování GCV-trifosfátu do DNA řetězce DNA polymerázou během replikace dojde k inhibici syntézy a následné buněčné smrti (**Obr. 11a**). Nejrozšířenější využití systému HSV-TK/ganciklovir je potlačení GVHD u pacientů po alogenní transplantaci, kterým byly podány lymfocyty modifikované tímto sebevražedným genem [115, 116]. Příkladem využití tohoto sebevražedného genu v CAR-T lymfocytech jsou připravené anti-CD44v6 CAR-T lymfocyty proti variantě antigenu CD44 izoformy 6 [117].

I když byla snaha zařadit HSV-TK i do CAR-T buněk, širší uplatnění v praxi se nenašlo. Důvodů je hned několik, je třeba zmínit ten, že proléčivo GCV je klíčovou farmakologickou látkou pro léčbu cytomegalovirové infekce a plného účinku, tj. k vyvolání apoptózy T-buněk, je dosaženo až po několika dnech, což je nepříjemné vzhledem k akutní toxicitě, která bezprostředně ohrožuje život [118]. Přístup byl nahrazen účinnějšími vypínači.

Kaspáza 9 jako indukovaný bezpečnostní spínač

Dalším sebevražedným systémem je fúzní gen modifikované lidské kaspázy 9 (iCasp9) a vazebného proteinu FK506 (FKBP). Poté, co se dostane malá sloučenina induktoru AP1903 do buněk exprimující tento fúzní protein a naváže se na FKBP, způsobí jeho dimerizaci a tím následnou aktivaci kaspázy (**Obr. 11b**) [119]. Farmakokinetika AP1903 byla sledována u dobrovolníků v placebem kontrolované studii s eskalovanou dávkou. Látka byla dobře snášena až do množství 1mg/kg, s plazmatickými hladinami přímo úměrnými podané látce. K rychlému snížení na 1% maximální plazmatické koncentrace se dosáhlo už za 10 hod [120]. V práci [121] bylo ukázáno, že už 20 nM koncentrace AP1903 po 24 h eliminuje 90% anti-CD20 CAR-T buněk exprimujících iCasp9. Po 72 hod už bylo mrtvých 98% buněk. Kromě toho, koncentrace 200 nM neměly vliv na růst netransdukovaných T-buněk.



Obr. 11: Mechanismy překonání cytotoxicity koexpresí sebevražedného genu v CAR-T buňkách

- (a) Tymidin kináza z viru herpes simplex fosforyluje netoxické léčivo GCV, které je pak inkorporováno do řetězce DNA během replikace. Buněčná smrt je způsobena zastavením replikace.
- (b) Molekula AP1903 způsobuje dimerizaci kaspázy 9 fúzované s vazebným proteinem pro tuto molekulu. Dojde k aktivaci vnitřní apoptické dráhy.
- (c) Koexprese CD20 nebo zkráceného receptoru pro epidermální růstový faktor (tEGFR) v CAR-T buňkách umožňuje jejich eliminaci prostřednictvím buněčné cytotoxicity závislé na komplementu/protilátce po podání monoklonální protilátky.
Obrázek převzat z publikace [122].

3.8.2 Zkrácené membránové receptory

T-buňky, které exprimují CAR receptor a zároveň molekulu CD20 nebo zkrácený receptor pro epidermální růstový faktor (tEGFR, truncated), lze účinně eradikovat monoklonálními protilátkami rituximabem nebo cetuximabem prostřednictvím buňkami zprostředkované cytotoxicity závislé na komplementu (CDC) nebo na protilátkách (ADCC) (**Obr. 11c**). Ke zmírnění cytotoxicity způsobené CAR-T buňkami se do řady preklinických a klinických zkoušek dostal především tEGFR. Ačkoliv bylo dosaženo významných účinků při kontrole toxicity, jeho další vývoj by mohla omezit biodistribuce terapeutické protilátky a jí způsobené poškození normální tkáně exprimující endogenní EGFR [123].

3.8.3 CAR receptory nové generace

Cílení na dva antigeny³

Jde o přístup, kdy lymfocyty exprimují dva samostatné CAR receptory specifické pro dva nádorové antigeny. Do těchto dvou receptorů jsou rozděleny i sekvence pro plný aktivační signál. Tím by se mělo zajistit, že zasaženy budou pouze nádorové buňky, nikoliv ty zdravé. V preklinických studiích byly zkoušeny duální CAR receptory, jejichž dvě extracelulární domény se vážou na dva různé antigeny a každá z nich je spojena se samotnou intracelulární aktivační doménou (**Obr. 12f**). U tohoto typu CAR receptoru ovšem panují obavy, zda by nemohlo dojít k částečné signalizaci prostřednictvím jednoho z receptorů [124].

Inhibiční CAR receptory (iCAR)

Jde opět o dva receptory specifické na dva antigeny, přičemž jeden antigen je exprimován výlučně normální tkání. Vazbou receptoru na tento antigen dojde k inhibici zprostředkované signálními doménami odvozených od molekul PD-1 a CTLA-4 [125]. Tím je zacíleno pouze na maligní tkáň (**Obr. 12e**).

CAR receptory aktivované přepínačem⁴

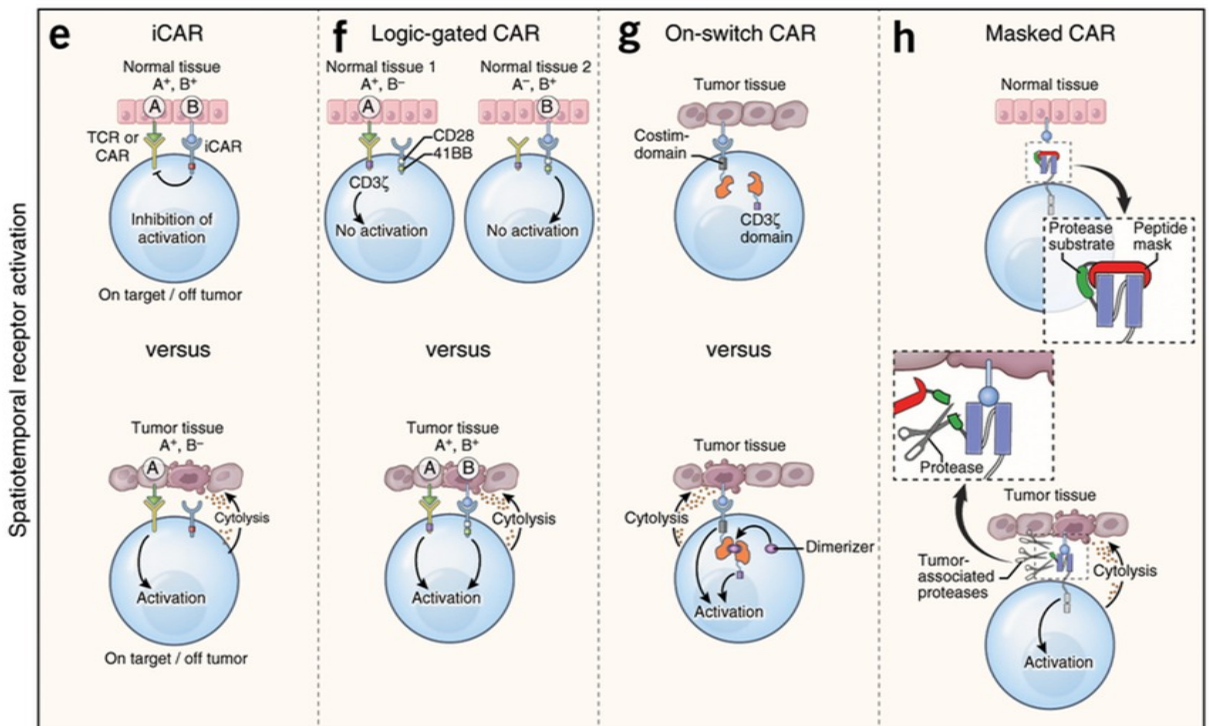
CAR receptor je tvořen opět vazebnou doménou specifickou pro určitý antigen, kostimulační doménou a částí tvořené elementem s motivem ITAM z podjednotky CD3ξ. Druhá část podjednotky CD3ξ se exprimuje samostatně. V aktivaci kromě rozpoznání antigenu hraje důležitou roli malá molekula, která po dimerizaci zprostředkuje sestavení úplné intracelulární domény (**Obr. 12g**). Čili zapnutí je závislé na molekule, kterou je možné přesně časově dávkovat reverzibilním způsobem. Tím se zmírňuje cytotoxicita, protože ani malá molekula či antigen by neměly CAR aktivovat samostatně [126, 127].

Maskované CAR receptory (mCAR)

Součástí těchto receptorů je peptid, který blokuje vazebné místo pro antigen, a linker citlivý na proteázu. Proteázy běžně aktivní v mikroprostředí nádoru štěpí linker, a tak uvolní peptid, což umožní CAR-T buňkám vazbu na antigen pouze v místě nádoru (**Obr. 12h**) [128].

³ v odborné anglické literatuře označovány jako logic-gated CAR nebo AND gate

⁴ v odborné anglické literatuře označovány jako on-switch CAR



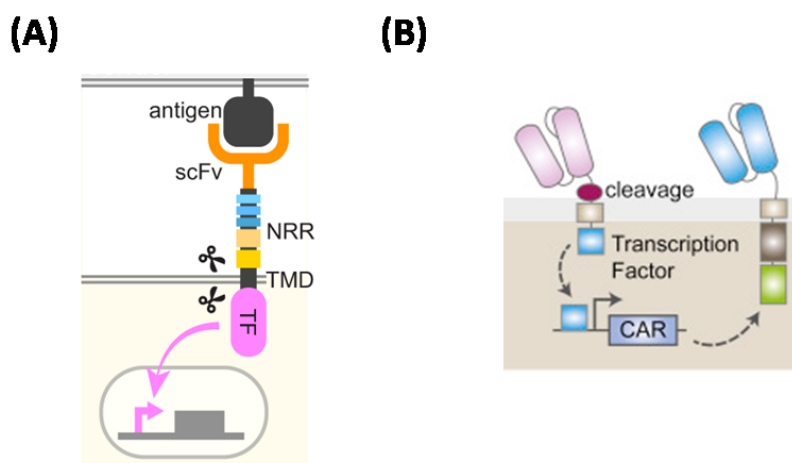
Obr. 12: CAR receptory nové generace s bezpečnostními mechanismy zajišťující tkáňovou specifitu

- (e) Inhibiční CAR receptory. Jeden receptor v intracelulární části nese signální domény koinhibičních receptorů. Po jeho vazbě na antigen specifický pro zdravé buňky dojde k inhibičnímu signálu.
 - (f) CAR receptory logicky řízené kotransdukci. Navázáním receptoru na první antigen dojde pouze k suboptimální aktivaci. Plné aktivace je dosaženo kostimulačním signálem po navázání druhého receptoru na jiný antigen.
 - (g) CAR receptory aktivované přepínačem. K aktivaci dojde po navázání antigenu a zároveň připojením aktivačních domén zprostředkované heterodimerní molekulou.
 - (h) Maskované CAR receptory. Vazebná doména je stericky blokována peptidem připojeným k receptoru linkerem. Po vstupu CAR-T buněk do tkání obohacených na proteázy dojde k štěpení linkeru a uvolnění vazebné domény.
- Obrázek převzat z publikace [122].

Syntetický Notch (synNotch)

Nedávno byl v laboratoři Wendelly Limy vyvinut nový duální receptor nazývaný syntetický Notch. Je tvořen doménou vázající první antigen, na niž je navázáno jádro odvozené od receptoru Notch. Jádro je tvořeno extracelulární regulační doménou následovanou transmembránovou doménou. Intracelulární část tvoří arteficiální transkripční faktor (**Obr. 13A**) [129, 130]. Po navázání antigenu dojde ke konformační změně v regulační doméně. Výsledkem je odhalení míst štěpení pro metaloproteinázu a sekretázu, které proteolyticky

odštěpí transkripční faktor. (např. TetR-VP64 nebo Gal4-VP64). Odštěpený transkripční faktor aktivuje expresi druhého CAR receptoru specifického na druhý antigen. Tento druhý CAR receptor nese všechny aktivační domény, proto tento systém funguje jen tehdy, jsou-li na buňce přítomny oba dva antigeny (**Obr. 13B**) [131]. V rámci použití tohoto systému je nutné ještě ověřit imunogenicitu transkripčních faktorů, které nejsou lidské.



Obr. 13: Syntetický Notch receptor

- (A) Struktura syntetického Notch receptoru. Jádru Notch je tvořeno regulační oblastí (NRR, Notch regulatory region) a transmembránovou doménou proteinu Notch (TMD, Transmembrane domain). Intracelulární část představuje arteficiální transkripční faktor. Obrázek převzat z publikace [131].
- (B) Po rozpoznání antigenu syn-Notch receptor indukuje transkripci druhého CAR receptoru. CAR-T buňky jsou plně aktivovány pouze tehdy, když dojde k rozpoznání obou dvou antigenů. Obrázek převzat z publikace [132].

3.8.4 mRNA

Bezpečnost CAR-T buněk mohou také zvýšit strategie, které řídí dobu aktivity vytvořeného receptoru. Tím může být už jednou zmiňovaná elektroporace mRNA, která časově omezuje expresi CAR receptorů. V případě toxicity způsobené CAR-T buňkami dojde k jejich eradikaci během několika dnů, když zhasne exprese receptoru [122].

3.9 Léčba CAR-T lymfocyty

Současný režim terapie je založen na obecném protokolu. T-lymfocyty jsou získány leukaferetickým odběrem z periferní krve pacienta. Buňky se aktivují pomocí protilátek nebo kuliček potažených protilátkou. Následuje přenos CAR receptoru pomocí retrovirové nebo lentivirové transdukce či elektroporací. Modifikované CAR-T buňky jsou *in vitro* pomnoženy na dostatečný počet. Před infuzí CAR-T přípravku pacient dostává lymfodepleční chemoterapii v závislosti na onemocnění, jde o různé dávky cyklofosfamidu, či kombinace fludarabin a cyklofosfamid, či režim založený na bendamustinu. Lymfodepleční chemoterapie zvyšuje perzistenci CAR-T buněk [133-135].

3.9.1 Hematologická nádorová onemocnění

Imunoterapie pomocí CAR-T buněk se používá zejména při léčbě lymfomů, leukémií, myelomu a dalších hematologických malignit a je považována za účinnou léčbu s kontrolovatelnou a tolerovatelnou toxicitou.

3.9.1.1 Schválené anti-CD19 CAR produkty

V roce 2017 FDA schválil dva produkty anti-CD19 CAR-T buněk pro léčbu hematologických onemocnění, Tisagenlecleucel a Axicabtagene ciloleucel.

Tisagenlecleucel (Kymriah, dříve CTL019, firma Novartis) byl povolen pro léčbu relabující/refrakterní (r/r) ALL u dětí a mladých dospělých do věku 25 let. V následujícím roce byl povolen i pro dospělé pacienty s relabujícím/refrakterním velkobuněčným B lymfomem (DLBCL) po dvou nebo více liniích terapie, včetně jinak neurčené/neklasifikované DLBCL, buněčného lymfomu vysokého stupně (high-grade) a DLBCL vznikajícího z folikulárního lymfomu. Tisagenlecleucel jsou autologní buňky modifikované *ex vivo* pomocí lentivirových vektorů s kostimulační molekulou 4-1BB v CAR receptoru. Evropská agentura pro léčivé přípravky (EMA) schválila Tisagenlecleucel v roce 2018 [78, 136].

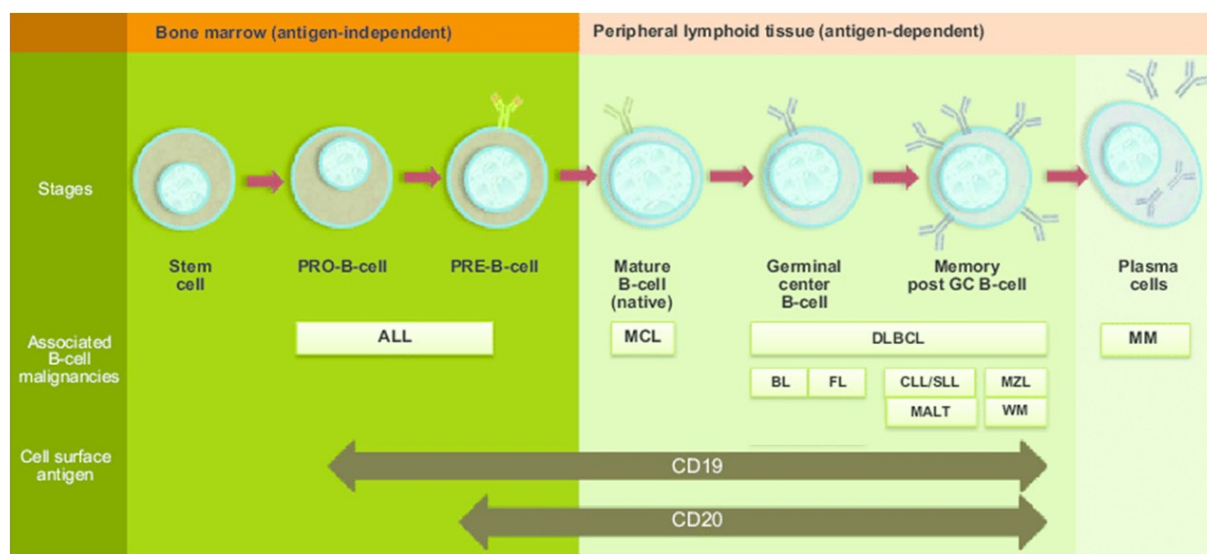
Axicabtagene ciloleucel (Yescarta, dříve KTE-C19, firma Gilead) je schválen pro léčbu dospělých pacientů s r/r DLBCL po dvou nebo více liniích terapie, včetně mediastinálního DLBCL, buněčného lymfomu vysokého stupně (high-grade) a DLBCL vznikajícího z folikulárního lymfomu. Axicabtagene ciloleucel jsou autologní buňky modifikované *ex vivo* pomocí retrovirových vektorů s kostimulační doménou CD28 v CAR receptoru [137]. EMA schválila tento produkt o rok později, rovněž pro r/r DLBCL a primárních mediastálních velkobuněčných lymfomů po dvou nebo více liniích systémové terapie [138].

V roce 2020 FDA povolil použití Brexucabtagene autoleucel (Tecartus, dříve KTE-X19, firma Gilead) k léčbě dospělých pacientů s refrakterním/relabujícím lymfomem z plášťových buněk (r/r MCL). Brexucabtagene autoleucel jsou autologní buňky modifikované *ex vivo* pomocí retrovirů s jednou kostimulační doménou CD28 v CAR receptoru [139].

Posledním přípravkem, který byl schválen FDA prakticky nyní (únor 2021), je lisocabtagene maraleucel (Breyanzi, JCAR017, firma Bristol Myers Squibb), určený pro léčbu dospělých s r/r DLBCL, kteří jsou po dvou nebo více liniích systémové terapie⁵. Lisocabtagene maraleucel jsou autologní CD19 CAR-T buňky s jednou kostimulační doménou 4-1BB modifikované *ex vivo* pomocí lentivirů [140].

3.9.1.2 Nejčastější cíle terapie CAR-T buněk u hematologických malignit

Nyní budou stručně popsány antigeny CD19, CD20 a BCMA, které jsou častým cílem terapie CAR-T buněk u hematologických malignit, jejichž úspěšné léčbě pak bude věnována následující kapitola. Antigenům CD19 a CD20 se rovněž věnovala část experimentální práce.



Obr. 14: Ilustrativní znázornění zrání B-buněk, exprese antigenů CD19 a CD20 a neoplázie B-buněk spojené s různými stádii vývoje.

Pozn. CD19 je exprimován ještě na plazmablastech (nejsou zakresleny).

Zkratky: GC, zárodečné centrum; ALL, akutní lymfoblastická leukemie; MCL, lymfom z plášťových buněk; BL, Burkittův lymfom; DLBCL, difuzní velkobuněčný B lymfom; MZL, lymfom marginální zóny; CLL/SLL, chronická lymfocytární leukemie/malý lymfocytární lymfom; MALT, lymfoidní tkáň asociovaná se sliznicí; WM, Waldenströмова makroglobulinémie; MM, mnohočetný myelom. Obrázek převzat z publikace [141].

⁵ Převzato z internetového zdroje (6).

Antigen CD19

CD19 je transmembránový glykoprotein typu I náležející do rodiny imunoglobulinů Ig. CD19 je specificky exprimován normálními a neoplastickými B-buňkami. Patří mezi pan-B znaky⁶. Exprese je trojnásobně vyšší ve zralých buňkách ve srovnání s nezralými B-buňkami. Nemá expresi na hematopoetických kmenových buňkách a exprese se ztrácí v terminálně diferenciovaných plazmatických buňkách (**Obr. 14**) [141]. Během lymfopoézy se CD19 kriticky podílí na stanovení prahu signalizace B-buněk tím, že moduluje intracelulární signalizaci zprostředkovanou i nezprostředkovanou B-buněčným receptorem (BCR). Hraje roli při vývoji nezávislém na vazbě antigenu i při aktivaci B-buněk indukované imunoglobulinem. CD19 je tedy kritický pro dosažení optimální imunitní odpovědi [142].

Antigen CD20

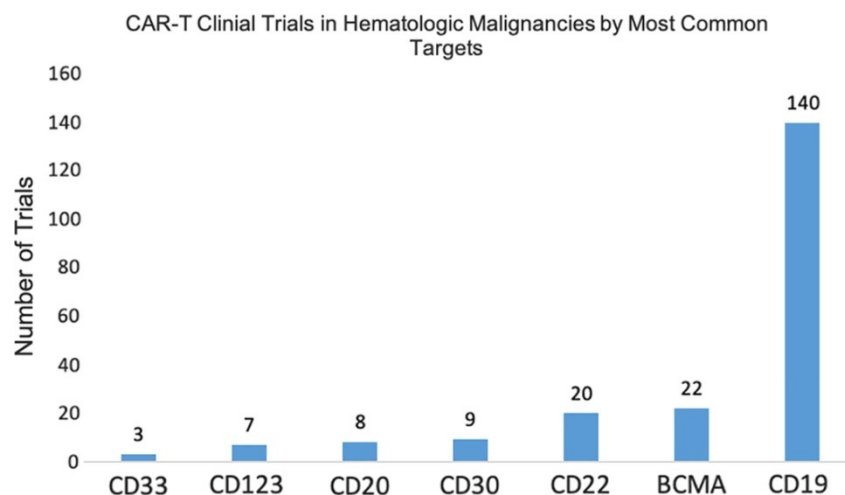
CD20 je aktivovaný glykosylovaný transmembránový fosfoprotein náležící k rodině tetraspaninů. Jeho exprese během vývoje a diferenciace B-buněk začíná o něco později a je ztracena o něco dříve než u CD19 (CD20 už není exprimován na plazmablastech, **Obr. 14**) [143]. Funkce CD20 je neznámá. Dříve se myslelo, že hraje roli jako kanál pro vápenaté ionty, protože ektopická overexprese generovala tok vápníku do buněk [144, 145]. Dnes se přiklání k tomu, že by se mohl účastnit signalizace zprostředkované BCR receptorem, jde ale o dost rozporuplnou roli [146].

Antigen BCMA

Antigen pro zrání B-buněk BCMA (B-cell maturation antigen)⁷ je členem superrodiny receptoru pro tumor nekrotizující faktor (TNFR). BCMA je exprimován hlavně zralými paměťovými B-lymfocyty a plazmatickými buňkami a s minimální expresí v hematopoetických kmenových buňkách nebo mimo hematopoetickou tkáň. Reguluje proliferaci a přežití B-buněk, jakož i jejich zrání a diferenciaci do plazmatických buněk. Membránově vázaný BCMA může být odštěpen z buněčného povrchu γ -sekretázou do cirkulace. Ligandy BCMA jsou faktor aktivující B-buňky (BAFF, B-cell activating factor) a ligand indukující proliferaci (APRIL, proliferation-inducing ligand). Overexprese a aktivace je asociována s progresí mnohočetného myelomu, což z něj činí atraktivní terapeutický cíl [147, 148].

⁶ Pan-leukocytární markery slouží k rozlišení zralých, nezralých a potenciálně maligních leukocytů v buněčné populaci.

⁷ označovaný též jako TNFRSF17 nebo CD269



Obr. 15: Počet klinických studií podle cílových antigenů

Studie s CAR-T lymfocyty pro léčbu hematologických malignit. V grafu je vyneseno pouze 7 nejběžněji zacílených antigenů. Počty k roku 2019. Obrázek převzat z publikace [149].

3.9.1.3 B-ALL

Akutní lymfoblastická leukemie je maligní klonální onemocnění krvetvorby vycházející z prekursorových B-buněk (B-ALL) nebo T-buněk (T-ALL), přičemž B-ALL je asi 3x častější než T-ALL. Jedná se o nejčastější onkologické onemocnění v dětském věku s incidencí 3-4/100.000 dětí ročně. U dospělých patří mezi vzácné malignity s incidencí 1-1,6/100.000 obyvatel ročně [150].

Relaps ALL postihne ve věkové skupině > 18 let až polovinu nemocných, a asi 5% pacientů má onemocnění primárně refrakterní na indukční léčbu [150]. Jedinou léčebnou možností pro tyto pacienty byl až donedávna záchranný chemoterapeutický režim následovaný u mladších nemocných alogenní transplantací krvetvorných buněk. V dnešní době je k dispozici cílená terapie monoklonálními protilátkami a jejich konjugáty nebo inhibitory kináz [150]. Pokud i tato terapie selže, poslední možností pro pacienty je terapie CAR-T buňkami. S ní bylo v klinických studiích zaměřených na léčbu r/r B-ALL dosaženo velmi povzbudivých výsledků.

Ve studii fáze I-IIa prováděné na dětské klinice ve Philadelphii bylo zahrnuto 60 dětí a mladých dospělých, u kterých po terapii tisagenlecleucelem bylo dosaženo úplné remise u 93% pacientů. Následné čtyřleté sledování prokázalo významnou kontrolu nemoci bez další terapie [151]. Na základě těchto výsledků navazovala studie ELIANA (Novartis), probíhala v 11 zemích, a bylo do ní vzato 75 pacientů mladších 21 let. U 61 z nich (81%) bylo během 3 měsíců dosaženo remise. Celkového přežití bez nemoci a celkového přežití po 12 měsících dosáhlo 50%, resp. 76% pacientů [152]. Výsledek této studie přispěl ke schválení FDA pro

tisagenlecleucel u mladých dospělých s r/r B-ALL. Výsledky studie ELIANA byly v roce 2018 aktualizovány – trvalé odpovědi dosahovalo 29 pacientů (45%) s dobou sledování s mediánem 24 měsíců [153]. Účinnost prokázaly i další klinické studie s úplnou odpovědí u 67% - 93% pacientů [154].

3.9.1.4 Difuzní velkobuněčný B-lymfom

Difuzní velkobuněčný B-lymfom je nejběžnějším typem ne-Hodgkinova lymfomu (NHL), což představuje zhruba 30% případů NHL každý rok. DLBCL lymfocyty odpovídají třem podtypům buněk, jednak lymfocyty podobné normálním germinálním B-buňkám a normálním aktivovaným B-buňkám, a zbylých 10-15% představují neklasifikované lymfocyty. Histologicky se jedná o difuzní proliferaci velkých nádorových B-lymfoidních buněk, které nahrazují normální architekturu lymfatické uzliny či extranodální tkáně. Incidence onemocnění je asi 5,6-6,6 případů na 100.000 obyvatel ročně [155, 156].

Klasický režim léčby R-CHOP (kombinace rituximabu s cyklofosfamidem, doxorubicidem, vinkristinem a prednisonem) vede k vyléčení 50-60% pacientů. Zhruba 15% pacientů je refrakterních a 35% pacientů zrelabuje do 3 měsíců od zahájení léčby.

V progresi nebo relapsu je standardní léčbou pacientů, u kterých je možná transplantace, záchranná chemoterapie následovaná konsolidační autologní transplantací kmenových buněk [155]. Kompletní odpověď je dosažena jen u 7% pacientů s mediánem celkového přežití 6,2 měsíce [157].

V klinické studii fáze IIa podání tisagenlecleucelu 28 pacientům s r/r DLBCL bylo dosaženo po 3 měsících odpovědi u 50% pacientů, přičemž 43% z nich po 6 měsících dosáhlo kompletní odpovědi [158]. Na výsledky této studie navázala mezinárodní studie JULIET, kam bylo zahrnuto 93 pacientů. Medián sledování byl 14 měsíců po infuzi (k 3. 1. 2019). Celkové odpovědi dosáhlo 52% pacientů, přičemž 40% dosáhlo kompletní odpovědi. Medián celkového přežití pacientů, kteří dostali infuzi, je 12 měsíců [159]. Výsledky studie JULIET byly podkladem pro schválení tisagenlecleucelu FDA do klinické praxe.

Dalších úspěchů v léčbě r/r DLBCL dosáhla anti-CD19 CAR-T terapie s axicabtagene-ciloleucelem v klinické studii ZUMA-1, kdy 4 ze 7 pacientů odpověděli úplně a zbylí 3 zůstali i po roce v remisi [110]. Na ní navazovala II. fáze studie ZUMA-1, kam bylo zařazeno 111 pacientů, celkové odpovědi dosáhlo 82% a kompletní odpovědi 54% pacientů [160], výsledky později vedly ke schválení axicabtagene-ciloleucelu FDA. Aktualizované výsledky

obou fází (k roku 2020) s mediánem sledování 2 roky ukázaly trvalou odpověď u 37% pacientů [161].

Nejnovější CD19 CAR-T přípravek, lisocabtagene maraleucel, byl zkoušen v rámci studie TRANSCEND, kdy byl podán 344 pacientům, z nich alespoň jednu dávku dostalo 269 pacientů. Medián sledování celkového přežití byl 18,8 měsíců. Ze souboru 256 pacientů, který byl hodnocen, bylo dosaženo odpovědi u 73%, úplné odpovědi pak u 53% pacientů [162]. Výsledky studie podpořily schválení přípravku lisocabtagene maraleucel FDA začátkem letošního roku.

3.9.1.5 Mnohočetný myelom

Mnohočetný myelom je maligní B-lymfoproliferativní onemocnění charakterizované osteolytickými ložisky kostí a infiltrací kostní dřene patologickými plazmocytami. Charakteristická je přítomnost monoklonálního imunoglobulinu M-Ig v séru a/nebo moči. MM představuje asi 1% všech nádorových onemocnění, a více než 10% všech hematologických malignit. Výskyt je asi 4 případy na 100.000 obyvatel/rok. Výskyt MM roste s věkem, medián věku při diagnóze je 65 let. MM se stále považuje za nevléčitelné onemocnění s nevyhnutelným relapsem [163, 164].

Myelomové buňky zřídka kdy exprimují CD19, takže pro léčbu se hledají jiné cíle. Jedním z nich je antigen BCMA. V současné době se zkouší několik anti-BCMA CAR produktů. V rámci studie EVOLVE byly do léčby pomocí anti-BCMA CAR-T lymfocytů zařazeni pacienti s r/rMM, kteří podstoupili 3 nebo více předchozích léčebných režimů včetně autologní transplantace. Produkt obsahuje lentivirové konstrukty s plně humánním scFv, 4-1 BB kostimulační a CD3 ξ aktivační doménou. Ze 44 pacientů, 82% dosáhlo kompletní nebo částečné odpovědi, přičemž 48% mělo velmi dobrou/lepší parciální odpověď [147, 165].

3.9.1.6 Akutní myeloidní leukémie

AML je výsledkem klonální expanze transformovaných hematopoetických kmenových buněk a genetickými abnormalitami včetně chromozomálních přesmyků a mutací ve více genech. AML je fenotypicky a geneticky heterogenní onemocnění. Leukemické blasty se hromadí v kostní dřeni, později často zasahují i lymfatické uzliny, slezinu, játra, varlata a centrální nervový systém. Postihuje zhruba 3-4 ze 100.000 obyvatel s mediánem středního věku 67 let. Pětiletého přežití dosahuje zhruba 20% pacientů. Kompletní remise dosáhne 66% starších pacientů, ale v této skupině 16% znovu zrelabuje [166, 167].

Hlavním problémem terapie AML CAR-T buňkami je nepřítomnost unikátních antigenů maligních myeloidních buněk, které by je odlišily od zdravých progenitorových buněk. Cílí se antigeny, jako jsou CD123, antigen LeY, CD33, folátový receptor, FLT3 aj. [168]. Aby se zabránilo zasažení normálních krvetvorných buněk, zkouší se různé varianty receptorů přizpůsobené k jejich vypnutí (viz kapitola 3.8.3). Přednost se rovněž dává kostimulační molekule CD28 před 4-1BB, a to kvůli nižší perzistenci CAR-T lymfocytů *in vivo*. Problémem je i samotná výroba autologních CAR-T buněk, protože 2/3 pacientů má nedostatečný počet buněk pro jejich přípravu díky vysokému procentu blastů v periferní krvi [169].

V současné době probíhá s CAR-T lymfocyty několik klinických studií zaměřených na různé hematologické malignity, v následující tabulce je uveden jejich přehled.

Disease	CAR-T cell Therapy Targets	Phase
Acute Lymphoblastic Leukemia	CD19	I, II
	CD22	I, I
	Dual CD19 and CD22	I
	Dual CD28 and CD137 CD33 (NCT02799680)	I
	CD20/CD22/CD10 (NCT03407859)	I
	CD33/CD38/CD56/CD123/CD117/CD133/CD34/Mucl (NCT03473457)	N/A
	CD123 (NCT03556982)	I/II
	CD38 (NCT03754764)	I/II
	CD7 (NCT04004637)	I
	4SCAR-CD22/CD123/CD38/CD10/CD20/TSLPR (NCT04016129)	I/II
Multiple Myeloma	XYF19 (NCT04037566)	I
	BCMA	b/II, I
	BCMA and/or CD19	I/II
	CD138 (NCT01886976)	
	CD138/BCMA/CD19/more (NCT03196414)	I/II
	BCMA/CD38/CD56/CD138/alternative antigens (NCT03271632, NCT03473496)	I/II
	CD38 (NCT03464916)	I/II, N/A I
	NY-ESO-1 (NCT03638206)	I/II
	IM21 (NCT03711864, NCT04537442)	I, I
	Dual BCMA and CD38 (NCT03767751)	I/II
Non-Hodgkin Lymphoma	Integrin β7/BCMA/CS1/CD38/CD138 (NCT03778346)	I
	CD44v6ΔNL (NCT04097301)	I/II
	CD4 (NCT04162340)	I
	SLAMF7 (NCT04499339)	I/II
	CS1 (NCT04541368)	I
	CD19	I, I, I
	Dual CD19 and CD20	I
	CD19/CD20/CD22/CD30 (NCT03196830)	II
CD20	I/II, I	
Dual CD19 and CD22 (NCT04303247, NCT04412174)	I, I	

Diffuse Large B Cell Lymphoma	CD19 Dual CD19 and CD20/CD22	II, II <i>in vivo</i>
Hodgkin Lymphoma	CD30	I
NK/T-Cell Lymphoma T-Lymphoblastic Lymphoma	CD7 (NCT04004637, NCT04572308)	I, N/A
Acute Myeloid Leukemia NK Cell Lymphoma T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia	CD7 (NCT04033302)	I/II
Adult T-Cell Lymphoma/Leukemia Anaplastic Large Cell Lymphoma Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Hodgkin Lymphoma NK/T-Cell Lymphoma Peripheral T-Cell Lymphoma	CD30 (NCT04008394)	I
Anaplastic Large Cell Lymphoma Extra-nodal NK/T-Cell Lymphoma Diffuse Large B Cell Lymphoma Peripheral T-Cell Lymphoma Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma	CD30 (NCT04526834)	I
Lymphoma	CD30(NCT02259556, NCT02917083) 4SCAR20/22/70/PSMA/13/79b/GD2 (NCT04429438)	I/II, I I/II
Chronic Lymphocytic Leukemia	CD19 (NCT03085173)	I
Acute Myeloid Leukemia	CD33	I/II
	CD123	I
	CLL-1+CD33	I
	Muc1/CLL1/CD33/CD38/CD56/CD123 (NCT03222674)	N/A
	CD38/CD33/CD56/CD123/CD117/CD133/CD34/Muc1 (NCT03473457)	N/A
	CD123/CLL1 (NCT03631576)	I/II
	CLL-1/CD33 and/or CD123 (NCT04010877)	N/A
	CD44v6ΔNL (NCT04097301)	II/III
	CD19 (NCT04257175)	II/III
	CD38 (NCT04351022)	I/II
Acute Myeloid Leukemia Myelodysplastic Syndrome	NKG2D (NCT03018405) CD33/CD38/CD56/CD117/CD123/CD34/Muc1 CAR T-cells + Eps8 or WT1 peptide specific dendritic cell (NCT03291444)	I/II I
Acute Myeloid Leukemia Myelodysplastic Syndrome Myeloproliferative neoplasms	CLL1-CD33 (NCT03795779) CD123-CD33 (NCT04156256)	I I
Chronic Myeloid Leukemia	IL-1RAP (NCT02842320)	N/A
CD4+ T-Cell Lymphoma	LCAR-T2C (NCT04219319)	I

Tab. 5: Přehled klinických zkoušek CAR-T buněk v léčbě hematologických malignit. Tabulka převzata z publikace [139].

3.9.2 Solidní nádory

Ve srovnání s CD19 CAR-T terapií leukémií a lymfomů léčba solidních nádorů dosahuje malých klinických výsledků. Jedním z prvních neúspěchů byla smrt pacientky s metastazickým kolorektálním karcinomem krátce po podání CAR-T buněk 3. generace

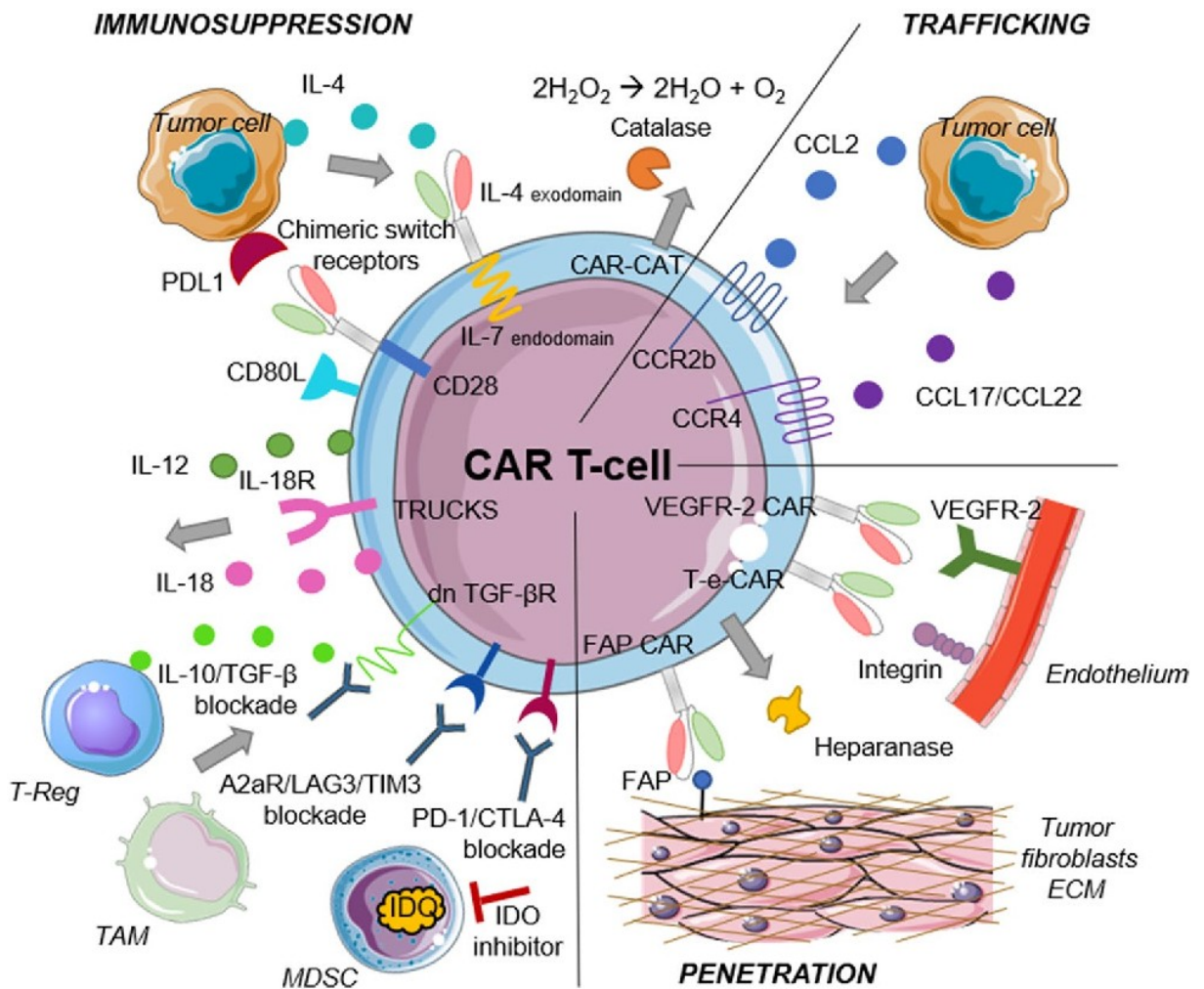
cílených na antigen HER2/neu⁸. V tomto případě, CAR-T buňky napadly i epiteliální buňky plic, které rovněž exprimují ve velmi nízkých hladinách antigen HER2/neu. Již 15 minut po infuzi buněk pacientka pociťovala respirační potíže. Rentgen hrudníku prokázal významný plicní infiltrát a pacientka zemřela 5 dní po léčbě [36]. Pro úspěšnou terapii solidních nádorů je tedy potřeba překonat 2 podstatné problémy – nalézt vhodný antigen a překonat imunosupresivní prostředí pevného nádoru.

3.9.2.1 Nádorové mikroprostředí

Nádorovou masu tvoří heterogenní populace nádorových buněk, ale i nádorové kmenové buňky, infiltrující hostitelské buňky, sekretované faktory a proteiny extracelulární matrix - souhrnně vše označované jako nádorové mikroprostředí. Jde o „dynamické“ prostředí, kdy se mění vzájemný vztah mezi nádorovými buňkami a složkami mikroprostředí s tím, jak nádor roste. Nádory jsou infiltrovány různými buňkami adaptivní i vrozené imunity s pro- tak i protinádorovými účinky [170, 171]. Pevné nádory se obvykle sestávají z velkého počtu imunitních supresorových buněk, jako jsou regulační T-buňky (Tregs), myeloidní supresorové buňky (MDSC) a makrofágy spojené s nádorem. Všechny tyto buňky chrání nádorové buňky před imunitním systémem hostitele, tak i před CAR-T lymfocyty [171, 172].

Na rozdíl od hematologických malignit, se kterými efektorové T-buňky sdílí hematopoetický původ a mají tak vyšší sklon k migraci do kostní dřeně a lymfatických uzlin, solidní nádory pro CAR-T buňky představují rozdílné prostředí. Mikroprostředí, imunitní suprese T-buněk, ale i fyziologické bariéry jsou příčinou, proč terapie CAR-T lymfocyty u pevných nádorů selhává. Rovněž heterogenita antigenů TAA přispívá k úniku nádorových buněk. Některé překážky budou v následujícím textu popsány, včetně možných sofistikovaných modifikací CAR-T lymfocytů, které mohou pomoci tyto problémy překonat.

⁸ též označován jako ERBB2



Obr. 15: Ideální CAR-T buňka s vlastnostmi, které jí dovolují překonat nádorové mikroprostředí.

CAR-T buňka je modifikovaná tak, že exprimuje chemokinové receptory (CCR2b, CCR4 aj.) pro vazbu chemokinů vylučovaných nádory, a tím je motivovaná k migraci směrem k nádoru. Je schopná infiltrace do nádorového stromatu díky expresi receptorů specifických pro vazbu integrinů a dalších adhezivních molekul. Expresí proteinu FAP může buňka snížit počet nádorových fibroblastů a tím inhibovat růst nádoru. Produkce heparanázy umožní štěpit extracelulární matrix. Anti-VEGFR-2 CAR-T buňka ovlivňuje vaskularizaci nádoru. CAR-T buňka, která produkuje cytokiny IL-12 nebo IL-15 lépe odolává nepřátelskému prostředí nádorů, lépe přežívá a má vyšší cytotoxickou aktivitu. Cytokiny tak působí proti účinkům IL-10 a TGF- β . CAR-T buňka, která sekretuje anti-PD-L1 protilátku působí proti supresi zprostředkované ligandem PD-L1, ale může pomocí ní přilákat i NK buňky. Obrázek převzat z publikace [173].

Homing a fyzické bariéry

Přestup CAR-T buněk z krevního řečiště do nádoru je vysoce regulovaný proces závislý na selektinech, integrinech a chemokinových receptorech. Nádory často vylučují chemokiny, pro které T-lymfocyty nemají receptory, a tím nejsou atrahovány směrem k nádoru. Modifikace T-buněk receptory pro chemokiny výrazně přispívá k infiltraci. Například zvýšená migrace

byla pozorována u anti-GD2 CAR-T buněk modifikovaných receptorem CCR2b pro chemokin CCL2, který je vylučován buňkami neuroblastomu [174]. Podobného účinku bylo dosaženo i u anti-CD30 CAR-T buněk modifikovaných k expresi CCR4 pro vazbu CCL17 a CCL22 produkovaným Hodgkinovým lymfomem [175]. Na druhé straně pevné nádory vylučují chemokiny, jako jsou CXCL12 nebo CXCL5, které aktivně inhibují migraci CAR-T buněk [176]. Například podání inhibitoru receptoru CXCR4 (receptor pro CXCL12) vyvolalo rychlou akumulaci T-buněk v nádoru na zvířecích modelech adenokarcinomu pankreatu [177]. Rovněž narušení cév nádorů a tím i omezený přístup živin, brání jeho vývoji, a současně zvyšuje infiltraci efektorových buněk. Na cévním endotelu je overexprimován receptor (VEGFR-2) pro růstový faktor (VEGF). T-buňky modifikované anti-VEGFR-2 CAR receptorem vedly k regresi myších nádorů [178]. Fibroblasty nádorů a myeloidní buňky produkují proteiny extracelulární matrix (ECM), která může bránit samotné penetraci CAR-T buněk. Modifikace CAR-T buněk pro produkci enzymu heparázy (HPSE) jim pomáhá štěpit heparan sulfát proteoglykany [179], které jsou hlavní součástí ECM. Modifikace serinovou proteázou FAP (Fibroblast activation protein) jim usnadňuje její remodelaci [180] a zároveň snižuje počet fibroblastů a tím inhibuje růst nádoru [180].

Imunosupresivní mikroprostředí

Tvoří ho především buňky Tregs, MDSC a makrofágy spojené s nádorem, ale i cytokiny a rozpustné faktory jako jsou TGF- β a IL-10, stejně tak checkpoint inhibitory.

Aktivované lymfocyty exprimují proteiny PD-1, CTLA-4, TIM3 (T-cell membrane protein) a LAG-3 (Lymphocyte activating gene 3), které patří mezi tzv. kontrolní body imunitního systému (checkpoint). Tyto proteiny kontrolují aktivaci T-buněk a chrání organismus před autoimunitním poškozením. Nádorové buňky produkují často ligandy PD-L1 a PD-L2. Kombinací CAR-T buněk se současným podáním protilátek, které blokuje CTLA-4 (ipilimumab) nebo PD-1 (nivolumab a pembrolizumab) se zvyšuje protinádorová odpověď [181]. Byly rovněž připraveny CAR-T buňky, které secernovaly přímo anti-PD-L1 [182] nebo koexprimovaly dominantně negativní receptor PD-1, který vázal PD-L1, ale nesignalizoval [183].

Transformující růstový faktor TGF- β potlačuje aktivitu efektorových T-buněk a vede k diferenciaci směrem k regulačním T-buňkám. Vyřazení receptoru pro TGF- β na CAR-T buňkách pomocí metody CRISP/CAS9 zabraňuje jejich vyčerpání [184], stejně tak exprese dominantně negativního receptoru zabrání účinkům TGF- β [185]. Využití tzv. TRUCK CAR

receptorů schopných vylučovat prozánětlivé cytokiny, například IL-12, zlepšuje nejen perzistenci a účinek CAR-T buněk, ale pomáhá překonat působení TGF- β [186].

CAR-T buňky mohou být geneticky upraveny tak, aby inhibiční signály TGF- β , IL-4 nebo PD-1 převáděly na stimulační signály.

3.9.2.2 Nejčastější cíle terapie CAR-T buněk u pevných nádorů

Gangliosid GD2

Jedním z nejvíce slibných antigenů, na který se zaměřuje CAR-T imunoterapie, je disialogangliosid GD2. Je exprimován řadou solidních nádorů včetně neuroblastomu a normálně se nachází se na periferních nervech. GD2 se jeví jako bezpečný cíl terapie založené na schválené terapeutické protilátce. U pacientů se sice objevují významné vedlejší účinky, které jsou však klinicky zvládnutelné [187-189].

Antigen PSMA

Specifický membránový antigen prostaty PSMA je glykoprotein typu II exprimovaný zejména na epitelech prostaty, s velmi nízkou expresí buněk prsu, tlustého střeva, jater a ledvin, ale i centrálním a periferním nervovým systémem [190]. Jde o glutamát karboxypeptidázu, která v mozku metabolizuje neurotransmitér NAAG. Jeho další funkce je neznámá, ale je spojovaný s progresí tumoru a karcinogenezí [191]. U karcinomu prostaty dochází k jeho výrazné upregulaci. I když antigen PSMA patří ke slibným cílům imunoterapie, zacílení je spojeno s rizikem autoimunitních poruch.

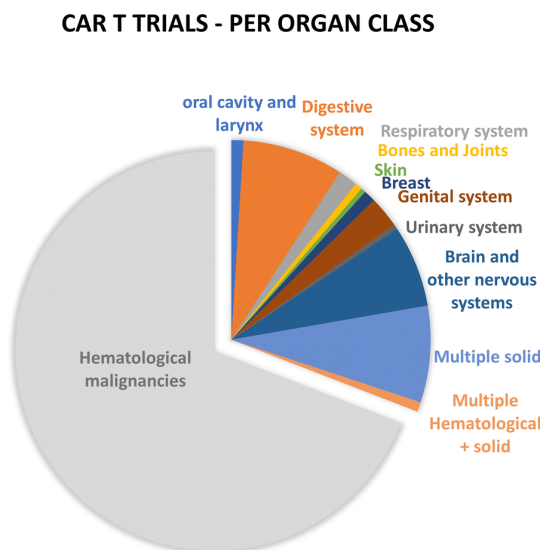
Mesothelin

Je glykoprotein ukotvený v membráně pomocí GPI (glycosylphosphatidylinositol), který vzniká po odštěpení solubilního proteinu v místě Arg295 z prekurzoru. Přesná funkce mesothelinu není známa. U myši v přítomnosti IL-3 stimuluje tvorbu kolonií megakaryocytů [192]. Aberantní exprese mesothelinu v nádorových buňkách přispívá k jejich proliferaci a invazi [193]. Exprese byla popsána u buněk mezoteliomu a nádoru vaječníku [194] a u normálních buněk mezotelu⁹ [194, 195]. I když terapie CAR-T buňkami je opět spojena s „on target, off tumor“ toxicitou, prozatím u pacientů, kterým byly CAR-T buňky podány, nebyla pozorována žádná rozsáhlá nebo závažná poškození normálních tkání [196].

⁹ Výstelka tělních dutin pocházející z coelomového epitelu – mezodermálního původu.

3.9.2.3 Klinické zkoušky s CAR-T buňkami u solidních nádorů

Jak ilustruje **Obr. 16**, počet studií s CAR-T buňkami pro léčbu solidních nádorů je výrazně nižší než pro hematologické malignity, zcela jistě z důvodu nízké úspěšnosti terapie. Pro klinické studie zaměřené na terapii solidních nádorů pomocí CAR-T buněk byly použity už buněčné produkty nové generace, přesto výsledky byly velkým zklamáním, jak ilustrují data v **tabulce 6**.



Obr. 16: Podíl klinických studií s CAR-T lymfocyty zaměřených na různá nádorová onemocnění Klinické zkoušky v USA v roce 2019 bez dlouhodobých follow-up a retrospektivních studií. Největší podíl klinických indikací připadá na hematologické malignity. Obrázek převzat z publikace [197].

CAR-T cell Therapy Targets	Cancer Subtype	Outcome
HER2	Sarcoma	SD 24% (4/17)
	Glioblastoma	PR 7% (1/15)
		SD 27% (4/15)
	Pancreatic Cancer	SD 45% (5/11)
PSMA	Prostate	PR 40% (2/5)
PSCA	Metastatic pancreatic, gastric, or prostate cancers	SD 53% (8/15) PD 20% (3/15)
GD2	Neuroblastoma	CR 18% (3/11)
CAIX	Renal Cell Carcinoma	NR
Mesothelin	Pancreatic	2/6 SD
	Ovarian	6/6 SD

Tab. 6: Výsledky některých klinických zkoušek CAR-T buněčné terapie u solidních nádorů. Zkratky: **PR**, partial response, částečné přesně definované zmenšení součtu velikosti všech ložisek nádoru; **PD**, progressive disease, přesně definované zvětšení součtu velikosti všech ložisek nádoru; **SD**, stable disease, minimální změny velikosti ložiska nedosahující parametru PR nebo PD; **CR**, complete response, úplné vymizení všech detekovatelných ložisek; **NR**, no response. Data převzata z publikací [55, 198].

3.10 Příčiny selhání terapie pomocí CAR-T lymfocytů

V posledních několika letech proběhla/probíhá celá řada klinických studií s CD19 CAR-T buňkami. Výsledky bezesporu ukazují, že terapie má léčebný efekt. Přesto se léčba potýká s vysokou mírou relapsu. Srovnání výsledků je velmi obtížné, protože studie jsou velmi heterogenní. Jen samotná kohorta pacientů je různorodá, pacienti se liší věkem, nemocí, stratifikací rizika, předchozí chemoterapií a lymfodeplečním režimem. Liší se i produkty CAR-T buněk – různé generace receptorů s různými kostimulačními doménami a různým způsobem přípravy.

Pacienti, kteří zrelabovali po CD19 CAR-T léčbě můžeme rozdělit na dvě kategorie: s CD19⁺ a CD19⁻ relapsem

CD19 pozitivní relaps

Řada faktorů, které jsou příčinou neúspěchů léčby, už byla popsána. Selhání terapie může způsobovat limitovaná expanze CAR-T buněk nebo jejich nedostatečná perzistence v těle. Rovněž jejich vyčerpání, resp. stupeň diferenciací CAR-T buněk způsobený opakovanou expozicí antigenu oslabuje jejich funkci. Buňky jsou rychle vyčerpány u pacientů s vysokou nádorovou náloží, naopak nízká nálož zase snižuje proliferaci a diferenciací CAR-T buněk. Nepřetržitá aktivace buněk vede k jejich předčasné senescenci. Nádorové buňky mohou uniknout i díky imunosupresivnímu prostředí (produkce IL-10, TGF- β nebo IDO) či expresí PD-L1 [199].

CD19 negativní relaps

CD19⁻ relaps je rezistentní k CD19 CAR-T reinfuzi a nelze mu zabránit ani zvýšenou perzistencí nebo zlepšenou funkcí lymfocytů. Objevuje se zhruba u 10-20% pacientů s ALL po terapii. Grup *et al.* přepokládají minoritní populaci CD19⁻ blastů, z které se selekčním tlakem terapie vyvine dominantní klon. Předpoklad je založen na analýze vzorku, kde ještě před zahájením CAR-T terapie takové blasty byly nalezeny [103]. Další příčinou vzniku CD19 negativního relapsu je ztráta antigenu CD19 na nádorových buňkách, CD19 není totiž esenciální pro přežití a proliferaci ALL buněk [200]. Experimenty Sotillové *et al.* prokázaly jednak ztrátu celého chromozómu 16, na kterém je gen pro CD19 lokalizovaný [201]. Dalším popsaným mechanismem byl alternativní sestřih RNA exonu 2 způsobený sestřihovým faktorem 3 (SRSF3, serine and arginine-rich splicing factor 3). V důsledku sestřihu se exprimoval protein CD19 zkrácený na N'konci, který již nebyl CD19 CAR-T lymfocytů

rozeznáván [201]. Dalším popsaným mechanismem byla změna nádorových buněk z linie lymfoidní na myeloidní. To bylo pozorováno u dvou dětských pacientů s B-ALL s přestavbou genu MLL (myeloid/lymfoid or mixed lineage leukemia), kterým byly podány CD19 CAR-T lymfocyty. Pacienti sice dosáhli kompletní remise, ale měsíc po infuzi CAR-T buněk se u nich vyvinula akutní leukemie (AML) [202].

3.11 Výhled do budoucna

V předchozím textu byla řada perspektiv ohledně směru výzkumu a vývoje receptorů popsána. Nyní budou jen stručně shrnuty nové přístupy a inovace zaměřené na „genetické přepracování“ CAR-T buněk. Důvodem je snaha o dosažení léčebné odpovědi v terapii pevných malignit.

Zaměření	Možnosti řešení
Hledání vhodných cílů CAR-T terapie <i>(rozšíření i o další TAA)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • CAR napodobující TCR receptor specifický pro peptidy prezentované molekulami HLA • CAR cílené na více antigenů (<i>syntetický Notch receptor indukující expresi CAR</i>) • vyladění afinity CAR k preferenčnímu zacílení na antigen s vysokou hustotou • indukovatelné sebevražedné spínače • Zacílení na nádorové stroma, resp. CAR specifický pro FAP pro kontrolu růstu nádoru
Zvýšení infiltrace CAR-T buněk do solidních nádorů	<ul style="list-style-type: none"> • inhibice receptoru CXCR4 (blok osy CXCL12/CXCR4) • modifikace receptory pro chemokiny (CXCR2,CCR2b) • zvýšení adheze CAR-T buněk • modifikace heparanázou (pro degradaci proteoglykanů)
Regulace molekul kontrolních bodů imunity	<ul style="list-style-type: none"> • kombinovaná blokáda PD-1 a CTLA-4 (nivolumab, ipilimumab) • genetická inaktivace genu pro PD-1 • exprese PD-1 bez signální části receptoru • koexprese CD40L
Úprava mikroprostředí pomocí cytokinů	<ul style="list-style-type: none"> • potlačení účinků cytokinů IL-10, TGF-β, IL-35 pro podporu proliferace a cytolytické funkce CAR-T buněk • exprese dominantně negativní formy receptoru pro TGF-β • signalizace prostřednictvím IL-4 pro podporu expanze a aktivity CAR-T buněk • exprese IL-12, IL-18, IL-15 pro zvýšení protinádorové aktivity
Změny spojené s metabolismem	<ul style="list-style-type: none"> • využití inhibitorů IDO (indoleamin-2,3-dioxygenáza)

Tab. 7: Zpracováno podle [203].

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Práce s primárními buňkami a buněčnými liniemi

4.1.1 Kultivační média a aditiva

RPMI-1640 (Sigma-Aldrich R0883)

s přidavkem: 10% telecí fetální sérum FBS (Gibco, 10270-106); teplotně inaktivované
2 mM L-glutamin (Gibco 25030-024)
20 mM HEPES; pH 7,5 (MERCK 54457)
penicilin 100 U/ml (Gibco 15140)
streptomycin 0,1 mg/ml (Gibco 15140)

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose; MERCK D6545)

s přidavkem: 10% telecí fetální sérum; teplotně inaktivované
2 mM L-glutamin
20 mM HEPES; pH 7,5
penicilin 100 U/ml
streptomycin 0,1 mg/ml

CellGenix GMP DC (CellGenix GmbH, 0020801)

s přidavkem: 10% telecí fetální sérum FBS; teplotně inaktivované
penicilin 100 U/ml
streptomycin 0,1 mg/ml

Do médií, ve kterých byly kultivované lymfocyty, byly přidávány cytokiny (jednotlivě/ v různé kombinaci v závislosti na experimentu)

- IL-2 (Proleukin S, Novartis) – 1.000 U/ml
- IL-4 (Miltenyi Biotec) – 20 ng/ml
- IL-7 (Miltenyi Biotec) – 10 ng/ml

Všechny primární buňky a buněčné linie byly kultivovány při teplotě 37°C v 5% CO₂ atmosféře.

4.1.2 Buněčné linie

- | | |
|----------|--|
| K562 | <ul style="list-style-type: none">◦ zdroj DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)◦ odvozena z kostní dřeně od 53-leté pacientky s CML◦ suspenzní buňky s morfologií lymfoblastu◦ kultivovaná v médiu RPMI-1640 |
| HEK 293T | <ul style="list-style-type: none">◦ poskytnuty J.A. Kleinschmidtem, DKFZ, Německo◦ lidské embryonální ledvinné buňky produkující velký T antigen viru SV40◦ adherentní buňky kultivované v médiu D-MEM |
| RAMOS | <ul style="list-style-type: none">◦ zdroj ATCC (The American Type Culture Collection)◦ odvozené z nádorové tkáně 3-letého chlapce s Burkittovým lymfomem◦ suspenzní buňky, CD19+, CD20+◦ kultivované v médiu RPMI-1640 |

- | | |
|--------|---|
| LNCaP | <ul style="list-style-type: none"> ◦ zdroj ATCC ◦ prostatická linie odvozena z metastáz v lymfatické uzlině 50-ti letého muže ◦ adherentní linie, PSMA+ ◦ kultivované v médiu D-MEM |
| Jurkat | <ul style="list-style-type: none"> ◦ zdroj ATCC ◦ imortalizovaná linie lidských T-lymfocytů ◦ odvozena z periferní krve 14-ti letého chlapce s diagnostikovanou akutní T-buněčnou leukémií ◦ suspenzní linie ◦ kultivované v médiu RPMI-1640 |

4.1.3 Izolace mononukleárních buněk z periferní krve (PBMCs)

Zdrojem PBMCs byly buffycoaty, které byly poskytnuty Transfuzním oddělením ÚHKT s informovaným souhlasem dárců. Buňky byly separovány pomocí gradientní centrifugace přes hustotní gradientní médium Ficoll-Plaque PLUS (hustota 1.077 g/ml; firma GE Healthcare). Krev byla naředěna PBS v poměru 1:1 a navrstvena na hustotní gradientní médium v poměru 20 ml média: 30ml ředěné krve. Následovala centrifugace s pomalým rozběhem a pomalým brzděním se zrychlením 800g 30min při pokojové teplotě. Po rozvrstvení buněk na základě hustotního gradientu byly z vrstvy mléčného prstence odebrány mononukleární buňky. Buňky byly 3x promyty v 50 ml PBS s centrifugací při postupném snižování zrychlení 400g, 200g a 100g. Buňky byly resuspendovány v médiu CellGenix nebo PBS. Byl stanoven počet a viabilita vyizolovaných buněk.

4.1.4 Počítání buněk, viabilita

Počet a procento živých buněk bylo stanoveno manuálním počítáním buněčné suspenze smíchané v poměru 1:1 s 0,4% roztokem trypanové modři (Merck) v Bürkerově komůrce v mikroskopu Meopta DN 816Bi při zvětšení 400x.

4.1.5 Transfekce adherentních buněk

Transfekce byla prováděna pomocí transfekčního činidla Metafectane (Biontex) podle přiloženého protokolu. Zkráceně, adherentní buňky byly den předem vysety do 6-ti jamkové destičky (velikost 9,5 cm²) v takovém počtu, aby následující den byly narostlé na subkonfluentní koncentraci 60%. Směs transfekčního činidla (6μl) a DNA (2-3 μg) byla namíchána v roztoku PBS. Samotná transfekce probíhala do 1 ml média bez antibiotik. Za 24 hod bylo médium vyměněno za čerstvé s antibiotiky.

Pokud transfekce sloužila k produkci lentivirů (viz dále), za dalších 24 a 48 hod bylo médium sebráno pro následující transdukcii.

Pokud transfekce sloužila k ověření exprese nebo k přípravě buněk nesoucí požadovaný antigen, bylo rovněž 24 hod po transfekci vyměněno médium za čerstvé a buňky za dalších 24-48 hod byly analyzovány na průtokovém cytometru nebo použity pro další funkční experimenty.

4.1.6 Příprava primárních lidských T-buněk exprimující CAR receptory

Zdrojem T-lymfocytů byly mononukleární buňky vyizolované z buffycoatů, do kterých byly vneseny CAR receptory pomocí lentivirové transdukcce nebo elektroporace.

4.1.6.1 Příprava lentivirů

Pro přípravu virových partikulí byly využity komerční lentivirové pakážovací plazmidy 2. generace od firmy Addgene.

psPAX2 - plazmid nese gen *HIV1-gag* pro GAG protein podílející se na skládání viru podobných partikulí a gen *HIV1-pol*, který kóduje 2 proteiny, reverzní transkriptázu a integrázu

pMD2.G - plazmid nese gen *VSV-G* pro obalový protein

pWPXL¹⁰ - je klonovací vektor, mezi sekvencemi 3'LTR a 5'LTR (long terminal repeat), které zprostředkovávají integraci transférové sekvence do hostitelského genomu, je vložen gen pro GFP (zelený fluorescenční protein) pod promotorem EF-1 α . Vektor byl použit pro zaklonování CAR receptorů výměnou za gen pro GFP.

Buňky HEK 293T byly transfekovány všemi třemi plazmidy, tj. transferový vektor, psPAX2 a pMD2.G v následujícím poměru 2:1:1. Na jamku o velikosti 9,5 cm² bylo použito 1,5 μ g: 0,75 μ g :0,75 μ g DNA, transfekce probíhala v 1 ml média D-MEM bez antibiotik. Následující den bylo médium vyměněno za 1 ml média RPMI s antibiotiky. Za dalších 24 hod bylo znovu médium vyměněno, sebrané médium (obsahující virové partikule, tzv. LV supernatant) se přefiltrovalo přes 0.22 μ m filtr nebo bylo stočeno 5 min při 1500 rpm a bylo použito okamžitě k infekci T-lymfocytů nebo bylo uchováno pro další použití při -80°C. Za dalších 24 hod se znovu LV supernatant sebral a zpracoval se stejným způsobem.

¹⁰ Mapa vektoru je součástí přílohy č. 2

4.1.6.2 Infekce pomocí lentivirů a stimulace T-buněk

Infekce probíhala v 6-ti jamkové kultivační destičce, následující rozpis je pro 1 jamku. Jeden až dva miliony čerstvě vyizolovaných a promytých mononukleárních buněk bylo resuspendováno v 1 ml LV supernatantu (čerstvě sebraný nebo rozmražený) s přidavkem 4 µg/ml polybrenu (Merck) a přeneseno do jamky s naadherovanými stimulačními protilátkami. Ke stimulaci byly používány protilátky anti-CD3 a anti-CD28 (obě Miltenyi Biotec). Protilátky naředěné v PBS na koncentraci 1 µg/ml se nechaly navázat na povrch plastiku po dobu 1 hod při teplotě 37°C. Poté byl povrch kultivační jamky 2x opláchnut PBS a ihned převrstven LV supernatantem s buňkami, aby nedošlo k jeho vyschnutí. Následně se kultivační destička stáčela při 800g 60 min při teplotě 30°C. Po centrifugaci se destička umístila do inkubátoru. Po 2 hod kultivaci byl k buňkám přidán 1 ml čerstvého média RPMI s přidavkem IL-2 v konečné koncentraci 1.000 U/ml. Buňky byly udržovány v exponenciální fázi růstu po dobu 2-3 týdnů přidáváním čerstvého média RPMI s IL-2 v množství 1.000 U/ml na konečný objem kultivačního média.

4.1.6.3 Elektroporace buněk PBMCs

Elektroporace byla prováděna pomocí transfekčního systému Neon od firmy Invitrogen. Součástí systému jsou elektroporační jehly, elektroporační kyvety, pufr T a pufr E2 (Electrolytic buffer). Samotná elektroporace probíhala podle přiloženého manuálu. Elektroporací byly do buněk vnášeny 2 základní plazmidy transpozonového systému piggyBac firmy Hera Biolabs.

PiggyBac Transposase (pBASE) vektor – kóduje super-piggyBac transpozázu, která s vysokou účinností integruje transpozon do hostitelského genomu.

PiggyBac Transposon (pPB UBC)¹¹ – jde o prázdný klonovací plazmid, kde mezi sekvencemi 5' TR a 3' TR (transposon region), které zprostředkovávají integraci transférové sekvence do hostitelského genomu, jsou vloženy promotor UBC a polyadenylační sekvence bGH polyA.

Čerstvě vyizolované PBMCs byly resuspendovány v médiu CellGenix v konečné koncentraci 10-15 x 10⁶ b/ml a ponechány v inkubátoru do druhého dne. Následující den byly PBMCs 2x promyty PBS a resuspendovány v počtu 8 mil buněk ve 100 µl pufru T s namíchanou DNA v množství 2 µg plazmidu pBASE a 4 µg PB plazmidu s transgenem. Resuspendované buňky byly přeneseny do elektroporační jehly, která byla potom umístěna do elektroporační kyvety

¹¹ Mapa vektoru je součástí přílohy č. 3

naplněné pufrem E2. Buňky byly elektroporovány jedním pulsem o délce 20 ms a napětí 2300 V. Po elektroporaci byly buňky okamžitě přeneseny do vytemperovaného média CellGenix v počtu 2-4 elektroporační reakce na 400 ul média. Za 24 hod byly T-lymfocyty stimulovány aktivačními protilátkami (**kapitola 4.1.6.4**) a bylo k nim přidáno stejné množství čerstvého média s cytokiny o požadované koncentraci na výsledný objem média. Poté, co buňky začaly výrazně proliferovat, byly udržovány po dobu 3-4 týdny v exponenciální fázi růstu v koncentraci cca 1-5 mil bb/ml.

4.1.6.4 Aktivace T-lymfocytů elektroporovaných PB plazmidy

CAR-T buňky byly aktivovány v závislosti na experimentu buď nespecificky pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 nebo specificky pomocí protilátek proti CAR receptoru. Výjimkou byly CD19 CAR-T lymfocyty, které byly stimulovány bez protilátky, ale pomocí antigenu CD19 exprimovaného na B-lymfocytech (ty jsou zastoupeny ve směsi PBMCs).

Seznam aktivačních protilátek je uveden v **tabulce 8**. Protilátky byly imobilizované na povrch kultivačního plastiku či byly navázané na kuličky a přidány přímo k buňkám. Buňky byly aktivovány protilátkami 24 hod po elektroporaci.

- a) Imobilizované protilátky: Protilátky naředěné v PBS v poměru 1:100 byly naneseny na povrch kultivačního plastiku a nechány 1 hod při 37°C. Poté, co bylo PBS s nenavázanými protilátkami odsáto, byl povrch 2x propláchnut PBS, aby se odstranily zbytky neadherované protilátky. Okamžitě, aby nedošlo k vyschnutí povrchu, byly do kultivačních jamek přeneseny buňky, které byly stimulovány 2-4 dny.
- b) Protilátky vázané na kuličky: Byly používány magnetické kuličky Dynabeads Protein G (Invitrogen). 5 ul výchozí suspenze kuliček bylo 2x promyto PBS a resuspendováno ve 20 µl PBS. Ke kuličkám byl přidán 1 ul protilátek anti-myc/anti-flag/anti-CD34 nebo 0,25 µl trastuzumabu/rituximabu. Protilátky se nechaly vázat na kuličky 20 minut při pokojové teplotě s občasným vortexováním. Poté byly 2x promyty PBS a resuspendovány v 10 µl PBS. Toto množství se pak přidávalo k 800 µl buněčné suspenze v jedné jamce 24 jamkové destičky. Kuličky byly většinou ponechány po celou dobu kultivace (došlo k jejich vyředění), ev. byly po 2-4 dnech odstraněny magnetickou separací.

Protilátka	Klon	Firma	Koncentrace zásobní protilátky
Anti-CD3, pure-functional grade	OKT3	Milteneyi Biotec	100 µg/ml
Anti-CD28, pure-functional grade	15E8	Milteneyi Biotec	100 µg/ml
Anti-c-Myc	9E10	Exbio	1 mg/ml
Anti-c-Myc tag biotin	9E10	Exbio	1 mg/ml
Anti-DDDDK tag (anti-flag)	F-tag-01	Exbio	1 mg/ml
Anti-huCD34	QBEnd-10	Exbio	1 mg/ml
Herceptin (Trastuzumab)	---	Roche	21 mg/ml
Mabthera (Rituximab)	---	Roche	10 mg/ml
Erbix (Cetuximab)	---	Merck	5 mg/ml
Avastin (Bevacizumab)	---	Roche	25 mg/ml

Tab. 8: Seznam používaných aktivačních protilátek

4.1.7 Průtoková cytometrie

4.1.7.1 Používané protilátky

Protilátka	Fluoroform	Klon	Firma	Koncentrace zásobní protilátky*	Ředění
anti-CD19	FITC	HIB19	eBioscience		1:100
anti-CD20	APC	LT20	ExBio		1:100
anti-CD69	PE	FN50	ExBio		1:400
anti-ING-g	PE	B27	BioLegend		3:100
anti-IL-21	APC	3A3-N2	BioLegend		1:20
anti-CD3	BV786	UCHT1	BD Horizon		1:100
anti-scFv (goat-anti-mouse)	AF647		Jackson ImmunoResearch	1,5 mg/ml	1:200 pro buňky Jurkat 1:500 pro CAR-T lymfocyty
anti-myc	FITC	9E10	ExBio	1 mg/ml	1:100
anti-CD25/IL-2R (Basiliximab)	AF488	Hu107	RD Systems	0,2 mg/ml	1:20
anti-DYKDDDDK tag (anti-FLLAG)	AF488	L5	BioLegend	0,5 mg/ml	1:1000
anti-CD34	FITC	QBEnd-10	ExBio		
Herceptin (Trastuzumab)	---	---	Roche	21 mg/ml	1:1000
Mabthera (Rituximab)	---	---	Roche	10 mg/ml	1:1000
Erbix (Cetuximab)	---	---	Merck	5 mg/ml	1:1000
Avastin (Bevacizumab)	---	---	Roche	25 mg/ml	1:1000
anti-human IgG Fc	AF647	HP6017	BioLegend		1:100

*pokud výrobce uvádí

Tab. 9: Seznam primárních a sekundárních protilátek používaných pro barvení buněk na analýzu průtokovým cytometrem.

4.1.7.2 Extracelulární barvení buněk

Buňky v počtu 0,5 až 1 mil byly dvakrát promyty studeným PBS (600 x g, 5 min, 4°C) a resuspendovány v 50 µl FACS¹² pufru s naředěnou protilátkou/protilátkami s následnou inkubací 30 min na ledu ve tmě. Poté byly buňky opět dvakrát promyty PBS a resuspendovány ve 400 µl FACS pufru a přeneseny do FACS zkumavek.

- Pokud v barvicí směsi byla primární protilátka bez fluoroforu, po promytí primární protilátky se stejným způsobem buňky barvily ještě sekundární fluorescenčně značenou protilátkou.

V případě, že bylo potřeba v rámci jednoho barvení detekovat myší scFv část CAR receptoru pomocí anti-scFv (= goat-anti-mouse) AF647 a zároveň další lidské povrchové markery pomocí myších protilátek, bylo nutné nejdříve samostatně obarvit scFv, poté buňky dvakrát promýt PBS a zablokovat sekundární protilátku pomocí 10% myší séra (Sigma-Aldrich) ředěném ve FACS pufru 10 min na ledu ve tmě. Buňky byly poté znovu 2x promyty PBS a následně zbylé markery barveny primárními protilátkami stejným způsobem, jak je popsáno výše.

4.1.7.3 Barvení mrtvých buněk

K rozlišení živých a mrtvých buněk se ve většině případů používalo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich), které bylo na konci barvení přidáno přímo k buňkám do FACS zkumavky v konečné koncentraci 1,25 ng/µl.

V některých případech bylo použito barvení pomocí LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes, Life Technologies). Buňky byly barveny ještě před samotným barvením primárními protilátkami. Tj. ke sklizeným buňkám, které byly 2x promyty PBS, byl přidán LIVE/DEAD ředěný 1:100 v PBS. Buňky byly barveny 20 min ve tmě při pokojové teplotě. Poté byly opět dvakrát promyty PBS a barveny stejným způsobem, jak je popsáno v kapitole 4.1.7.2. V kapitole 4.1.8 jsou podrobně popsány postupy pro barvení mrtvých buněk v rámci funkčních testů.

4.1.7.4 Intracelulární barvení buněk

Popsáno v kapitole 4.1.8.5.

4.1.7.5 Měření na průtokovém cytometru

Měření probíhalo na přístroji BD LSR Fortessa TM (BD Biosciences). Pomocí nebarvené a jednobarevných kontrol bylo nastaveno vhodné napětí detektorů. Následně byly proměřeny

¹² složení: 1% BSA (bovine serum albumin) v PBS s 0,01% NaN₃

vzorky. Pokud to experiment vyžadoval (při použití více fluoroforů najednou, které se částečně překrývají ve svých spektrech), byly předem pomocí kompenzačních kuliček s navázanými protilátky (podle přiloženého manuálu) a kontrolou mrtvých buněk barvených LIVE/DEAD nastaveny kompenzace (s laskavou pomocí dr. Musila). Zároveň byly proměřeny FMO kontroly (Fluorescence minus one, buňky barvené všemi protilátkami kromě jedné, která váže znak našeho zájmu) pro stanovení nespecifického barvení pozadí. Poté byly proměřeny vícebarevné vzorky.

4.1.7.6 Vyhodnocení dat z průtokového cytometru

Data byla analyzována pomocí softwaru Flowjo 7.6.5 (TreeStar). Po vynesení parametru SSC versus FSC na scatter plotu byla zažetována buněčná populace, z ní vynesením SSC-W versus SSC-A (pro lymfocyty) nebo FSC-H versus FSC-A (pro buněčné linie) byly zažetovány jednotlivé buňky (singlety). Zobrazením kanálu Indo-1-Violet byly rozlišeny živé a mrtvé buňky. Jednotlivé buněčné znaky byly zažetovány z populace živých buněk.

4.1.8 Funkční testy

4.1.8.1 Cytotoxický test

Terčové (cílové buňky) v exponenciální fázi růstu byly odebrány z kultury a přímo v médiu barveny 5 μ M karboxyfluorescein succinimidyl esterem (CFSE) od firmy Merck 10 min při pokojové teplotě ve tmě. Poté byly buňky dvakrát promyty PBS a resuspendovány v čerstvém médiu v dvojnásobné cílové koncentraci buněk. Použité médium bylo stejné, ve kterém se kultivovaly efektorové buňky, ale bez přísad cytokinů.

Efaktorové buňky byly dvakrát promyty PBS a resuspendovány v čerstvém médiu bez cytokinů o vhodné výchozí koncentraci buněk. Z této suspenze pak byly ředící řadou připraveny jednotlivé alikvoty. Smícháním terčových buněk s jednotlivými alikvoty efektorových buněk v objemovém poměru 1:1 byly připraveny smíšené lymfocytární kultury v různých poměrech a kultivovány 24 hod. Následující den byl přímo do média přidán propidium jodid (PI) (Merck) o výsledné koncentraci 250 ng/ml. Celá buněčná suspenze byla přenesena do FACS zkumavky a proměřena na průtokovém cytometru. Procento zabitých buněk bylo získáno zažetováním populace buněk CFSE+ PI+ z parentální populace CFSE+.

4.1.8.2 Stanovení aktivity laktát dehydrogenázy jako markeru cytotoxicity

Ke stanovení byl použit komerční kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific). Aktivita LDH se stanovovala podle přiloženého manuálu. Absorbance se měřila na přístroji Microplate Reader M1000 PRO (Tecan) při doporučených vlnových délkách výrobcem. Pro hodnocení byl použit program Magellan (Tecan).

4.1.8.3 Aktivace lymfocytů sledováním exprese časného aktivačního antigenu CD69

Byly připraveny směsné lymfocytární kultury stejným způsobem, jak bylo popsáno v kapitole 4.1.8.1 s tím rozdílem, že se buňky nebarvily CFSE. Po 24 hod kultivaci buněčná kultura byla 2x promyta PBS a obarvena protilátkou anti-CD69 PE v kombinaci s anti-myc FITC nebo anti-scFv AF647 podle postupu popsaném v kapitole 4.1.7.2. Buňky byly analyzovány na průtokovém cytometru.

4.1.8.4 Stanovení hladiny cytokinů INF- γ a IL-21 metodou ELISA

Hladina cytokinů se stanovovala v médiu, ve kterém byly 24 hod kultivované směsné lymfocytární kultury. Sebrané médium se 2x stočilo (400g a 800g 5 min) pro odstranění buněk a debris a bylo okamžitě podrobeno analýze nebo se uskladnilo při teplotě -20°C do dne analýzy.

Pro stanovení byly použity komerční kity založené na metodě ELISA, a to Human INF- γ ELISA MAX Deluxe SET (BioLegend), Human INF- γ Standard TMB ELISA Development Kit (PeproTech) a Legend Max Human IL-21 ELISA Kit (BioLegend).

Součástí kitu od firmy PeproTech nebyl substrát TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), byl proto použit substrát TMB od firmy Sigma-Aldrich, ředěný na koncentraci 0,1mg/ml v 100 mM octanu sodném o pH 6,0. Zároveň součástí kitu nebyl streptavidin-HRP, byl použit Pierce High Sensitivity NeutrAvidin-HRP (ThermoScientific).

Součástí obou kitů pro stanovení INF- γ není kultivační plastik. Byly používány 96 jamkové destičky Polysorb (Nunc).

Absorbance se měřila na přístroji Microplate Reader M1000 PRO (Tecan) při doporučených vlnových délkách výrobcem, v případě použití substrátu TMB od firmy Sigma-Aldrich se měřilo při 450 nm s korekcí při 630 nm. Pro hodnocení byl použit program Magellan (Tecan).

4.1.8.5 Stanovení intracelulární produkce cytokinů INF- γ a IL-21

K buňkám, které byly nasazeny do testu, byl po 2 hod inkubace přidán BD GolgiPlug (BD Biosciences) v koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Po 20 hod byly buňky 2x promyty PBS a následně

barveny LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes, Life Technologies) ředěném 1:100 v PBS 20 min ve tmě při pokojové teplotě. Buňky byly promyty FACS pufrem a fixovány eBioscience IC Fixation Buffer (Thermo Fischer Scientific) 20 min ve tmě při pokojové teplotě. Buňky byly promyty permeabilizačním pufrem eBioscience Permeabilization Buffer (Thermo Fischer Scientific) a poté barveny 30 min ve tmě při pokojové teplotě protilátkami ředěnými ve stejném permeabilizačním pufru. Byly použity následující protilátky: anti-CD3 BV786, anti-INF-g PE, a anti-IL-21 APC. Buňky byly 2x promyty FACS pufrem a resuspendovány ve FACS pufru a analyzovány na průtokovém cytometru.

4.2 Práce s DNA

4.2.1 Plazmidy

Seznam všech používaných nebo nově zkonstruovaných plazmidů je uveden v příloze č. 1.

4.2.2 Elektroforéza DNA

K separaci DNA byl používán agarózový gel 0,5-3% (SeaKem, Lonza). Pro vizualizaci bylo používáno fluorescenční činidlo GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain (Biotinum). Jako markery molekulové hmotnosti byly používány MassRuler low range DNA Ladder (Thermo Scientific), Lambda DNA/Eco 130I (StyI) Marker 16 (Fermentas) a GeneRuler DNA Ladder, Low Range (Fermentas). Gel byl dokumentován na přístroji UVP EC3 Imaging System (UVP).

4.2.3 Izolace DNA

Izolace DNA z gelu

Pro izolaci DNA z gelu byl používán komerční kit Gel Extraction Kit (Qiagen; ID 28604) podle přiloženého manuálu.

Izolace DNA z bakterií

Pro izolaci čisté plazmidové DNA byly používány komerční kity QIAprep Spin Miniprep Kit, a dále Qiagen Plasmid Midi, Maxi a Giga Kit (vše firma Qiagen). Protokoly pro izolaci jsou součástí kitů. Plazmidy byly rozpuštěny v TE pufru o výsledné koncentraci 2-5 µg/ul s výjimkou plazmidů, které byly sekvenovány, ty se rozpouštěly v deionizované vodě.

Pro izolaci DNA, která sloužila pouze k restričnímu ověření získaných klonů, byly využity pufrы P1, P2 a P3 z předchozích kitů. DNA byla izolována z 1 ml bakteriální kultury narostlé přes noc. Po stočení buněk při 5.000 g 10 min při pokojové teplotě byla peleta resuspendována v 150 µl pufru P1. K resuspendované peletě se přidalo 150 µl pufru P2, opatrně promíchalo a nechalo 5 min lyzovat při pokojové teplotě. Přidáním 210 µl pufru P3 se srazilily proteiny, které byly odstraněny centrifugací 10 min při 15.000 g při teplotě 4°C. DNA byla precipitována přenesením čistého supernatantu do nové zkumavky a přidáním 1 ml isopropanolu (Penta) s následnou centrifugací 10 min při 15.000 g při teplotě 4°C. Peleta DNA byla promyta 200 µl chlazeným 70% etanolem (Penta) a znovu stočena 5 min při otáčkách 15.000 g a teplotě 4°C. Poté byla peleta vysušena při laboratorní teplotě a resuspendována ve 20 µl deionizované vodě.

4.2.4 Stanovení koncentrace DNA

Množství DNA bylo stanoveno na přístroji NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

4.2.5 Klonování

Restriční štěpení DNA

Pro štěpení DNA byly používány restriční enzymy a pufrы od firmy New England Biolabs. Pro získání fragmentů pro klonování bylo štěpeno 5 µg plazmidu enzymem o koncentraci 1U/1µg DNA ve 20 µl reakci 2 hod při teplotě 37°C (resp. teplotě doporučené výrobcem pro daný enzym). Pro běžné restriční ověření bylo štěpeno 0,5 µg DNA v 10 µl reakci za stejných podmínek.

Defosforylace 5' konců DNA

Pro defosforylaci byl používán enzym CIP (Calf Intestinal Phosphatase) od firmy New England Biolabs, který byl přidán po štěpení DNA přímo do restriční reakce. Defosforylace probíhala 30 min při 37°C s následnou inaktivací enzymu CIP přidáním 1,5 µl 10% SDS, 1,5 µl 0,5M EDTA a 6 µl vody a inkubací 30 min při 80°C.

Ligace

Pro ligaci konců DNA byl používán enzym T4 DNA Ligase od firmy New England Biolabs. Ligační reakce byla připravena podle přiloženého manuálu. Jako kontroly byly paralelně

míchány 2 ligační reakce, kde v první reakci byl vynechán insert (pro kontrolu ověření účinnosti fosfatázy, pro vyloučení recirkulizace vektoru), v druhé reakci byl vynechán insert a ligáza (pro vyloučení nenaštěpeného vektoru). DNA byla ligována 12 hod při teplotě 16°C.

Klonování metodou In-Fusion

V některých případech byly vektory klonovány pomocí metody In-Fusion. Reagencie byly od firmy Clontech – CloneAmp HiFi PCR premix a 5x In-Fusion HD Enzyme Premix. Postup pro PCR a klonování In-fusion se držel manuálu přiloženého výrobcem.

Seznam použitých primerů a oligonukleotidů

Název	Sekvence	Modifikace konců
C4	AATCCAGTCCTCTGGTGTGC	
H98 oligo 1	CGGAGGTTTGTGGGTCCGTATGAGTTGTGGGAGCTTCTCAT GGAGGC AAGCTT GGTAC	5'-fosfát
H98 oligo 2	CAAGCTT GCCTCCATGAGAAAGCTCCCACAACCTCATACGGACC CAACAA ACCTCCGGTAC	5'-fosfát
D12 oligo 1	CGGAGGTTGGCTGGAGATGCACTGGCCCGCACACTCCGGAGG CAAGCTT GGTAC	5'-fosfát
D12 oligo 2	CAAGCTT GCCTCCGGAGTGTGCGGGCCAGTGCATCTCCAGCC AACTCC GGTAC	5'-fosfát
FLAG oligo 1	AGCTTGGAGGCGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCGGT CC CGGGA	5'-fosfát
FLAG oligo 2	AGCTT CCCGGG ACCGCCCTTGTGCGTCATCGTCTTTGTAGTCGC CTCCA	5'-fosfát
3xFLAG oligo1	AGCTTGGAGGCGACTACAAGGACCACGACGGTGACTACAAGG ACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGGGCGGT CCGGGA	5'-fosfát
3xFLAG oligo2	AGCTT CCCGGG ACCGCCCTTGTGCGTCGTCGTCCTTGTAGTCGA TGTCGTGGTCCCTTGTAGTCACCGTCGTGGTCCCTTGTAGTCGCC TCCA	5'-fosfát
CD20 epitop oligo 1	CGGAGGTTGTTGGTGGGAGTGGACCATCGGCTGCGGAGGC AA GCTT GGTAC	5'-fosfát
CD20 epitop oligo 2	CAAGCTT GCCTCCGCAGCCGATGGTCCACTCCCACCAACAACCTC CGGTAC	5'-fosfát
12P oligo 1	CGGAGGTGACCACACCTTGTACACCCCCTACCACACACACCCT GGAGGC AAGCTT GGTAC	5'-fosfát
12P oligo 2	CAAGCTT GCCTCCAGGGTGTGTGTGGTAGGGGGTGTACAAGGTG TGGTCACCTCCGGTAC	5'-fosfát
12P N oligo 1	CGCGTGGCGGGCGGTGGCGACCACACCTTGTACACCCCCTACCA CACACACCCTGGCGGCGGTGGCCCGGGA	5'-fosfát
12P N oligo 2	CGCGT CCCGGG GCCACCGCCGAGGGTGTGTGTGGTAGGGGGT GTACAAGGTGTGGTCCGACCGCCGCA	5'-fosfát
CD34 oligo 1	AGCTTAGCGGGCGGAGGCGAGCTGCCACCCAGGGCAC CTT CAGCAACGTGTCCACCAACGTGTCCCCCGCAAGCCCACC ACCGCCCC GGGA	5'-fosfát
CD34 oligo 2	AGCTT CCCGGG GGCGGTGGTGGGCTTGGCGGGGACACGTTGGT GGACACGTTGCTGAAGGTGCCCTGGGTGGGAGCTCGCTGCCTCC GCCGCCGCTA	5'-fosfát
CD25a oligo mimotop 1	CGGCGGCGGAGGCTCCTGCTGGTATCACTACATCTGGGAGTGC TCCGGCGGCGGAGGC AAGCTT GGTAC	5'-fosfát

CD25a mimotop oligo 2	CAAGCTT GCCTCCGCCGCGGAGCACTCCCAGATGTAGTGATAC CAGCAGGAGCCTCCGCCGCGGTAC	5'-fosfát
CD25a endo oligo 1	CGGCGGCGGAGGCTCCTGCGAGCGGATCTACCACTTCGTGTGC TCCGGCGGCGGAGGC CAAGCTT GGTAC	5'-fosfát
CD25a endo oligo 2	CAAGCTT GCCTCCGCCGCGGAGCACACGAAGTGGTAGATCCGC TCGAGGAGCCTCCGCCGCGGTAC	5'-fosfát
E72 oligo 1	CGGAGGT GTGCTGCCAAGACCCTGTGCGGCGGCGGAAGCGG AGGC CAAGCTT GGTAC	5'-fosfát
E72 oligo 2	CAAGCTT GCCTCCGCTTCCGCCCGCACAGGGTCTTGGGCAGC ACACCTCCGGTAC	5'-fosfát
CD20 epitop 2 oligo 1	CGGCGGCAGCT GCCCC TACTCCAACCCTTCCCTGTGCAGCGGC GGC CAAGCTT GGTAC	5'-fosfát
CD20 epitop 2 oligo 2	CAAGCTT GCCGCCGCTGCACAGGGAAGGGTTGGAGTAGGGGCAG CTGCCGCCGGTAC	5'-fosfát
Rp5-L oligo 1	CGGAGGTTCC CAGGACAAGTTGACCCAGTGGCCTAAGTGGCT GGAGTCCGGAGGC CAAGCTT GGTAC	5'-fosfát
Rp5-L oligo 2	CAAGCTT GCCTCCGGACTCCAGCCACTTAGGCCACTGGGTCAACT TGTCTGGGAACCTCCGGTAC	5'-fosfát
T2A IL21 forward	TGGAAGAAAACCCGGGCCCGATGAGGTCAAGTCTGGCAACATG GAACGCATTGTGATTTGCCTGA	
T2A IL21 reverse	AACAAAACCTTTAACTAGTATGTTCGACCC	

Tab. 10: Sekvence primerů a oligonukleotidů

- všechny primery a oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Generi-Biotech
- u oligonukleotidů je tučně zvýrazněna sekvence kódující epitop a barevně zvýrazněna restriční místa štěpení, která pak sloužila jako unikátní místa k ověření vložení epitopu do nově konstruovaných vektorů (viz **kapitola 5.3.1**):
 - červeně: HindIII
 - modře: XmaI

Párování oligonukleotidových sekvencí

Pro annealing oligonukleotidů byla namíchána reakce obsahující 2 μ l každého oligonukleotidu o výsledné koncentraci 1 μ g/ μ l, 5 μ l pufru 10x NEBuffer 4 (New England Biolabs) a doplněné deionizovanou vodou na konečný objem 50 μ l.

Annealing oligonukleotidů byl docílen během řízeného poklesu teploty z 98°C na 28°C při změně teploty 1°C/2min na cykléru C1000 touch Thermal Cycler (BioRad). Spárované oligonukleotidy byly ředěny v poměru 1 μ l reakční směsi a 250 μ l deionizované vody. Pro ligaci byl použit poměr 1 μ l naředěných spárovaných oligonukleotidů a 100 ng štěpeného plazmidu na 20 μ l ligační reakce (viz **kapitola 4.2.5 Ligace**). Pro transformaci kompetentních bakterií pak byly použity 2 μ l z ligační směsi.

PCR

PCR sloužila k určení počtu vložených tagů do vektorů (viz **kapitola 5.3.1**). PCR reakce o celkovém objemu 10 μ l byla namíchána z 2x koncentrovaného gb SG PCR Master Mix (Generi-Biotech) a dvojice primerů C4 a příslušného oligo1, každý o výsledném množství 1 pmol. Jako templát byl přidán 1 μ l vyzolované DNA z bakterií (metodou izolace pro restriční ověření klonů). Byl použit cyklér C1000 touch Thermal Cycler (Bio-Rad). PRC produkty pak byly analyzovány elektroforeticky.

Používaný program (Touchdown PCR):

- | | | | |
|----|-------|------------------------|-------|
| 1. | 95 °C | 4 min | |
| 2. | 94 °C | 1 min | } 30x |
| 3. | 75 °C | 30 s; -1 °C each cycle | |
| 4. | 72 °C | 1 min | |
| 5. | 94 °C | 1 min | } 30x |
| 6. | 57 °C | 30 s | |
| 7. | 72 °C | 30s | |
| 8. | 95 °C | ∞ | |

Sekvenování

Pro sekvenování byly připraveny vzorky o celkovém objemu 8 μ l, které obsahovaly primer C4 v množství 5 pmol a plazmidovou DNA v množství 3ng/100pb. Další reagentie byly přidány servisním pracovištěm PřF UK, Laboratoří sekvenace DNA a následně sekvenovány. Délka přečtené sekvence byla 400 bp.

Použité programy

Pro *in silico* klonování byly použity programy Clone Manager 6 (Sci-Ed Software) a SnapGene 4.1 (GSL Biotech).

4.3 Práce s bakteriemi

4.3.1 Bakteriální kmeny

Escherichia coli kmen HST08 (Stellar Competent Cells)

- komerční chemicky ošetřené kompetentní buňky od firmy ClonTech
- kultivované při teplotě 37°C

Escherichia coli kmen Stbl2

- získáno z PřF UK

- kultivované při teplotě 30°C

Escherichia coli kmen XL-1 Blue

- získáno z PřF UK
- kultivované při teplotě 37°C

4.3.2 Média pro kultivaci bakterií

LB agar High Salt (Duchefa Biochemie, T1507.0100)

LB Broth Low Salt (Duchefa Biochemie, L1703.0500)

Používaná selekční antibiotika

Ampicilin (BB Pharma) – přidáno do média na konečnou koncentraci 100 µg/ml

Kanamycin (USB Corporation) – přidáno do média na konečnou koncentraci 50 µg/ml

4.3.3 Příprava kompetentních bakterií

Pokud nebyly použity komerční kompetentní buňky (Stellar Competent Cells, Clontech), byly kompetentní bakterie připraveny následujícím způsobem. Z inokula bylo zaočkováno 200 ml tekutého LB média a bakteriální kultura se nechala růst při 37°C/30°C do optické denzity $OD_{A600} = 0,6$. Poté byly buňky na 15 min přeneseny na led. Buňky byly stočeny při 7.000 g 10 min 4°C. K peletě se pomalu přikapávalo 15 ml studeného 0,1M CaCl₂ a buňky byly opatrně resuspendovány a znovu ponechány 15 min na ledu. Po následném stočení při 5.000 g 10 min 4°C byly opatrně resuspendovány ve 4 ml roztoku 0,1M CaCl₂ a 15% glycerolu, rozplněny po 50 µl do zkumavek a nechány několik hodin na ledu. Následně byly uskladněny při teplotě -80°C. Takto připravené buňky byly používány po dobu 6 měsíců.

4.3.4 Transformace bakterií

Komerční kompetentní buňky (Stellar Competent Cells, Clontech) byly transformovány podle protokolu přiloženého výrobcem. Ostatní buňky byly transformovány podle následujícího postupu. Kompetentní buňky byly rozmrazeny na ledu, poté k nim byl přidán 1 ng cirkulární DNA nebo 2 µl ligační směsi, buňky byly inkubovány 20 min na ledu. Následoval teplotní šok při 42°C po dobu 45 s následovaný okamžitým zchlazením na ledu po dobu 2 min. K buňkám byl přidán 1 ml LB média bez antibiotika. Buňky byly třepány 2 hod při teplotě 37°C/30°C při otáčkách 200 rpm. Poté byly vysety o různé koncentraci na pevný LB agar s příslušným selekčním antibiotikem.

4.4 Pokusy se zvířaty

Pokusy na zvířatech byly prováděny v Centru pro experimentální biomodely 1. LF UK podle §15d odst. 3 (navrhování pokusů a projektů pokusů) a odst. 4 (provádění pokusů na pokusných zvířatech, péče o pokusná zvířata a usmrcování pokusných zvířat) zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Příprava buněk pro aplikaci myším

Byly připraveny dvě skupiny CAR-T lymfocytů. První skupina mononukleární buněk byla elektroporována třemi plazmidy pBASE, pPB PSMA CAR myc a pPB mCherry. Druhá skupina byla elektroporována třemi plazmidy pBASE, pPB PSMA CAR myc H98 CD34 a pPB GFP. Následující den po elektroporaci byly buňky aktivované protilátkou anti-myc imobilizovanou na plastik a k buňkám byly přidány cytokiny IL-2, IL-4 a IL-7. Buňky byly udržované v exponenciální fázi po dobu asi 14 dnů. Následně byla ověřena úspěšnost elektroporace barvením protilátkou anti-scFv AF647 společně s detekcí příslušného fluorescenčního proteinu (GFP/OFP) na průtokovém cytometru.

Z těchto dvou skupin po dvojím promytí PBS byla připravena směs CAR-T lymfocytů v poměru 1:1 o koncentraci 25 mil buněk / 1 ml PBS.

Aplikace CAR-T buněk myším¹³

Experimentální skupiny tvořily 3 imunodeficientní myši NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (Jackson Laboratory) samičího pohlaví a stáří 6 týdnů. Myším byla intravenózní injekcí do ocasu aplikována dávka 100 mil CAR-T buněk. Zároveň byl stejným způsobem myším podán trastuzumab o dávce 1 nebo 0.2 µg. Kontrolním myším nebyl trastuzumab aplikován. Za 24 hod byla všem myším z ocasní žíly do heparinu odebrána krev a první skupině znovu podán trastuzumab o dávce 1 µg. Za dalších 48 a 120 hod byla myším znovu odebrána žilní krev. Myši byly šestý den po aplikaci usmrceny a byla jim odebrána slezina.

Analýza buněk na průtokové cytometru¹²

Krevní buňky po lyzi červených krvinek (lyzačním pufrem o složení 8,3 mg NH₄CL / 1 ml 0,01 M tris-HCl pH 7,5; chemikálie od firmy Sigma-Aldrich) byly analyzovány na FACSu na

¹³ Pokusy provedl dr. Otáhal.

základě detekce GFP/OFP. Slezina byla mechanicky rozbita a pipetováním rozdisociována na jednotlivé buňky, které byly stejným způsobem analyzovány na FACSu.

4.5 Statistické vyhodnocení

Data byla statisticky vyhodnocena pomocí párového t testu v programu GraphPad Prism 7 (GraphPad).

5. VÝSLEKDY

5.1 Bispecifické CAR receptory pro léčbu hematologických malignit

Cílem této první experimentální části práce bylo ověřit funkčnost nových bispecifických CAR receptorů namířených proti maligním buňkám vycházejících z B-lymfocytární řady. Jako cílové antigeny byly vybrány CD19 a CD20. Jde o ideální cílové antigeny, dobře validované, s expresí výhradně na prekurzorových a zralých B-buňkách. CAR-T lymfocyty cílené na tyto antigeny se s velkým úspěchem používají pro léčbu B-ALL, B-NHL nebo folikulárního lymfomu.

Důvodem pro přípravu receptorů, které jsou specifické pro více antigenů zároveň, je snaha zvýšit protinádorový účinek CAR-T lymfocytů tím, že se zabrání maligním klonům uniknout smrti v případě, že přestanou exprimovat jeden z antigenů.

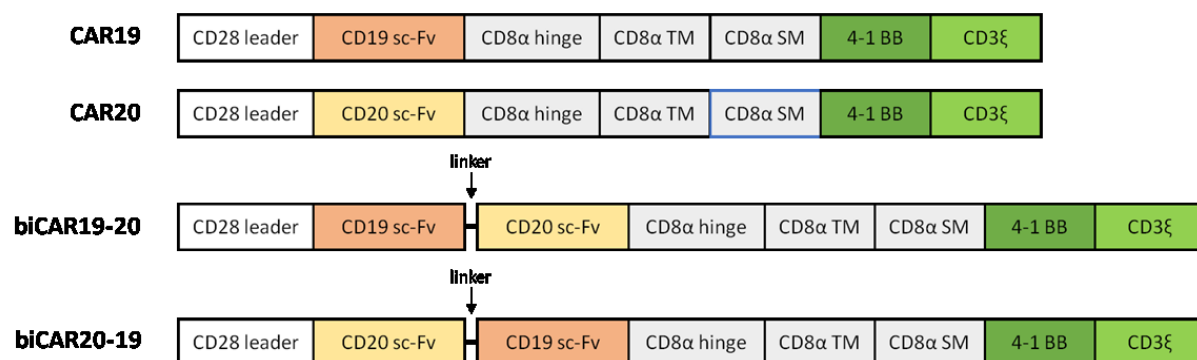
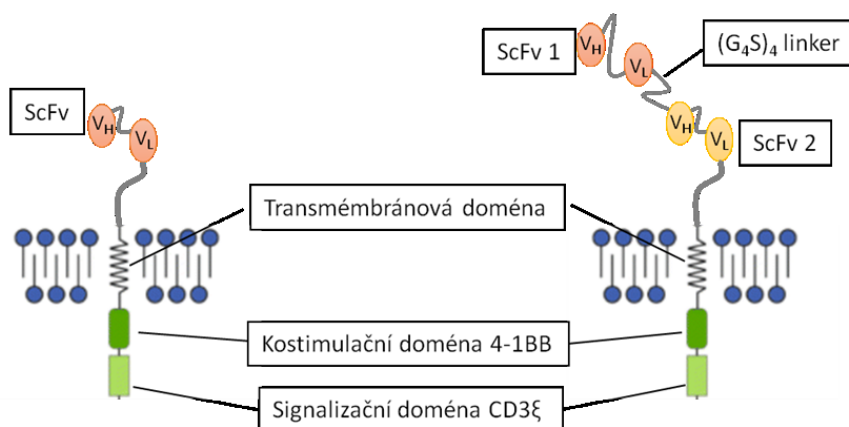
5.1.1 Konstrukce bispecifických CAR receptorů

Lentivirové plazmidy pLV CAR19 a pLV CAR20 byly zkonstruovány v laboratoři již dříve a jsou podrobněji popsány v publikaci [204]. Receptor CAR19 je odvozen od myší monoklonální protilátky anti-CD19, klon B-D3 a receptor CAR20 od myší monoklonální protilátky anti-CD20, klon MEM-97. Sekvence obou CAR receptorů kódují ve směru 5' → 3' následující podjednotky – signální sekvenci pro směřování receptoru do plazmatické membrány, jednořetězcový variabilní fragment (ScFv) anti-CD19 nebo anti-CD20 a kostimulační molekulu 4-1BB spojenou se sekvencí pro podjednotku molekuly CD3 ζ (**obr. 17**). Z těchto dvou plazmidů vychází i nově zkonstruované bispecifické plazmidy pLV biCAR19-20 a pLV biCAR20-19. Jsou navrženy tak, aby každý CAR receptor rozpoznával současně dva povrchové antigeny CD19 a CD20. Jde o identické konstrukty, liší se pouze pořadím vazebných domén, které jsou odděleny krátkým linkerem (G₄S)₄ (**obr. 17**). Sekvence bispecifických CAR receptorů byly vloženy do lentivirového vektoru pWPXLd¹⁴ výměnou za gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Exprese receptorů je řízena eukaryotickým promotorem EF-1 α , který zajišťuje stabilně vysokou hladinu transgenů v savčích buňkách. Celá sekvence je ohraničena specifickými sekvencemi LTR (long terminal repeat), které zajišťují její integraci do genomu hostitelské buňky během virové transdukce.

K ověření exprese konstruktů byly plazmidy přechodně transfekovány do buněk HEK 293T. Za 48 hod po transfekci se pomocí průtokové cytometrie úspěšně detekovala povrchová exprese obou vektorů. Ze stejných buněk byl připraven buněčný lyzát k ověření exprese CAR

¹⁴ Mapa vektoru pWPXLd je součástí přílohy č. 2

receptorů pomocí metody Western Blot. Proteiny byly detekovány protilátkou anti-CD3ξ s očekávanou velikostí 58 kDa¹⁵.



Obr. 17: Schématické znázornění monospecifického a bispecifického CAR receptoru.

Jde o receptory 2. generace s kostimulační doménou 4-1BB. Monospecifické CAR receptory nesou fragment scFv, který je specifický pro antigen CD19 nebo CD20. V případě bispecifických CAR receptorů jsou stejné fragmenty scFv vloženy za sebou a odděleny krátkým linkerem.

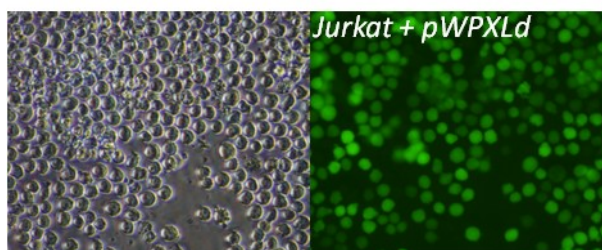
5.1.2 Příprava lentivirů

Lentiviry byly produkovány buňkami HEK 293T kotransfekovanými pomocnými plazmidy pSPAX, pMDL2G a lentivirovými vektory s monospecifickými (CAR19 a CAR20) a bispecifickými (biCAR19-20 a biCAR20-19) receptory. Zároveň byly buňky transfekovány i vektorem pWPXLd nesoucí gen pro GFP. Viry s tímto proteinem pak následně sloužily jako pozitivní kontrola transdukce.

Pro ověření správného sbalení lentivirových partikulí byly čerstvé lentivirové supernatanty použity k transdukci buněk Jurkat. Kontrolní buňky infikované virem s GFP vykazovaly již

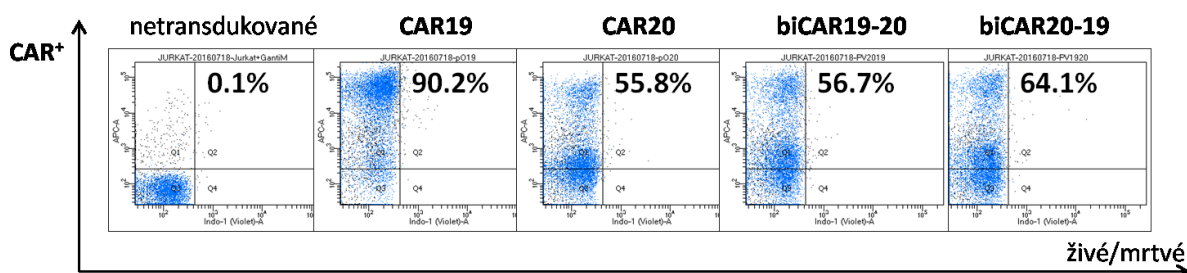
¹⁵ Bispecifické vektory byly zkonstruovány dr. Šrollerem, který provedl i ověření povrchové exprese na FACSu a ověření metodou Western Blot.

48 hod po transdukci vysokou expresi GFP, jak je patrné z obrázku z fluorescenčního mikroskopu (**obr. 18**). Analýzou průtokové cytometrie pak 5. den po transdukci bylo v této kontrolní skupině detekováno 98% GFP pozitivních živých buněk. Stejný den byly analyzovány i buňky Jurkat transdukované CAR receptory. Protože CAR receptory jsou odvozené od myších monoklonálních protilátek, k detekci povrchové exprese CAR receptorů byla použita anti-scFv, kozí protilátka proti myši (goat anti-mouse), konjugovaná s AlexaFluor 647 (AF647). Jako negativní kontrola byly stejnou protilátkou barveny netransdukované buňky Jurkat. Výsledek měření je ukázán na **obr. 19**. Z něj je patrné, že se úspěšně podařilo připravit funkční lentivirové partikule schopné infikovat cílové buňky s poměrně vysokou účinností. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u konstruktů CAR19, který infikoval 90% buněk, u ostatních konstruktů bylo dosaženo menší účinnosti transdukce (50-70%). U těchto konstruktů je patrná i rozdílná exprese, kdy je vidět dvojí populace buněk s vysokou expresí (srovnatelnou s CAR19) a populace s nižší expresí CAR receptorů.



Obr. 18: Buňky Jurkat infikované virem s GFP

Buňky 48 hod po transdukci zachycené ve viditelném světle a pod UV.



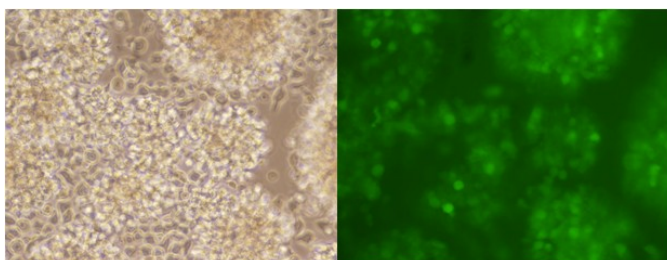
Obr. 19: Povrchová exprese CAR receptorů v buňkách Jurkat.

Buněčná linie Jurkat byla transdukována lentiviry s mono- a bispecifickými CAR receptory. Pátý den po transdukci byly buňky obarveny protilátkou anti-scFv konjugovanou s AF647 a analyzovány pomocí FACSu. Obarvené netransdukované buňky sloužily jako kontrola pro nastavení pozitivní exprese CAR. DAPI bylo použito k rozlišení mrtvých buněk v populaci.

5.1.3 Příprava T-buněk exprimujících bispecifické CAR receptory

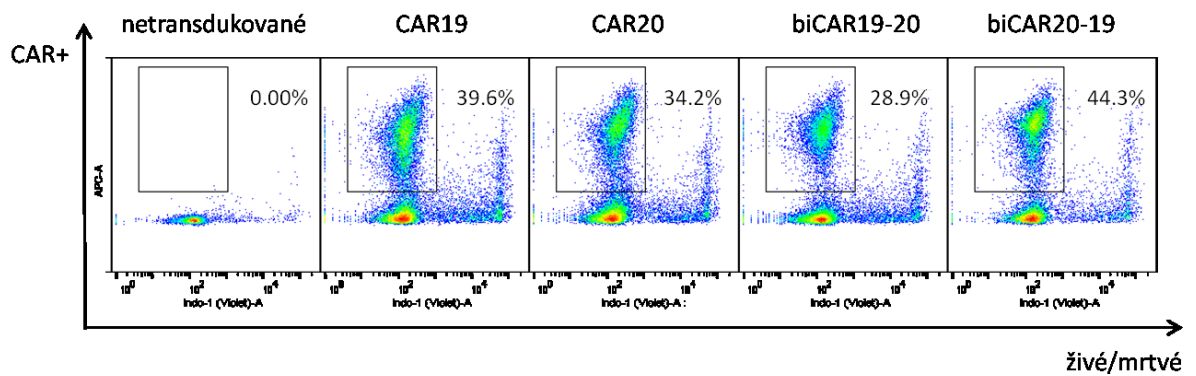
CAR-T buňky byly připravené z čerstvě vyizolovaných mononukleárních buněk, které byly infikovány čerstvě sebraným lentivirovým supernatantem a stimulovány monoklonálními protilátkami anti-CD3 a anti-CD28. Za 24 hod byly buňky znovu reinfikovány. Spolu s tím byly i připraveny kontrolní T-lymfocyty, které byly infikovány virem s GFP. T-buňky byly udržovány 3-4 týdny v exponenciální fázi růstu (1.000-2.000 b/ml) v médiu RPMI-1640 s přidávkou IL-2 v množství 1.000 U/ml. Tímto způsobem byly připraveny lymfocyty od šesti dárců.

Expres transgenů byla ověřována pomocí průtokové cytometrie 10-14 dnů po transdukcii. Účinnost transdukce u kontrolních T-lymfocytů exprimujících GFP byla mezi 30-60%. Stejná úspěšnost transdukce byla u skupiny modifikované CAR19 receptorem, kde bylo detekováno 40-50% pozitivních buněk. Druhý monospecifický CAR20 receptor se exprimoval s větší variabilitou, kdy od jednotlivých dárců se podařilo připravit CAR-T lymfocyty s 15-43% pozitivitou na receptor. Úspěšnost transdukce bispecifickými CAR receptory byla 42-49% pro biCAR19-20 a 28-33% pro biCAR20-19. Na **obr. 21** je výsledek analýzy CAR-T buněk připravených od jednoho dárce.



Obr. 20: T-lymfocyty infikované virem s GFP

Několik kolonií T-buněk 5 dní po transdukcii zachycené ve viditelném světle a pod UV.



Obr. 21: Povrchová exprese CAR receptorů v T-lymfocytech.

Primární T-buňky byly transdukovány mono- a bispecifickými konstrukty, stimulovány protilátkami anti-CD3 a anti-CD28 a expandovány. Po 14-ti denní kultivaci byly buňky obarveny protilátkou anti-scFv AF647 a analyzovány pomocí FACSu. Obarvené netransdukové lymfocyty sloužily jako kontrola pro nastavení positivity. DAPI bylo použito k rozlišení mrtvých buněk v populaci.

5.1.4 Funkční charakterizace bispecifických CAR-T lymfocytů

Podářilo se připravit lymfocyty exprimující CAR receptory od několika dárců. Následně bylo nutno ověřit i jejich funkčnost, tj. zda jsou schopné rozpoznat cílový antigen, vyvolat aktivační signál přes CAR receptor a zprostředkovat vysokou a specifickou cytotoxicitu.

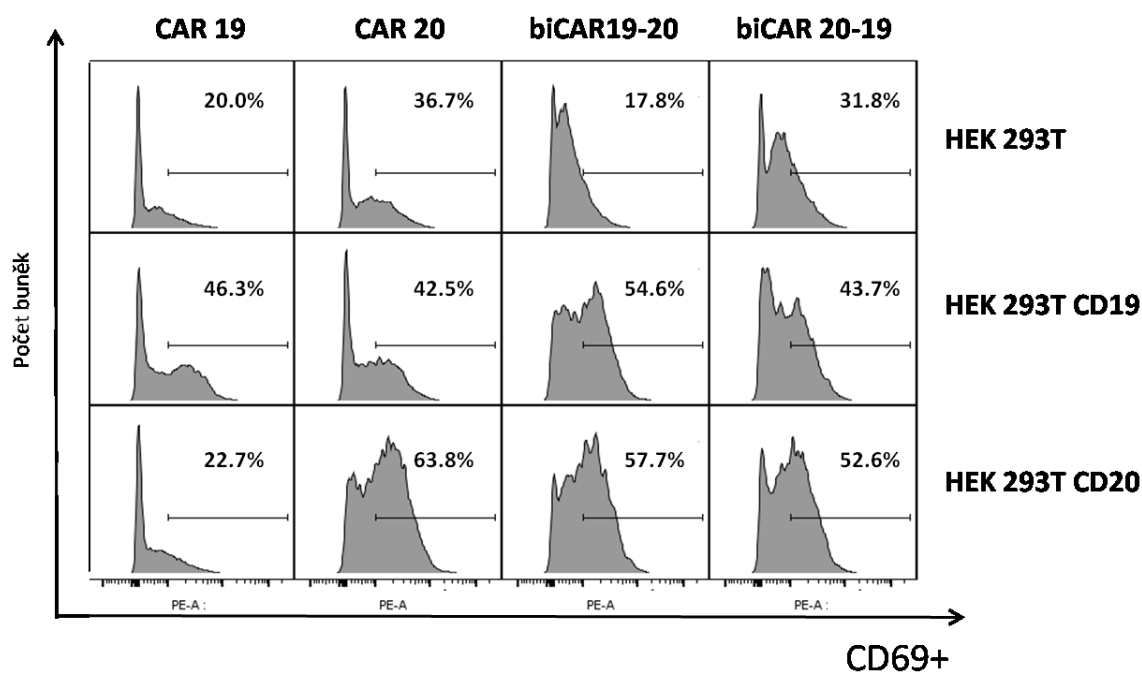
K tomu bylo potřeba připravit cílové buňky, které by exprimovaly CD19 a CD20. Buňky HEK 293T byly transiálně transfekovány expresními plazmidy pCMV6-XL5-CD19 a pCMV-Neo-Bam-CD20, případně oběma kotransfekovány. Za 48 hod po transfekci byla pokaždé ověřena povrchová exprese antigenů pomocí FACSu. Transfekované buňky byly barveny protilátkou anti-CD19 FITC nebo anti-CD20 PE. Netransfekované barvené HEK 293T sloužily jako negativní kontrola. Transfekcí se dařilo připravit kolem 55-72% CD19+ a 85-92% CD20+ pozitivních buněk HEK 293T.

Nejdříve byla měřena cytotoxicita protinádorových T-lymfocytů. Snahou bylo kultivovat v různých poměrech CAR-T lymfocyty s terčovými buňkami, které byly značeny CFSE¹⁶. Cytolytická aktivita T-lymfocytů byla hodnocena po 24-48 hod kultivaci měřením mrtvých CFSE+ terčových buněk na FACSu. Toto provedení pokusů se ukázalo jako problematické, protože transfekované buňky po obarvení CFSE a následném smíchání s lymfocyty již plně neadherovaly k povrchu kultivačního plastiku. Ze získaných údajů o počtu mrtvých buněk v jednotlivých skupinách nešlo udělat jednoznačný závěr o cytolytické aktivitě CAR-T buněk.

¹⁶ CFSE je vitální barvivo, které prochází membránou. V buňkách je intracelulárními esterázami přeměněno na membránou nepropustnou sloučeninu, která je fluoreskující. CFSE tak netoxicky označí buňky, značení vydrží několik dní.

Změřené hodnoty ukazovaly na to, že terčové buňky umíraly spíše v důsledku neschopnosti adherovat než v důsledku lýze.

Ověření funkčnosti CAR receptorů na stejném systému terčových buněk bylo nakonec provedeno alternativními testy. Byla sledována aktivace CAR-T buněk po navázání receptoru na antigen na základě exprese časného aktivačního markeru CD69 a následně sledována produkce INF- γ . K přisedlým buňkám HEK 293T CD19+, HEK 293T CD20+ (ev. dvojité pozitivním) nebo kontrolním HEK 293T byly po opatrném odsátí kultivačního média přidány CAR-T lymfocyty v RPMI médiu bez cytokinů. Za 24 hod byla buněčná suspenze sebrána, centrifugací oddělené médium bylo metodou ELISA vyšetřeno na množství vyprodukovaného INF- γ . Buňky byly obarveny protilátkami anti-scFv AF647 (k odlišení efektorových a terčových buněk) a anti-CD69 PE. Změny v expresi molekuly CD69 jsou ukázány na **obr. 22**. Rozdíly v počtu CAR+ CD69+ buněk jsou vidět už mezi jednotlivými skupinami mono- a bispecifickými CAR-T lymfocyty v kontrolní skupině kultivované s terčovými buňkami neexprimující žádný antigen. Je možné, že i samotné buňky mohou částečně nespecificky aktivovat lymfocyty. Tyto změny jsou pravděpodobně způsobené rozdílně aktivovanými lymfocyty, které byly do testu nasazeny a které jsou způsobené samotnou kultivací CAR-T buněk při expanzi. Podstatnější jsou ale změny v počtu CAR+ CD69+ buněk při kokultivaci s terčovými buňkami nesoucí cílový antigen. To je patrné u monospecifických CAR-T lymfocytů, kde došlo až k dvojnásobnému nárůstu počtu buněk pozitivních na CD69, pokud byly kultivované s buňkami pozitivními na cílový antigen. Zatímco k téměř žádné změně nedošlo u lymfocytů kultivovaných s buňkami pozitivními na druhý antigen (ne cílový) a počet aktivovaných lymfocytů odpovídá skupině lymfocytů kultivovaných jen s buňkami HEK 293T. U bispecifických CAR-T lymfocytů došlo k aktivaci molekuly CD69 po kultivaci jak s CD19+ tak i CD20+ terčovými buňkami. Porovnáním výsledků pro bispecifické CAR-T lymfocyty se zdá, že by mohl lépe fungovat biCAR19-20, protože jsou tam výraznější rozdíly v počtu aktivovaných buněk.

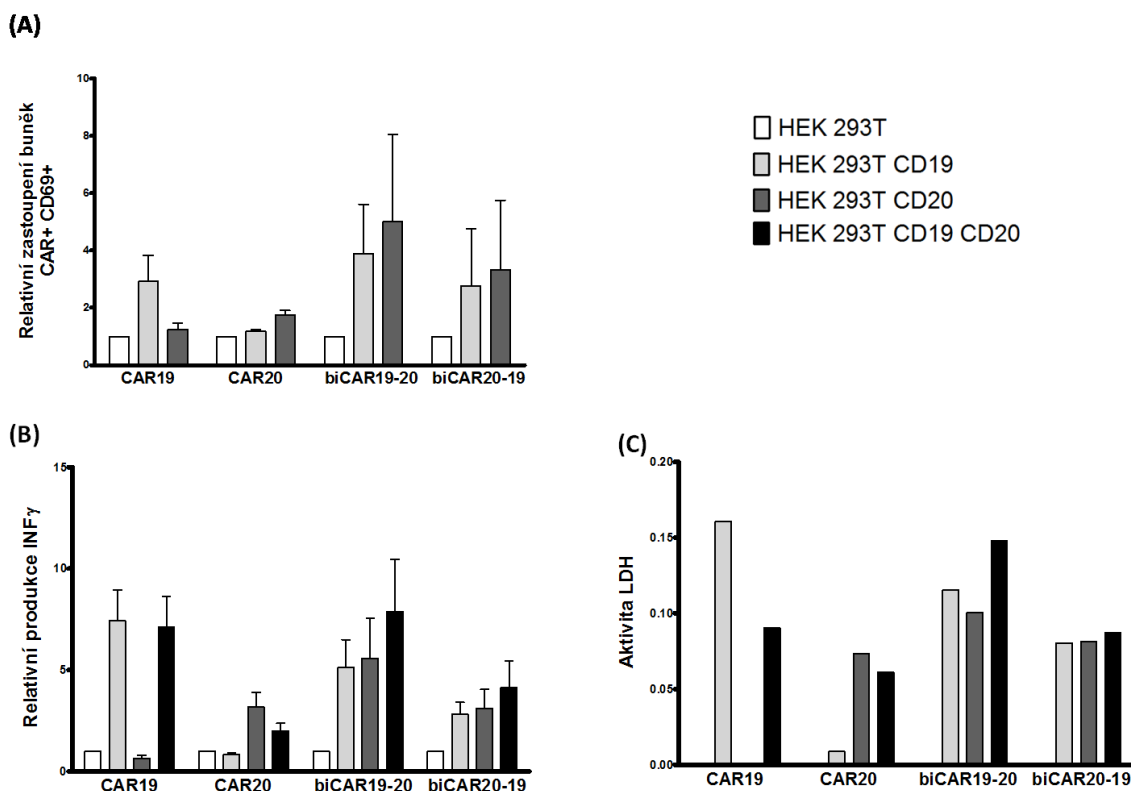


Obr. 22: Expresе časného aktivačního markeru CD69

CAR-T lymfocyty byly 24 hod kultivované s terčovými buňkami. Celá buněčná suspenze pak byla obarvena protilátkami anti-scFv AF647 a anti-CD69 PE a analyzovány na FACSu. Změny exprese molekuly CD69 jsou ukázány na histogramech, které byly nastaveny pro gate CAR+ a zároveň DAPI-. Netransdukované lymfocyty barvené anti-scFv sloužily jako kontrola k nastavení positivity CAR receptoru.

Stejný pokus byl ověřen ještě dvakrát s lymfocyty připravenými od jiných dvou dárců. Výsledky ze všech třech aktivačních testů pak shrnuje graf na **obr. 23A**. Pro lepší porovnání mezi mono- a bispecifickými CAR-T lymfocyty je počet buněk CAR+ CD69+ vynesena relativně, kdy jednotlivé skupiny CAR-T lymfocytů kultivované se samotnými buňkami HEK 293T jsou vyneseny jako 1 (100%) a ostatní skupiny jsou k této hodnotě staženy. Trend v aktivaci CD69 byl potvrzen. Opět se ukazuje, že pravděpodobně biCAR19-20 receptor bude zprostředkovávat lepší aktivaci buněk. Změny jsou bez statistické významnosti, což pravděpodobně způsobily zmíněné rozdílné změny v expresi CD69 buněk nasazených do testu, možnou roli hraje i variabilita dárců.

Stejným způsobem je vynesena graf i pro hladiny INF- γ , který byl změřen v médiu po skončení kokultivace (**obr. 23B**) a dá se i stejně interpretovat, což jen potvrzuje předchozí výsledky.



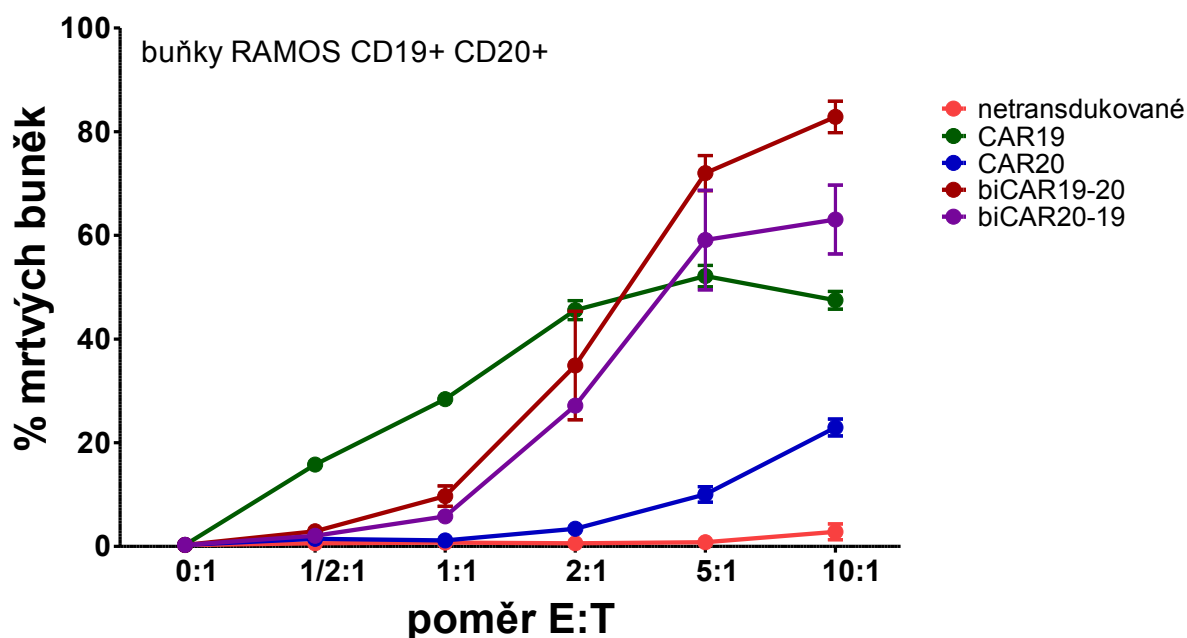
Obr. 23: Aktivace a cytotoxicita mono- a bispecifických CAR-T lymfocytů

- (A)** Exprese časného aktivačního markeru CD69. Změny hladiny exprese CD69 po aktivaci buňkami exprimující/neexprimující cílový antigen. Výsledek je ze dvou nezávislých pokusů s lymfocyty od dvou různých dárců. Pro názornější srovnání, počet CD69+ buněk je vyneseno relativně, kdy exprese jednotlivých skupin CAR-T buněk aktivovaných netransfekovanými buňkami byla stanovena jako 100% (resp. 1). Bez statistické významnosti.
- (B)** Produkce cytokinu INF- γ po aktivaci CAR-T lymfocytů buňkami exprimující/neexprimující cílový antigen. Výsledek je ze tří nezávislých pokusů s lymfocyty od tří různých dárců. Pro názornější srovnání, hladina INF- γ vynesena jako relativní hladina, kdy produkce jednotlivých skupin CAR-T buněk aktivovaných netransfekovanými buňkami byla stanovena jako 100% (resp. 1). Bez statistické významnosti.
- (C)** Aktivita laktát dehydrogenázy uvolněné do okolí po lýzi terčových buněk CAR-T lymfocytů. Výsledek z jednoho měření. Pro názornější srovnání, aktivita LDH vynesena jako relativní hodnota, kdy množství uvolněné LDH netransfekovanými buňkami byla stanovena jako 100% (resp. 1).

Cytotoxicita vyvolaná mono- a bispecifickými CAR-T lymfocyty byla měřena alternativním testem, a to stanovením aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné z buněk do okolí v důsledku nevratného poškození buněčné membrány. Test byl proveden obdobně, kdy k transfekovaným/netransfekovaným HEK 293T buňkám byly přidány monospecifické a bispecifické CAR-T lymfocyty. Měření bylo provedeno opakovaně, nicméně většina získaných výsledků nemohla být hodnocena díky relativně vysokým hodnotám spontánní lýze

terčov \acute{y} ch buněk. Na **obr. 23C** je uveden v \acute{y} sledek z jednoho m \acute{e} ření stanovení aktivity LDH, kde hodnoty spontánní lyze byly nízké. V \acute{y} sledky poukazují na cytotoxický potenciál v \acute{s} ech p \acute{r} ipravených CAR-T lymfocytů.

Pro konečné a v \acute{e} rohodné ov \acute{e} ření cytotoxického potenciálu CAR-T buněk byl nakonec proveden cytotoxický test, kde terčovými buňkami byly suspenze RAMOS buňky, které jsou odvozeny od Burkittova lymfomu, tedy p \acute{r} irozeně obsahují antigeny CD19 a CD20. Cytotoxický test byl proveden tak, jak je popsáno v **kapitole 4.1.8.1**. Byly p \acute{r} ipraveny sm \acute{e} sné lymfocytární kultury v poměrech vynes \acute{e} ných na **obr. 24**. Z grafu je jasně patrný cytotoxický potenciál v \acute{s} ech CAR-T lymfocytů. V nízkých poměrech nejlépe funguje CAR19, ale p \acute{r} i v \acute{y} šších poměrech lepšího cytotoxického účinku dosahují oba bispecifické CAR-T lymfocyty, a op \acute{e} t se zdá, že biCAR19-20 funguje o něco lépe.



Obr. 24: Cytotoxická aktivita mono- a bispecifických CAR-T lymfocytů vůči antigenně specifické nádorové linii.

CAR-T lymfocyty a kontrolní T-buňky byly kultivované 24 hod s buňkami RAMOS v různých poměrech v RPMI médiu bez cytokinů. Následně buněčná suspenze byla analyzována pomocí průtokového cytometru. Mrtvé RAMOS buňky byly stanoveny jako CFSE+ PI+. V \acute{y} sledek ze dvou biologických duplikátů. (*E*, efektorové buňky; *T*, terčov \acute{e} buňky)

Podáři lo se ov \acute{e} řit, že nov \acute{e} zkonstruované bispecifické receptory biCAR19-20 a biCAR20-19 jsou plně funkční, tj. jsou exprimovány na povrchu CAR-T buněk, jsou schopné vazby na oba cílové antigeny CD19 a CD20 a poskytují aktivační signály pro účinnou l \acute{y} zi nádorových buněk. Rovněž se v této experimentální části práce dařilo modifikovat CAR-T lymfocyty

pomocí lentivirových vektorů a po nespecifické stimulaci pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 expandovat je s dobrou účinností transdukce (většinou kolem 30-50% CAR+ buněk). V době, kdy se dokončovaly tyto pokusy, byl v laboratoři zaveden a optimalizován nový a jednodušší způsob modifikace T-lymfocytů pomocí nevirových vektorů založený na transpozonovém systému PiggyBac (PB) s následnou specifickou aktivací CAR+ buněk pomocí protilátky anti-CAR nebo pomocí přirozeného antigenu (CD19⁺ B-buněk přítomných v PBMCs v případě přípravy CAR19 T-lymfocytů)¹⁷. Touto modifikací se reprodukovatelně daří připravit CAR-T lymfocyty o velmi vysoké čistotě (> 80%) pro všechny PB vektory. Lentivirové vektory se proto opustily a následující experimenty jsou zaměřené už jen na přípravu PB vektorů. Tato modifikace T-lymfocytů je pak podrobněji popsána v publikaci [205].

¹⁷ Protokol v laboratoři zavedl a optimalizoval dr. Otáhal.

5.2 CAR receptory modifikované pro sekreci IL-21

V předchozích experimentech, které byly provedeny v laboratoři, a které jsou podrobněji popsány v práci [205]¹⁸, se ukázalo, že kultivace CAR-T lymfocytů pro přidání cytokinu IL-21 do kultivačního média vede k expanzi 2 populací nezralých buněk: centrálně paměťových (T_{CM}) a kmenových paměťových (T_{SCM}). Společným rysem těchto subpopulací je, že jde o lymfocyty dlouhodobě přežívající a po vystavení antigenu jsou schopné rychlé proliferace a diferenciaci do efektorových T-lymfocytů. Navíc u těchto dvou subpopulací byla zjištěna i nízká exprese inhibičních receptorů PD-1, LAG-3 a TIM-3.

Cílem druhé části experimentální práce bylo připravit CAR-T lymfocyty, které by IL-21 sekretovaly samy a byly by tak alternativou ke CAR-T buňkám, kterým je IL-21 dodáván exogenně. Předpokladem je, že tyto nově připravené CAR-T buňky by byly schopné udržet si *in vivo* nízkou sérovou koncentraci cytokinu, který by mohl snížit systémovou toxicitu, a tím by se zlepšil i protinádorový účinek.

5.2.1 Vektory pro CD19 CAR receptory a sekreci IL-21

Jako cílový vektor pro konstrukci byl vybrán transpozonový vektor typu PiggyBac ze dvou hlavních důvodů. Jednak kvůli snadnější přípravě CAR-T lymfocytů s velmi vysokou účinností transdukce (> 90% CAR+ buněk), a dále kvůli vlastnosti samotného PB vektoru integrovat dlouhé sekvence bez snížení účinnosti transdukce. Do buňky je tak možno vnést více genů, čímž odpadá kotransdukce několika vektory, a zároveň je zaručeno, že všechny buňky ponесou všechny vnášené geny.

Byly navrženy dva typy konstruktů, kde gen pro IL-21 je pod konstitutivním promotorem (ten bude samostatně popsán v **kapitole 5.2.1.3**) a pod indukibilním promotorem.

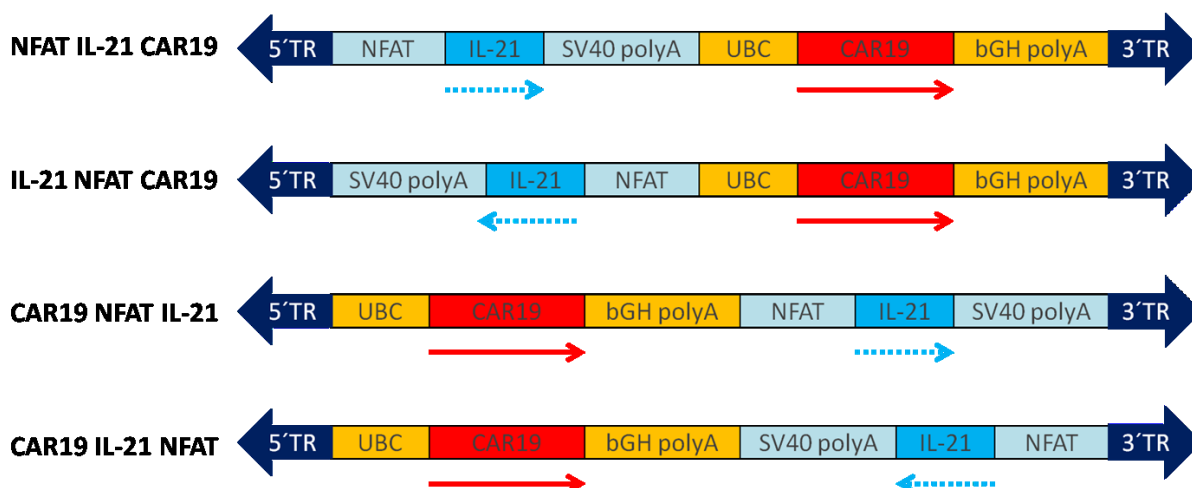
Aby se omezila sekrece IL-21 pouze na aktivované CAR-T lymfocyty, byl pro indukovatelný PB vektor řídicí expresi IL-21 zvolen syntetický složený promotor, který obsahuje 6 vazebných míst pro nukleární faktor aktivovaných T-buněk (NFAT), a minimální promotor IL-2 [206]. Pro zjednodušení je pak tento promotor v této práci nazýván jako NFAT promotor.

Výchozím vektorem, do kterého se transgen pro IL-21 vnášel, je transpozonový vektor CAR19 (PB19), který byl v laboratoři zkonstruován dříve a více je charakterizován v publikaci [205]. PB19 nese transgen pro CAR receptor specifický pro antigen CD19, jehož sekvence je totožná s CAR19 ve vektoru pLV CAR19 (byl popsán v **kapitole 5.1.1**). Celá

¹⁸ Článek je přiložen k práci jako **Publikace č. 1**

kódující sekvence CAR19 byla z vektoru pLV CAR19 překlonoována do prázdného pPB UBC vektoru^{19,20}. Kódující sekvence CAR19 je tedy v PB19 vektoru pod novým konstitutivním promotorem UBC a s novou terminační sekvencí bGH polyA. Proto při návrhu vektoru s IL-21 byla zvolena jiná terminační sekvence, a to sekvence SV40 polyA.

Do PB19 se tedy vkládala celá sekvence transgenů i s promotorem a polyadenylační sekvencí. Při návrhu konstruktů se uvažovalo o tom, že se připraví 4 varianty plazmidů. Jednak že se NFAT-IL-21-SV40 polyA vloží před i za sekvenci CAR19, a to ve stejném i opačném směru orientace transkripce CAR19 (**obr. 25**). Jednotlivé plazmidy pak byly zkráceně pojmenovány tak, aby z názvu bylo jasné pořadí transgenů IL-21 a CAR19 včetně směru transkripce IL-21 (**obr. 25**). Názvy jednotlivých plazmidů tedy jsou NFAT IL-21 CAR19, IL-21 NFAT CAR19, CAR19 NFAT IL-21 a CAR19 IL-21 NFAT.



Obr. 25: Ilustrativní schéma konstruktů pro CD19 CAR receptor s inducibilní expresí IL-21

Byly navrženy 4 varianty plazmidů. Mezi terminální repetice 5'-TR a 3'-TR PB vektoru jsou vloženy 2 transgeny, CAR19 a IL-21, každý s vlastním promotorem a terminační sekvencí pro ukončení transkripce. Šipky značí směr transkripce, plná šipka značí konstitutivní expresi, přerušovaná inducibilní expresi.

NFAT je označení pro minimální promotor pro IL-2 s 6-ti vazebnými místy pro jaderný faktor NFAT (NFAT/IL-2).

¹⁹ Vektor PB19 zkonstruoval dr. Šroller.

²⁰ Mapa vektoru pPB UBC je součástí přílohy č. 3

5.2.1.1 Konstrukce vektorů CAR19 s inducibilní expresí IL-21

Ve vektoru PB19 se před začátkem sekvence pro promotor UBC nachází unikátní restrikční místo pro *NheI*. Na konci terminační sekvence bGH polyA je další unikátní restrikční místo pro *Sall*. Do těchto dvou míst se pak vkládal gen pro IL-21. K navržené nukleotidové sekvenci pro NFAT-IL-21-SV40 polyA byly na její začátek a konec přidány ještě sekvence o délce 100 bp. Tyto sekvence byly zkopírovány z plazmidu pTre-Tight-luciferase-HygR (firma Addgene) a slouží pouze ke krátkému oddělení sekvencí obou promotorů a terminačních sekvencí ve výsledných plazmidech. Jde o nekódující sekvence. Na oba dva konce sekvence NFAT-IL-21-SV40 polyA s oddělovacími sekvencemi pak byly přidány ještě restrikční místa pro *NheI* a *Sall*. Výsledná sekvence²¹ se nechala nasyntetizovat u firmy Genewiz do klonovacího plazmidu PUC57. Z něho byla vyštěpená syntetická sekvence defosforylována a následně zaligována do vektoru PB19 buď do místa restrikčního štěpení *NheI* (pro výsledné plazmidy NFAT IL-21 CAR19 nebo IL-21 NFAT CAR19) nebo do místa restrikčního štěpení *Sall* (pro výsledné plazmidy CAR19 NFAT IL-21 nebo CAR19 IL-21 NFAT).

DNA izolovaná z bakteriálních klonů byla posléze analyzovaná pomocí restrikčního štěpení k ověření vložení insertů a k rozlišení jejich orientace ve vektoru. Klony, které byly připraveny ligací přes restrikční místo *Sall*, byly jednak dvojité štěpeny pomocí *KpnI* a *HindIII* s očekávanou velikostí hlavního fragmentu 1584 bp pro CAR19 NFAT IL-21 nebo 1930 bp pro CAR19 IL-21 NFAT, a dále štěpeny pouze *BsrGI* s očekávanou velikostí hlavního fragmentu 1930 bp pro CAR19 NFAT IL-21 nebo 771 bp pro CAR19 IL-21 NFAT. Oba dva plazmidy byly úspěšně připraveny. Klony, které byly připraveny ligací přes restrikční místo *NheI*, byly štěpeny *XhoI* s očekávanými fragmenty o velikostech 1069 bp, 2051 bp a 4548 bp pro plazmid NFAT IL-21 CAR19 a s očekávanými fragmenty o velikostech 112 bp, 2051 bp a 5505 bp pro plazmid IL-21 NFAT CAR19. Tímto způsobem se podařilo připravit pouze plazmid NFAT IL-21 CAR19, mezi testovanými klony nebyla 2. varianta vektoru nalezena.

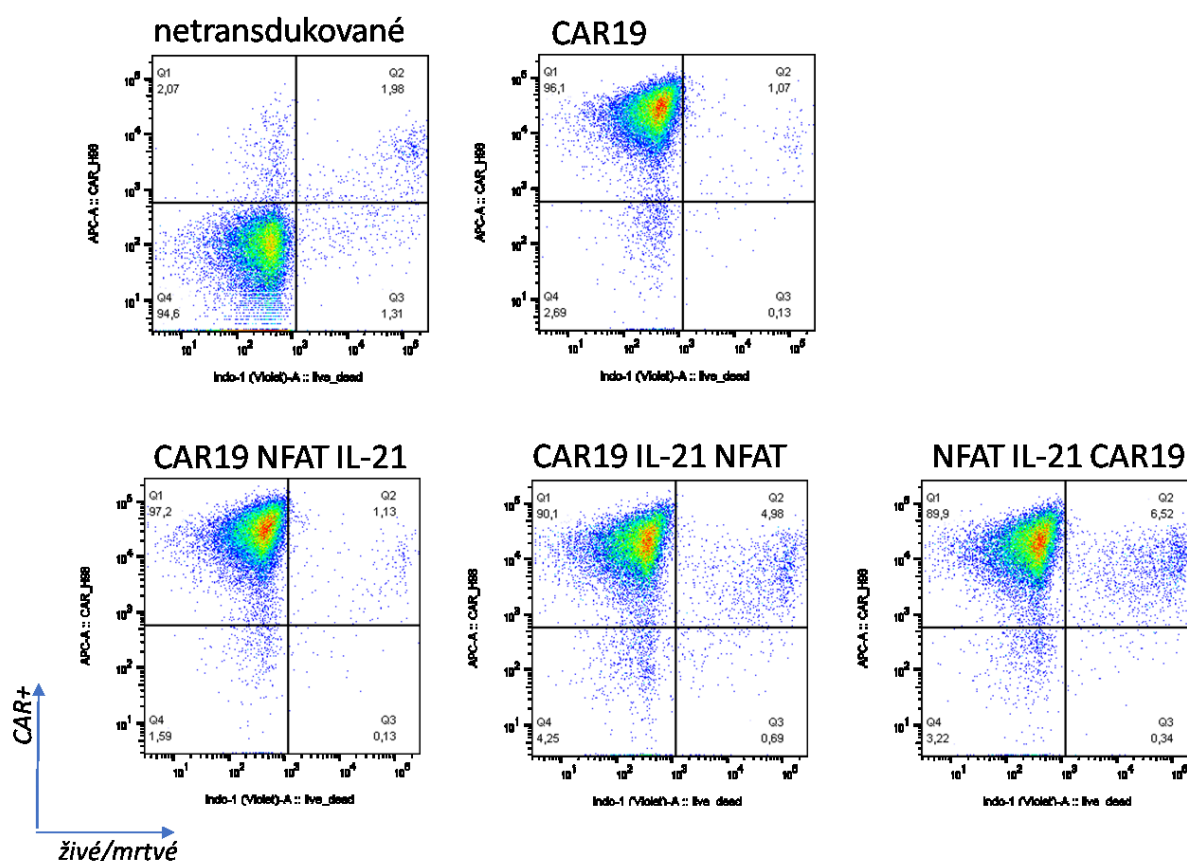
5.2.1.2 Ověření exprese CAR19 receptorů s inducibilní expresí IL-21

Vzhledem k tomu, že ověřit expresi IL-21 z inducibilního promotru NFAT lze až po úspěšném navázání transkripčního faktoru NFAT do tohoto promotru, nebylo možné připravené plazmidy transfekovat do buněčné linie HEK 293T. Proto byla exprese rovnou ověřena na lymfocytech. Čerstvě vyizolované mononukleární buňky byly následující den elektroporovány plazmidem pBASE s jednotlivými plazmidy NFAT IL-21 CAR19, CAR19

²¹ Navržená nukleotidová sekvence je součástí přílohy č. 4

NFAT IL-21 a CAR19 IL-21 NFAT. Jako kontrolní skupina byly elektroporovány PBMCs původním plazmidem CAR19. Po elektroporaci byly buňky přeneseny do kultivačního média CellGenix. Buňky nebyly nijak aktivovány protilátkami, T-lymfocyty byly stimulovány k proliferaci vazbou CAR receptoru na molekulu CD19 přítomné B-lymfocytech, které se vPBMCs nacházejí. 24 hodin po elektroporaci byly do média přidány cytokiny IL-2, IL-4 a IL-7. CAR-T lymfocyty byly udržovány cca 3 týdny v exponenciálním růstu.

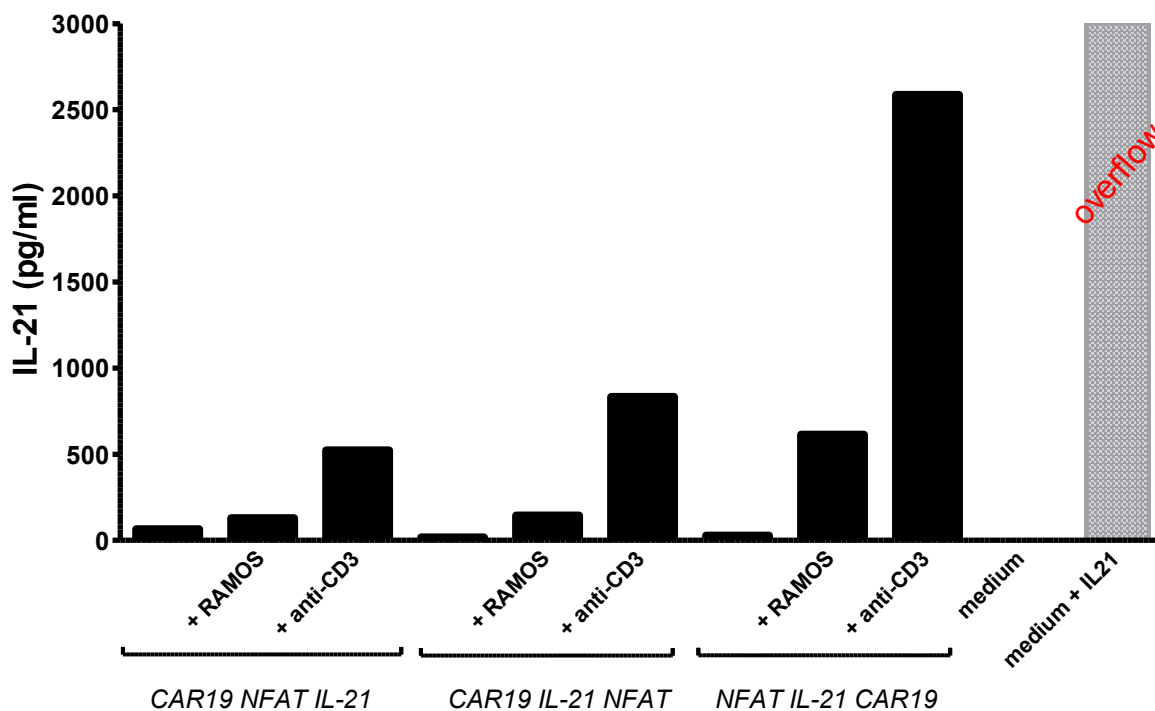
Buňky byly 12.den po elektroporaci obarveny protilátkou anti-scFv AF 647 k ověření exprese CD19 CAR receptoru a analyzovány na průtokovém cytometru. Jak je vidět na **obr. 26**, podařilo úspěšně připravit T-lymfocyty transdukované novými vektory s vysokou účinností (přes 90% transdukovaných buněk). Všechny nově připravené konstrukty exprimují CAR receptor.



Obr. 26: Ověření povrchové exprese CAR19 receptorů.

Primární T-buňky byly elektroporovány s nově zkonstruovanými vektory pro CD19-CAR receptory a zároveň pro IL-21 s inducibilní expresí. Buňky elektroporované původním vektorem CAR19 slouží jako pozitivní kontrola s expresí CAR receptoru. Po 12-ti denní kultivaci byly buňky obarveny protilátkou anti-scFv konjugovanou s AF647 a analyzovány pomocí FACSu. Obarvené netransdukované lymfocyty sloužily jako kontrola pro nastavení positivity exprese CAR receptoru. DAPI bylo použito k rozlišení mrtvých buněk v populaci.

K předběžnému ověření samotné exprese IL-21 z nově zkonstruovaných vektorů byla použita metoda ELISA. T-lymfocyty byly aktivované prostřednictvím receptoru TCR pomocí solubilní protilátky anti-CD3 nebo přes CAR receptor jeho vazbou na specifický antigen. Schéma pokusu bylo následující. Jeden milion CAR-T lymfocytů byly 2x promyty PBS a smíchány s buňkami RAMOS v 200 ul čerstvého média CellGenix bez přidání cytokinů. K další skupině CAR-T lymfocytů, tj. rovněž 1 mil buněk promytých 2x v PBS a resuspendovaných v 200 ul čerstvého média bez cytokinů byla přidána solubilní protilátka anti-CD3 UCHT-1 v množství 1 ug/ml. Jako kontrolní skupina neaktivovaných CAR-T buněk byly samotné lymfocyty 2x promyté v PBS a rovněž resuspendované v 200 ul média. Jako pozitivní kontrola bylo použité samotné médium s přidavkem exogenního IL-21 v množství 50 ng/ml. Po 20 hod inkubaci bylo ze všech skupin sebráno médium. Byla provedena metoda ELISA pomocí komerčního kitu. Výsledek je ukázán na **obr. 27**. Skupina, ve které bylo samotné médium s nadbytkem exogenního cytokinu IL-21 se dle předpokladu pozitivně zbarvilo a hodnota absorbance se dostala mimo rozsah metody (overflow). Z obrázku je patrné, že ze všech třech vektorů CAR19 NFAT IL-21, CAR19 NFAT IL-21 a NFAT IL-21 CAR19 dochází po aktivaci T-lymfocytů k expresi IL-21. U nestimulovaných buněk pravděpodobně dochází k bazální expresi IL-21 z NFAT promotoru. Výrazný nárůst v hladině IL-21 byl patrný zejména po stimulaci TCR receptoru. Z tohoto prvotního výsledku se zdálo, že nemusí všechny vektory fungovat stejně a nejvhodnějším pro další použití se jevil vektor NFAT IL-21 CAR19.

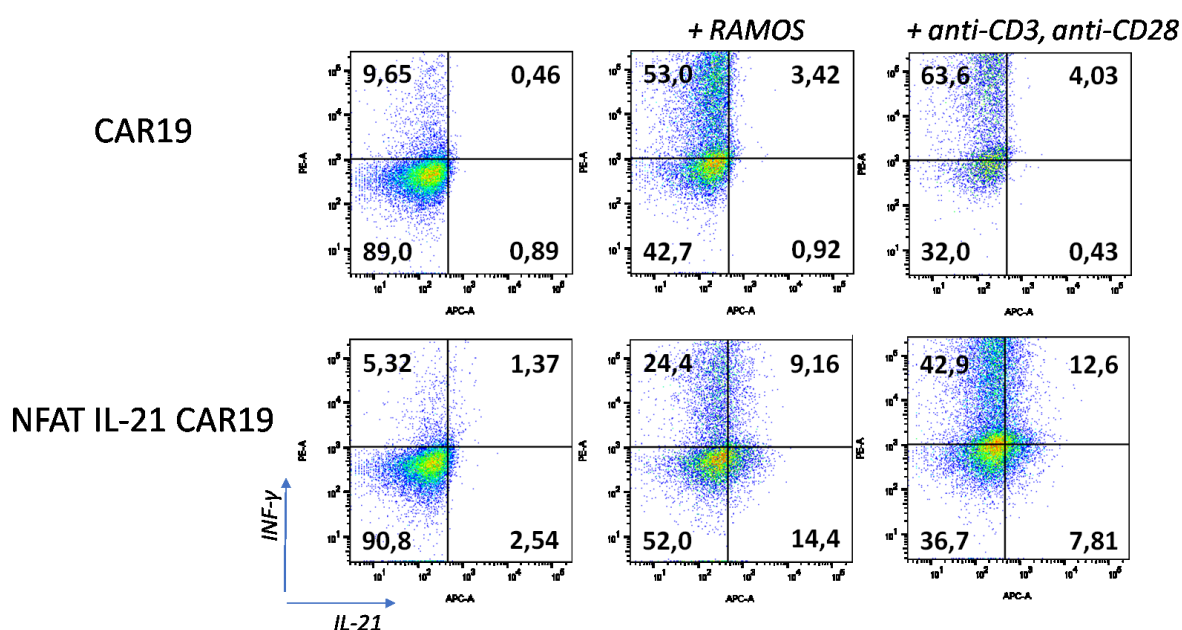


Obr. 27: Inducibilní exprese IL-21

Pro ověření exprese IL-21 z inducibilního promotoru NFAT bylo stanoveno množství produkovaného cytokinu IL-21 metodou ELISA. Buňky transdukované vektory CAR19 NFAT IL-21, CAR19 IL-21 NFAT a NFAT IL-21 CAR19 byly 20 hod stimulovaly buňkami RAMOS CD19⁺ nebo solubilní protilátkou anti-CD3. Jako negativní kontrola bylo použité samotné médium, jako pozitivní kontrola médium, do kterého byl přidán cytokin IL-21.

Produkce IL-21 z vektoru NFAT IL-21 CAR19 byla ověřena ještě jednou nezávislou metodou. Množství produkovaného IL-21 bylo měřeno pomocí intracelulárního barvení na průtokovém cytometru. Buňky byly nasazeny obdobně jako v předchozím pokusu. Kultivace tentokrát probíhala v 500 ul média CellGenix, kam byly přidány cytokiny IL-2, IL-4 a IL-7. Do testu bylo nasazeno 3 milionů T-lymfocytů transdukováných vektorem CAR19 nebo vektorem NFAT IL-21 CAR19. Lymfocyty byly stimulovaly přidáním 3 milionů buněk RAMOS nebo pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 navázaných na plastik. Jako kontrolní skupina byly samotné neaktivované lymfocyty. Po 2 hodinách, kdy byl nasazen test, byl do všech skupin přidán GolgiPlug²² v koncentraci 1ug/ml. Následující den byly všechny buňky obarveny anti-CD3 konjugovanou s BV786 (pro rozlišení CAR-T lymfocytů od buněk RAMOS), zafixovány a obarveny anti-INF- γ PE a anti-IL-21 APC a analyzovány na FACSu (**obr. 28**).

²² GolgiPlug je inhibitor, který obsahuje brefeldin A – ten inhibuje transport proteinů z endoplazmatického retikula do Golgiho komplexu.



Obr. 28: Intracelulární produkce cytokinů INF- γ a IL-21

T-lymfocyty exprimující CAR19 nebo NFAT IL-21 CAR19 byly 24 hod stimulovány pomocí CD19+ buňkami RAMOS nebo protilátkami anti-CD3 a anti-CD28. Pomocí průtokové cytometrie byla sledována intracelulární produkce cytokinů INF- γ a IL-21. Nestimulované buňky sloužily jako kontrolní.

Jak je z **obr. 28** patrné, CAR-T buňky se podařilo úspěšně nastimulovat buněčnou linií pozitivní na CD19, tj. buňkami RAMOS nebo protilátkami proti TCR a molekule CD28, protože se zvýšil v populaci počet buněk produkujících INF- γ v rozmezí z 5-10% na 30-60%. Navíc CAR-T lymfocyty modifikované NFAT IL-21 CAR19 produkovaly i IL-21 z vektoru v důsledku aktivace transkripčního faktoru NFAT, kdy bylo vidět zvýšení počtu buněk ze 4% na 20-25% IL-21+ buněk.

5.2.1.3 Konstrukce vektoru CAR19 s konstitutivní expresí IL-21

Pro přípravu CAR19 receptoru s konstitutivní expresí IL-21 byl navržen bicistronický vektor s koexpresí 2 genů CAR19 a IL-21, které jsou pod kontrolou jednoho promotoru. Mezi tyto dva transgeny je vložen tzv. samoštěpící peptid 2A. Obecně, tzv. 2A peptidy jsou virové oligopeptidy o velikosti 18-22 AA, které během translace zprostředkovávají štěpení polypeptidu [207, 208]. Rozštěpení je dosaženo mechanismem, kdy ribozom přeskočí vytvoření glycy-propyl peptidové vazby na C konci 2A peptidu [209]. Vysoce konzervovaná sekvence GDVEXNPGP 2A peptidu vytvoří sterickou zábranu, která vede k přeskočení ribozomu a k opětovnému zahájení translace. Na první translatovaný protein je navázán

kompletní 2A peptid bez C-terminálního prolinu. Naopak na druhém translatovaném proteinu je na N-konci navázán navíc jeden prolin.

Do vektoru vycházejícího z původního CAR19 (PB19) bylo navrženo vložit za CAR19 gen pro IL-21, který je oddělen sekvencí pro T2A peptid²³. Exprese IL-21 by tedy byla pod kontrolou promotoru UBC (**obr. 29**)

Pro zkonstruování nového vektoru se využily sekvence ze dvou plazmidů, které byly v laboratoři k dispozici. Prvním byl plazmid pubc19_T2A²⁴ (odvozený od PB19), kde za genem pro CAR19 jsou vloženy další geny oddělené sekvencemi 2A. První vložený gen je oddělen T2A sekvencí. Tento konstrukt byl linearizován dvojitým štěpením pomocí SmaI a Sall. Tím z něj byly odstraněny insertované geny včetně terminačního signálu bGH polyA. Sekvence T2A byla z velké části zachována.

Druhým využitým plazmidem byl nefunkční plazmid se sekvencí T2A-IL12BA-E2A-IL18-F2A-IL21. Šlo o multicistronický konstrukt, kde za GFP byly vloženy geny pro cytokiny IL-12, IL-18 a IL-21, které byly odděleny 3 různými 2A peptidy. Z tohoto plazmidu pak byl pomocí PCR nasyntetizován fragment obsahující IL-21 včetně terminačního signálu bGH polyA. Pro syntézu byly navrženy primery s 15 bp přesahem na 5' koncích pro následné infuzion klonování do cílového vektoru pubc19_T2A. Navíc forward primer byl ještě doplněn o část sekvence pro N'signální peptid (v původním konstruktu nebyla totiž signální sekvence kompletní). Přečištěný PCR produkt pak byl pomocí enzymu z kitu In-Fusion spojen s linearizovaným pubc19_T2A, čímž došlo k obnovení sekvence T2A. Za ní následuje gen pro IL-21 včetně sekvence pro celý N'signální peptid. Správné vložení fragmentu bylo ověřeno restričním štěpením DNA izolované ze získaných klonů bakterií. Cílový plazmid se podařilo úspěšně připravit a byl označen jako CAR19 T2A IL-21 (**obr. 29**).



Obr. 29: Ilustrativní schéma konstruktů pro CD19 CAR receptor s konstitutivní expresí IL-21

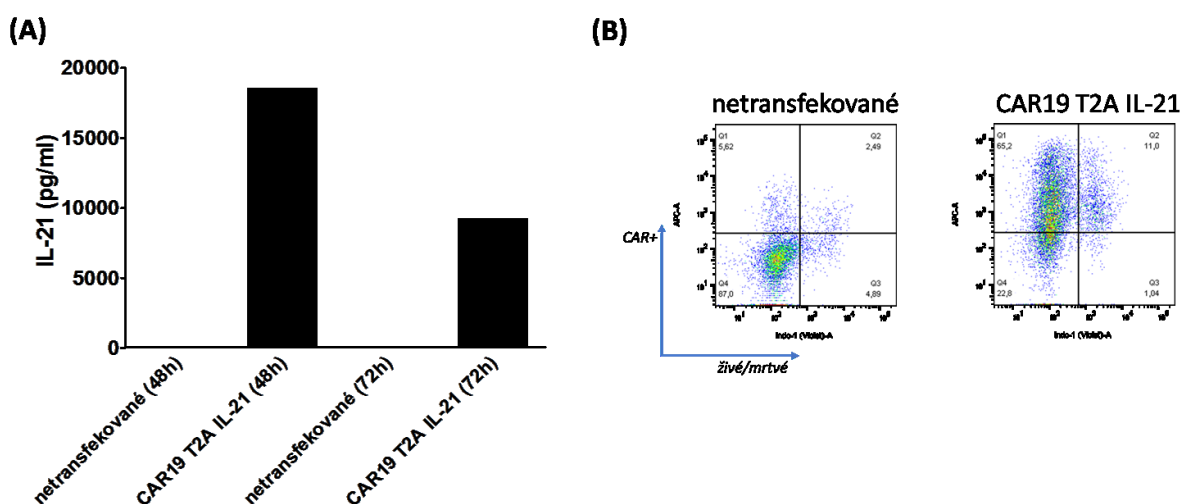
Mezi terminálními repeticemi 5'-TR a 3'-TR PB vektoru jsou vloženy 2 transgeny, CAR19 a IL-21, které jsou odděleny sekvencí pro T2A peptid. Šipky značí směr transkripce a značí konstitutivní expresi.

²³ Jde o 2A peptid odvozený z viru *Thossea asigna*, proto nese označení T2A.

²⁴ Plazmid pubc19_T2A zkonstruovala dr. Pokorná.

5.2.1.4 Ověření exprese CAR19 T2A IL-21 receptoru

Expres IL-21 byla úspěšně ověřena po transfekci buněk HEK 293T vektorem CAR19 T2A IL-21 metodou ELISA, kdy množství sekretovaného cytokinu do média bylo změřeno 48h a 72 hod po transfekci. Jako kontrolní skupiny byly netransfekované buňky (**obr. 30A**). Paralelně na stejných buňkách byla ověřena povrchová exprese CAR19 (**obr. 30B**).



Obr. 30: Expres vektoru CAR19 T2A IL-21

- (A) Expres IL-21 pod konstitutivním promotorem byla ověřena stanovením sekrece cytokinu do média pomocí metody ELISA 48h a 72h po transfekci HEK 293T tímto vektorem. Netransfekované buňky sloužily jako negativní kontrola.
- (B) Expres receptoru CAR19 byla ověřena barvením stejných buněk protilátkou anti-scFv AF647 a měřením na FACSu. DAPI sloužilo k rozlišení živých a mrtvých buněk.

Podrobnější charakterizaci všech konstruktů CAR19 s inducibilní i konstitutivní expresí IL-21 provedli dr. Pokorná a Mgr. Štach. Podle jejich výsledků jako nejlepší vektor pro navazující experimenty byl zvolen konstrukt NFAT IL-21 CAR19. Výsledky experimentů Mgr. Štacha jsou součástí publikace [210]²⁵.

5.2.2 Konstrukce vektoru PSMA CAR s inducibilní expresí IL-21

V rámci této experimentální části práce byl připraven ještě jeden konstrukt s inducibilní expresí IL-21 odvozený od plazmidu PSMA CAR myc. Ten kóduje chimerický antigenní receptor specifický na prostatický membránový antigen (PSMA), který je vysoce exprimovaný u nediferenciovaného metastázického karcinomu prostaty. CAR-T lymfocyty specifické na PSMA jsou v laboratoři používány jako modelové buňky namířené na solidní

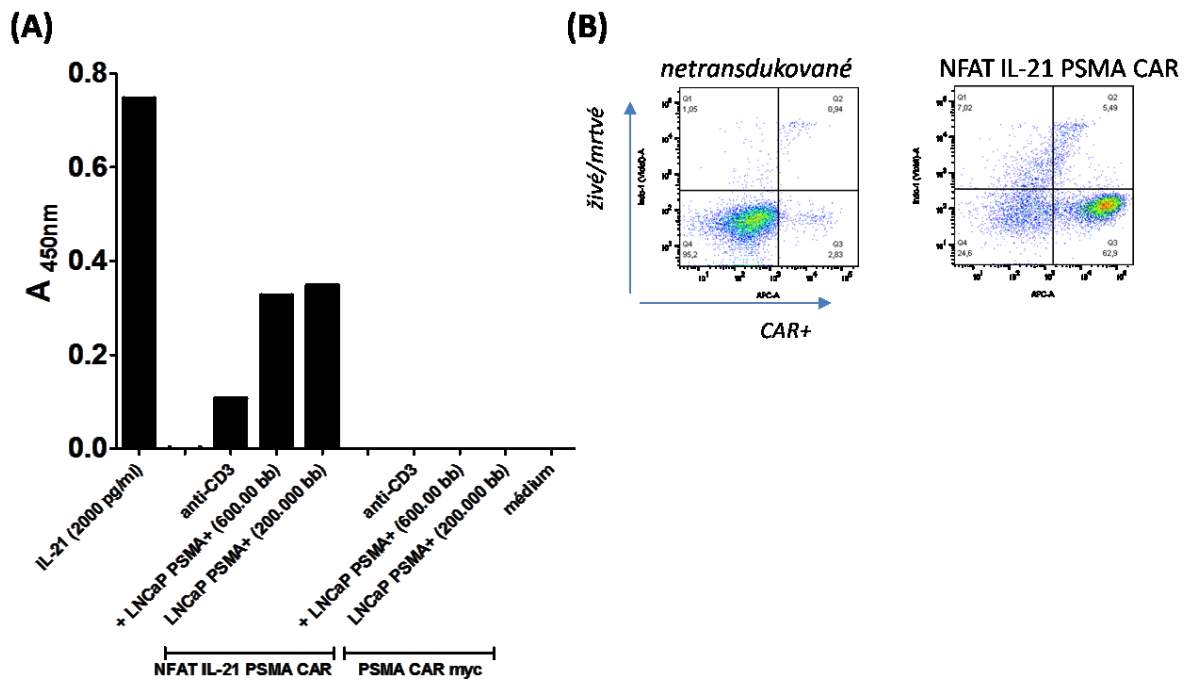
²⁵ Článek je přiložen k práci jako **Publikace č. 2**

nádor a jsou alternativou k pokusům s CAR19. Vektor PSMA CAR myc je více popsán v publikaci [205]. Je identický s CAR19 (PB19), jen vazebná část je odvozena od myší protilátky specifické na antigen PSMA, za kterou hned následuje myc-tag epitop. Tento epitop dovoluje jednak specificky aktivovat PSMA CAR-T lymfocyty pomocí protilátky anti-myc, stejnou protilátkou fluorescenčně značenou je možné lymfocyty vizualizovat na FACSu. Vektor NFAT IL-21 PSMA CAR byl připraven stejným způsobem jako analogický NFAT IL-21 CAR19, tj. vložením sekvence NFAT IL-21 SV40 polyA přes restrikční místo NheI. DNA izolovaná z bakteriálních klonů byla podrobena restrikční analýze pro potvrzení vložení insertu a zjištění jeho orientace. Očekávané velikosti fragmentů po štěpení XhoI byly 4587 bp, 2021 bp a 1069 bp pro NFAT IL-21 PSMA CAR a 5544 bp, 22021 bp a 112 bp pro IL-21 NFAT PSMA CAR.

NFAT IL-21 PSMA CAR se podařilo úspěšně připravit. Zajímavé je, že v žádných klonech nebyl nalezen IL-21 NFAT PSMA CAR (stejně jako nebyl nalezen IL-21 NFAT CAR19).

5.2.2.1 Ověření exprese vektoru NFAT IL-21 PSMA CAR

Vyizolované PBMCs byly po elektroporaci vektorem NFAT IL-21 PSMA CAR nebo PSMA CAR myc nechány v médiu CellGenix do druhého dne. Buňky byly poté přeneseny na novou kultivační jamku s navázanou protilátkou anti-myc a do média byly přidány cytokiny IL-2, IL-4 a IL7. Buňky byly po dobu 10 dní drženy v exponenciální fázi růstu. Poté byly obarveny protilátkou anti-scFv AF647 a povrchová exprese PSMA CAR receptorů ověřena na FACSu. K ověření exprese IL-21 musely být T-lymfocyty aktivovány. Den předem byly do jamky 6-ti jamkové kultivační destičky vysety buňky LNCaP, které jsou přirozeně pozitivní na antigen PSMA, v počtu 200.000 a 600.000 b/j. Následující den bylo kultivační médium opatrně vyměněno za 0,4 ml média CellGenix bez cytokinů s 1 ml promytých buněk NFAT IL-21 PSMA CAR. Do prázdné jamky byly nasazeny jen samotné NFAT IL-21 PSMA CAR lymfocyty, ke kterým byla přidána solubilní protilátka anti-CD3, klon UCHT1, v množství 1ug/ul. Jako neaktivovaná kontrola sloužily samotné NFAT IL-21 PSMA CAR lymfocyty. Stejně nasazení testu bylo provedeno i pro kontrolní skupinu PSMA CAR myc T-lymfocytů. Po 24 hod inkubaci bylo médium sklizeno a sekretovaný IL-21 byl detekován metodou ELISA. Povrchová exprese PSMA CAR byla u nového konstruktů ověřena, stejně tak IL-21 byl detekovatelný jen ve skupině NFAT IL-21 PSMA CAR lymfocytů, které byly aktivovány (**obr. 31**)



Obr. 31: Ověření exprese vektoru NFAT IL-21 PSMA CAR

- (A)** Expres IL-21 byla detekovaná pomocí metody ELISA. NFAT IL-21 PSMA CAR a PSMA CAR myc lymfocyty byly ponechány 24 hod bez aktivace, nebo aktivovány solubilní protilátkou anti-CD3 nebo antigenem PSMA přirozeně se exprimujícím na buněčné linii LNCaP. Jako pozitivní kontrola posloužil cytokin IL-21 (2000 pg/ml) ze standardu dodávaném v kitu. Rovněž bylo analyzováno samotné médium.
- (B)** Povrchová exprese receptoru buněk NFAT IL-21 PSMA CAR byla detekovaná pomocí protilátky anti-scFv AF647. Netransdukované buňky obarvené stejnou protilátkou sloužily jako kontrola pro nastavení pozitivivity. Barvením pomocí DAPI byly identifikovány živé buňky.

5.3 CAR receptory obsahující multi-epitopy

Specifickou aktivací CAR+ buněk pomocí protilátky anti-CAR po elektroporaci plazmidu nesoucí CAR receptor lze vyselektovat populaci T-lymfocytů s vysokým zastoupením CAR+ pozitivních buněk (> 90%). Cílem třetí části experimentální práce bylo připravit konstrukty obsahující epitopy/mimotopy²⁶ specifické pro další protilátky, pomocí kterých by se aktivovaly CAR-T lymfocyty. Mělo jít o protilátky, které se používají v klinické praxi či v souladu s GMP, aby mohly být použity pro rutinní výrobu CAR-T lymfocytů v Ústavu hematologie a krevní transfuze. Ve výrobě by pak nahradily TansAct CD3/28 firmy Miltenyi nyní používaný k aktivaci CAR-T buněk. Zvýšila by se tak výrazně čistota CAR-T produktů, aktivací pomocí TansActu CD3/28 je totiž získáno jen 20-28% CAR+ buněk v konečném produktu (ústní sdělení). Jak se ukázalo a v dalším textu bude i popsáno, některé protilátky místo k aktivaci buněk vedly k jejich předčasné smrti. Byly tedy nečekaně připraveny i konstrukty s epitopy, které fungovaly jako bezpečnostní switch k vypnutí CAR-T buněk. Tyto varianty by pak mohly v budoucnosti sloužit k rychlé depleci CAR-T buněk, které by při léčbě vyvolaly závažné nežádoucí účinky.

Seznam nových epitopů a mimotopů, které byly nově vkládány do CAR konstruktů, je uveden v **tabulce 11**. Aminokyselinové sekvence mimotopů byly získány z literatury věnované technologii fágového displeje. Jde o metodiku, kdy randomizovaná DNA knihovna určitého proteinu je vložena do fágových částic, a *in vitro* se testuje vazba protilátky na malý úsek proteinu (peptidu) vystaveného na povrchu fága [211]. Z literatury byly vybrány mimotopy H98, 12P, D12, E72, CD25a, Rp5-L a CD20, na které se vázaly protilátky dnes běžně používané v klinické praxi, jmenovitě trastuzumab, bevacizumab, cetuximab, basiliximab a rituximab. Dále byly vybrány sekvence dvou epitopů, CD20 epitop 2 a CD34, které byly již popsány v literatuře jako vložené multi-epitopy do CAR receptoru [60] a úspěšně vyzkoušené. CD20 epitop 2, který je rozpoznáván rituximabem, byl autory používán jako epitop pro rychlou depleci CAR-T buněk a epitop CD34 byl využíván k selekci CAR+ buněk pomocí kitu humanCD34 microBead firmy Miltenyi Biotec [60]. Tento kit se běžně používá v klinické praxi pro selekci CD34+ buněk a jeho použití je tedy v souladu s GMP. Dále byly vybrány sekvence pro FLAG-tag a 3x FLAG-tag jako alternativa k doposud v laboratoři používanému epitopu pro myc-tag. V případě ověření protilátky anti-FLAG při úspěšné aktivaci CAR-T buněk byly v plánu s firmou Exbio připravit komerční kuličky potažené

²⁶ Mimotop je peptid, který mimikuje strukturu epitopu. Díky tomu protilátka specifická pro daný epitopový antigen rovněž váže mimotop. Mimotopy se běžně získávají z knihoven fágového displeje.

s touto protilátkou, které by splňovaly podmínky GMP a mohly by být tak využity při výrobě. K jejich přípravě už nedošlo.

Mimotop/epitop	Sekvence aminokyselin	Protilátka	Publikace
H98	LLGPYELWELSH	Trastuzumab	[212]
12P	DHTLYTPYHHP	Bevacizumab	[213]
D12	WLEMHWPAHS	Bevacizumab	[214]
E72	VLPKTLCGGGS	Cetuximab	[215]
CD25a mimitop	CWYHYIWEC	Basiliximab	[216]
CD25a neoepitop	ERIYHFV	Basiliximab	[216]
CD20 mimitop	CWWEWTIGC	Rituximab	[217]
CD20 epitop 2	CPYSNPSLC	Rituximab	[60]
Rp5-L	QDKLTQWPKWLE	Rituximab	[218]
FLAG	DYKDDDDK	anti-FLAG	[219]
3x FLAG	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	anti-FLAG	[220]
CD34 epitop	ELPTQGTFSTNVSTNVS	anti-CD34	[60]

Tab. 11: Seznam mimitopů/epitopů, které byly vkládány do vektorů jako tagy, včetně aminokyselinových sekvencí, protilátek, které jednotlivé tagy rozeznávají, a publikací, z kterých byly sekvence převzaty.

5.3.1 Konstrukce vektorů pro CAR receptory s vloženými multi-epitopy

Příprava nových vektorů vycházela z původního PB plazmidu pro PSMA CAR myc, kam byly jednotlivé epitopy vkládány pomocí částečně překrývajících se oligonukleotidů. Pro jednotlivé mimitopy/epitopy byla navržena cDNA s optimalizací kodónů pro expresi v lidských buňkách. Tato sekvence pak byla základem forward oligonukleotidu. Zároveň do tohoto oligonukleotidu bylo vloženo unikátní restrikční místo (viz **tab. 10, kapitola 4.2.5**). Spárované oligonukleotidy byly přímo zaklonovány do přesahů vzniklých restrikčním štěpením v původním vektoru, který byl štěpen v oblasti hinge, v místě těsně za epitopem pro myc.

K identifikaci bakteriálních klonů s vloženými oligonukleotidy bylo využito restrikční štěpení DNA v nově vneseném unikátním restrikčním místě. PCR reakce s použitím dvojice primerů C4 a stejným forward oligonuklotidem s následnou gelovou analýzou produktů sloužila k rozlišení klonů, do kterých se epitop vložil pouze jednou. K ověření vložení ve správné orientaci pak byla provedena sekvenační reakce s použitím C4 primeru.

Pro přípravu vektorů s dvěma navíc vloženými epitopy byl využit stejný postup. Druhý epitop byl vkládán pomocí spárovaných oligonukleotidů do restikčního místa vneseném oligonukleotidy pro první epitop²⁷.

Tímto způsobem bylo připraveno 12 vektorů pro PSMA CAR receptory. Jejich seznam včetně schématického diagramu se zakreslenými kombinacemi jednotlivých epitopů jsou uvedeny na **obr. 32**. Následně u nich byla ověřena exprese a vazba protilátek na jednotlivé epitopy (viz **kapitola 5.3.2**). Epitopy, na které se protilátky vázaly, byly vloženy i do dalších CAR receptorů (**obr. 32**).

Jednak byly připraveny další tři vektory odvozené od vektoru CLL-1 CAR myc²⁸. Vazebnou část tohoto receptoru tvoří fragment sc-Fv odvozený od humanizované monoklonální protilátky specifické na antigen CLL-1. Tento antigen je exprimovaný na myeloidních liniích a AML blastech, T-buňky exprimující tento receptor jsou určeny pro léčbu akutní myeloidní leukemie [221]. Vektor CLL-1 CAR myc H98 byl připravený stejným způsobem jako PSMA CAR myc H98, tj. vložení mimotopu pomocí částečně překrývajících se oligonukleotidů. Po ověření správného vložení počtu a směru orientace mimotopu H98 a exprese vektoru CLL-1 CAR myc H98 (viz **kapitola 5.3.7**) z něj pomocí enzymu KpnI byl mimotop H98 vyštěpen, vektor byl defosforylován a následně do něho byly zaligovány defosforylované fragmenty *H98-FLAG* a *H98-CD4* vyštěpené pomocí enzymu KpnI z vektorů PSMA CAR myc H98 FLAG a PSMA CAR myc H98 CD34. Získané bakteriální klony byly restrikcí štěpením pomocí XmaI a NheI ověřeny pro vložení fragmentů H98-FLAG a H98-CD34. Od každého vektoru byly náhodné 3 klony osekvenovány pro určení správné orientace vložených fragmentů. Následně u těchto vektorů byla ověřena exprese a znovu vazba protilátek na jednotlivé epitopy (viz **kapitola 5.3.7**).

Od vektoru CAR19 byly připraveny 2 vektory s multi-epitopy, a to CAR19 myc H98 PH (= prodloužený hinge) a 12P CAR19 myc H98. Oba dva byly připraveny z vektoru CAR19 myc H98²⁹, který byl celý nasyntetizovaný u firmy Genescript. Při ověření exprese a barvení epitopů pomocí fluorescenčně značených protilátek u tohoto nasyntetizovaného vektoru se ukázalo, že epitopy CD19-scFv a H98 se daleko hůře barví v porovnání s kontrolními vektory CAR19 a PSMA myc H98 (viz **kapitola 5.3.7**). Důvodem mohla být zkrácena oblast hinge u CAR19 myc H98 v porovnání s vektorem PSMA myc H98. Proto byl připravený nový konstrukt CAR19 myc H98 s prodlouženou oblastí hinge. Byl připraven vyštěpením

²⁷ Schéma vkládání epitopu je součástí přílohy č. 5

²⁸ Vektor CLL-1 CAR myc zkonstruovala, expresi ověřila a dále charakterizovala dr. Pokorná.

²⁹ Sekvence pro syntézu vektoru CAR19 myc H98 byla navržena dr. Otáhalem.

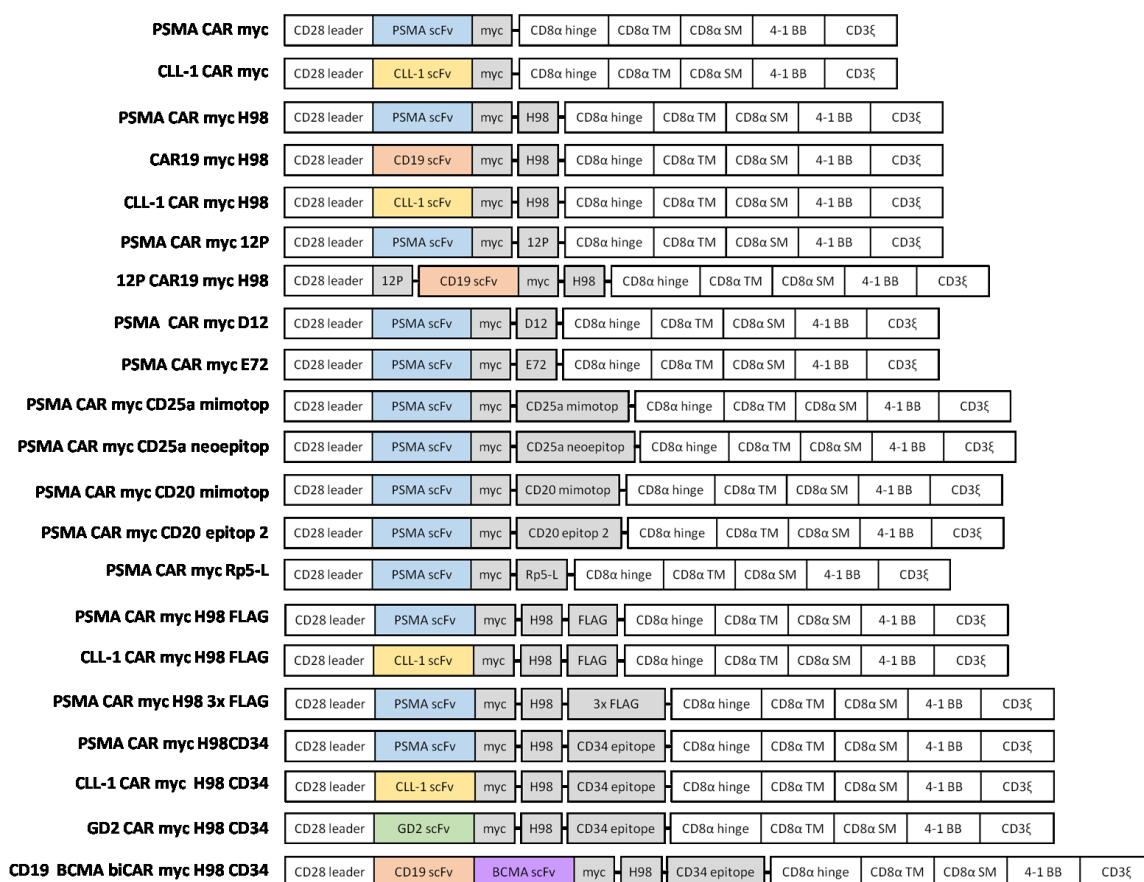
fragmentu *myc-H98-zkrácený CD8a hinge* pomocí ApaI a XhoI z nasyntetizovaného vektoru CAR19 myc H98 a nahrazen fragmentem *myc-H98-CD8a hinge* vyštěpeného stejnými restrikčními enzymy z vektoru PSMA myc H98.

Důvody pro vložení mimotopu 12P na začátek CAR19 receptoru byly dva. Jak bude uvedeno v **kapitole 5.3.2**, mimotop vložený uvnitř PSMA CAR receptoru nebyl rozeznáván svoji specifickou protilátkou bevacizumabem, proto mimotop umístěný před začátek CAR receptoru by mohl být pro protilátku přístupnější. Druhým důvodem bylo, že v CAR19 receptoru je unikátní restrikční místo MluI mezi sekvencemi pro CD28 leader a CD19 scFv, které umožnilo vložení mimotopu. Stejným způsobem, jak bylo popsáno výše, byl tedy mimotop 12P vložený pomocí částečně překrývajících se oligonukleotidů 12P N do vektoru CAR19 myc H98.

Dále byl zkonstruován vektor GD2 CAR myc H98 CD34. Sekvence pro GD2-scFv vyšla z původního GD2 CAR myc receptoru³⁰, který byl již zkonstruován a funkčně ověřen. U firmy GeneArt, Thermo Fisher Scientific, pak byla nasyntetizována sekvence *GD2-scFv-myc-H98-CD34-CD8a hinge* s krátkým začátkem transmembránové části CD8a. Ta byla pomocí restrikčních míst MluI a ApaI vložena do CAR19 myc H98 vektoru výměnou za *CD19-scFv-myc-H98-CD8a hinge*.

Posledním vektorem obsahující multi-epitopy, který byl zkonstruovaný, byl bispecifický CD19 BCMA biCAR myc H98 CD34 receptor. Sekvence pro BCMA-scFv byla převzata z publikace [222]. Pořadí dvou fragmentů scFv, resp. umístění BCMA-scFv blíže k transmembránové doméně bylo zvoleno rovněž na základě výsledků popsaných v této publikaci, kde jejich připravený bispecifický CS1-BCMA biCAR receptor vykazoval lepší cytotoxické účinky než BCMA-CS1 biCAR receptor, pravděpodobně díky právě proximálnímu umístění anti-BCMA. K oddělení našich protilátkových částí CD19-scFv a BCMA-scFv byl zvolen motiv (Gly₄Ser)₄, který byl použit už u bispecifických receptorů biCAR1920 a biCAR2019 popsaných v **kapitole 5.1**. U firmy GeneArt, Thermo Fisher Scientific, pak byla nasyntetizována sekvence *CD28leader-CD19-scFv-BCMA-scFv-myc-H98* a vložena do vektoru CLL-1 CAR myc H98 CD34 místo *CD28leader-CLL-1-scFv-myc-H98* pomocí enzymů BamHI a HindIII.

³⁰ Sekvence vektoru byla navržena dr. Otáhalem, funkční ověření plazmidu bylo provedeno v jeho spolupracující laboratoři.



Obr. 32: Přehled vektorů pro CAR receptory s vloženými tagy

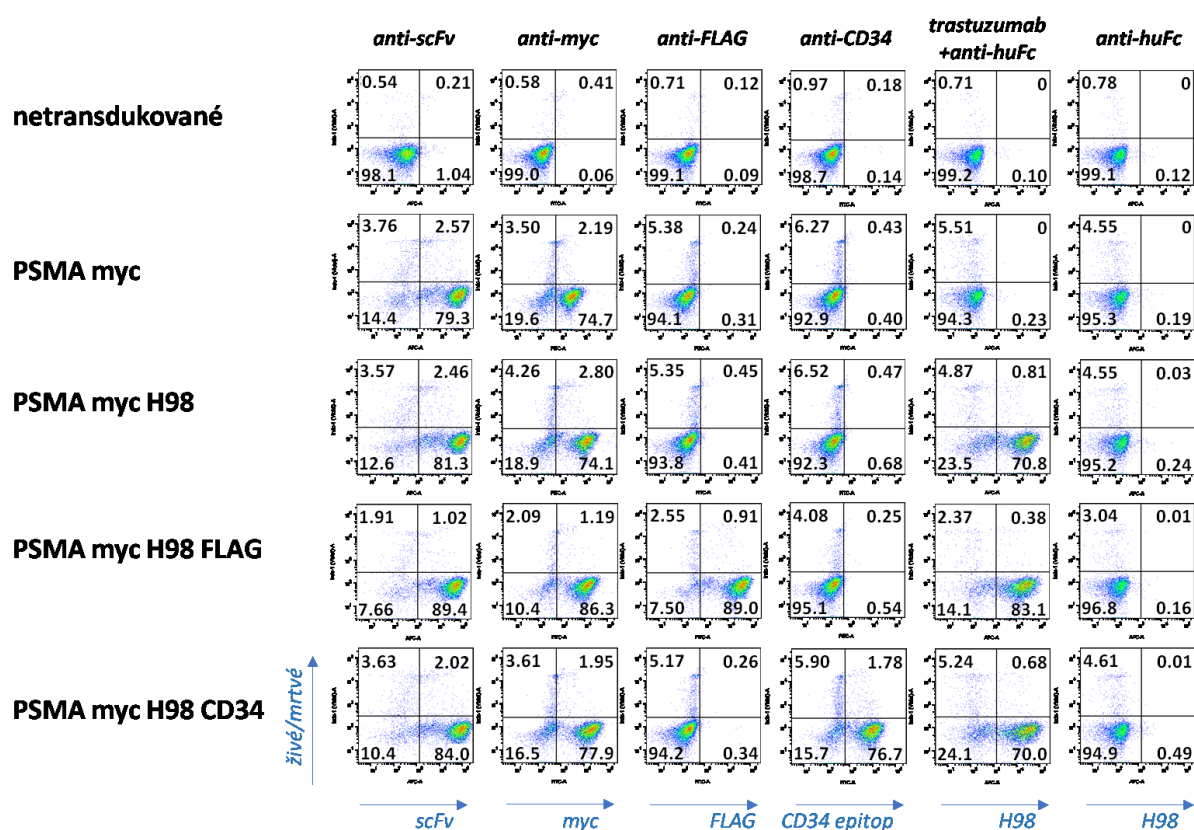
Ilustrativní schéma jednotlivých konstruktů s různě lokalizovanými mimotopy a epitopy. CAR receptory 2. generace s kostimulační doménou 4-1BB. Všechny receptory jsou vloženy v PB transpozonovém systému. První dva uvedené vektory, PSMA CAR myc a CLL-1 CAR myc jsou původní, zkonstruované v laboratoři dříve, z nich byly ostatní vektory odvozeny. *Zkratky: TM, transmembránová doména; SM, submembránová doména.*

5.3.2 Ověření exprese PSMA CAR receptorů s multi-epitopy a vazby protilátek na epitopy

Všechny nově zkonstruované plazmidy pro PSMA CAR receptory byly transfekovány do buněk HEK 293T. Od většiny konstruktů byly připraveny i CAR-T lymfocyty. Druhý den po elektropraci těmito vektory byly T-buňky aktivovány protilátkou anti-myc imobilizovanou na plastik a kultivovány v médiu CellGenix s přidavkem cytokinů Il-2, IL-4 a IL-7. Buňky HEK 293T 48 hod po transfekci nebo CAR-T lymfocyty po 10-14 denní kultivaci byly následně barveny protilátkami proti všem epitopům obsažených v CAR receptoru a analyzovány na průtokovém cytometru. Pro detekci byly použité fluorescenčně značené protilátky anti-scFv AF647, anti-myc FITC, anti-FLAG AF488, anti-CD34 FITC a basiliximab konjugovaný

s AF488, a dále primární protilátky trastuzumab, rituximab, bevacizumab a cetuximab s následnou detekcí pomocí sekundární protilátky anti-huFc AF647. Všechny připravené konstrukty se exprimovaly, což potvrdilo pozitivní barvení všech epitopů scFv a myc (data nejsou ukázána). Bohužel, většinu nových epitopů se nepodařilo detekovat specifickou protilátkou, šlo o epitopy 12P, D12, E72, CD25a mimotop, CD25a neoepitop a CD20 mimotop.

Na **obr. 33** z průtokového cytometru jsou pak ukázány výsledky detekce epitopů H98, FLAG a CD34. Jak je patrné, každý vektor po obarvení jednotlivými protilátkami má přesně korelovanou expresi. Těmto třem vektorům pak byla v následující práci věnována větší pozornost, proto se nejdříve ověřilo, že vložení epitopu do vektoru neovlivňuje vazbu CAR receptoru na antigen a nemění se jiným způsobem jeho funkčnost v porovnání s výchozím vektorem, od kterého byl odvozen.



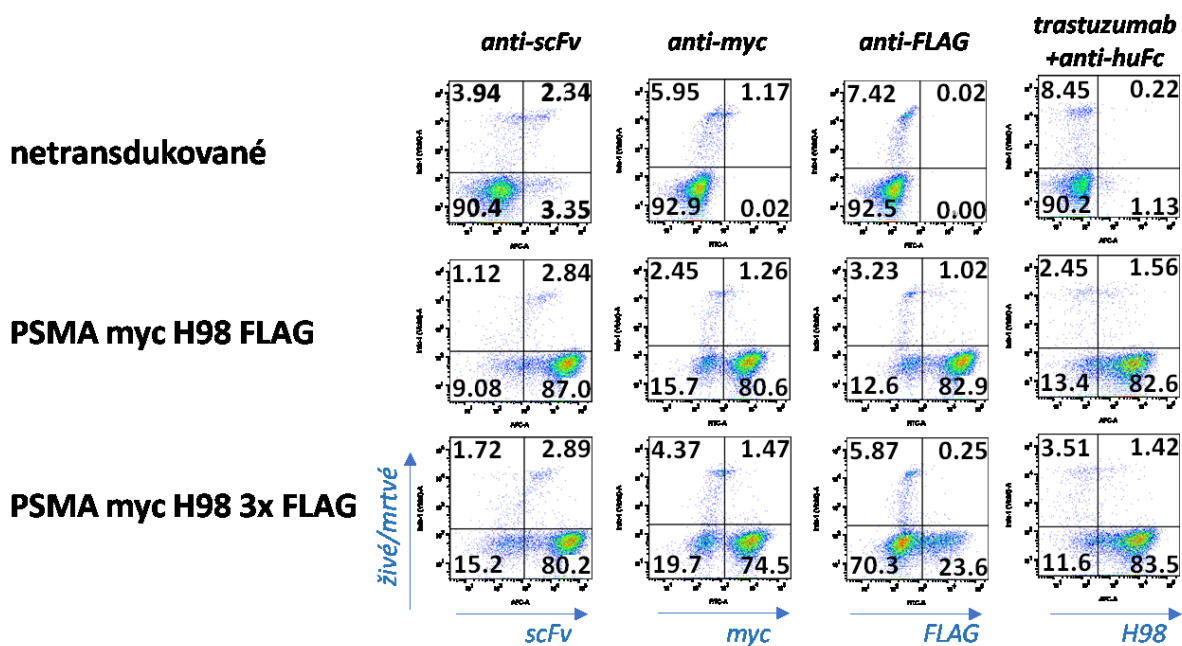
Obr. 33: Detekce epitopů H98, FLAG a CD34 pomocí trastuzumabu, anti-FLAG a anti-CD34

Transdukované T-buňky příslušnými vektory byly po 10 dnech kultivace obarveny protilátkami proti jednotlivým epitopům. Nastavení gatů bylo provedeno na netransdukovaných buňkách značenými stejnými protilátkami a rovněž všechny skupiny byly obarveny samotnou sekundární protilátkou anti-huFc jako další negativní kontroly pro detekci epitopu H98. K rozlišení živých a mrtvých buněk bylo použito DAPI.

Pro ověření byly provedeny dva funkční testy, a to stanovení produkce cytokinu INF- γ a exprese aktivační molekuly CD69. Lymfocyty transdukované vektory PSMA myc, PSMA myc H98, PSMA myc H98 FLAG, PSMA myc H98 CD34 a kontrolní netransdukované vektory byly po promytí PBS resuspendovány v CellGenix médiu bez cytokinů a poté převrstveny přes cílové buňky LNCaP vyšetých den předem na kultivační jamky nebo byly lymfocyty kultivované bez terčových buněk. Po 24 hod inkubaci bylo médium analyzováno metodou ELISA pro stanovení hladiny INF-g. Výsledky prokázaly, že všechny PSMA CAR-T lymfocyty stimulované antigenem PSMA produkují vysoké hladiny cytokinu (data nejsou ukázána). Buňky ze stejného pokusu byly barveny protilátkami anti-myc FITC (k odlišení lymfocytů od terčových buněk) a anti-CD69 PE a analyzovány na průtokovém cytometru. Opět byla pozorována zvýšená exprese CD69 ve srovnání s kontrolními skupinami (data nejsou ukázána). Zároveň byly sledovány v průběhu 14-ti denní kultivace i růstové křivky všech PSMA CAR-T lymfocytů, mezi skupinami nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl v proliferaci (data neukázána). Vložení nových sekvencí do PSMA CAR vektorů tedy nijak nenarušilo vazbu cílové molekuly na receptor a ani neovlivnilo signální transdukcii přes receptor, vektory se dobře exprimují a jsou funkční.

Na **obr. 34** jsou ukázané výsledky srovnání detekce epitopů FLAG a 3x FLAG. Jak je patrné, 3xFLAG se hůře barví. Pomocí anti-FLAG bylo detekováno pouze 23% pozitivních buněk, ale barvením anti-scFv a anti-myc na stejných buňkách bylo detekováno asi 80% CAR+ buněk. O jeden řád je snížena i intenzita fluorescence MFI³¹, pokud se srovná barvení protilátkou anti-FLAG u lymfocytů exprimujících 3xFLAG-tag v porovnání s FLAG-tagem. Přitom ostatní epitopy ve vektoru PSMA myc H98 3xFLAG se detekují se stejně vysokou mírou pozitivivity (kolem 80%) a intenzitou fluorescence, které jsou srovnatelné s barvením těchto epitopů v konstruktu PSMA myc H98 FLAG. Závěrem lze tedy asi říct, že samotný vektor PSMA myc H98 3xFLAG se exprimuje stejně dobře jako PSMA myc H98 FLAG, a tudíž i jako výchozí vektor, od kterého byl odvozen. Pouze epitop 3xFLAG je hůře rozeznáván protilátkou anti-FLAG. Sekvence 3xFLAG je o 444 AK delší než FLAG, délka tagu tak může hrát roli v konečné konformaci receptoru a tím i přístupnosti epitopu k protilátce anti-FLAG.

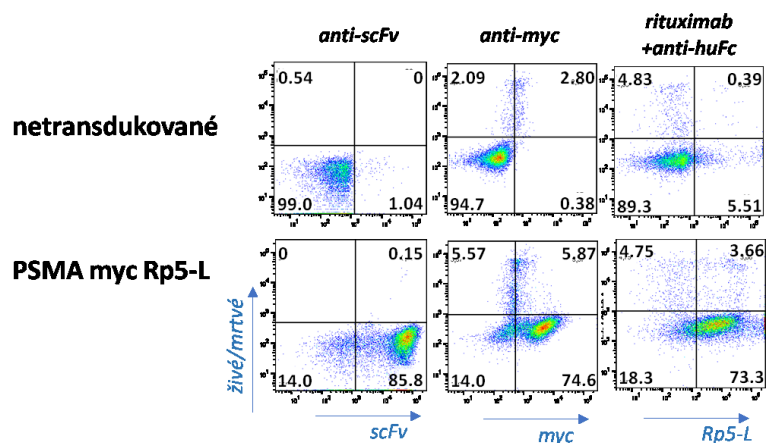
³¹ MFI, mean fluorescence intensity



Obr. 34: Srovnání CAR receptů s epitopem FLAG-tag nebo 3xFLAG-tag

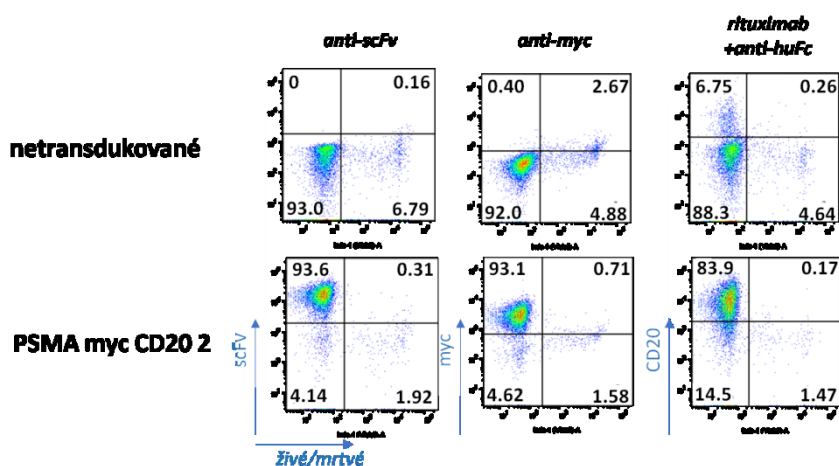
Transdukované T-buňky příslušnými vektory byly po 12 dnech kultivace barveny protilátkami proti jednotlivým epitopům. Nastavení gatu bylo provedeno na netransdukovaných buňkách značenými stejnými protilátkami. K rozlišení živých a mrtvých buněk bylo použito DAPI.

Jako poslední jsou ukázány výsledky barvení dvou epitopů Rp5-L a CD20 2, které byly detekovány rituximabem s následnou detekcí pomocí fluorescenčně značené sekundární protilátky (**obr. 35 a 36**). Mimetop Rp5-L byl úspěšně rozeznáván rituximabem, počet pozitivně detekovaných buněk koreloval s počtem buněk barvených pomocí protilátek anti-myc a anti-scFv. CAR receptor s epitopem CD20 2 a vazba rituximabu na něj byly popsány už v literatuře, a stejný výsledek byl očekáván i v našem nově zkonstruovaném vektoru, což výsledky barvení potvrdily.



Obr. 35: Značení epitopu Rp5-L rituximabem

Transdukované T-buňky vektorem *PSMA myc Rp5-L* byly po 14 dnech kultivace barveny protilátkami proti jednotlivým epitopům. Nastavení gatu bylo provedeno na netransdukovaných buňkách značenými stejnými protilátkami. K rozlišení živých a mrtvých buněk bylo použito DAPI.



Obr. 36: Značení epitopu CD20 2 rituximabem

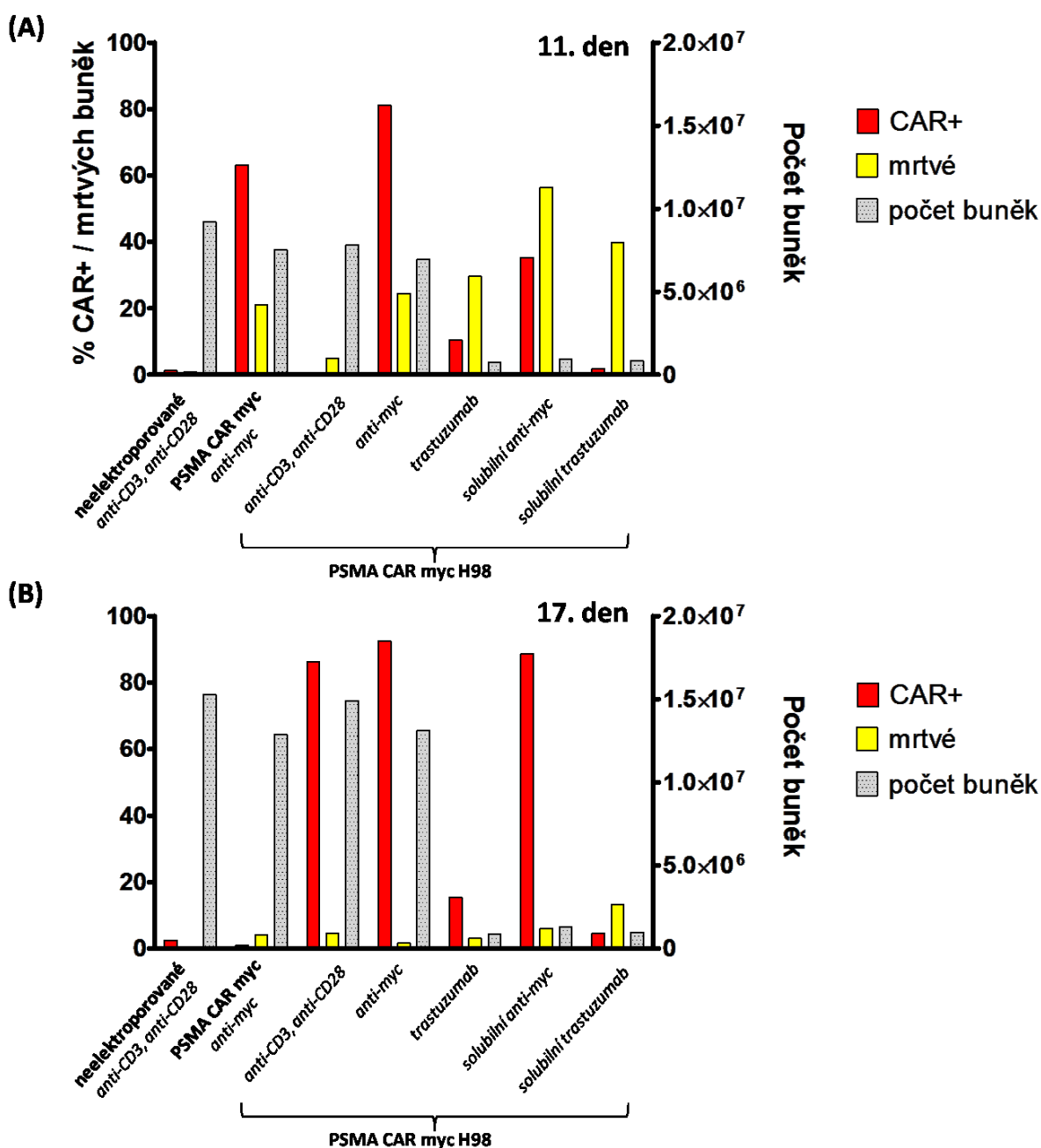
Transdukované T-buňky vektorem *PSMA myc CD20 epitop 2* byly po 14 dnech kultivace barveny protilátkami proti jednotlivým epitopům. Nastavení gatu bylo provedeno na netransdukovaných buňkách značenými stejnými protilátkami. K rozlišení živých a mrtvých buněk bylo použito DAPI.

5.3.3 Stimulace CAR-T buněk protilátkou trastuzumab přes mimotop H98

Vektor *PSMA CAR myc H98* byl prvním zkonstruovaným vektorem s ověřenou expresí receptoru a detekcí mimotopu H98 protilátkou trastuzumab pomocí průtokové cytometrie. Jemu bylo věnováno nejvíce času v navazující části práce, kdy se T-lymfocyty elektroprované tímto CAR receptorem aktivovaly pomocí trastuzumabu.

Byly vyzkoušeny různé způsoby aktivace pomocí transtuzumabu, kdy protilátka byla adherována na plastik (stejným způsobem jako anti-CD3, anti-CD28 nebo anti-myc), nebo byla přidána přímo do média k buňkám (solubilní). Trastuzumab se zkoušel imobilizovat

k plastiku pomocí sekundárních protilátek (proti Fc fragmentu trastuzumabu či proti jeho kappa řetězci). Rovněž trastuzumab byl navazován na sepharosové kuličky přes protein A/G nebo na magnetické kuličky přes protein G, a kdy kuličky byly posléze přidány přímo k buňkám. Byl vyzkoušen i plastík s vysokovazebným povrchem pro protilátky (ELISA destičky), na který byl trastuzumab imobilizován. Modifikovaly se i postupy samotné imobilizace trastuzumabu na plastík, kdy např. místo PBS pro ředění protilátky byl použit karbonátový pufr o pH 9.6, který mohl napomoci vazbě neprotonovanému trastuzumabu k pozitivně nabitému plástu. Byly vyzkoušeny různé koncentrace imobilizovaného trastuzumabu, různé časové intervaly, kdy buňky byly trastuzumabem aktivovány. Důvodem k těmto různým modifikacím aktivace T-lymfocytů byly neúspěchy připravit CAR-T lymfocyty o dostatečném množství, s velkým zastoupením CAR+ a živých buněk. Na **obr. 37** jsou dokumentovány na ukázkou výsledky z jednoho takového experimentu. V tomto konkrétním pokusu byly primární mononukleární buňky elektroporovány původním plazmidem *PSMA CAR myc* a od něho odvozeným plazmidem *PSMA CAR myc H98*. Následující den byly buňky aktivovány protilátkou anti-myc imobilizovanou na plastík a byly k nim do média přidány cytokiny IL-2, IL-4 a IL-7, a udržovány nadále v exponenciální fázi růstu. Tyto skupiny sloužily jako buňky kontrolní. Skupina elektroporovaná vektorem *PSMA CAR myc H98* byla ještě paralelně aktivovaná trastuzumabem vázaným na plastík anebo přidáním protilátek anti-myc a trastuzumabu přímo do média. Zároveň byly připraveny kontrolní buňky, kterými byly neelektroporované lymfocyty a *PSMA CAR myc H98* lymfocyty stimulované protilátkami anti-CD3 a anti-CD28. Buňky v jednotlivých skupinách byly 11. a 17. den po elektroporaci spočítány a pomocí průtokového cytometru byl stanoven počet přítomných CAR+ buněk pomocí barvení protilátkou anti-myc FITC. Z **obr. 37** je patrné, že protilátkou anti-myc vázanou na plastík se podařilo připravit CAR-T lymfocyty o vysokém zastoupením CAR+ buněk u obou skupin elektroporovaných CAR vektory. Naopak trastuzumab nevedl k aktivaci a proliferaci CAR T-buněk, výrazný rozdíl je vidět už 11. den po elektroporaci v celkovém počtu buněk (zhruba 10x méně živých buněk s 10% CAR+ oproti skupině aktivované anti-myc). Ke konci experimentu, tj. 17. den po elektroporaci u této skupiny prakticky nedošlo ke zvýšení absolutního počtu buněk, ani k tomu, že by ve skupině začaly přerůstat neelektroporované lymfocyty. Stejný efekt na CAR-T buňky měl i trastuzumab přidáný do média. Pro srovnání, protilátka anti-myc přidaná k buňkám do média sice nepřispěla k žádné proliferaci CAR-T lymfocytů, nicméně na konci experimentu byla populace zastoupena převážně CAR+ buňkami.

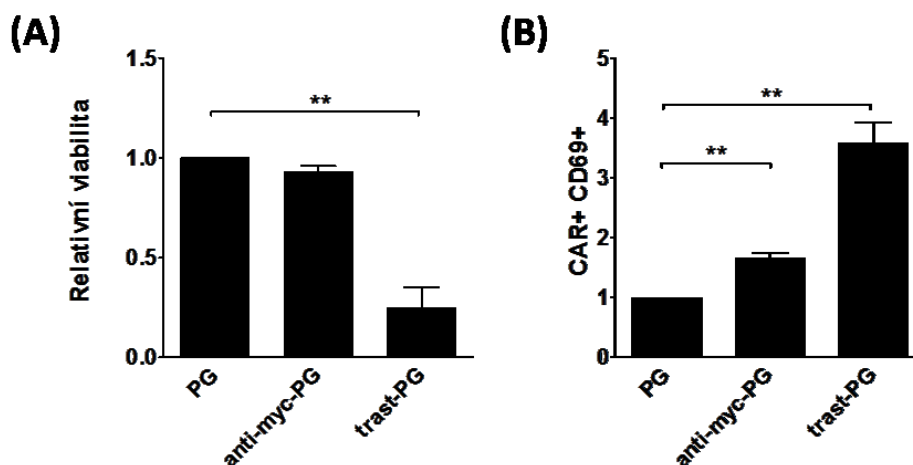


Obr. 37: Stimulace CAR-T lymfocytů pomocí trastuzumabu přes epitop H98

Mononukleární buňky byly elektroporovány vektory *PSMA CAR myc* nebo *PSMA CAR myc H98* a za 24 hod stimulovány aktivačními protilátkami. Obě dvě skupiny byly aktivovány protilátkou anti-myc vázanou na plastik, *PSMA CAR myc H98* T-buňky pak ještě paralelně trastuzumabem vázaným na plastik, nebo protilátkami anti-myc nebo trastuzumabem přidaným k buňkám do média. Jako kontrolní skupina byly připraveny neelektroporované lymfocyty a *PSMA CAR myc H98* lymfocyty stimulované anti-CD3 a anti-CD28. 11. den (A) nebo 17. den (B) po elektroporaci byly buňky spočítány a zároveň bylo stanoven podíl CAR+ buněk a mrtvých buněk v populaci barvením anti-myc FITC a DAPI pomocí průtokového cytometru.

5.3.4 Deplece CAR-T buněk *in vitro* pomocí trastuzumabu přes mimotop H98

Epitop H98 vložený do CAR receptorů nikterak neovlivnil jejich funkci. Trastuzumab se na tuto část receptoru dobře vázal, přesto pomocí něho nebylo možné žádným zkoušeným způsobem nastimulovat k proliferaci CAR+ buňky. Naopak, při kultivaci buněk po elektroporaci vždy ve skupinách, které byly aktivovány trastuzumabem, bylo pozorované větší množství mrtvých buněk s minimálním zastoupením CAR+ buněk ve srovnání se skupinou stejných buněk, které byly aktivovány protilátkou anti-myc. Byly provedeny následující pokusy, pro které byly připraveny CAR-T lymfocyty elektroporované vektorem *PSMA CAR myc H98* a které po elektroporaci byly stimulované k proliferaci protilátkou anti-myc adheřovanou na plastik. Po 14 dnech kultivace, kdy byla pomocí průtokového cytometru ověřena přítomnost CAR+ buněk v populaci (>90%), byly buňky rozděleny do tří skupin o stejném počtu a byly k nim do média přidány magnetické kuličky s navázanou anti-myc protilátkou nebo trastuzumabem, ke třetí kontrolní skupině pak byly přidány samotné kuličky bez protilátky. Za 24 hod byly buňky analyzovány na průtokovém cytometru, byla sledována viabilita CAR+ buněk a exprese časného aktivačního markeru CD69. Výsledky uvedené na **obr. 38** ukazují, že trastuzumab je schopný CAR buňky aktivovat, protože došlo k nejen výraznému zvýšení počtu lymfocytů exprimující CD69, ale i jeho množství (na základě porovnání hladin MFI, výsledky nejsou ukázány). Buňky byly aktivované i pomocí protilátky anti-myc, ale zvýšení počtu CAR+ CD69+ buněk nebylo tak výrazné jako u trastuzumabu. Nutno podotknout, že toto jsou výsledky, kdy se porovnává populace buněk CD69+ k rodičovské a neukazují absolutní počty. Ty jsou částečně vidět na **obr. 38 A**, kde je patrné, že ve skupině s přidáním trastuzumabem na kuličkách došlo k výraznému zabití CAR+ buněk oproti ostatním dvěma skupinám. Obdobně na scatter plotech SSC-A versus FSC-A ve skupině, kam byl přidán trastuzumab, byl patrný úbytek buněčné populace s větším zastoupením buněk se zvýšenou granularitou a buněčné debris (výsledky nejsou ukázány). Trastuzumab tedy buňky *in vitro* zabíjí, je možné že mechanismem podobným buněčné smrti indukované aktivací (AICD), která je pro T-lymfocyty popisována jako apoptóza vyvolaná aktivací prostřednictvím TCR receptorů. Tomu by nasvědčovala právě hyperaktivace CAR buněk, ale bylo by nutné toto dále ověřit, alespoň změřením exprese CD95 či FasL.



Obr. 38: Deplece CAR-T buněk *in vitro* pomocí trastuzumabu

K lymfocytů *PSMA CAR myc H98* byly do média přidány na 24 hod samotné magnetické kuličky s proteinem G (PG), nebo s protilátkou anti-myc či trastuzumabem navázanými k těmto kuličkám přes PG. Buňky byly poté obarveny DAPI a protilátkami anti-myc FITC a anti-CD69 PE. Byla sledována životnost CAR+ buněk (A) a u těchto živých CAR+ buněk exprese molekuly CD69 (B). V grafech jsou hodnoty vyneseny jako relativní, kdy pro kontrolní skupinu se samotnými kuličkami byly vyneseny jako 1 (resp. 100%). Vyneseny výsledky z pěti nezávislých pokusů. Pro statistickou analýzu byl proveden párový t test, ** $P < 0,01$.

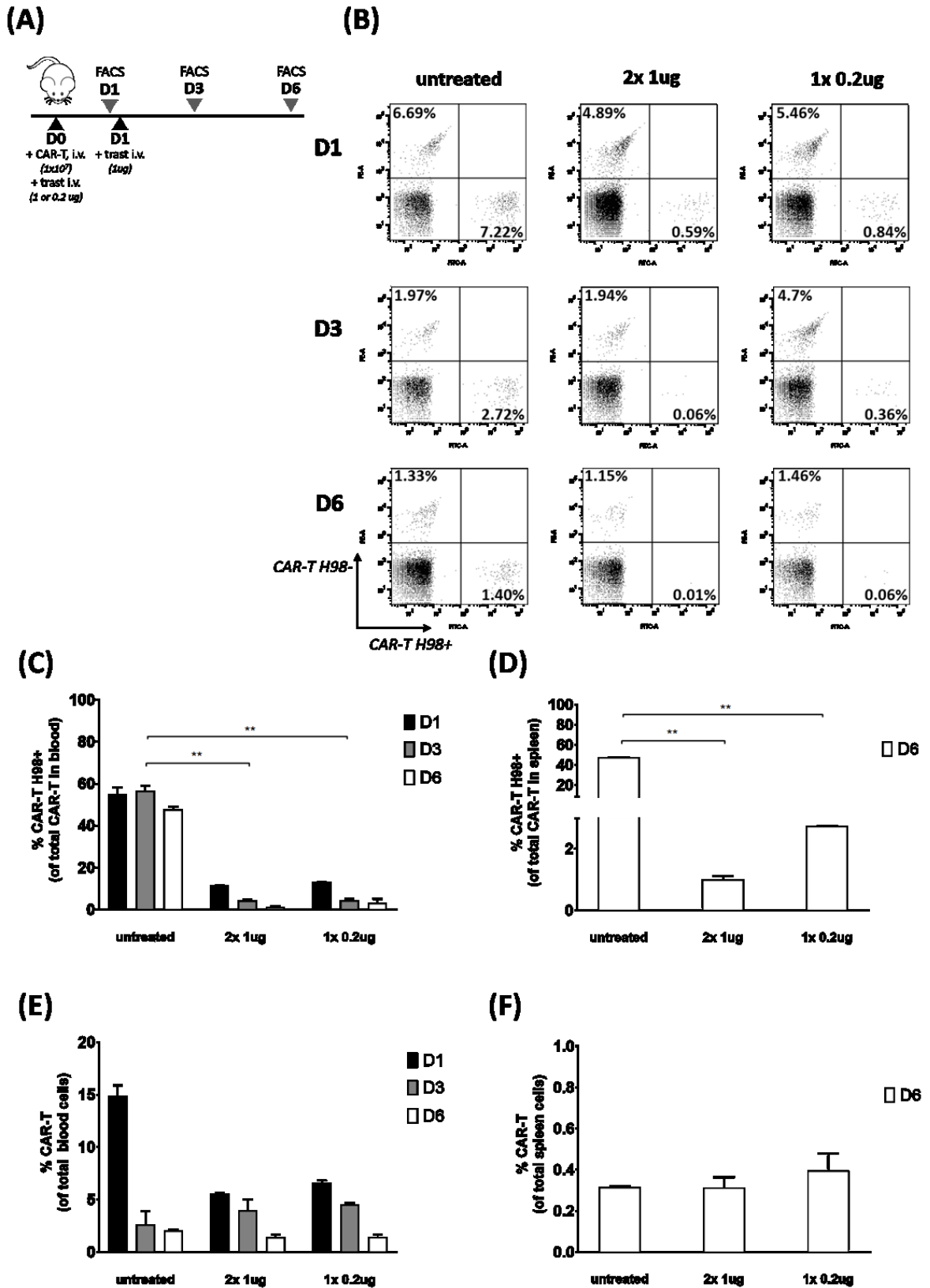
5.3.5 Deplece CAR-T buněk *in vivo* pomocí trastuzumabu přes mimotop H98

Pomocí trastuzumabu specifického pro mimotop H98 se nepodařilo nastimulovat CAR-T buňky k proliferaci, protože protilátka buňky zabíjela. Nabízela se tedy možnost využít jej k depleci CAR-T buněk v případech, kdy by bylo zapotřebí zmírnit vedlejší účinky a cytotoxicitu způsobených CAR-T lymfocyty *in vivo*. Předpokladem tedy je, že by mimotop H98 by mohl fungovat stejně jako např. v literatuře popisovaný zkrácený lidský polypeptid EGFR, který po kotransdukci s CAR receptory slouží v CAR-T buňkách jako cíl pro buněčnou cytotoxicitu závislou na podaném cetuximabu a je tedy cílem pro buněčnou ablacii v případě, kdy by to klinická situace vyžadovala [223].

Pro ověření deplece CAR-T lymfocytů exprimujících mimotop H98 pomocí protilátky trastuzumab byl proveden pokus na myších. NOD/scid myši jsou zavedeným zvířecím modelem pro ADCC kvůli jejich reziduální vrozené imunitě, včetně aktivity NK buněk [224, 225]. Předem byly připraveny dvě skupiny T-lymfocytů, každá byla elektroporována dvěma plazmidy, první skupina vektory *PSMA CAR myc* a pPB mCherry (kóduje oranžový fluorescenční protein) a druhá skupina vektory *PSMA CAR myc H98 CD34* a pPB GFP. Zhruba po 14 denní kultivaci byla na FACSu ověřena úspěšnost koelektroporace. Populace byly zastoupeny zhruba z 91% CAR+ buněk, které zároveň exprimovaly GFP nebo OFP.

Buňky byly smíchány v poměru 1:1 a aplikovány třem skupinám myším (podrobně viz **kapitola 4.4**). Dvěma skupinám byl zároveň podán trastuzumab. První skupině pouze v jedné dávce 0,2 ug, druhé skupině dvakrát v dávce 1 ug. Časové schéma injekce je znázorněno na **obr. 39**. Třetí skupina byla kontrolní, té nebyl trastuzumab podán. První, třetí a šestý den po injekci CAR-T buněk byla myším odebrána krev a po lyzi červených krvinek byla analyzována na FACSu. Poměr buněk obsahující epitop H98 byl stanoven na základě exprese GFP a OFP. Zároveň exprese fluorescenčních proteinů dovolila rozlišit lidské buňky od myších. Na konci experimentu byly myším odebrány sleziny, z kterých byly mechanickým způsobem připraveny buněčné suspenze a které byly stejným způsobem analyzovány na FACSu.

Jak je patrné z **obr. 39 B a C**, u myších, kterým nebyl trastuzumab podán, byly po celou dobu experimentů detekovány v periferní krvi CAR-T lymfocyty, které nesou/nesou H98, ve zhruba stejném poměru 1:1. I když celkový počet CAR-T buněk v krvi s časem klesal (**obr. 39 E**), tento poměr zůstal zachován. Stejný poměr byl pozorován i u lymfocytů zachycených slezinou (**obr. 39 D**). Naopak u myších, které dostaly trastuzumab, byla patrná signifikantní eliminace CAR-T buněk exprimující H98, a to už následující den po podání protilátky. Pokles byl patrný i u lymfocytů zachycených ve slezině, zejména u skupiny, které byl trastuzumab podán ve dvou dávkách. Tyto údaje podporují využití podání trastuzumabu jako sebevražedné strategie.



Obr. 39: Deplece CAR-T buněk *in vitro* pomocí trastuzumabu

popis obr. je na další straně

Obr. 39: Deplece CAR-T buněk *in vitro* pomocí trastuzumabu

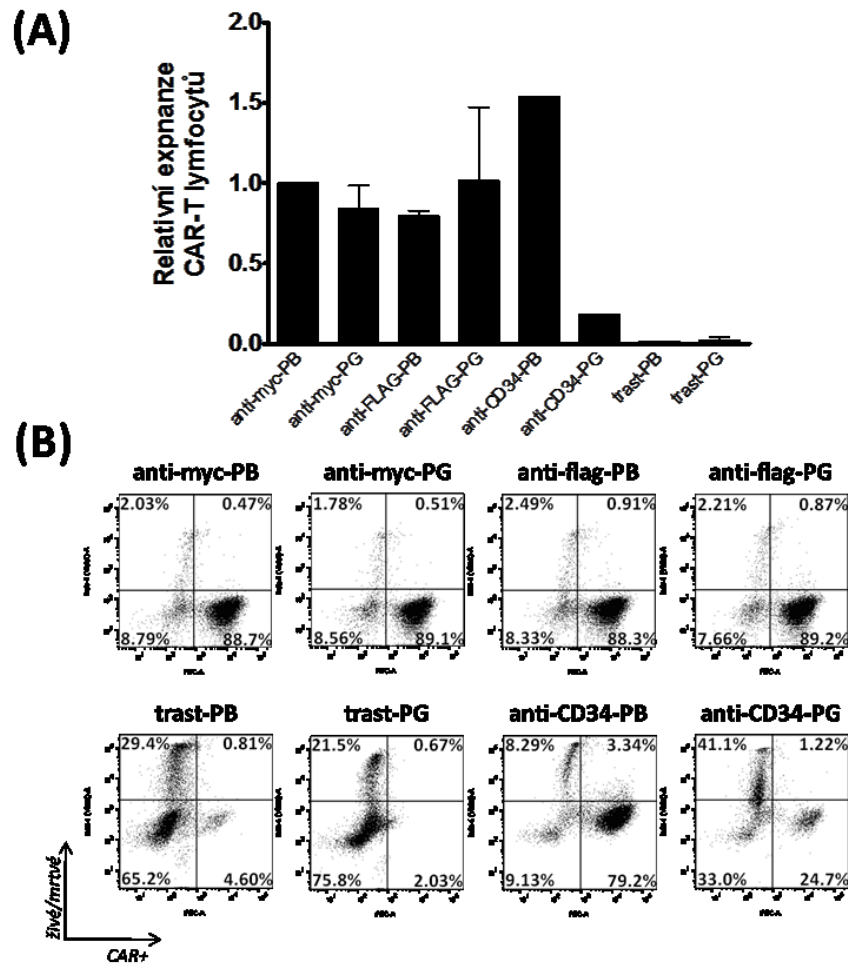
- (A) Časové schéma experimentu na myších. V den 0 byly třem skupinám myším (každá po třech kusech) intravenózně podány CAR-T lymfocyty. Dvěma skupinám byl zároveň podán i trastuzumab v dávce 1 a 0,2 µg. V den 1 byla odebrána krev všem myším, a to před aplikací druhé dávky trastuzumabu 1 ug první skupině. Krev byla odebrána i v den 3 a 6. V den 6 byla odebrána slezina.
 - (B) Na základě exprese GFP a OFP se dají rozlišit CAR-T buňky, které mimotop H98 nesou/nesou a buňky myši. Pro každý den a každou skupinu je vybrána jedna analýza periferní krve jedné myši.
 - (C) Procentuální zastoupení CAR-T buněk, které nesou mimotop H98 a které byly detekovány v periferní krvi. Vynesen průměr z měření od tří myší pro každou skupinu.
 - (D) Procentuální zastoupení CAR-T buněk, které nesou mimotop H98 a které byly detekovány ve slezině. Vynesen průměr z měření od tří myší pro každou skupinu.
 - (E) Procentuální zastoupení všech CAR-T buněk (s/bez H98) v periferní krvi. Vynesen průměr z měření od tří myší pro každou skupinu
 - (F) Procentuální zastoupení všech CAR-T buněk (s/bez H98) ve slezině. Vynesen průměr z měření od tří myší pro každou skupinu.
- Pro statistickou analýzu byl proveden párový t test, ** P < 0,01.

5.3.6 Stimulace expanze CAR-T buněk zprostředkovaná ostatními protilátkami

V této kapitole jsou stručně shrnuty výsledky aktivace expanze CAR-T buněk po jejich elektroporaci CAR receptory, kdy stimulace byla zprostředkovaná novými epitopy vloženými do CAR. Konkrétně se dále zkoušela stimulace přes Rp5-L, FLAG a CD34.

Buňky po elektroporaci příslušnými vektory byly následující den stimulovány protilátkami rituximab, anti-FLAG a anti-CD34, a to imobilizovanými na plastik nebo navázanými na magnetické kuličky prostřednictvím proteinu G. Buňky byly opět kultivované cca 14 dní v médiu s cytokiny IL-2, IL-4 a IL-7. Poté byly spočítány a analyzovány na FACSu pomocí protilátky anti-myc FITC. Paralelně jako kontroly sloužily ty samé skupiny buněk, ale stimulované protilátkou anti-myc rovněž imobilizovanou na plastik nebo navázanou na magnetické kuličky. Výsledky jsou shrnuté na **obr. 40**. Stimulace pomocí protilátky anti-FLAG fungovala stejně dobře jako protilátka anti-myc. Buňky po její stimulaci expandovaly a na konci experimentu dosahovaly stejného výtěžku jak co do počtu buněk, tak i zastoupení CAR+ buněk v populaci. Stejného výsledku bylo dosaženo i stimulací přes epitop CD34 pomocí protilátky anti-CD34, ale to pouze v případě, kdy byla imobilizovaná na plastik. Pokud se k buňkám přidala vázaná na kuličky přes protein G, buňky umíraly a neproliferovaly, stejně tak, jak to bylo pozorováno u stimulace trastuzumabem přes epitop H98 (viz **kapitola 5.3.3**). Stejný efekt, jako trastuzumab, vykazoval i rituximab adherovaný

na plastik i vázaný na kuličky, který stimuloval buňky přes epitop Rp5-L (výsledky nejsou ukázány).



Obr. 40: Stimulace expanze CAR-T buněk vyvolaná různými protilátkami

- (A) Relativní počet buněk po 14-ti denní expanzi CAR-T buněk, které byly po genové manipulaci stimulovány protilátkami specifickými na epitopy, které nesly CAR receptory. Protilátky anti-myc, anti-FLAG, anti-CD34 a trastuzumab byly vázané na plastik (PB) nebo na magnetické kuličky prostřednictvím proteinu G (PG).
- (B) Procentuální zastoupení CAR+ buněk na konci expanze. Buňky byly detekovány protilátkou anti-myc FITC. K rozlišení mrtvých a živých buněk bylo použito DAPI.

5.3.7 Ověření exprese ostatních CAR receptorů s multi-epitopy a vazby protilátek

Epitopy H98, FLAG a CD34 byly rovněž vloženy do dalších CAR receptorů, jejichž exprese a vazba protilátek na jednotlivé epitopy byly ověřeny jak na buněčné linii HEK 293T tak i na primárních T-lymfocytech stejným způsobem, jak bylo pospané v kapitole 5.3.2.

Byly připraveny tři vektory odvozené od *CLL-1 CAR myc*, a to *CLL-1 myc H98*, *CLL-1 myc H98 FLAG* a *CLL-1 myc H98 CD34*. Protilátky anti-myc, anti-FLAG, anti-CD34 a trastuzumab se na epitopy vázaly opět s korelovanou expresí. Používaná protilátka anti-scFv (goat anti mouse) nikoliv, protože variabilní fragment v tomto řetězci je odvozen od lidské anti-CLL1 (výsledky nejsou ukázány). Se stejnými výsledky byla ověřena i exprese *GD2 CAR myc H98 CD34*, kde variabilní fragment je rovněž odvozen od lidské anti-GD2 (výsledky nejsou ukázány).

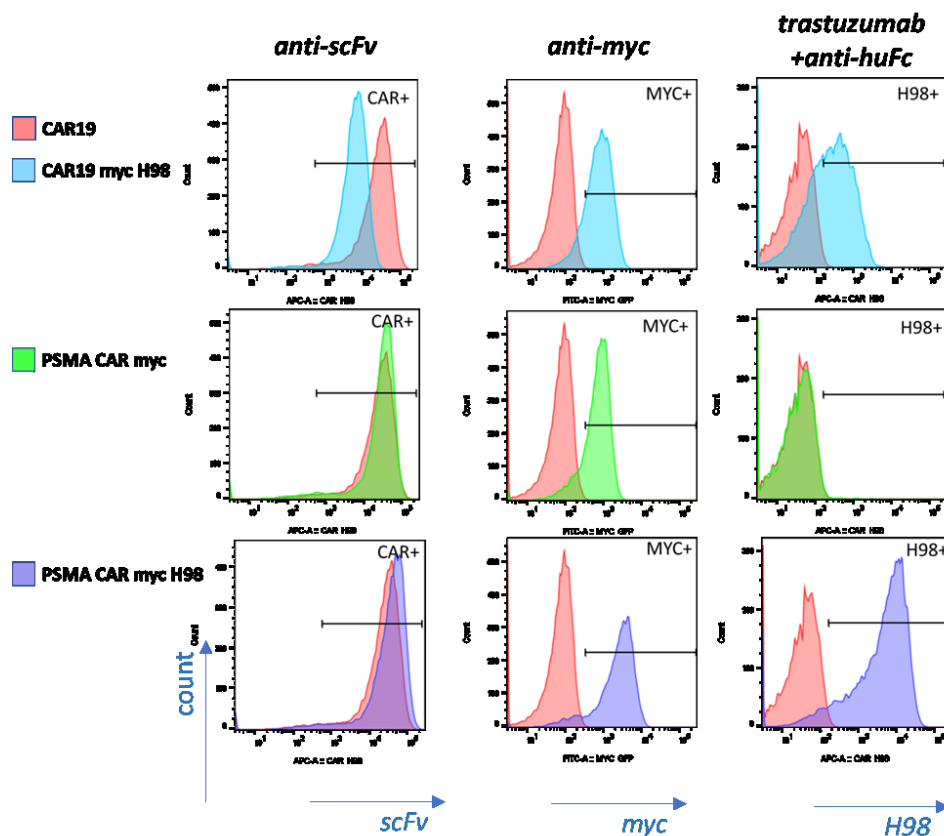
Úspěšně se podařilo s výše zmíněnými protilátkami detekovat epitopy v bispecifickém receptoru *CD19 BCMA biCAR myc H98 CD34* s tím, že již nelze rozeznat, kam přesně se vázala protilátka anti-scFv, protože obě dvě vazebné domény receptoru jsou odvozené od myších monoklonálních protilátek (data nejsou ukázána).

Plazmid *CAR19 myc H98* byl jediný, který se nechal celý nasyntetizovat na zakázku. Pro ověření jeho exprese byl elektroporován do primárních buněk. Elektroporované buňky *CAR19* pak sloužily jako kontrolní skupina. Obě tyto skupiny po elektroporaci nebyly aktivovány protilátkou, ale molekulou CD19 na B-lymfocytech a byly dále kultivovány po dobu 14 dní v přítomnosti IL-2, IL-4 a IL-7. Paralelně stejným způsobem byly připraveny T-lymfocyty s *PSMA CAR myc* a *PSMA myc H98* s tím rozdílem, že tyto buňky byly po elektroporaci aktivovány protilátkou anti-myc imobilizovanou na plastik.

Buňky byly poté analyzovány na průtokové cytometru, výsledky jsou ukázané na **obr. 41**. Z něho je jasně patrné, že buňky elektroporované nasyntetizovaným vektorem *CAR19 myc H98* se hůře barvily protilátkami anti-scFv a trastuzumabem s dalekou menší intenzitou fluorescence ve srovnání jak s *CAR19* tak i *PSMA myc H98*. Přitom intenzita barvení protilátkou anti-myc je srovnatelná jako u buněk s *PSMA myc*. Obrázek ještě navíc ukazuje, že začleněním epitopu H98 do *PSMA CAR myc* vektoru došlo ke zvýšení intenzity barvení epitopu myc v tomto receptoru.

Byl zkonstruován ještě jeden vektor vycházející z nasyntetizovaného vektoru *CAR19 myc H98*, a to vektor *CAR19 myc H98 PH*, který se liší v několika málo aminokyselinách v oblasti hinge. Tento nový konstrukt je tedy přesně totožný v sekvenci s vektorem *PSMA myc H98*, kromě vazebné domény scFv. Oblast hinge včetně epitopů myc a H98 a části anti-CAR vazebné domény byla pro jistotu i osekvenována. Nicméně opakovaně se nepodařilo připravit jak lymfocyty tak ani HEK 293T, které by *CAR19 myc H98 PH* exprimovaly. Neprokázalo se tedy, zda oprava v oblasti hinge by mohla zlepšit vazbu protilátek na epitopy scFv a H98 v *CAR19*.

Posledním vektorem, který byl připraven rovněž z nasyntetizovaného *CAR19 myc H98*, byl konstrukt, kterému byl před vazebnou doménu anti-CD19 přidán epitop 12P. Ani změna umístění tohoto epitopu nevedla k jeho detekci pomocí protilátky bevacizumabu (výsledky nejsou ukázány).



Obr. 41: Srovnání barvení epitopů scFv, myc a H98 u CD19 a PSMA CAR receptorů

T-lymfocyty byly elektroporovány vektory *CAR19*, *CAR19 myc H98* (bez následné aktivace anti-myc) a vektory *PSMA myc* a *PSMA myc H98* (s aktivací expanze pomocí protilátky anti-myc). Po 14-denní kultivaci byly buňky barveny pomocí anti-scFv AF647, anti-myc FITC a trastuzumabem s následnou detekcí anti-huFc AF647. Paralelně netransdukované buňky barvené stejnými protilátkami sloužily k nastavení positivity exprese epitopů. Výsledky z průtokového cytometru jsou vyneseny jako histogramy, kde na ose y je vynesena počet buněk.

6. DISKUZE

T-lymfocyty modifikované chimerickými antigenními receptory jsou slibnou terapií určenou pro léčbu leukémií a solidních nádorů. Zhruba před deseti lety bylo dosaženo prvních klinických výsledků s pozoruhodnými účinky v léčbě B-ALL. Od té doby se výzkum intenzivně věnuje nejen vývoji samotných CAR receptorů pro dosažení vyšší účinnosti a bezpečnosti, ale i zlepšení technologie jejich výroby a přenosu genů [132]. V rámci dizertační práce bylo připraveno několik CAR receptorů s navrženými změnami v základní struktuře receptoru 2. generace s cílem vylepšit vlastnosti CAR-T buněk a imunoterapii nádorových onemocnění: zabránit úniku maligních klonů, které přestanou exprimovat cílový antigen (*i*), zasáhnout maligní klony, které cílový antigen nikdy neexprimovaly (*ii*), zavést systém, který umožňuje pozitivní nebo negativní selekci *in vitro* během výroby a *in vivo* po podání pacientovi (*iii*), překonat imunosupresivní prostředí a zvýšit perzistenci buněk *in vivo* (*ii*), zvýšit počet expandovaných CAR-T buněk během výroby a zajistit jejich snadné monitorování (*iii*).

(*i*)

Adoptivní terapie pomocí CD19 CAR-T lymfocytů je vysoce účinná v léčbě akutní lymfoblastické leukémie (B-ALL) nebo B-buněčných lymfomů. Jde o účinnou terapii pro pacienty, kteří nereagovali na konvenční léčbu nebo po ní zrelabovali. I přesto 30-60% pacientů po CD19 CAR-T terapii znovu relabuje, přičemž 10-20% relapsů je CD19 negativních. Možnosti další léčby jsou už omezené. Je tedy velkou snahou zabránit relapsům objevujících se po CAR-T terapii, zejména těm CD19 negativním [202, 226, 227]. Jednou z možností, jak jim předejít, je použití tandemových, čili bispecifických CAR receptorů [228]. Myšlenka není nikterak nová, první návrh struktury CAR molekuly zprostředkující bispecifickou aktivaci a cílení T-buněk na dva cíle byla popsána už v roce 2013 a vzešla z počítačového modelování. Podle něho Grada *et al.* zkonstruovali první tandemový CAR (TanCAR) pro antigeny CD19 a HER2. Receptor rozpoznával každou cílovou molekulu individuálně a umožňoval synergetickou aktivaci a funkčnost v případě přítomnosti obou cílových molekul [229]. Stejně fungující CAR receptory jsme se pokusily v laboratoři připravit a ověřit i my. Zkonstruovali jsme dva bispecifické receptory biCAR19-20 a biCAR20-19. V každém glykoproteinu jsou vloženy dva vazebné motivy anti-CD19 a anti-CD20, konstrukty se liší pouze jejich pořadím. Výběr druhého vazebného motivu anti-CD20 byl nasnadě. Za prvé, v laboratoři byl již dříve vyzkoušen a charakterizován monospecifický

CAR20 [204]. Za druhé, molekula CD20 je exprimovaná na většině CD19 pozitivních ALL buňkách [230, 231]. Navíc se nepředpokládá, že by relaps onemocnění mohl být způsobem blasty, které by přestaly exprimovat oba antigeny najednou. Velkou výhodou je i to, že exprese CD20 ve zdravých tkáních je omezena na prekurzorové B-buňky, což snižuje riziko vedlejšího účinku terapie CAR-T buněk spojeného s „on-target, off-tumor“ toxicitou [232]. Při samotném návrhu bispecifických konstruktů se vyšlo ze sekvencí našich monospecifických receptorů CAR19 a CAR20. Pro oddělení vazebných motivů jsme pak použili linker (G₄S)₄. Výběr peptidového linkeru je nezbytný pro správnou separační vzdálenost mezi funkčními jednotkami, může ovlivnit jednak přístup receptoru k epitopu, ale i vazebnou adivitu [233]. Motiv Gly₄Ser s různým opakováním je běžně používaný a dobře charakterizovaný flexibilní peptid, který je rezistentní k štěpení proteázami a jeho začlenění do pantové oblasti zpravidla nevede k výraznější separaci vazebných domén [233]. Stejný motiv se stejným počtem opakováním, jako jsme použili my v našich konstruktech, byl použit k oddělení vazebných domén anti-CD19 a anti-CD20 v bispecifických receptorech, které již byly úspěšně ověřeny funkčně *in vitro* a *in vivo* a publikovány [234, 235]. Nicméně v práci Qin *et al.* připravili několik variant bispecifických CAR receptorů pro CD19 a CD22, na kterých ukázali, že délka linkeru mezi vazebnými doménami, resp. počet opakování Gly₄Ser, ale i délka linkeru mezi V_H a V_L ve vazebné doméně může výrazně snížit expresi bispecifických CAR receptorů oproti původním monospecifickým [236]. V našich konstruktech jsme spojení mezi lehkými a těžkými řetězci ponechali stejné, jako ve výchozích monospecifických CAR receptorech, ze kterých byly odvozeny. Je však možné, že kdybychom toto spojení modifikovali, mohli jsme docílit zvýšené exprese bispecifických konstruktů. Zbylá struktura CAR receptoru zůstala zachována, tj. za vazebnými doménami následuje oblast hinge, transmembránová doména odvozená od molekuly CD8 α a intracelulární část sestávající se z kostimulační domény 4-1BB a aktivační domény CD3 ζ . Naše bispecifické CAR receptory jsou vloženy do lentivirových vektorů odvozených od viru lidského imunodeficitu typu 1 (HIV-1). Dalším krokem tedy bylo nutné připravit lentivirové partikule a infikovat jimi buněčnou linii pro ověření exprese, my jsme si vybrali buněčnou linii T-lymfocytů, Jurkat. Protokol pro přípravu lentivirů a transdukci buněk je v laboratoři dobře zaveden [204], což dokumentovaly buňky Jurkat infikované virem s kontrolním proteinem GFP, kdy jsme pět dní po transdukci dosahovali téměř 100% účinnosti. Při infekci viru s bispecifickými CAR receptory jsme dosahovali nižších účinností (mezi 50-70%). Tento výsledek není nikterak překvapivý, a snížená účinnost transdukce se dala předpokládat. Měla bych pro ni dvě vysvětlení. Zprv, může být způsobena velikostí přenášeného transgenu.

Protein GFP je daleko menší v porovnání s bispecifickými CAR receptory. Jeho nukleotidová sekvence je 716 bp dlouhá, zatímco velikost receptorů je něco kolem 1670 bp (celé elementy mezi 3' a 5' LTR pak mají 4.380 bp, resp. 5.230 bp). V literatuře se uvádí, že produkce viru a účinnost transdukce virovou RNA v rozmezí od 5 do 9 kb je obecně velmi slušná, zatímco vektory v rozmezí od 10 do 18 kb jsou transdukovány už hůře [237, 238]. Avšak v práci Canté-Barrettové *et al.* došli k závěru, že i délka relativně malých vektorů je důležitým faktorem ovlivňující přenos lentivirového genu na úrovni produkce viru a následné účinnosti buněčné transdukce [239]. Buňky Jurkat, které infikovali množstvím 10^6 virových partikulí připravených z lentivirových vektorů, do kterých zaklonovali elementy o velikosti 4.215, 5.190 a 5.750 bp, se výrazně lišily v účinnosti transdukce, a to s výsledkem 75%, 50% a 20% transdukováných buněk Jurkat [239].

Za druhé, detekce proteinu GFP v buňkách pomocí průtokové cytometrie je citlivější v porovnání s detekcí CAR receptorů pomocí fluorescenčně značené protilátky. Předpokládám jednak, že celkový počet molekul proteinu GFP naprodukovaných v buňkách je daleko větší než povrchových molekul bispecifických CAR receptorů z důvodu rozdílné stability proteinů. Uvádí se, že poločas rozpadu GFP v savčích buňkách je 26 hod [240]. V literatuře je těžké dohledat poločas rozpadu CAR receptoru, stěžuje to výrazná variabilita struktur CAR receptorů. Např. Fujiwara *et al.* ukazují, že jejich připravené CAR receptory 2. generace zmizí z membrány s poločasem přibližně 12 hod poté, co se ztratí CAR mRNA [241]. Navíc v našem kontrolním vektoru máme zaklonovanou variantu GFP s mutací, díky čemuž je protein 35x jasnější než jeho původní divoká mutace a zároveň je tato varianta optimalizována v kodónech pro vyšší expresi v savčích buňkách [242]. Tento vylepšený protein tak výrazně zvyšuje citlivost metody detekce. Z těchto důvodů jsme asi proto schopni pomocí průtokového cytometru zachytit i buňky s menším počtem integrovaných kopií GFP, kdežto buňky s menším počtem integrovaných kopií CAR receptorů vyhodnotíme po obarvení specifickou protilátkou jako negativní.

Stejným způsobem, tedy lentivirovou transdukcí, pak byly vektory biCAR19-20 a biCAR20-19 modifikovány primární lidské mononukleární buňky s následnou aktivací pomocí monoklonálních protilátek anti-CD3 a anti-CD28 a kultivací za přítomnosti IL-2 k získání CAR-T lymfocytů. Po zhruba 14 denní kultivaci byly připraveny lymfocyty se zastoupením CAR+ pozitivních buněk v rozmezí 30-50%. Dosahovali jsme tedy snížené účinnosti transdukce ve srovnání s buňkami Jurkat (50-70%). Stejný efekt jsme pozorovali i u lymfocytů transdukováných kontrolním GFP (40-50%) v porovnání s téměř 100% účinností u buněk Jurkat. Tyto rozdíly nejsou však překvapivé. Obecně platí, že řada buněčných linií je

snadno a účinně transdukována pomocí lentivirů. Naproti tomu primární lidské T-buňky, zejména klidové, jsou vůči transdukcii lentivirem odolnější [243]. Nedojde u nich k dokončení reverzní transkripce a integrace do genomu, pokud nejsou aktivovány prostřednictvím TCR receptoru nebo cytokiny podporující proliferaci [244]. To nebude případ našich CAR-T buněk, protože ty byly aktivovány hned po transdukcii přes TCR receptor a molekulu CD28. Zároveň od samého začátku jsou kultivovány v přítomnosti IL-2, jednoho z důležitých cytokinů regulující T-buněčný růst a podporující přežití buněk indukcí exprese řady proteinů [245]. Množství dodávaného IL-2 do média bylo po celou dobu kultivace 1.000 U/ml, což je dostatečné. V celé řadě prací byly transdukovány lymfocyty kultivovány i v menším množství IL-2, jako například v množství 100 U/ml přidaného cytokinu [246, 247]. Účinnost transdukce výrazně ovlivňuje i množství použitých lentivirových částic [248]. My jsme pro přípravu lentivirů použili protokol, který je v laboratoři snadno proveditelný, a není ani časově ani přístrojově náročný. Přesný titr viru jsme nestanovovali, ale na základě exprese transgenů GFP v transdukováných buňkách jsme schopni odhadnout funkční titr, i když tato metoda je omezena vzhledem k nemožnosti rozlišit buňky s více kopiemi vektoru [74]. Funkční titr můžou snižovat i přítomné interferující částice a kontaminanty plazmidové DNA, které se do supernatantů dostanou během transfekcí používaných pro produkci virových částic [248]. Z tohoto důvodu se využívají postupy, které koncentrují lentivirové partikule za účelem zvýšení titru a odstranění nečistot. Obvykle se používají ultracentrifugace či ultrafiltrace [249, 250]. Četné studie používají optimalizované protokoly produkce lentiviru založených na těchto technikách za účelem zvýšení vysokého titru lentiviru, ale už bez ohledu na infekčnost produkovaného viru [251]. Cribbs *et al.* ukázali, že pro přípravu lentiviru s vysokým titrem a účinností transdukce primárních lidských T-buněk je lepší použít koncentrování pomocí nižších rychlostí centrifugace, v jejich případě pak 20.000g. Když totiž porovnávali nekoncentrovaný lentivirus, který byl po odebrání supernatantu stočen při 1.500 rpm 5 min (stejně jako naše LV supernatanty) s lentivirem koncentrovaným standardním postupem ultracentrifugací 90.000 g po dobu 90 minut, došlo k 10-ti násobnému snížení výtěžku viru, což naznačovalo, že během ultracentrifugace docházelo k významné ztrátě viru nebo ztrátě infekčnosti [251]. Naopak zakoncentrování a čištění virů snížením odstředivé rychlosti ze standardního protokolu 90.000 g na 20.000 g se výrazně zlepšila účinnost transdukce [251]. Naše lentiviry jsme produkovali do malého objemu kultivačního média (1 ml), kterým pak byly po stočení 1.500 rpm/5 min nebo filtrací přes filtr s póry o velikosti 45 nm rovnou infikovány primární buňky. Tímto postupem se odstranily pouze buňky HEK 293T či jejich buněčné debris, nikoliv zbytky plazmidové DNA. Je tedy možné, že modifikací postupu

začleněním kroku čištění LV supernatantů centrifugací při 20.000 g bychom mohli tak dosáhnout zvýšené účinnosti transdukce našich T-lymfocytů. Stejně tak i modifikací přípravy LV supernatantu z většího počtu buněk HEK 293T a následným zakoncentrováním na 1 ml lentivirového supernatantu.

Dalším faktorem, který ovlivňuje samotný počátek transdukce, je elektrostatické odpuzování mezi negativně nabitou buňkou a blížícím se obalovým virem [252]. Protokoly pro virovou transdukcí proto zahrnují centrifugaci cílových buněk a viru při nízkých rychlostech a zároveň doporučují více opakování transdukci [252, 253]. Důležitým krokem je přidání pozitivně nabitých polykationtů jako jsou polybren, DEAE-dextran, protamin-sulfát či poly-L-lysin, které snižují odpudivé síly mezi buňkou i virem a zvyšují tak účinnost transdukce [254, 255]. Warren *et al.* na základě svých výsledků doporučují pro každý typ buněk otestovat nejen různé polykationty, ale i různé zdroje sér (fetální nebo telecí sérum, inaktivované nebo aktivované) [256]. Pro transdukcí buněk Jurkat jsme používali polybren a inaktivované telecí sérum, stejně tak pro primární buňky. Je však možné, že výběrem jiného polykationtu či séra bychom mohli opět zvýšit účinnost transdukce T-lymfocytů.

Zvýšení účinnosti transdukce T-lymfocytů pomocí lentivirů bychom mohli zcela jistě dosáhnout i aktivací CAR+ buněk pomocí specifické protilátky (anti-myc nebo anti-FLAG) během expanze, tak jak bylo používáno v další části dizertační práce. Nově zkonstruované bispecifické receptory by šlo tedy ještě vylepšit začleněním krátkých peptidů do receptoru za účelem specifické aktivace, nebo je rovnou překlouvat do transpozonového systému.

Jak bylo zmíněno, lentivirovou transdukcí primárních buněk bispecifickými receptory biCAR19-20 a biCAR20-19 jsme získávali v průměru mezi 30-50% CAR+ pozitivních T-lymfocytů. Stanovení jsme prováděli na průtokovém cytometru barvením buněk pomocí protilátky anti-scFv AF670, resp. kozí protilátkou proti myši, protože vazebné části CAR receptorů jsou odvozeny stejně jako u monospecifických CAR19 a CD20 od monoklonálních myších protilátek. Jistou nevýhodou tohoto stanovení u bispecifických receptorů je, že nejsme schopni rozlišit, zda se protilátka anti-scFv váže na obě dvě části receptoru se stejnou účinností jako u monospecifických CAR receptorů. V budoucnu by bylo jistě dobré nechat na receptory navázat například fluorescenčně značené peptidy CD19 a CD20 specifické k příslušným scFv částem CAR receptorů či přímo značené rekombinantní ligandy CD19 a CD20. Tím bychom si ověřili, že v tandemově specifických konstruktech si obě dvě domény zachovaly schopnost vázat cílové antigeny a jejich začleněním do společného konstruktů se mezi nimi neobjevily sterické zábrany. Lépe bychom pak byli schopni interpretovat i výsledky funkčních testů.

Zhodnotit, zda jsme byli v samotné přípravě bispecifických CAR-T lymfocytů pomocí lentivirové transdukce úspěšní, a výsledky porovnat s literaturou je obtížné, protože existuje široké spektrum způsobů přípravy lentivirových částic s následnou transdukcí. Například v práci Schneiderové *et al.*, ve které rovněž připravovali CAR-T lymfocyty s tandemovým receptorem proti CD19 a CD20 pomocí lentivirové transdukce, dosahovali účinnosti v rozmezí 80-89%. Nicméně používali jiný protokol transdukce, kdy z mononukleárních buněk purifikací vyizolovali přímo populaci CD3+ buněk, které stimulovali pomocí TransActu CD3/CD28 a teprve třetí den po aktivaci buňky modifikovaly vektory [235]. V jiné práci [257], kde používali pro přípravu bispecifických CD19 CD20 CAR receptorů již standardizovaný protokol pro klinické použití, dosahovali účinnosti transdukce pouze 11%. Zdrojem byly buňky purifikované z periferní krve pomocí magnetických kuliček CD3/CD28 (Dynabeads), kterými byly zároveň T-lymfocyty aktivovány a za dva dny byly buňky transdukovány. Nutno ovšem poznamenat, že se při přípravě vycházelo z kryoprezervovaných buněk od pacientů s diagnózou B-ALL [257]. Oba tyto faktory zcela určitě mají vliv na konečnou nízkou účinnost transdukce. Závěrem si dovoluji konstatovat, že si myslím, že se naše T-lymfocyty dařily transdukovat s velmi dobrým výsledkem.

S nově konstruovanými bispecifickými CAR receptory byly dále provedeny funkční testy. *In vitro* byla sledována aktivita laktát dehydrogenázy, sekrece cytokinu INF- γ , exprese časného aktivačního markeru CD69 a cytotoxická aktivita CAR-T lymfocytů. Všechny provedené pokusy potvrdily funkčnost bispecifických CAR receptorů. Změřené výsledky naznačují, že z dvojice by lépe mohl fungovat biCAR19-20. Lymfocyty modifikované tímto vektorem měly vyšší cytolytickou účinnost, což potvrdila i aktivita laktát dehydrogenázy. Na druhou stranu je nutné zmínit, že do těchto funkčních testů byl nasazen vždy stejný počet lymfocytů, bez ohledu na výsledné zastoupení CAR+ buněk v populaci. Jak bylo zmíněno, vektor biCAR19-20 oproti biCAR20-19 se lépe transdukoval (cca 40-50% oproti 30%), a tím mohly být výsledky funkčních testů ovlivněny. Pro příště bylo by lepší do testů nasadit buňky přepočítané na stejný počet CAR+ buněk bez ohledu na počet nasazených netransdukovaných lymfocytů, které by neměly být ve funkčních testech aktivovány, nebo jen mírně nespecificky. Další možností by bylo např. využít vyzkoušených epitopů myc či CD34 (popsaných ve třetí části práce) a vložit je také do bispecifických CAR receptorů. Po expanzi buněk modifikovaných těmito vektory by bylo možné vypurifikovat pomocí magnetické separace čistou populaci CAR-T buněk a použít jí do funkčních testů a následně výsledky porovnat.

Vliv na cytolýzu, resp. aktivaci jednotlivých biCAR receptorů, ovlivňuje i vzdálenost mezi T-buňkou a buňkou cílovou. Důležité je prostorové uspořádání scFv v receptoru, jeho poloha na membráně a umístění cílového antigenu v buňce [258, 259]. Např. v práci Hombach *et al.* porovnali dva různé anti-CEA receptory. První rozeznával proximální část epitopu antigenu CEA a aktivoval CAR-T buňky s vyšší účinností. Druhý se vázal na distální část epitopu sice s daleko vyšší afinitou, ale účinnost aktivace byla nižší [260]. Proto pořadí anti-CD19 a anti-CD20 v bispecifických receptorech může být pro jejich funkci rozhodující. V již zmiňované práci Schneiderové *et al.* zaznamenali nižší úroveň lýze buněčných linií negativních na CD20 zprostředkovanou biCAR19-20 na rozdíl od tandemového vektoru biCAR20-19. Vysvětlují to tím, že vazebná doména CD19 musí být umístěna blízko buněčné membrány T-buňky, aby receptor lépe fungoval [235].

V našich testech, které byly provedeny, byly i značné rozdíly mezi monospecifickými receptory CD19 a CD20, z nichž daleko lépe fungoval CAR19. CAR19 T-lymfocyty měly vyšší cytolýzu, větší produkci INF- γ , větší aktivitu laktát dehydrogenázy, a daleko větší odpověď CD69 na aktivaci. Opět se tu mohl uplatnit vliv celkového počtu CAR+ buněk nasazených do testů. Ale v potaz by se měly vzít i biofyzikální vlastnosti vazby samotných receptorů, jako jsou afinita, avidita, ale i hustota samotných antigenů. A ty samozřejmě se ovlivní funkčnost jak monospecifických tak bispecifických konstruktů.

Závěrem lze tedy říct, že se podařilo připravit dva funkční bispecifické CAR receptory specifické na CD19 a CD20. Provedené testy by bylo potřeba doplnit o další nejen *in vitro*, ale i o pokusy *in vivo*.

(ii)

Účinnost adoptivní CAR-T terapie solidních nádorů snižuje řada faktorů, jako je stroma, přítomnost velkého množství infiltrovaných imunosupresorových buněk a maligních buněk, které ztratily zacílený antigen [261]. Některé z těchto překážek lze překonat použitím CAR-T lymfocytů s indukovatelnou nebo konstitutivní produkcí cytokinů (TRUCK). Po přesměrování CAR-T buněk následovanou produkcí cytokinů dochází jednak k indukci vrozené imunitní odpovědi, která ničí nádorové buňky, které nejsou CAR-T buňkami rozeznávány, a zároveň se spouští programové změny v imunosupresorových buňkách [261]. V rámci této práce byly sestrojeny 4 vektory pro CD19 CAR a sekretovaný IL-21, a to jak ve variantě inducibilního nebo konstitutivního expresního systému, a jeden vektor PSMA CAR s inducibilní sekrecí IL-21.

IL-21 byl vybrán na základě předchozích experimentů v laboratoři, které ukázaly, že kultivace CAR-T lymfocytů v přítomnosti IL-21 v médiu vede k preferenční expanzi nezralých T-buněk, a to T_{CM} a T_{SCM} . Zároveň u těchto T-buněk byla zjištěna nízká exprese inhibičních receptorů PD-1, LAG-3 a TIM-3 [205]. Samotný interleukin 21 je pleiotropní cytokin, který reguluje jak vrozenou tak specifickou imunitu. Má silné protinádorové účinky díky své schopnosti indukovat a expandovat cytotoxické CD8⁺ T buňky, NK a NKT buňky. Zároveň má schopnost potlačovat expresi FOXP3 a expanzi T_{regs} [262]. Má vliv na přežití a diferenciaci B-buněk a funkci buněk dendritických [263]. Kromě toho IL-21 působí na lymfoidní buňky různých leukémií a lymfomů. Na straně jedné může podporovat jejich proliferaci, na straně druhé naopak vyvolat zastavení růstu a apoptózu [263]. Kromě toho může být protinádorová aktivita IL-21 potencována jeho kombinací s jinými molekulami zvyšujícími imunitu, monoklonálními protilátkami rozpoznávajícími nádorové antigeny, chemoterapií nebo látkami cílenými na molekuly [263]. Z hlediska své snášenlivosti je IL-21 vhodný také pro kombinované terapeutické režimy s jinými látkami [263]. IL-21 se tedy jevil jako vhodný cytokin pro začlenění do CAR receptorů a přípravy tzv. TRUCK.

Konstrukty s inducibilní expresí byly navrženy tak, aby samotný CAR receptor a indukovatelná kazeta pro IL-21 byly součástí jednoho vektoru. Sice když dva transgeny mají různé transkripční regulační jednotky, jsou velmi často do buněk kotransfekovány současně na dvou samostatných plazmidech, výsledkem je ale směs dvou nebo více transfekovaných buněk [264]. Začleněním do jediného konstruktů tyto kotransfekce odpadají. Na druhou stranu ale hrozí, že interference mezi dvěma promotory nacházejících se v jediném konstruktů ovlivní expresi jednoho z transgenů [265-267]. Tento jev je často pozorovaný u virových vektorů i v případech, kdy dva transgeny jsou umístěny v opačném směru. To bylo pozorováno i v případech, kdy byl připraven jediný virový vektor pro indukovatelný promotor obsahující 4 nebo 6 responsivních elementů NFAT následovaných minimálním IL-2 promotorem, a který byl řízen aktivačními signály z CD19 CAR [268], což je i stejné schéma struktury našich konstruktů. Proto jsme do vektorů začlenili krátké izolační sekvence oddělující tyto dvě transkripční jednotky, aby se eventuálně zmírnilo potenciální působení polyadenylačních, terminátorových a promotorových sekvencí. Kowarz *et al.* připravili podobné neviróvé plazmidy s konstitutivním a inducibilním promotorem v jediném vektoru odvozeném od systému Sleeping Beauty. Buněčné linie transfekované jejich vektory bez problémů exprimovaly sledované geny ať už konstitutivně nebo přísně regulovaně [269]. My jsme jako cílový vektor pro zaklonování vybraly rovněž neviróvý transpozonový systém, a to PiggyBac. Tento integrační vektor je vhodný pro modifikaci primárních T-buněk CAR

receptory [270-272]. Má velkou „přepavní“ kapacitu pro sekvence delší než 100 kb [273, 274], někteří autoři uvádějí i účinnou integraci sekvencí delších než 200 kb [275]. Sekvence našich TRUCK CAR receptorů je asi 4.7100 bp, nepředpokládali jsme proto žádný problém s následným přenosem do buněk a ani se snížení účinnosti transdukce.

Jako indukovatelný promotor byl vybrán promotor složený z šesti vazebních míst pro faktor NFAT následovaný minimálním promotorem pro IL-2. Tento promotor je aktivovaný prostřednictvím signalizace z CAR nebo TCR receptoru, kdy transkripce je řízena prostřednictvím jaderného faktoru NFAT, která vede k produkci a uvolnění cytokinu IL-21 do okolí buňky. Tento systém v rámci přípravy různých CAR receptorů je běžně zavedený a vyzkoušený pro inducibilní expresi řady cytokinů [276-278]. Samotný transportní systém má nesmírnou výhodu. CAR-T buňka si nese vlastní gen pro daný cytokin s nádorově lokalizovanou sekrecí. Tyto TRUCK systémy jsou tedy alternativou k aplikaci CAR-T lymfocytů spojenou s podáním rekombinantního cytokinu, který sám o sobě může vyvolat nežádoucí vedlejší účinky [279]. Těžké toxicity byly pozorovány například při aplikaci rIL-12 [280], které vedly až ke smrti související s léčbou [281]. Pravdou je, že systémová cytotoxicita vyvolaná rIL-21 je dobře tolerována [282], avšak při vysokých koncentracích může způsobovat granulocytopenii a poškození jater [283], proto jeho použití v TRUCK systému je určitě pro pacienta benefitem, kdy díky časované produkci IL-21 lze dosáhnout protinádorové odpovědi bez výrazných vedlejších účinků objevujících se po aplikaci rIL-21.

Sekvence NFAT IL-21 i s oddělovacími sekvencemi byla nasyntetizována na zakázku. Na oba dva konce sekvence byly navíc vloženy 2 restrikční místa NheI a SalI pro snadné vložení do cílových vektorů pPB CAR19 a pPB PSMA CAR myc. Samotné klonování se obešlo bez problémů. Od obou vektorů se však nepodařilo připravit cílový vektor s obráceně vloženou sekvencí NFAT IL-21 před genem pro CAR receptor. Nemám vysvětlení, proč mezi testovanými klony nebyla tato varianta nalezena.

U všech čtyř připravených PB vektorů, tj. CAR19 NFAT IL-21, CAR19 IL-21, NFAT IL-21 CAR19 a NFAT IL-21 PSMA CAR, byla úspěšně *in vitro* ověřena inducibilní exprese IL-21 po stimulaci receptoru CAR (resp. jeho vazbou na antigen) nebo TCR (zprostředkované protilátkou anti-CD3). Nepatrné množství sekretovaného IL-21 byla metodou ELISA změřeno i v lymfocytech exprimujících tyto CAR receptory, aniž by byly stimulovány. Nelze v tomto případě vyloučit vliv druhého silného promotoru UBC. K ověření, zda skutečně dochází k ovlivnění exprese IL-21 z konstitutivního promotoru, by bylo potřeba připravit nový vektor se samostatnou sekvencí NFAT-IL-21 a tímto vektorem modifikované lymfocyty začlenit jako kontrolní buňky do stejných experimentů. Ale s největší pravděpodobností

sekrece IL-21 u nestimulovaných CAR-T buněk bude způsobena bazální expresí z NFAT promotoru. V práci Jaaloukové *et al.* porovnávali bazální hladiny reportérové exprese řízené promotorem pro IL-2 o plné délce se syntetickým promotorem složeným ze 3 opakovaných NFAT vazebných sekvencí, ten právě vykazoval zvýšenou bazální hladinu reportéru [284]. Je však nutno si uvědomit, že byť naše kontrolní lymfocyty v experimentu nebyly stimulovány, jde přesto o populaci živých proliferujících buněk, čili částečně aktivovaných. I to může být příčinou, proč se detekovalo malé množství vyprodukovaného IL-21.

I když jsem se podílela na dalších experimentech *in vitro* a *in vivo* s těmito novými vektory, nejsou v této práci uvedeny, a proto nebudou dále diskutovány. Získané výsledky z těchto pokusů jsou základem práce Mgr. Štacha a jsou shrnuty v publikaci [210]. Mohu závěrem zmínit, že produkovaný IL-21 z vektoru NFAT IL-21 CAR19 inhiboval terminální diferenciaci CAR-T buněk po jejich aktivaci buňkami nádorovými, měl výrazný vliv na následnou proliferaci a efektorové funkce lymfocytů *in vitro*. IL-21 rovněž výrazně eradikoval CD19+ nádory transplantované pokusným myším [210].

V druhé části práce byl sestrojen ještě jeden vektor, a to CAR19 s konstitutivní expresí IL-21. Byl navržen jako bicistronický vektor s jedním promotorem a dvěma transgeny, které jsou odděleny samoštěpícím peptidem T2A. Tento typ vektorů koexprimující více genů v požadovaném poměru jsou „atraktivní“ v řadě biomedicínských aplikací včetně přípravy CAR-T buněk [285, 286]. Obecně, začleněním 2A peptidů do vektoru vede k relativně vysoké úrovni exprese genů, které je následují, v porovnání s jinými strategiemi pro koexpresi více genů. Navíc 2A peptidy jsou velice krátké, tudíž představují nižší riziko interference s funkcí společně exprimovaného proteinu [286]. Pro samotnou konstrukci vektoru byla použita metoda klonování označovaná jako „In-Fusion“, která umožňuje klonovat PCR produkty do vektoru v libovolném místě linearizace bez ohledu na přítomnost restrikčního místa [287]. Pro začlenění sekvence pro peptid T2A a IL-21 byly jako templát využity 2 vektory a s pomocí specifických primerů s přesahem byly tyto sekvence nasyntetizovány PCR reakcí a zaklonovány bez větších problémů do cílového vektoru CAR19. Expese obou začleněných genů ve výsledném konstruktu byla úspěšně ověřena na buněčné linii. Tento vektor byl otestován jen v několika málo experimentech a dále se s ním už nepracovalo. Ale dá se předpokládat, že i tento CAR receptor rozšířený o novou funkci bude mít zvýšenou protinádorovou účinnost. To podporují i data z literatury, kdy například lymfocyty modifikované bicistronickým vektorem pro CAR19 s konstitutivní produkcí myšího IL-12 účinně eradikovaly v myších nádorové CD19+ buňky [288].

(iii)

Jedním z nejdůležitějších požadavků na buněčnou terapii pomocí CAR-T buněk je bezpečnost pro pacienta. Už samotný buněčný produkt musí být kvalitní. Správná výrobní praxe je podstatně náročnější než u mnoha biologických léčiv, zejména kvůli složitosti a variabilitě buněčné složky a složitým postupem genetické manipulace [63]. Konečná kvalita produktu je ideálně spojena s měřitelnými molekulárními a buněčnými charakteristikami, které vypovídají o klinické aktivitě buněk. Mezi důležité parametry patří čistota připravených CAR-T buněk, tj. nejen procentuální zastoupení T-lymfocytů (bez příměsí ostatních krevních buněk), ale i s co nejvyšším procentuálním zastoupením CAR+ buněk (s optimálním rozložením jednotlivých subpopulací a dalšími vlastnostmi, jako je stav vyčerpání apod.) [289, 290].

K naplnění těchto požadavků lze dosáhnout nejen optimalizovanou technikou genetické manipulace buněk s co nejvyšší účinností, ale i následnou aktivací a vhodnými podmínkami expanze CAR+ buněk. K aktivaci expanze CAR-T buněk se většinou používá nespecifická stimulace pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 [291]. Ale je možné buňky aktivovat i specificky. Například v práci Singh *et al.* použili pro specifickou expanzi CAR-T buněk letálně ozářené buňky K562 modifikované nádorově specifickým antigenem a kostimulačními molekulami (CD64, CD86, CD137L a membránově vázaným IL-15) [292]. Pro změnu v naší laboratoři úspěšně používáme protokol elektroporace T-buněk transpozonovým systémem PiggyBac s následnou specifickou aktivací CAR+ buněk pomocí protilátky anti-myc vázající se na tag v chimerickém receptoru. Na konci expanze dosahujeme populace o čistotě převyšující i 90% CAR+ buněk [205].

Ve třetí části dizertační práce pak byla připravena řada vektorů pro CAR receptory, které nesou další epitopy nebo jejich kombinaci, a které by se rovněž daly využít ke specifické expanzi CAR-T buněk. Většina tagů, která byla do CAR zaklonována, byla vybrána na základě dat z literatury věnující se identifikaci epitopů pomocí technologií fágového displeje. Všechny takto vybrané krátké peptidy byly úspěšně zaklonovány do CAR receptorů, aniž by ovlivnily expresi a funkci samotných CAR receptorů. Nicméně většinu epitopů se nepodařilo specificky detekovat protilátkou, šlo o dva epitopy pro bevacizumab, dva epitopy pro basiliximab a po jednom epitopu pro rituximab a cetuximab. Jedním z vysvětlení, proč se protilátky nevázaly, může být právě začlenění krátkého lineárního peptidu do složitější struktury CAR receptoru. Fágový displej je strategie vystavení krátkých lineárních peptidů (které ale mohou mimikovat konformační nebo diskontinuální epitop) o velikosti 8-20 zbytků fúzovaných na konci povrchového proteinu bakteriofága. Protilátky tyto peptidy pak

rozeznávají s vysokou afinitou [293, 294]. Jejich začleněním do receptoru o vyšší strukturu mohly vzniknout v jejich okolí sterické zábrany, které znemožnily přístup monoklonálním protilátkám jakožto velkým, silně glykosylovaným proteinům či nativní struktura CAR receptoru mohla snížit vazebnou afinitu epitopů vůči zkoušeným protilátkám.

Jediné dva peptidy, které se úspěšně začlenily do CAR struktury s následnou detekcí specifickou protilátkou byly mimotopy H98 a Rp5-L. H98 je 12-merní peptid napodobující vazebný epitop proteinu HER2, na který se váže trastuzumab. Mezi ním a HER2 nebyla nalezena sekvenční homologie a tak pravděpodobně napodobuje konformační epitop HER2 [212]. Rp5-L je také 12-merní peptid mimikující epitop CD20, který je rozeznáván rituximabem [218]. Jde o lineární peptid opět bez zjevné sekvenční homologie k CD20 a pravděpodobně také napodobuje prostorově blízké motivy rozpoznávané rituximabem [218]. Vložením těchto dvou mimotopů do CAR receptorů se tyto jejich vlastnosti nezměnily a elektroporované buňky po obarvení protilátkami anti-myc a trastuzumabem nebo rituximabem vykazovaly korelovanou expresi mimotopů s myc-tag.

Dalšími epitopy, které byly vybrány a zaklonovány do CAR receptorů, jsou tzv. afinitní tagy – FLAG a 3x FLAG, které se běžně používají pro imunoprecipitaci proteinů. Předpokládá se, že oktapeptid FLAG díky své hydrofilní povaze je umístěn na povrchu fúzního proteinu, a tak je snadno přístupný pro protilátky [295]. Ani jeho začleněním do vnitřní části extracelulární domény CAR receptoru nezměnilo jeho dostupnost pro protilátku anti-FLAG a buňky s ní byly snadno a bez problému detekovatelné. 3x FLAG zahrnuje aminokyselinové změny v prvních dvou opakování sekvence FLAG [296], oproti němu je více hydrofilní a jeho citlivost detekce protilátkou anti-FLAG je zvýšena řádově [297]. Původně jsem si myslela, že by to mohla být zajímavá alternativa k „jednoduchému“ FLAG-tagu zejména pak v navazujících experimentech zaměřených na expanzi CAR-T buněk pomocí protilátky anti-FLAG. Bylo by zajímavé srovnat, jestli by se i nějak změnila samotná aktivace buněk v reakci na vazbu anti-FLAG na epitop 3x FLAG. Bohužel, po začlenění tohoto tagu do CAR receptoru nebyla naše protilátka anti-FLAG schopna epitop dostatečně detekovat, resp. vážala se asi slaběji. Jedním z vysvětlení by mohla být samotná délka peptidu a jeho následné uspořádání v terciální struktuře CAR receptoru, které neumožnilo dostatečnou vazbu anti-FLAG. Ta nebyla dostatečná ani ke stimulaci proliferace buněk po elektroporaci přes tento epitop (výsledky nebyly ukázány).

Poslední dva epitopy, které se podařilo úspěšně začlenit do CAR receptorů, byly CD34 a CD20 epitop 2. Ty byly převzaty z publikace, kde je autoři už použily jako tagy ve svých anti-BCMA CAR receptorech [60]. Jejich CD20 epitop sloužil k depleci CAR-T buněk

pomocí CDC zprostředkované rituximabem [60]. Tento epitop jsme vybraly jako kontrolu pro konstrukty s epitopy Rp5-L a CD20 mimotop. Druhý epitop CD34 autoři používaly k purifikaci CAR-T buněk po lentivirové transdukcii pomocí klinicky certifikovaného kitu humanCD34 microBead (Miltenyi Biotec) [60]. Jeho implementace do našich konstruktů by se mohla v budoucnu hodit při praktickém využití CAR receptorů v klinické praxi v rámci ÚHKT.

Úspěšně se tedy podařilo do CAR receptorů k již stávajícímu epitopu myc začlenit dalších pět. Vznikla řada konstruktů se dvěma až třemi tagy. Multi-epitopy byly začleněny do PSMA CAR, CLL-1 CAR, GD-2 CAR a jednoho bispecifického CD19 BCMA biCAR receptoru, u těchto receptorů byla ověřena exprese i vazba protilátek na všechny epitopy, které obsahují. S největší pravděpodobností je použití multi-epitopů univerzální, a bylo by je možné vložit do jakéhokoli CAR receptoru. Z této „teorie“ se vymyká vektor CAR19 myc H98, který se hůře barvil protilátkou anti-scFv ve srovnání s CAR19, ale i trastuzumabem ve srovnání s PSMA myc H98. Nicméně CAR19 myc H98 jako jediný není odvozen od původního CAR19, nechal se celý nasynthetizovat komerční firmou. Je tu tedy určitá pravděpodobnost, že jeho horší exprese na buňkách nemusí být způsobena začleněním myc a H98, ale třeba chybou v sekvenci kdekoli v vektoru.

Začleněné epitopy do CAR receptorů umožňují snadnou detekci CAR-T buněk pomocí průtokové cytometrie a pomocí nich by bylo možné monitorovat jejich přítomnost v periferní krvi po infuzi pacientovi. K tomu by byly vhodné protilátky anti-myc i anti-FLAG, které s vysokou citlivostí buňky detekují. Epitopy, které rozpoznávají, nejsou u člověka přirozené, takže buňky by byly jasně identifikovatelné. Naopak k monitorování CAR-T buněk v periferní krvi se nehodí epitop Rp5-L. Molekula CD20, kterou rozpoznává rituximab, se přirozeně vyskytuje na B-lymfocytech. Použití epitopu H98 k detekci CAR-T buněk by bylo trochu problematické v případě hematologických pacientů. Protein HER2/neu, na který se váže trastuzumab, je sice v nízkých hladinách exprimován pouze v normálních tkáních epiteliálními buňkami gastrointestinálního, respiračního, reprodukčního a močového traktu, a epiteliálními buňkami, kůže, prsu a placenty [298]. Lymfocyty HER2/neu neexprimují, což bylo vidět i na obrázcích z průtokového cytometru, kde byly touto protilátkou barveny netransdukované buňky a CAR-T buňky by byly jasně identifikovatelné. Ale u přibližně 30% případů ALL je HER2/neu exprimován na leukemických buňkách [299], což by detekci značně zkomplikovalo. Obdobně je to i s molekulou CD34, která je převážně považovaná za marker hematopoetických kmenových a progenitorových buněk, ale je i rovněž exprimovaná leukemickými blasty u některých podskupin pacientů [300].

Původním záměrem, proč jsme se rozhodli epitopy začlenit do CAR receptorů, byla snaha rozšířit paletu protilátek, které by bylo možno použít ke specifické expanzi CAR+ buněk po elektroporaci. Mělo jít o protilátky, které jsou schválené pro klinickou praxi a v souladu s GMP by mohly být využity při rutinní výrobě CAR-T buněk v ÚHKT. Jediným epitopem, pomocí kterého šlo nastimulovat expanzi CAR+ buněk, byl epitop FLAG, jenže protilátka anti-FLAG nesplňuje výše zmíněná kritéria. Částečně fungoval i epitop CD34, kdy pomocí protilátky anti-CD34 imobilizované na plastik se lymfocyty aktivovaly k růstu. Zajímavé bylo zjištění, že tato protilátka na rozdíl od anti-myc a anti-FLAG nefungovala v případě, kdy byla k buňkám přidaná vázaná na kuličkách. Proč v tomto případě místo stimulace růstu docházelo k zabití buněk, nemám vysvětlení, ale pravděpodobně anti-CD34 vázaná na kuličkách bude na buňky působit stejně jako trastuzumab a rituximab. Ani pomocí těchto protilátek, ať už adherentních k povrchu či vázaných na kuličkách, nebylo docíleno aktivace expanze CAR-T buněk, ba naopak, buňky *in vitro* účinně zabíjely. Stejný jev byl pozorovaný *in vivo*, kdy u pokusných myší, kterým byl injektován trastuzumab, docházelo k účinné eradikaci CAR-T buněk. Jednou z možností jak vysvětlit, proč k tomuto efektu docházelo, je buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách nebo cytotoxicita zprostředkovaná komplementem. Pravděpodobnost, že by CAR+ buňky po elektroporaci, které byly stimulované trastuzumabem nebo rituximabem, zabíjely NK buňky přítomné v populaci, je velmi malá. Roli nebude hrát ani komplement, protože se při kultivaci *in vitro* používalo teplotně inaktivované médium. Pro ověření byly provedeny pokusy ADCC a CDC *in vitro*, kdy naexpandované CAR-T buňky exprimující epitop H98 byly kultivované v různém množství solubilního trastuzumabu a různém poměru autologních NK buněk nebo v různém množství solubilního trastuzumabu v přítomnosti lidského séra v médiu (výsledky nejsou součástí dizertační práce). V žádné skupině však nedocházelo ke smrti CAR-T buněk v porovnání s kontrolními skupinami. Pokud však tyto naexpandované CAR-T buňky byly kultivované v přítomnosti kuliček s vázaným trastuzumabem, buňky jím byly hyperaktivovány, zvýšil se počet buněk exprimujících CD69, zvýšila se i samotná hladina CD69, buňky silně sekretovaly INF- γ (výsledky nebyly ukázány), zvýšila se u nich granularita a začaly velmi rychle umírat. Kuličky s navázaným trastuzumabem pravděpodobně pokryly celý povrch buňky, u které tak mohlo dojít k nadměrné stimulaci prostřednictvím CAR receptoru s následnou smrtí připomínající proces aktivací indukované buněčné smrti (AICD) [301]. Jakým způsobem docházelo k eradikaci CAR-T buněk pomocí trastuzumabu v myších není známo, a asi by bylo třeba ověřit, že *in vivo* nedochází k hyperaktivaci buněk, což by bylo nežádoucí.

Byly provedeny i pokusy na myších, kde stejným způsobem se sledovala deplece CAR-T buněk pomocí rituximabu, a na kterých jsem se podílela, ale konečné výsledky nemám k dispozici, proto nemohu epitopy H98 a Rp5-L srovnat.

Ještě zmíním, že byla úspěšně vyzkoušena i pozitivní selekce CAR-T buněk pomocí epitopů myc a CD34 pomocí magnetické separace (výsledky nejsou součástí dizertační práce).

Bezpečnost CAR-T produktů musí být zajištěna i po aplikaci pacientovi. Adoptivní imunoterapie je často spojena s vedlejšími účinky, někdy až ohrožujícími na životě. Brzy po zahájení terapie mohou adoptivně přenesené buňky rychle expandovat a vyvolat silnou cytokinovou bouři. Současně lýze nádorových buněk může vyvolat syndrom rozpadu nádoru. Po eradikaci maligních buněk se mohou objevit i vedlejší účinky v důsledku zkřížené reaktivity CAR-T buněk vůči zdravé tkáni [302-304]. Proto je žádoucí mít k dispozici mechanismy ke kontrole toxicity.

Myšlenka začlenit do CAR-T lymfocytu bezpečnostní mechanismus pro jejich vypnutí v případě potřeby není nikterak nová. Už v roce 2011 byla publikovaná práce, kde autoři připravili zkrácený lidský polypeptid odvozený od receptoru pro epidermální růstový faktor (huEGFRt), který postrádal extracelulární doménu pro vazbu ligandu a zároveň aktivitu intracelulárního receptoru tyrozin kinázy [305]. Peptid si ale zachoval vazebný epitop pro protilátku cetuximab. Po lentivirové kotransdukci s CAR receptorem umožňoval huEGFRt selekci pozitivních buněk, ale sloužil i jako marker sledování adoptivně přenesených CAR-T buněk pomocí průtokové cytometrie a zároveň umožňoval eliminaci *in vivo* mechanismem buněčné cytotoxicity závislé na cetuximabu [305]. V práci Philipové *at al.* transdukovali pomocí retrovirů do T-buněk gen pro membránově vázaný 136 AK dlouhý arteficiální protein RQR8, který byl rozeznáván dvěma protilátkami, anti-CD34 a rituximabem. Jednalo se o jeden z prvních komplexních markerů a zároveň sebevražedného genu s potenciálním využitím v genové terapii pomocí zavedených klinických činidel a terapeutik (klinicky schválený systém CliniMACS CD34 od Mitneyi a rituximab). Protein rovněž dovozoval měřit účinnost transdukce, selekci transdukovaných buněk, ale i selektivní delecii [123]. Multi-epitopy začleněné do našich CAR receptorů toto vše umožňují také. Oproti dvěma předešlým přístupům ale mají jednu výhodu. Jsou součástí samotného CAR receptoru, tudíž není potřeba transdukce buněk dalším genem navíc, zároveň nehrozí, že by CAR-T buňky ztratily expresi těchto epitopů, a tak všechny budou zasaženy při depleci. Při transdukci buněk dvěma geny existuje určitá pravděpodobnost, že by se *in vivo* mohla vyskytnout malá populace CAR-T buněk, do kterých se druhý gen nedostal, a ty by pak nemohly být účinně eradikovány. Podobně konstruované vektory obsahující multi-epitopy byly ukázány např. v již zmíněné

práci, z které byly převzaty sekvence pro peptidy CD34 nebo CD20 epitop 2 [60]. Jiná strategie byla zvolena v práci Stefanie Koristka *et al.*, kde využili malý peptidový epitop E-tag začleněný do spacerové oblasti CAR receptoru a který je rozpoznáván paralelně připravenými anti-E-tag CAR-T buňkami. Takto upravené T-buňky se snažily využít k účinné eliminaci CAR-T buněk přímo v tkáních vzhledem k poločasů a omezené penetraci protilátek do těchto míst [306]. Je pravdou, že protilátky jsou schopné proniknout pouze několika vrstvami buněk mimo cévy a jsou tak heterogenně distribuovány v nádorech a mikrometastázích [307]. Nicméně nekonjugované protilátky jsou dobře tolerovány a mohou být podávány ve vyšších dávkách, tím se saturují receptory na buněčných vrstvách blíže ke krevní cévě, což umožňuje protilátce difundovat dále nádorem [308]. Tím pádem by mohly být protilátkou zasaženy i CAR-T buňky uvnitř nádoru.

Dalším možným problémem, který by mohl omezit použití multi-epitopů *in vivo*, je potenciální imunogenicitu sekvencí epitopů myc, FLAG a mimotopů CD34, H98 a Rp5-L. Současné imunoterapeutické protokoly však používají v době podání CAR-T buněk přípravné režimy lymfodeplece v hluboké imunosupresi [309], což výrazně snižuje výskyt a rozvoj imunitní odpovědi proti těmto sekvencím.

Je možné položit si ještě otázku, zda je výhodnější buněčná deplece pomocí mimotopu H98 nebo Rp5-L. Trastuzumab, neboli herceptin, je humanizovaná monoklonální protilátka, výrazně zlepšuje výsledky léčby žen s HER2 pozitivním karcinomem prsu [310]. Pokud je trastuzumab podáván souběžně se systémovou chemoterapií, může zlepšit celkové přežití nebo přežití bez onemocnění, ačkoliv léčba je spojena s kardiotoxicitou. Ta se projevuje hlavně poklesem ejekční frakce levé komory a abnormální srdeční funkcí [311, 312]. Vyskytuje se až u 7% pacientů, pokud je trastuzumab podáván v monoterapii, v kombinaci s jinými látkami až u 13-27% [313]. Mechanismus, který je základem kardiomyopatie vyvolané trastuzumabem, není zcela jasný. Někteří autoři se domnívají, že to může souviset s přítomností receptoru HER2 na povrchu kardiomyocytů [314]. Naproti tomu monoterapie rituximabem je většinou u pacientů velmi dobře snášena, ale s vyšším rizikem výskytu oportunních infekcí díky depleci B-lymfocytů [315, 316], nicméně s možností intravenózního podání imunoglobulinů podle potřeby. Pro pacienta by tak byla asi tedy „výhodnější“ deplece CAR-T buněk rituximabem, zejména při použití PSMA CAR nebo GD2 CAR T-buněk, čili v léčbě solidních nádorů. Naopak, u hematologických pacientů, kteří dostávají rituximab jako součást léčby, nepřipadá deplece pomocí něj v úvahu, protože by nebyl kompatibilní s přenosem CAR-T buněk. U nich by bylo vhodné podat CAR-T buňky s mimotopem H98.

Závěrem lze shrnout, že jednotlivé epitopy, které se do CAR receptorů zařadily, lze kombinovat pro využití v rámci genové terapie jednak pro zjednodušení, a tím i zefektivnění a zlevnění výroby, ale i pro bezpečnější použití buněčného produktu.

7. ZÁVĚR

V této práci bylo nově zkonstruováno 26 vektorů pro CAR receptory a další dva vektory byly funkčně charakterizovány. CAR receptory byly sestrojeny pro celou řadu antigenních cílů, a to proti molekulám CD19, CD20, PSMA, GD2, CLL-1 a BCMA. CAR receptory byly strukturně vylepšeny pro zlepšení funkčních vlastností CAR-T lymfocytů.

Vektory, kterých si cením nejvíce, jsou ty s vloženými mimotopy Rp5-L a H98. Oba dva obsahují krátké sekvence pro depleci CAR-T buněk. Zejména vektor s mimotopem H98 je originální v tom, že doposud v literatuře nebyla deplece buněk pomocí protilátky trastuzumab popsána.

Vektory CAR19 a PSMA CAR s inducibilní expresí cytokinu IL-21 výrazně zvyšovaly počet CAR-T lymfocytů v nádorových modelech *in vitro*, a ty jediné byly prozatím úspěšně publikovány.

Tímto bych chtěla čtenáři poděkovat za přečtení, a zároveň se mu i trochu omlouvám, protože nejsem žádný spisovatel... Práci jsem chtěla původně koncipovat jinak, ale po odchodu z laboratoře jsem přišla o většinu primárních dat, což se odrazilo i na kvalitě některých obrázků. Doufám, že mi prominete.

8. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Melief, C.J. and W.M. Kast, *T-cell immunotherapy of cancer*. *Res Immunol*, 1991. **142**(5-6): p. 425-9.
2. Lin, Y. and H. Okada, *Cellular immunotherapy for malignant gliomas*. *Expert Opin Biol Ther*, 2016. **16**(10): p. 1265-75.
3. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. *Science*, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
4. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(32): p. 5233-9.
5. Lee, S.J., et al., *The clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes and microscopic satellites in acral melanoma in a korean population*. *Ann Dermatol*, 2013. **25**(1): p. 61-6.
6. Nguyen, L.T., et al., *Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2*. *Cancer Immunol Immunother*, 2019. **68**(5): p. 773-785.
7. Robbins, P.F., et al., *A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(5): p. 1019-27.
8. Zhao, Y., et al., *Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes recognize and kill diverse human tumor cell lines*. *J Immunol*, 2005. **174**(7): p. 4415-23.
9. Ramachandran, I., et al., *Systemic and local immunity following adoptive transfer of NY-ESO-1 SPEAR T cells in synovial sarcoma*. *J Immunother Cancer*, 2019. **7**(1): p. 276.
10. Ramos, C.A. and G. Dotti, *Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy*. *Expert Opin Biol Ther*, 2011. **11**(7): p. 855-73.
11. Makita, S., K. Yoshimura, and K. Tobinai, *Clinical development of anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Cancer Sci*, 2017. **108**(6): p. 1109-1118.
12. Baggio, L., et al., *Natural killer cell adoptive immunotherapy: Coming of age*. *Clin Immunol*, 2017. **177**: p. 3-11.
13. Hu, W., et al., *Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1205.
14. Rezvani, K., *Adoptive cell therapy using engineered natural killer cells*. *Bone Marrow Transplant*, 2019. **54**(Suppl 2): p. 785-788.
15. Gogoi, D. and S.V. Chiplunkar, *Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside*. *Indian J Med Res*, 2013. **138**(5): p. 755-61.
16. Kabelitz, D., et al., *Cancer immunotherapy with gammadelta T cells: many paths ahead of us*. *Cell Mol Immunol*, 2020. **17**(9): p. 925-939.
17. Male, D., et al., *Immunology 8th ed.* 2012, New York: Elsevier.
18. Wang, Z., Y. Guo, and W. Han, *Current status and perspectives of chimeric antigen receptor modified T cells for cancer treatment*. *Protein Cell*, 2017. **8**(12): p. 896-925.
19. Love, P.E. and S.M. Hayes, *ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(6): p. a002485.
20. Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar, *Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(24): p. 10024-8.
21. Fu, Z., et al., *Cluster of differentiation 19 chimeric antigen receptor T-cell therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Oncol Lett*, 2020. **20**(4): p. 36.
22. Eshhar, Z., et al., *Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(2): p. 720-4.

23. Heuser, C., et al., T-cell activation by recombinant immunoreceptors: impact of the intracellular signalling domain on the stability of receptor expression and antigen-specific activation of grafted T cells. *Gene Ther*, 2003. **10**(17): p. 1408-19.
24. Darcy, P.K., et al., Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL. *J Immunol*, 2000. **164**(7): p. 3705-12.
25. Bridgeman, J.S., et al., The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J Immunol*, 2010. **184**(12): p. 6938-49.
26. Brocker, T., Chimeric Fv-zeta or Fv-epsilon receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1999-2001.
27. Zhang, C., et al., Engineering CAR-T cells. *Biomark Res*, 2017. **5**: p. 22.
28. Finney, H.M., et al., Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 2791-7.
29. Maher, J., et al., Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(1): p. 70-5.
30. Song, D.G., et al., CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood*, 2012. **119**(3): p. 696-706.
31. Hombach, A.A. and H. Abken, Of chimeric antigen receptors and antibodies: OX40 and 41BB costimulation sharpen up T cell-based immunotherapy of cancer. *Immunotherapy*, 2013. **5**(7): p. 677-81.
32. Kawalekar, O.U., et al., Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 712.
33. Ying, Z., et al., Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Mol Ther Oncolytics*, 2019. **15**: p. 60-68.
34. Wilkie, S., et al., Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4901-9.
35. Till, B.G., et al., CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, 2012. **119**(17): p. 3940-50.
36. Morgan, R.A., et al., Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*, 2010. **18**(4): p. 843-51.
37. Chmielewski, M. and H. Abken, TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation. *Advances in Cell and Gene Therapy*, 2020. **3**(3).
38. Chmielewski, M. and H. Abken, TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*, 2015. **15**(8): p. 1145-54.
39. Kagoya, Y., et al., A novel chimeric antigen receptor containing a JAK-STAT signaling domain mediates superior antitumor effects. *Nat Med*, 2018. **24**(3): p. 352-359.
40. Dwivedi, A., et al., Lymphocytes in Cellular Therapy: Functional Regulation of CAR T Cells. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 3180.
41. Maus, M.V., et al., An MHC-restricted antibody-based chimeric antigen receptor requires TCR-like affinity to maintain antigen specificity. *Mol Ther Oncolytics*, 2016. **3**: p. 1-9.
42. Sidaway, P., CD19 affinity - is lower also better? *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(11): p. 661.
43. Park, S., et al., Micromolar affinity CAR T cells to ICAM-1 achieves rapid tumor elimination while avoiding systemic toxicity. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 14366.
44. Chmielewski, M., et al., T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7647-53.
45. Ahmed, N., et al., HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(8): p. 1094-1101.

46. *Faitschuk, E., et al., A dual chain chimeric antigen receptor (CAR) in the native antibody format for targeting immune cells towards cancer cells without the need of an scFv. Gene Ther, 2016. 23(10): p. 718-726.*
47. *Murad, J.M., D.J. Graber, and C.L. Sentman, Advances in the use of natural receptor- or ligand-based chimeric antigen receptors (CARs) in haematologic malignancies. Best Pract Res Clin Haematol, 2018. 31(2): p. 176-183.*
48. *Brown, C.E., et al., Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. N Engl J Med, 2016. 375(26): p. 2561-9.*
49. *Schumacher, T., et al., A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. Nature, 2014. 512(7514): p. 324-7.*
50. *Posey, A.D., Jr., et al., Engineered CAR T Cells Targeting the Cancer-Associated Tn-Glycoform of the Membrane Mucin MUC1 Control Adenocarcinoma. Immunity, 2016. 44(6): p. 1444-54.*
51. *O'Rourke, D.M., et al., A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. Sci Transl Med, 2017. 9(399).*
52. *Garrett, T.P., et al., Antibodies specifically targeting a locally misfolded region of tumor associated EGFR. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(13): p. 5082-7.*
53. *Gutierrez, C. and R. Schiff, HER2: biology, detection, and clinical implications. Arch Pathol Lab Med, 2011. 135(1): p. 55-62.*
54. *Smith, A.J., et al., Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. J Cell Immunother, 2016. 2(2): p. 59-68.*
55. *Titov, A., et al., Advancing CAR T-Cell Therapy for Solid Tumors: Lessons Learned from Lymphoma Treatment. Cancers (Basel), 2020. 12(1).*
56. *Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, T cell activation. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 591-619.*
57. *Davenport, A.J., et al., Chimeric antigen receptor T cells form nonclassical and potent immune synapses driving rapid cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. 115(9): p. E2068-E2076.*
58. *Benmebarek, M.R., et al., Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. Int J Mol Sci, 2019. 20(6).*
59. *Vormittag, P., et al., A guide to manufacturing CAR T cell therapies. Curr Opin Biotechnol, 2018. 53: p. 164-181.*
60. *Valton, J., et al., A Versatile Safeguard for Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapies. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 8972.*
61. *Iyer, R.K., et al., Industrializing Autologous Adoptive Immunotherapies: Manufacturing Advances and Challenges. Front Med (Lausanne), 2018. 5: p. 150.*
62. *Fernandez, L., et al., GMP-Compliant Manufacturing of NKG2D CAR Memory T Cells Using CliniMACS Prodigy. Front Immunol, 2019. 10: p. 2361.*
63. *Wang, X. and I. Riviere, Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. Mol Ther Oncolytics, 2016. 3: p. 16015.*
64. *Poltorak, M.P., et al., Expamers: a new technology to control T cell activation. Sci Rep, 2020. 10(1): p. 17832.*
65. *Norman, D.J., Mechanisms of action and overview of OKT3. Ther Drug Monit, 1995. 17(6): p. 615-20.*
66. *Cavazzana-Calvo, M., et al., Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science, 2000. 288(5466): p. 669-72.*
67. *Kay, M.A., J.C. Glorioso, and L. Naldini, Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med, 2001. 7(1): p. 33-40.*
68. *Lynch, C.M. and A.D. Miller, Production of high-titer helper virus-free retroviral vectors by cocultivation of packaging cells with different host ranges. J Virol, 1991. 65(7): p. 3887-90.*
69. *Wu, X., et al., Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. Science, 2003. 300(5626): p. 1749-51.*
70. *Morgan, R.A. and B. Boyerinas, Genetic Modification of T Cells. Biomedicines, 2016. 4(2).*

71. Brentjens, R.J., et al., Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 2003. **9**(3): p. 279-86.
72. Durand, S. and A. Cimarelli, The inside out of lentiviral vectors. *Viruses*, 2011. **3**(2): p. 132-59.
73. Burns, J.C., et al., Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(17): p. 8033-7.
74. Dull, T., et al., A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
75. Milone, M.C. and U. O'Doherty, Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 2018. **32**(7): p. 1529-1541.
76. Cavalieri, V., E. Baiamonte, and M. Lo Iacono, Non-Primate Lentiviral Vectors and Their Applications in Gene Therapy for Ocular Disorders. *Viruses*, 2018. **10**(6).
77. Dardalhon, V., et al., Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene Ther*, 2001. **8**(3): p. 190-8.
78. Liu, Y., et al., Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia. *Drugs Today (Barc)*, 2017. **53**(11): p. 597-608.
79. Feschotte, C. and E.J. Pritham, DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu Rev Genet*, 2007. **41**: p. 331-68.
80. Ivics, Z., et al., Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 501-10.
81. Mates, L., et al., Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): p. 753-61.
82. Ivics, Z. and Z. Izsvak, Transposons for gene therapy! *Curr Gene Ther*, 2006. **6**(5): p. 593-607.
83. Izsvak, Z. and Z. Ivics, Sleeping beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol Ther*, 2004. **9**(2): p. 147-56.
84. Munoz-Lopez, M. and J.L. Garcia-Perez, DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr Genomics*, 2010. **11**(2): p. 115-28.
85. Ivics, Z. and Z. Izsvak, Sleeping Beauty Transposition. *Microbiol Spectr*, 2015. **3**(2): p. MDNA3-0042-2014.
86. Fraser, M.J., et al., Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. *Virology*, 1995. **211**(2): p. 397-407.
87. Fraser, M.J., et al., Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol*, 1996. **5**(2): p. 141-51.
88. Wilson, M.H., C.J. Coates, and A.L. George, Jr., PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *Mol Ther*, 2007. **15**(1): p. 139-45.
89. Grabundzija, I., et al., Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells. *Mol Ther*, 2010. **18**(6): p. 1200-9.
90. Rostovskaya, M., et al., Transposon-mediated BAC transgenesis in human ES cells. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(19): p. e150.
91. Li, M.A., et al., Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(22): p. e148.
92. D'Aloia, M.M., et al., CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(3): p. 282.
93. Forde, P.F., et al., Development and characterization of an enhanced nonviral expression vector for electroporation cancer treatment. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2014. **1**: p. 14012.
94. Tang, X., et al., Therapeutic Prospects of mRNA-Based Gene Therapy for Glioblastoma. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 1208.
95. Meng, Y., et al., Rapid expansion in the WAVE bioreactor of clinical scale cells for tumor immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*, 2018. **14**(10): p. 2516-2526.
96. Ludwig, J. and M. Hirschel, Methods and Process Optimization for Large-Scale CAR T Expansion Using the G-Rex Cell Culture Platform. *Methods Mol Biol*, 2020. **2086**: p. 165-177.

97. Mock, U., et al., Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy*, 2016. **18**(8): p. 1002-1011.
98. Maude, S.L., et al., Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J*, 2014. **20**(2): p. 119-22.
99. Maude, S.L., et al., CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 4017-23.
100. Frey, N. and D. Porter, Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2019. **25**(4): p. e123-e127.
101. Martin, P.J., et al., First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012. **18**(8): p. 1150-63.
102. Porter, D.L., et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2011. **365**(8): p. 725-33.
103. Grupp, S.A., et al., Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*, 2013. **368**(16): p. 1509-1518.
104. Brentjens, R.J., et al., CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(177): p. 177ra38.
105. Si, S. and D.T. Teachey, Spotlight on Tocilizumab in the Treatment of CAR-T-Cell-Induced Cytokine Release Syndrome: Clinical Evidence to Date. *Ther Clin Risk Manag*, 2020. **16**: p. 705-714.
106. Chen, F., et al., Measuring IL-6 and sIL-6R in serum from patients treated with tocilizumab and/or siltuximab following CAR T cell therapy. *J Immunol Methods*, 2016. **434**: p. 1-8.
107. Santomasso, B.D., et al., Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov*, 2018. **8**(8): p. 958-971.
108. Siegler, E.L. and S.S. Kenderian, Neurotoxicity and Cytokine Release Syndrome After Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy: Insights Into Mechanisms and Novel Therapies. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1973.
109. Norelli, M., et al., Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med*, 2018. **24**(6): p. 739-748.
110. Locke, F.L., et al., Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther*, 2017. **25**(1): p. 285-295.
111. Howard, S.C., et al., Tumor lysis syndrome in the era of novel and targeted agents in patients with hematologic malignancies: a systematic review. *Ann Hematol*, 2016. **95**(4): p. 563-73.
112. Howard, S.C., D.P. Jones, and C.H. Pui, The tumor lysis syndrome. *N Engl J Med*, 2011. **364**(19): p. 1844-54.
113. Doan, A. and M.A. Pulsipher, Hypogammaglobulinemia due to CAR T-cell therapy. *Pediatr Blood Cancer*, 2018. **65**(4).
114. Maus, M.V., et al., T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol Res*, 2013. **1**(1): p. 26-31.
115. Bonini, C., et al., HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science*, 1997. **276**(5319): p. 1719-24.
116. Tiberghien, P., et al., Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 63-72.
117. Casucci, M., et al., Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 507.
118. Chalmers, D., et al., Elimination of the truncated message from the herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene. *Mol Ther*, 2001. **4**(2): p. 146-8.
119. Straathof, K.C., et al., An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4247-54.

120. Iulucci, J.D., et al., Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 2001. **41**(8): p. 870-9.
121. Budde, L.E., et al., Combining a CD20 chimeric antigen receptor and an inducible caspase 9 suicide switch to improve the efficacy and safety of T cell adoptive immunotherapy for lymphoma. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e82742.
122. Klebanoff, C.A., S.A. Rosenberg, and N.P. Restifo, Prospects for gene-engineered T cell immunotherapy for solid cancers. *Nat Med*, 2016. **22**(1): p. 26-36.
123. Philip, B., et al., A highly compact epitope-based marker/suicide gene for easier and safer T-cell therapy. *Blood*, 2014. **124**(8): p. 1277-87.
124. Brandt, L.J.B., et al., Emerging Approaches for Regulation and Control of CAR T Cells: A Mini Review. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 326.
125. Fedorov, V.D., M. Themeli, and M. Sadelain, PD-1- and CTLA-4-based inhibitory chimeric antigen receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(215): p. 215ra172.
126. Wu, C.Y., et al., Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*, 2015. **350**(6258): p. aab4077.
127. Juillerat, A., et al., Design of chimeric antigen receptors with integrated controllable transient functions. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 18950.
128. Han, X., et al., Masked Chimeric Antigen Receptor for Tumor-Specific Activation. *Mol Ther*, 2017. **25**(1): p. 274-284.
129. Morsut, L., et al., Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, 2016. **164**(4): p. 780-91.
130. Roybal, K.T., et al., Engineering T Cells with Customized Therapeutic Response Programs Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*, 2016. **167**(2): p. 419-432 e16.
131. Yang, Z.J., et al., Engineering of an enhanced synthetic Notch receptor by reducing ligand-independent activation. *Commun Biol*, 2020. **3**(1): p. 116.
132. Guedan, S., et al., Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019. **12**: p. 145-156.
133. Klebanoff, C.A., et al., Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol*, 2005. **26**(2): p. 111-7.
134. Hirayama, A.V., et al., The response to lymphodepletion impacts PFS in patients with aggressive non-Hodgkin lymphoma treated with CD19 CAR T cells. *Blood*, 2019. **133**(17): p. 1876-1887.
135. Yakoub-Agha, I., et al., Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*, 2020. **105**(2): p. 297-316.
136. Ali, S., et al., The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist*, 2020. **25**(2): p. e321-e327.
137. Bouchkouj, N., et al., FDA Approval Summary: Axicabtagene Ciloleucel for Relapsed or Refractory Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(6): p. 1702-1708.
138. Papadouli, I., et al., EMA Review of Axicabtagene Ciloleucel (Yescarta) for the Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncologist*, 2020.
139. Lin, W.Y., et al., Gene Modified CAR-T Cellular Therapy for Hematologic Malignancies. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(22).
140. Viardot, A., et al., Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy as a treatment option for patients with B-cell lymphomas: perspectives on the therapeutic potential of Axicabtagene ciloleucel. *Cancer Manag Res*, 2019. **11**: p. 2393-2404.
141. Raufi, A., A.S. Ebrahim, and A. Al-Katib, Targeting CD19 in B-cell lymphoma: emerging role of SAR3419. *Cancer Manag Res*, 2013. **5**: p. 225-33.

142. Wang, K., G. Wei, and D. Liu, CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 2012. **1**(1): p. 36.
143. Forsthuber, T.G., et al., B cell-based therapies in CNS autoimmunity: differentiating CD19 and CD20 as therapeutic targets. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018. **11**: p. 1756286418761697.
144. Bubien, J.K., et al., Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol*, 1993. **121**(5): p. 1121-32.
145. Li, H., et al., Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem*, 2003. **278**(43): p. 42427-34.
146. Kozlova, V., et al., CD20 is dispensable for B-cell receptor signaling but is required for proper actin polymerization, adhesion and migration of malignant B cells. *PLoS One*, 2020. **15**(3): p. e0229170.
147. Shah, N., et al., B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*, 2020. **34**(4): p. 985-1005.
148. Cho, S.F., K.C. Anderson, and Y.T. Tai, Targeting B Cell Maturation Antigen (BCMA) in Multiple Myeloma: Potential Uses of BCMA-Based Immunotherapy. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1821.
149. Leick, M.B. and M.V. Maus, CAR-T cells beyond CD19, UnCAR-Ted territory. *Am J Hematol*, 2019. **94**(S1): p. S34-S41.
150. Hrabovsky, S., F. Folber, and M. Doubek, Therapy of Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia Today and Tomorrow. *Klin Onkol*, 2019. **32**(2): p. 90-96.
151. Maude, S.L., et al., Sustained remissions with CD19-specific chimeric antigen receptor (CAR)-modified T cells in children with relapsed/refractory ALL. *Journal of Clinical Oncology*, 2016. **34**(15_suppl): p. 3011-3011.
152. Davila, M.L., et al., Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra25.
153. Grupp, S.A., et al., Updated Analysis of the Efficacy and Safety of Tisagenlecleucel in Pediatric and Young Adult Patients with Relapsed/Refractory (r/r) Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 2018. **132**(Supplement 1): p. 895-895.
154. Greenbaum, U., et al., Chimeric Antigen Receptor T-Cells in B-Acute Lymphoblastic Leukemia: State of the Art and Future Directions. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 1594.
155. Liu, Y. and S.K. Barta, Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 2019. **94**(5): p. 604-616.
156. Thuresson, P.O., et al., A Systematic Review of the Clinical Efficacy of Treatments in Relapsed or Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Adv Ther*, 2020. **37**(12): p. 4877-4893.
157. Vardhana, S.A., 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**(4): p. 591-599.
158. Schuster, S.J., et al., Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*, 2017. **377**(26): p. 2545-2554.
159. Schuster, S.J., et al., Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 2019. **380**(1): p. 45-56.
160. Neelapu, S.S., et al., Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 2017. **377**(26): p. 2531-2544.
161. Locke, F.L., 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): p. 31-42.
162. Abramson, J.S., et al., Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*, 2020. **396**(10254): p. 839-852.
163. Hajek, R., et al., Multiple myeloma. *Klin Onkol*, 2011. **24 Suppl**: p. S10-3.
164. Alanazi, F., et al., New generation drugs for treatment of multiple myeloma. *Drug Discov Today*, 2020. **25**(2): p. 367-379.

165. Mailankody, S., et al., JCARH125, Anti-BCMA CAR T-cell Therapy for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma: Initial Proof of Concept Results from a Phase 1/2 Multicenter Study (EVOLVE). *Blood*, 2018. **132**(Supplement 1): p. 957-957.
166. Walasek, A., The new perspectives of targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Adv Clin Exp Med*, 2019. **28**(2): p. 271-276.
167. Pourrajab, F., et al., Genetic Characterization and Risk Stratification of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Manag Res*, 2020. **12**: p. 2231-2253.
168. Hofmann, S., et al., Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia (AML). *J Clin Med*, 2019. **8**(2).
169. Kenderian, S.S., C.H. June, and S. Gill, Generating and Expanding Autologous Chimeric Antigen Receptor T Cells from Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Methods Mol Biol*, 2017. **1633**: p. 267-276.
170. Anderson, N.M. and M.C. Simon, The tumor microenvironment. *Curr Biol*, 2020. **30**(16): p. R921-R925.
171. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*, 2012. **125**(23): p. 5591-5596.
172. Scarfo, I. and M.V. Maus, Current approaches to increase CAR T cell potency in solid tumors: targeting the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer*, 2017. **5**: p. 28.
173. Gowrishankar, K., L. Birtwistle, and K. Micklethwaite, Manipulating the tumor microenvironment by adoptive cell transfer of CAR T-cells. *Mamm Genome*, 2018. **29**(11-12): p. 739-756.
174. Craddock, J.A., et al., Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother*, 2010. **33**(8): p. 780-8.
175. Di Stasi, A., et al., T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood*, 2009. **113**(25): p. 6392-402.
176. Yong, C.S.M., et al., CAR T-cell therapy of solid tumors. *Immunol Cell Biol*, 2017. **95**(4): p. 356-363.
177. Feig, C., et al., Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(50): p. 20212-7.
178. Chinnasamy, D., et al., Gene therapy using genetically modified lymphocytes targeting VEGFR-2 inhibits the growth of vascularized syngenic tumors in mice. *J Clin Invest*, 2010. **120**(11): p. 3953-68.
179. Caruana, I., et al., Heparanase promotes tumor infiltration and antitumor activity of CAR-redirceted T lymphocytes. *Nat Med*, 2015. **21**(5): p. 524-9.
180. Wang, L.C., et al., Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(2): p. 154-66.
181. Wang, H., et al., Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies. *J Hematol Oncol*, 2019. **12**(1): p. 59.
182. Suarez, E.R., et al., Chimeric antigen receptor T cells secreting anti-PD-L1 antibodies more effectively regress renal cell carcinoma in a humanized mouse model. *Oncotarget*, 2016. **7**(23): p. 34341-55.
183. Chen, N., et al., CAR T-cell intrinsic PD-1 checkpoint blockade: A two-in-one approach for solid tumor immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(2): p. e1273302.
184. Tang, N., et al., TGF-beta inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors. *JCI Insight*, 2020. **5**(4).
185. Bollard, C.M., et al., Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood*, 2002. **99**(9): p. 3179-87.

186. Hartley, J. and H. Abken, Chimeric antigen receptors designed to overcome transforming growth factor-beta-mediated repression in the adoptive T-cell therapy of solid tumors. *Clin Transl Immunology*, 2019. **8**(6): p. e1064.
187. Seitz, C.M., et al., GD2-targeted chimeric antigen receptor T cells prevent metastasis formation by elimination of breast cancer stem-like cells. *Oncoimmunology*, 2020. **9**(1): p. 1683345.
188. Louis, C.U., et al., Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*, 2011. **118**(23): p. 6050-6.
189. Bartholomew, J., et al., Dinutuximab: A Novel Immunotherapy in the Treatment of Pediatric Patients With High-Risk Neuroblastoma [Formula: see text]. *J Pediatr Oncol Nurs*, 2017. **34**(1): p. 5-12.
190. Sokoloff, R.L., et al., A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. *Prostate*, 2000. **43**(2): p. 150-7.
191. Evans, J.C., et al., The therapeutic and diagnostic potential of the prostate specific membrane antigen/glutamate carboxypeptidase II (PSMA/GCPII) in cancer and neurological disease. *Br J Pharmacol*, 2016. **173**(21): p. 3041-3079.
192. Yamaguchi, N., et al., A novel cytokine exhibiting megakaryocyte potentiating activity from a human pancreatic tumor cell line HPC-Y5. *J Biol Chem*, 1994. **269**(2): p. 805-8.
193. Servais, E.L., et al., Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(9): p. 2478-89.
194. Chang, K., I. Pastan, and M.C. Willingham, Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int J Cancer*, 1992. **50**(3): p. 373-81.
195. Ordonez, N.G., Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol*, 2003. **27**(11): p. 1418-28.
196. Lv, J. and P. Li, Mesothelin as a biomarker for targeted therapy. *Biomarker Research*, 2019. **7**(1): p. 18.
197. Springuel, L., et al., Chimeric Antigen Receptor-T Cells for Targeting Solid Tumors: Current Challenges and Existing Strategies. *BioDrugs*, 2019. **33**(5): p. 515-537.
198. Heyman, B. and Y. Yang, Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Solid Tumors: Current Status, Obstacles and Future Strategies. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(2).
199. Li, X. and W. Chen, Mechanisms of failure of chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Curr Opin Hematol*, 2019. **26**(6): p. 427-433.
200. Weiland, J., et al., BCP-ALL blasts are not dependent on CD19 expression for leukaemic maintenance. *Leukemia*, 2016. **30**(9): p. 1920-1923.
201. Sotillo, E., et al., Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy. *Cancer Discov*, 2015. **5**(12): p. 1282-95.
202. Gardner, R., et al., Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood*, 2016. **127**(20): p. 2406-10.
203. Kostic, P., J. Maher, and J.N. Arnold, Perspectives on Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy for Solid Tumors. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1104.
204. Otahal, P., et al., Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(4): p. e1115940.
205. Ptackova, P., et al., A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21. *Cytotherapy*, 2018. **20**(4): p. 507-520.
206. Hooijberg, E., et al., NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells. *Blood*, 2000. **96**(2): p. 459-66.
207. Ahier, A. and S. Jarriault, Simultaneous expression of multiple proteins under a single promoter in *Caenorhabditis elegans* via a versatile 2A-based toolkit. *Genetics*, 2014. **196**(3): p. 605-13.

208. Daniels, R.W., et al., Expression of multiple transgenes from a single construct using viral 2A peptides in *Drosophila*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e100637.
209. Donnelly, M.L.L., et al., Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 5): p. 1013-1025.
210. Stach, M., et al., Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy*, 2020. **22**(12): p. 744-754.
211. Smith, G.P., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
212. Jiang, B., et al., A novel peptide isolated from a phage display peptide library with trastuzumab can mimic antigen epitope of HER-2. *J Biol Chem*, 2005. **280**(6): p. 4656-62.
213. Li, W., et al., Mimotope vaccination for epitope-specific induction of anti-VEGF antibodies. *BMC Biotechnol*, 2013. **13**: p. 77.
214. Kobayash, T. and T. Shibui, Isolation of mimotopes to the anti-human VEGF antibody Bevacizumab by mRNA display using random peptide libraries and the vaccination of a rabbit. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2011. **2**(2): p. 97-102.
215. Hartmann, C., et al., Peptide mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-EGFR immune response. *Oncogene*, 2010. **29**(32): p. 4517-27.
216. Binder, M., et al., Identification of their epitope reveals the structural basis for the mechanism of action of the immunosuppressive antibodies basiliximab and daclizumab. *Cancer Res*, 2007. **67**(8): p. 3518-23.
217. Binder, M., et al., The epitope recognized by rituximab. *Blood*, 2006. **108**(6): p. 1975-8.
218. Perosa, F., et al., Two structurally different rituximab-specific CD20 mimotope peptides reveal that rituximab recognizes two different CD20-associated epitopes. *J Immunol*, 2009. **182**(1): p. 416-23.
219. Knappik, A. and A. Pluckthun, An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *Biotechniques*, 1994. **17**(4): p. 754-61.
220. Li, D., et al., Estrogen-Related Hormones Induce Apoptosis by Stabilizing Schlafen-12 Protein Turnover. *Mol Cell*, 2019. **75**(6): p. 1103-1116 e9.
221. Wang, J., et al., CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 017-0553.
222. Zah, E., et al., Systematically optimized BCMA/CS1 bispecific CAR-T cells robustly control heterogeneous multiple myeloma. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 2283.
223. Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*, 2011. **118**(5): p. 1255-1263.
224. Nijmeijer, B.A., et al., A mechanistic rationale for combining alemtuzumab and rituximab in the treatment of ALL. *Blood*, 2010. **116**(26): p. 5930-5940.
225. Shultz, L.D., et al., Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**(1): p. 180-191.
226. Maude, S.L., et al., Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 2014. **371**(16): p. 1507-17.
227. Ruella, M. and M.V. Maus, Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J*, 2016. **14**: p. 357-362.
228. Shah, N.N., et al., Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 146.
229. Grada, Z., et al., TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013. **2**: p. e105.
230. Ginaldi, L., et al., Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J Clin Pathol*, 1998. **51**(5): p. 364-9.

231. Solano-Genesta, M., et al., CD20 expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is common in Mexican patients and lacks a prognostic value. *Hematology*, 2012. **17**(2): p. 66-70.
232. Yu, S., et al., Next generation chimeric antigen receptor T cells: safety strategies to overcome toxicity. *Mol Cancer*, 2019. **18**(1): p. 125.
233. Klein, J.S., et al., Design and characterization of structured protein linkers with differing flexibilities. *Protein Eng Des Sel*, 2014. **27**(10): p. 325-30.
234. Zah, E., et al., T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res*, 2016. **4**(6): p. 498-508.
235. Schneider, D., et al., A tandem CD19/CD20 CAR lentiviral vector drives on-target and off-target antigen modulation in leukemia cell lines. *J Immunother Cancer*, 2017. **5**: p. 42.
236. Qin, H., et al., Preclinical Development of Bivalent Chimeric Antigen Receptors Targeting Both CD19 and CD22. *Mol Ther Oncolytics*, 2018. **11**: p. 127-137.
237. al Yacoub, N., et al., Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *J Gene Med*, 2007. **9**(7): p. 579-84.
238. Kumar, M., et al., Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(15): p. 1893-905.
239. Canté-Barrett, K., et al., Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Res Notes*, 2016. **9**(312): p. 016-2118.
240. Corish, P. and C. Tyler-Smith, Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng*, 1999. **12**(12): p. 1035-40.
241. Fujiwara, K., et al., Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells*, 2020. **9**(5).
242. Zhang, G., V. Gurtu, and S.R. Kain, An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **227**(3): p. 707-11.
243. Verhoeven E., C.C., Cosset FL. , Lentiviral Vector Gene Transfer into Human T Cells. *Genetic Modification of Hematopoietic Stem Cells. Methods In Molecular Biology*. Vol. 506. 2009: Humana Press.
244. Korin, Y.D. and J.A. Zack, Progression to the G₁b Phase of the Cell Cycle Is Required for Completion of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcription in T Cells. *Journal of Virology*, 1998. **72**(4): p. 3161-3168.
245. Lord, J.D., et al., The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *J Immunol*, 2000. **164**(5): p. 2533-41.
246. Kaartinen, T., et al., Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion. *Cytotherapy*, 2017. **19**(9): p. 1130.
247. Picanco-Castro, V., et al., Establishment of a simple and efficient platform for car-t cell generation and expansion: from lentiviral production to in vivo studies. *Hematol Transfus Cell Ther*, 2020. **42**(2): p. 150-158.
248. Sastry, L., et al., Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther*, 2002. **9**(17): p. 1155-62.
249. Kutner, R.H., X.Y. Zhang, and J. Reiser, Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc*, 2009. **4**(4): p. 495-505.
250. Reiser, J., Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther*, 2000. **7**(11): p. 910-3.
251. Cribbs, A.P., et al., Simplified production and concentration of lentiviral vectors to achieve high transduction in primary human T cells. *BMC Biotechnol*, 2013. **13**: p. 98.
252. Swaney, W.P., et al., The effect of cationic liposome pretreatment and centrifugation on retrovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther*, 1997. **4**(12): p. 1379-86.

253. O'Doherty, U., W.J. Swiggard, and M.H. Malim, Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J Virol*, 2000. **74**(21): p. 10074-80.
254. Le Doux, J.M., et al., Complexation of retrovirus with cationic and anionic polymers increases the efficiency of gene transfer. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(13): p. 1611-21.
255. Cornetta, K. and W.F. Anderson, Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods*, 1989. **23**(2): p. 187-94.
256. Denning, W., et al., Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: effect of sera and polycations. *Mol Biotechnol*, 2013. **53**(3): p. 308-14.
257. Dai, H., et al., Bispecific CAR-T cells targeting both CD19 and CD22 for therapy of adults with relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 2020. **13**(1): p. 30.
258. Wang, Y., et al., New Chimeric Antigen Receptor Design for Solid Tumors. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1934.
259. James, S.E., et al., Antigen Sensitivity of CD22-Specific Chimeric TCR Is Modulated by Target Epitope Distance from the Cell Membrane. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(10): p. 7028-7038.
260. Hombach, A.A., et al., T Cell Activation by Antibody-Like Immunoreceptors: The Position of the Binding Epitope within the Target Molecule Determines the Efficiency of Activation of Redirected T Cells. *The Journal of Immunology*, 2007. **178**(7): p. 4650-4657.
261. Chmielewski, M. and H. Abken, CAR T cells transform to trucks: chimeric antigen receptor-redirected T cells engineered to deliver inducible IL-12 modulate the tumour stroma to combat cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(8): p. 1269-77.
262. Santegoets, S.J., et al., IL-21 in cancer immunotherapy: At the right place at the right time. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(6): p. e24522.
263. Croce, M., V. Rigo, and S. Ferrini, IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *J Immunol Res*, 2015. **696578**(10): p. 15.
264. Kadesch, T. and P. Berg, Effects of the position of the simian virus 40 enhancer on expression of multiple transcription units in a single plasmid. *Molecular and Cellular Biology*, 1986. **6**(7): p. 2593-2601.
265. Emerman, M. and H.M. Temin, Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism. *Cell*, 1984. **39**(3 Pt 2): p. 449-67.
266. Proudfoot, N.J., Transcriptional interference and termination between duplicated alpha-globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation. *Nature*, 1986. **322**(6079): p. 562-5.
267. Villemure, J.F., N. Savard, and A. Belmaaza, Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken beta-globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J Mol Biol*, 2001. **312**(5): p. 963-74.
268. Uchibori, R., et al., Functional Analysis of an Inducible Promoter Driven by Activation Signals from a Chimeric Antigen Receptor. *Mol Ther Oncolytics*, 2019. **12**: p. 16-25.
269. Kowarz, E., D. Loscher, and R. Marschalek, Optimized Sleeping Beauty transposons rapidly generate stable transgenic cell lines. *Biotechnol J*, 2015. **10**(4): p. 647-53.
270. Manuri, P.V., et al., piggyBac transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum Gene Ther*, 2010. **21**(4): p. 427-37.
271. He, J., et al., Engineered CAR T cells targeting mesothelin by piggyBac transposon system for the treatment of pancreatic cancer. *Cellular Immunology*, 2018. **329**: p. 31-40.
272. Tanaka, K., et al., Direct Delivery of piggyBac CD19 CAR T Cells Has Potent Anti-tumor Activity against ALL Cells in CNS in a Xenograft Mouse Model. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 2020. **18**: p. 37-46.
273. Li, M.A., et al., Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(22): p. 24.

274. Hew, B.E., et al., RNA-guided piggyBac transposition in human cells. *Synth Biol (Oxf)*, 2019. **4**(1): p. ysz018.
275. Li, R., et al., piggyBac as a high-capacity transgenesis and gene-therapy vector in human cells and mice. *Dis Model Mech*, 2013. **6**(3): p. 828-33.
276. Chmielewski, M. and H. Abken, CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bet(high) FoxO1(low) Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep*, 2017. **21**(11): p. 3205-3219.
277. Liu, Y., et al., Armored Inducible Expression of IL-12 Enhances Antitumor Activity of Glypican-3-Targeted Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells in Hepatocellular Carcinoma. *J Immunol*, 2019. **203**(1): p. 198-207.
278. Chmielewski, M., et al., IL-12 Release by Engineered T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Effectively Muster an Antigen-Independent Macrophage Response on Tumor Cells That Have Shut Down Tumor Antigen Expression. *Cancer Research*, 2011. **71**(17): p. 5697-5706.
279. Jaspers, J.E. and R.J. Brentjens, Development of CAR T cells designed to improve antitumor efficacy and safety. *Pharmacol Ther*, 2017. **178**: p. 83-91.
280. Lacy, M.Q., et al., Phase II study of interleukin-12 for treatment of plateau phase multiple myeloma (E1A96): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Leuk Res*, 2009. **33**(11): p. 1485-9.
281. Leonard, J.P., et al., Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood*, 1997. **90**(7): p. 2541-8.
282. Schmidt, H., et al., Safety and Clinical Effect of Subcutaneous Human Interleukin-21 in Patients with Metastatic Melanoma or Renal Cell Carcinoma: A Phase I Trial. *Clinical Cancer Research*, 2010. **16**(21): p. 5312-5319.
283. Petrella, T.M., et al., Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(27): p. 3396-401.
284. Jaalouk, D.E., et al., A self-inactivating retrovector incorporating the IL-2 promoter for activation-induced transgene expression in genetically engineered T-cells. *Virology*, 2006. **3**(97): p. 3-97.
285. Yang, S., et al., Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther*, 2008. **15**(21): p. 1411-23.
286. Cronk, R.J., J. Zurko, and N.N. Shah, Bispecific Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for B Cell Malignancies and Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(9).
287. Park, J., A.L. Throop, and J. LaBaer, Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015. **110**(3): p. 1-3.
288. Pegram, H.J., et al., Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood*, 2012. **119**(18): p. 4133-41.
289. Hollyman, D., et al., Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother*, 2009. **32**(2): p. 169-80.
290. Church, S.E., et al., Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol*, 2014. **44**(1): p. 69-79.
291. Stock, S., M. Schmitt, and L. Sellner, Optimizing Manufacturing Protocols of Chimeric Antigen Receptor T Cells for Improved Anticancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(24).
292. Singh, H., et al., Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS One*, 2013. **8**(5).
293. Negi, S.S. and W. Braun, Automated detection of conformational epitopes using phage display Peptide sequences. *Bioinform Biol Insights*, 2009. **3**: p. 71-81.
294. Chen, L., et al., Epitope-directed antibody selection by site-specific photocrosslinking. *Sci Adv*, 2020. **6**(14): p. eaaz7825.
295. Zhao, X., G. Li, and S. Liang, Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *J Anal Methods Chem*, 2013. **581093**(10): p. 26.

296. Hernan, R., K. Heuermann, and B. Brizzard, Multiple epitope tagging of expressed proteins for enhanced detection. *Biotechniques*, 2000. **28**(4): p. 789-93.
297. Zhang, L., R. Hernan, and B. Brizzard, Multiple tandem epitope tagging for enhanced detection of protein expressed in mammalian cells. *Mol Biotechnol*, 2001. **19**(3): p. 313-21.
298. Press, M.F., C. Cordon-Cardo, and D.J. Slamon, Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*, 1990. **5**(7): p. 953-62.
299. Haen, S.P., et al., Prognostic relevance of HER2/neu in acute lymphoblastic leukemia and induction of NK cell reactivity against primary ALL blasts by trastuzumab. *Oncotarget*, 2016. **7**(11): p. 13013-30.
300. Oyan, A.M., et al., CD34 expression in native human acute myelogenous leukemia blasts: differences in CD34 membrane molecule expression are associated with different gene expression profiles. *Cytometry B Clin Cytom*, 2005. **64**(1): p. 18-27.
301. Tschumi, B.O., et al., CART cells are prone to Fas- and DR5-mediated cell death. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2018. **6**(1): p. 71.
302. Brentjens, R.J., et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 2011. **118**(18): p. 4817-4828.
303. Brudno, J.N. and J.N. Kochenderfer, Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*, 2016. **127**(26): p. 3321-30.
304. Wei, J., et al., The model of cytokine release syndrome in CAR T-cell treatment for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020. **5**(1): p. 134.
305. Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*, 2011. **118**(5): p. 1255-63.
306. Koristka, S., et al., Anti-CAR-engineered T cells for epitope-based elimination of autologous CAR T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2019. **68**(9): p. 1401-1415.
307. Thurber, G.M., M.M. Schmidt, and K.D. Wittrup, Antibody tumor penetration: transport opposed by systemic and antigen-mediated clearance. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(12): p. 1421-34.
308. Nessler, I., et al., Increased Tumor Penetration of Single-Domain Antibody-Drug Conjugates Improves In Vivo Efficacy in Prostate Cancer Models. *Cancer Res*, 2020. **80**(6): p. 1268-1278.
309. Maus, M.V., et al., Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) clinical practice guideline on immune effector cell-related adverse events. *J Immunother Cancer*, 2020. **8**(2).
310. Slamon, D.J., et al., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001. **344**(11): p. 783-92.
311. Bowles, E.J., et al., Risk of heart failure in breast cancer patients after anthracycline and trastuzumab treatment: a retrospective cohort study. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(17): p. 1293-305.
312. Telli, M.L. and R.M. Witteles, Trastuzumab-related cardiac dysfunction. *J Natl Compr Canc Netw*, 2011. **9**(2): p. 243-9.
313. Slamon, D., et al., Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 2011. **365**(14): p. 1273-83.
314. Huszno, J., et al., Cardiac side effects of trastuzumab in breast cancer patients - single center experiences. *Contemp Oncol*, 2013. **17**(2): p. 190-5.
315. Kanbayashi, Y., et al., Risk factors for infection in haematology patients treated with rituximab. *Eur J Haematol*, 2009. **82**(1): p. 26-30.
316. Salles, G., et al., Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Advances in Therapy*, 2017. **34**(10): p. 2232-2273.

9. SEZNAM POUŽITÝCH INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

1. <https://touchoncology.com/immunotherapy/journal-articles/clinical-development-and-manufacture-of-chimeric-antigen-receptor-t-cells-and-the-role-of-leukapheresis/>. [Online] [Citace: 02. 12 2020.]
2. <http://carat-horizon2020.eu/carat-approach/tools-and-technologies/>. [Online] [Citace: 18. 12 2020.]
3. <https://www.wilsonwolf.com/product-and-order-info/>. [Online] [Citace: 18. 12 2020.]
4. http://www.processdevelopmentforum.com/ppts/posters/OptimizingWAVE_Final_.pdf. [Online] [Citace: 18. 12 2020.]
5. <https://www.fda.gov/media/113790/download>. [Online] [Citace: 09. 01 2021.]
6. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/breyanzi-lisocabtagene-maraleucel>. [Online] [Citace: 20. 02 2021.]

10. SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace 1

Ptackova P, Musil J, Stach M, Lesny P, Nemeckova S, Kral V, Fabry M, Otahal P: A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21. *Cytotherapy* 2018;20:507-520. Impakt faktor 4,297.

Podíl na práci:

Izolace PBMCs z dárcovských buffycoatů. Částečně příprava CD19 CAR-T lymfocytů. Podíl na stanovení růstových křivek CD19 CAR-T lymfocytů kultivovaných v přítomnosti různých cytokinů.

Vztah k disertační práci

Příprava CAR-T lymfocytů pomocí transpozonového systému PiggyBac, která byl v publikaci popsána, byla využita při přípravě CAR-T buněk v druhé a třetí části této práce.



T CELL THERAPY

A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21

PAVLÍNA PTÁČKOVÁ^{1,*}, JAN MUSIL^{1,*}, MARTIN ŠTACH¹, PETR LESNÝ¹,
ŠÁRKA NĚMEČKOVÁ¹, VLASTIMIL KRÁL², MILAN FÁBRY² & PAVEL OTÁHAL^{1,3}

¹Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic, ²Institute of Molecular Genetics, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, and ³Department of Hematology, First Faculty of Medicine and General University Hospital, Prague, Czech Republic

Abstract

Background aims. Clinical-grade chimeric antigenic receptor (CAR)19 T cells are routinely manufactured by lentiviral/retroviral (LV/RV) transduction of an anti-CD3/CD28 activated T cells, which are then propagated in a culture medium supplemented with interleukin (IL)-2. The use of LV/RVs for T-cell modification represents a manufacturing challenge due to the complexity of the transduction approach and the necessity of thorough quality control. **Methods.** We present here a significantly improved protocol for CAR19 T-cell manufacture that is based on the electroporation of peripheral blood mononuclear cells with plasmid DNA encoding the piggyBac transposon/transposase vectors and their cultivation in the presence of cytokines IL-4, IL-7 and IL-21. **Results.** We found that activation of the CAR receptor by either its cognate ligand (i.e., CD19 expressed on the surface of B cells) or anti-CAR antibody, followed by cultivation in the presence of cytokines IL-4 and IL-7, enables strong and highly selective expansion of functional CAR19 T cells, resulting in >90% CAR⁺ T cells. Addition of cytokine IL-21 to the mixture of IL-4 and IL-7 supported development of immature CAR19 T cells with central memory and stem cell memory phenotypes and expressing very low amounts of inhibitory receptors PD-1, LAG-3 and TIM-3. **Conclusions.** Our protocol provides a simple and cost-effective method for engineering high-quality T cells for adoptive therapies.

Key Words: CAR T cells, cancer immunotherapy, IL-4, IL-7, IL-21, piggyBac transposon

Introduction

Current manufacture of clinical-grade CAR T cells is primarily based on lentiviral/retroviral (LV/RV) transduction of T cells followed by anti-CD3/CD28 activation, which enables generation of large numbers of transduced T cells. However, the use of viral vectors for clinical grade manufacturing has to follow a complicated set of rules to minimize biohazards associated with their use. Such a high level of manufacturing complexity leads to high costs and limits the availability of the technology itself. Thus, there is a general need for an easier method of CAR-T manufacture. One such approach is based on the electroporation of transposon vectors such as Sleeping Beauty or piggyBac in the form of plasmid DNA [1,2]. These methods are,

however, considered less efficient than LV/RV because of poor cell growth after electroporation and lower transduction efficiency compared with LV/RV. However, the use of transposons significantly reduces the overall costs of the manufacturing process and reduces the biological risks associated with the use of LV/RV [3]. Additionally, the maximum size of LV/RV is limited to approximately 10kB base pairs between LTRs, whereas transposons such as piggyBac can easily integrate far larger constructs, and their effectiveness is basically limited only by decreasing efficiency of electroporation of larger DNA molecules [4]. Recent discoveries in the CAR field suggest that there is a need to transfer multiple transgenes simultaneously, such as suicide genes, cytokines, decoy receptors, dominant negative receptors or multiple CARs [5].

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: **Pavel Otáhal**, MD, PhD, U nemocnice 1, Institute of Hematology and Blood Transfusion, 128 02, Prague, Czech Republic. E-mail: pavel.otahal@uhkt.cz, pavel.otahal@f1.cuni.cz

(Received 23 March 2017; accepted 6 October 2017)

ISSN 1465-3249 Copyright © 2017 International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.10.001>

Transfer of such large DNA sequences via LV/RV is impossible, which thus justifies the effort to improve transposon-based techniques of T-cell gene engineering.

The manufacture of CART cells is usually achieved by anti-CD3/CD28 activation followed by cultivation in the presence of exogenous interleukin (IL)-2 [6]; proliferating T cells are then infected with LV/RV to express the CARs. This is a well-established approach but one that has several limitations (in addition to low capacity of LV/RV); for example, it also induces an expansion of non-transduced T cells, and the anti-CD3/CD28 activation in combination with exogenous IL-2 drives T cells toward terminal effector differentiation at the expense of memory cell formation [7]. Currently, several alternative methods for T-cell expansion have been described; these protocols substituted IL-2 for other cytokines, such as IL-4, IL-7, IL-15 or IL-21, or activators of the Wnt pathway, such as glycogen synthase-3 β inhibitor TWS119 [8], which increased the proportion of less-differentiated T cells with central memory/stem cell memory features. Some of these protocols were originally developed for the manufacture of multivirus-specific T cells [9], and they are based on T-cell stimulation with antigenic peptides derived from viral antigens, followed by cultivation in the presence of cytokines IL-4 and IL-7. This cytokine mix supports the retention of a central memory phenotype by T cells and promotes T-cell survival by up-regulating anti-apoptotic molecules. This procedure has been used to manufacture Good Manufacturing Practice (GMP)-grade multivirus-specific T cells, which were then successfully used for the treatment of viral infections such as cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus in patients after allogeneic bone marrow transplantation [10]. Similar protocols based on IL-7 and IL-21 were also developed for the manufacture of CAR T cells [8,11–13]. These results thus indicate that the differentiation of CART cells toward the terminal effector stage can be reduced by cytokines IL-7 and IL-21.

The quality of the manufactured product depends not only on the functional properties of CAR T cells but also on their frequency, which is the result of the transduction efficiency. Because the transduction of larger DNA constructs using LV/RV is inefficient, certain methods have been developed to enrich for transduced T cells. A nice example of this that was tested clinically is a procedure based on the co-transduction of a chimeric IL-4/IL-2 receptor, which delivers a selective mitogenic signal to transduced T cells by culturing them in IL-4 instead of IL-2 [14]. Although this approach works, it prevents the use of alternative cytokine combinations and requires modification with another chimeric cytokine receptor. We present in this article an easier technique that is based

on a selective activation of transduced T cells with anti-CAR antibody or through recognition of the CAR-specific ligand (i.e., CD19 in the case of CAR19 T cells). We show that the activation of CAR either by recognition of CD19⁺ B cells or by anti-CAR antibody in the presence of exogenous IL-4 and IL-7 enables selective proliferation of transduced T cell. Next, we show that IL-21 (in combination with IL-4 and IL-7) prevents terminal differentiation of CAR19 T cells and reduces expression of inhibitory receptors TIM-3 and PD-1 by CAR19 T cells. Our method represents a substantial improvement of currently used electroporation/transposon-based methods of CAR19 manufacturing because it does not require special feeder cells and enables reliable and simple generation of clinical doses of CAR19 T cells.

Methods

Cell source

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy-coats obtained from blood donors or from fresh whole blood samples obtained from lymphoma patients. The use of all human materials was approved by the institutional review boards, and all donors signed an informed consent with the study.

DNA plasmids and sequences

As has been previously described [15], CAR19 contains 4-1BB costimulatory domain and T-cell receptor zeta domain. Prostate specific membrane antigen (PSMA) CAR has been prepared by cloning Vh and Vl chains from antibody J591 followed by Myc epitope into the 4-1BB-zeta CAR backbone via InFusion cloning. Both CARs were cloned into the piggyBac vector behind the UBC promoter via BamHI/EcoRI [1] to generate pPB CAR19 and pPB PSMA CAR. Hyperactive piggyBac transposase is driven by the cytomegalovirus promoter [1]. Plasmids were purified by standard techniques using EndoFree kits (Qiagen).

The amino acid sequence of CAR19 is: MALPVTALLPLALLLHAARPTREVQLQSGPE LVKPGASVKMSCKASGYTFSTSYVMWVKQKPG QGLEWIGYVNPYNDGTYNEKFKGKATLTSD KSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGPYYYGSSP FDYWGQGTITVTVSGGGSGGGGGSGGGSGG GGSDIVMTQSPSLPVS LGDQASISCRSSQSLEN SNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGLV DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVT HVPPTFGAGTKLEIKRTSPTTTPAPRPPTPAPTIA SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVRKGRKK LLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPPEEEEGG CELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE EYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYN

ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

The amino acid sequence of PSMA CAR is
MALPVTALLLPLALLLHAARPTREVQLQQSGPE
LVKPGTsvrisckTSGYTFTEYTIHWVKQSHGK
SLEWIGNINPNNGGTTYNQKFEDKATLTVDKS
SSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAAGWNFDYWGQ
GTTVTVSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM
TQSHKFMSTSVGDRVSIICKASQDVGTAVDWYQ
QKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTD
FTLTTTNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGAGTM
LEIKREQLISEEDLNGTTSPTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRRVKGRGR
KKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDKRRGRDPENGGKPKRRKNPQEG
LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Cell culture, transfections and magnetic bead isolation

For all experiments, we used CellGro medium (CellGenix) supplemented with 10% heat-inactivated 10% fetal calf serum (Gibco) and penicillin/streptomycin (Gibco).

PBMCs were prepared from buffy coats or fresh blood samples by gradient centrifugation using Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare) after separation cells were rested overnight in cell medium. The next day, cells were transfected with Neon electroporator (Thermo Fisher Scientific) similarly to the description by Ramanayake *et al.* [3]: 4×10^6 cells were resuspended in 100 μ L buffer T and mixed with 5 μ g plasmid DNA (2:1 mixture of piggyBac vector expressing the CAR and a plasmid expressing a hyperactive piggyBac transposase) and were electroporated 1×20 ms/2300V using 100- μ L tips (in some experiments, 10- μ L tips were used as well). Afterward, cells rested again overnight and were stimulated the next day.

To stimulate T cells with antibodies, anti-CD3 and anti-CD28 mouse mAb (Miltenyi Biotec) or mouse anti-Myc tag Ab (Cell Signaling) were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) at a concentration 1 μ g/mL and adhered onto a cell culture plastic for 1 h at 37°C; they were then washed with PBS and used for cell activation.

Cell medium was supplemented with cytokines: 1000 U/mL of IL-2 (Proleukin, Roche), 20 ng/mL IL-4, 10 ng/mL IL-7 and 20 ng/mL IL-21 (all Miltenyi Biotec). Cells were fed with fresh medium every 3–4 days according to the growth rate.

HEK293 (ATCC CRL-1573) cells were kept in Dulbecco's Modified Eagle's Medium and transfected with cDNA encoding CD19 (Origene cDNA

clone SC127938) using Metafectene Pro reagent (Biontex). Ramos is a CD19⁺ Burkitt lymphoma cell line (ATCC CRL-1596), PC3 is prostate carcinoma cell line negative for PSMA (ATCC CRL-1435) and LNCap is prostate carcinoma cell line positive for PSMA (ATCC CRL-1740).

To isolate CAR⁺ T cells, we stained CAR19 T cells with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch), followed by labeling with anti-FITC magnetic beads (Miltenyi Biotec), and positive cells were isolated on an LS column. To deplete B cells, PBMCs were labeled with biotinylated anti-CD19 antibody. Cells were then incubated with anti-biotin magnetic beads (Miltenyi Biotec) and separated on an LS magnetic column. Negative fraction depleted from B cells was then electroporated with CAR19 transposon using 10- μ L tips (4×10^5 cells).

Antibodies, fluorescence-activated cell sorting and functional assays

Mouse anti-human CD3 APC-Cy7, CD45RA Alexa Fluor 488, CD45RO BV786, CCR7 BV605, CD95 PeCy5 and PD1 Pe-Dazzle 594 were obtained from BioLegend. CD4-Pacific Blue, CD8 Alexa Fluor 700 were purchased from Exbio. Live cells were identified using LIVE/DEAD stain kit (Thermo Fisher Scientific).

To detect CAR transgene, cells were stained with Alexa-647, or FITC-labeled FAB₂ fragment of Goat anti-Mouse IgG (Jackson ImmunoResearch), this polyclonal antibody reacts with mouse anti-CD19 scFv in the CD19 CAR. To detect PSMA CAR, cells were labeled with unlabeled rabbit anti-Myc tag antibody (Cell Signaling) followed by Alexa 647-labeled goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch). If CAR T cells were stained for additional surface antigens, cells were first labeled with goat anti-mouse antibody, washed twice and blocked with 10% mouse serum, then were stained with fluorescently labeled mouse mAb. The specificity of staining was extensively tested to rule out possible binding of mouse antibodies to cells via goat anti-mouse Ab used to detect CAR.

To measure cytokine production, HEK293 cells were transfected with CD19 cDNA or control plasmid DNA (empty vector). The next day, CART cells were added into the wells with transfected HEK cells, and after 4 h of co-incubation, GolgiPlug (eBiosciences) was added at a concentration of 1 μ g/mL. Cell were then left overnight in the incubator (~12 h). After the incubation period was over, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and stained with fluorescently labeled mouse mAb antibodies to surface antigens, and cytokines

interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-4 (all eBiosciences).

Cytotoxic test was performed as follows: Ramos cells were labeled with 5 μ mol/L carboxyfluorescein succinimidyl ester (Sigma) in cell medium for 5 min at room temperature, washed and mixed with effector T cells in 96-well flat bottom plate. After overnight incubation, DAPI at a concentration of 100 ng/mL (Sigma) was added to cells, and the number of dead Ramos cells was determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS).

To visualize cytotoxicity of PSMA CAR T cells, monolayers of PC3 or LNCap cells were incubated with CART cells, and after 3 days, cells were imaged with phase-contrast microscope with digital camera (Olympus).

To determine the degranulation of CAR T cells, cells were incubated with or without Ramos B cells at ration of 1:1 for 4 h, phycoerythrin-labeled anti-CD107a Antibody (Exbio) was added to the cell medium at the beginning of co-incubation. After 4 h, cells were harvested and labeled with anti-CD8 and anti-CD4 antibodies and analyzed by FACS.

FACS samples were analyzed with BD Fortessa instrument, and FACS data were processed by FlowJo software. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software using unpaired *t*-test.

Results

Our experience with the manufacture of antiviral T cells shows that a supplementation of cell medium with IL-4 + IL-7 efficiently supports the *in vitro* expansion of antiviral T cells after stimulation with antigen [9]. Thus, we tested this approach to produce CD19-specific CART cells. First, PBMCs were electroporated using the Neon device with piggyBac transposon vectors encoding the CAR19 transgene and hyperactive piggyBac transposase (i.e., CAR19 transposon). The next day, cells were stimulated with immobilized anti-CD3+anti-CD28 mAbs or left unstimulated. Next, both stimulated and unstimulated cell cultures were supplemented with cytokines IL-2 or IL-4 + IL-7. After 7 days, cells were analyzed for the expression of CAR19 by staining with goat anti-mouse Ab, which reacts with the scFv portion of CAR19 (Figure 1A). After 14 days, we compared the expansion of non-stimulated cells grown in IL-2 or IL-4 + IL-7 (Figure 1B). The results in Figure 1A show, that the stimulation with anti-CD3+anti-CD28 mAbs induced a polyclonal expansion of T cells, while the cultivation in the presence of cytokines only (i.e. without anti-CD3+anti-CD28 mAbs) resulted in much higher frequency of CAR19⁺ T cells among cultured cells (32% vs. 90%). However, we found that cells grown in IL-4 + IL-7 expanded at later time points

significantly more than cells grown in IL-2 (Figure 1B). This experiment suggested to us that signaling via the CAR19 transgene in the presence of exogenously added IL-4 and IL-7 enables selective expansion of transduced T cells.

To verify this hypothesis, PBMCs were depleted from B cells via anti-CD19 magnetic beads before electroporation with CAR19 transposon. Electroporated T cells were then grown alone in IL-4 + IL-7 or were mixed back with sorted B cells, and then further cultured for 12 days. The data in Figure 1C show that electroporated PBMCs depleted from B cells did not grow significantly, whereas the same cells stimulated with anti-CD3/CD28 efficiently expanded, demonstrating their viability. When we mixed electroporated T cells with sorted autologous B cells, we observed a selective expansion of CAR19 T cells. This experiment thus demonstrates that recognition of B cells by CAR19 T cells in the presence of IL-4 and IL-7 enables their priming and expansion.

We have then determined the proliferation capacity of CAR19 T cells grown in various cytokine combinations: IL-2, IL-4 + IL-7, IL-4 + IL-7 + IL-2 and IL-4 + IL-7 + IL-21 and compared the growth after 24 days with the widely used type of cultivation anti-CD3/CD28 plus IL-2. The data in Figure 2 show that (i) IL-2 alone was not sufficient to initiate good and sustained proliferation of CAR19 T cells, which had to be pre-activated with anti-CD3/28 antibodies to expand; (ii) IL-4 + IL-7 enabled proliferation of CAR19 T cells, and additional cytokine stimulation with IL-2 or IL-21 (or IL-15, data not shown) did not result in significant enhancement of the cell growth; and (iii) CAR19 T cells treated with anti-CD3/CD28 plus IL-2 grew to similar numbers as cells grown in IL-4 + IL-7.

The next key question was to determine the percentage of CAR19 T cells in cultures generated under these conditions. We found that polyclonal activation of electroporated T cells (i.e., anti-CD3/CD28 plus IL-2) resulted in a significantly lower percentage of CAR19 T cells (~30%) than cells grown in IL-4 + IL-7 (~90%), IL-4 + IL-7 + IL-2 (~90%) or IL-4 + IL-7 + IL-21 (>95% of all cells were CAR positive; Figure 3A). The composition of the cytokine cocktails, however, had a significant effect on the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ T cells (Figure 3B). We found that the cultivation in the presence of exogenous IL-4 + IL-7 or IL-4 + IL-7 + IL-21 favored the expansion of CD4 T cells (none of them were regulatory T cells; data not shown), whereas expansion induced by anti-CD3/CD28 plus IL-2 treatment resulted in the majority (>80%) of all CAR19 T cells being of CD8⁺ type (Figure 3B). Next, we compared the effector functions of CAR19 T cells prepared under these conditions. The experiment shown in Figure 3C and

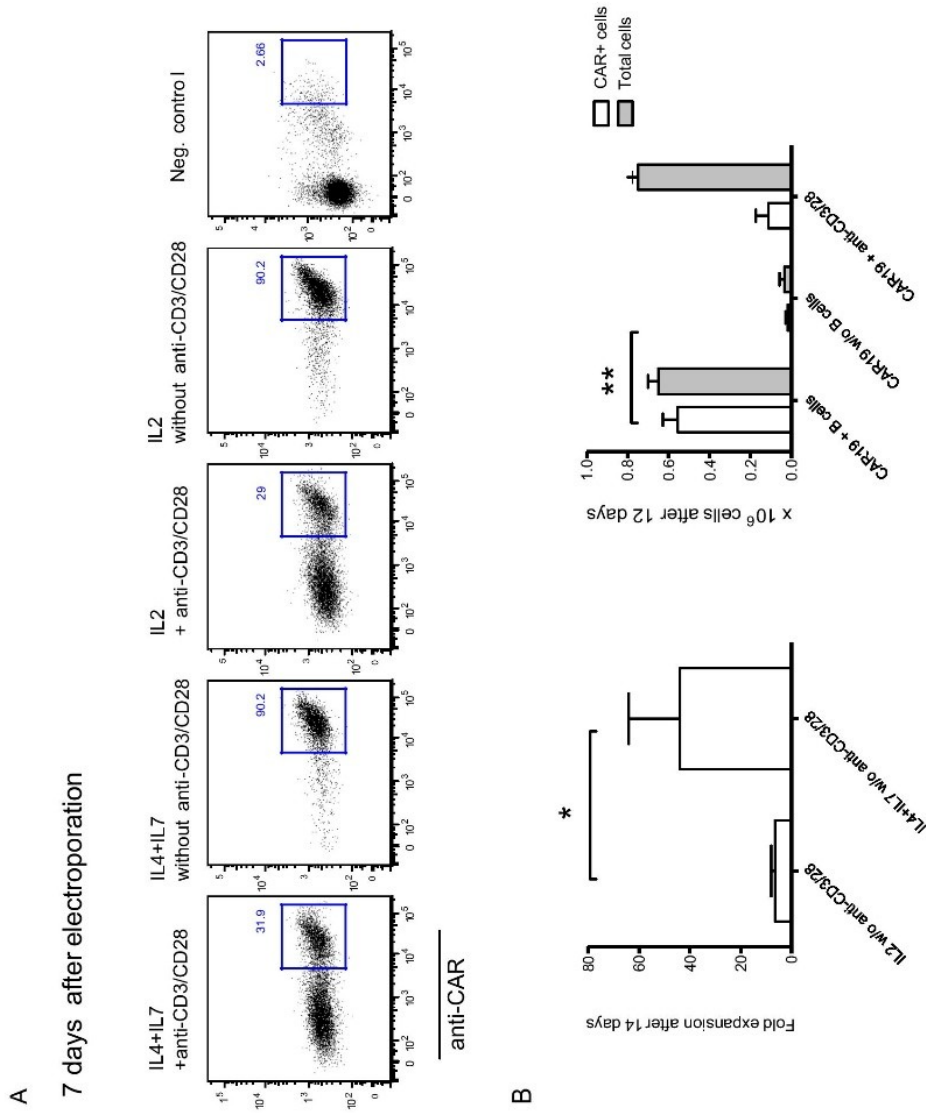


Figure 1. Recognition of CD19⁺ B cells by CAR19 T cells enables their selective expansion in the presence of IL-4 + IL-7. (A) Human PBMCs were electroporated with CAR19 transposon and stimulated with anti-CD3/CD28 Abs or left unstimulated. Cells were then cultivated in the presence of IL-2 or IL-4 + IL-7. Seven days later, the expression of CAR19 transgene was determined with anti-CAR antibody. The numbers show the percentage of CAR⁺ cells out of all live cells. Negative controls are untransduced cells. (B) The level of expansion of cells from (A) was analyzed after 14 days. (C) To determine whether endogenous B cells initiate CAR19 T-cell priming, PBMCs were first depleted from CD19⁺ cells by magnetic beads and then were electroporated with CAR19 transposon (4×10^6 cells in $10\text{-}\mu\text{L}$ tips). Cells were split into three groups and cultivated in the presence of IL-4 + IL-7: (i) with anti-CD19-sorted B cells, (ii) alone but activated with anti-CD3/28 Abs. After 12 days, live cells were counted, and FACS was performed to identify CAR19 T cells. (C) The graph shows the number of all cells and CAR19 T cells, $n = 3$. In (A), one representative donor is shown.

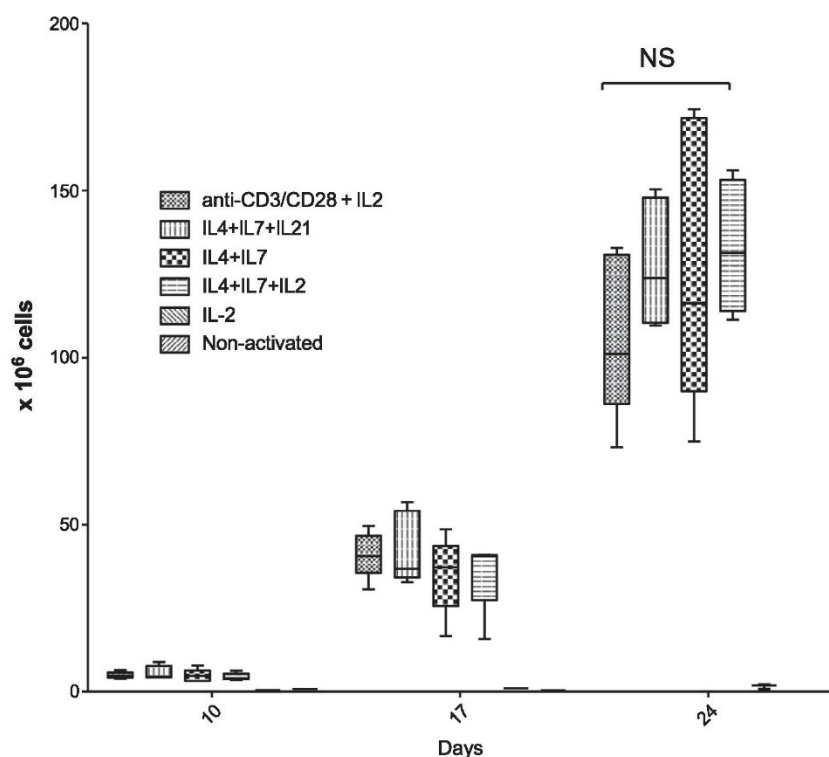


Figure 2. Anti-CD3/CD28 activation is not required for expansion of CAR19 T cells in the presence of IL-4 + IL-7. PBMCs were electroporated with CAR19 transposon (4×10^6 cells in 100- μ L tips per sample) and then incubated in the presence of the cytokines as indicated in the legend. The graph shows the total number of cells at indicated time points. The non-activated cells (i.e., without any exogenous cytokines) and cells grown only in the presence of IL-2 did not expand. The differences in the expansion among the samples in the first four groups were not significant (NS), $n = 5$.

3D demonstrates that all groups of CAR19 T cells were equally cytolytic (Figure 3D) and degranulated to similar levels (Figure 3C) after co-incubation with the Ramos B cell line. These results thus demonstrate that the activation of CAR19 T cells through recognition of CD19 on B cells in the presence of IL-4 + IL-7 leads to an almost pure population of cytotoxic CAR19 T cells.

Next, we determined the production of effector cytokines TNF-alpha and IFN-gamma by CAR19 T cells (Figure 4). To do that, we transfected the HEK293 cell line with cDNA encoding antigen CD19 and used the transfected HEK cells as stimulators for CAR19 T cells, whereas non-transfected HEK cells served as a negative control. The presented data (two out of five representative donors are depicted) show that (i) the response of CAR19 T cells is specific to antigen CD19 because no cytokine production was detected after incubation with HEK cells were transfected with control DNA and (ii) CD4⁺ CAR19 T cells grown in IL-4 + IL-7 produced more TNF-alpha than CAR19 T cells grown under anti-CD3/CD28+IL-2 conditions

and CD8⁺ CAR19 T cells grown under anti-CD3/CD28+IL-2 conditions produced more IFN-gamma than cells from remaining groups. Further, we did not detect any significant production of IL-4 in any group (data not shown). These results further demonstrate acquisition of effector functions by CAR19 T cells.

The experiments presented thus far were done with PBMCs obtained from healthy donors, and therefore we wished to determine whether this technique would also be functional with PBMCs obtained from patients undergoing chemotherapy for B-cell lymphoma. We tested PBMCs from six patients; each patient had a normal complete blood cell count at the time of the experiment, but because of previous treatment with rituximab, they had very low numbers of B cells in the peripheral blood. The data in Figure 5 show that we were able to induce expansion of CAR19 T cells in four of six patients similarly to healthy donors. These cells were also cytotoxic against Ramos cells (results not shown) However, the efficiency of the expansion depends on the presence of B cells in the blood of the donors.

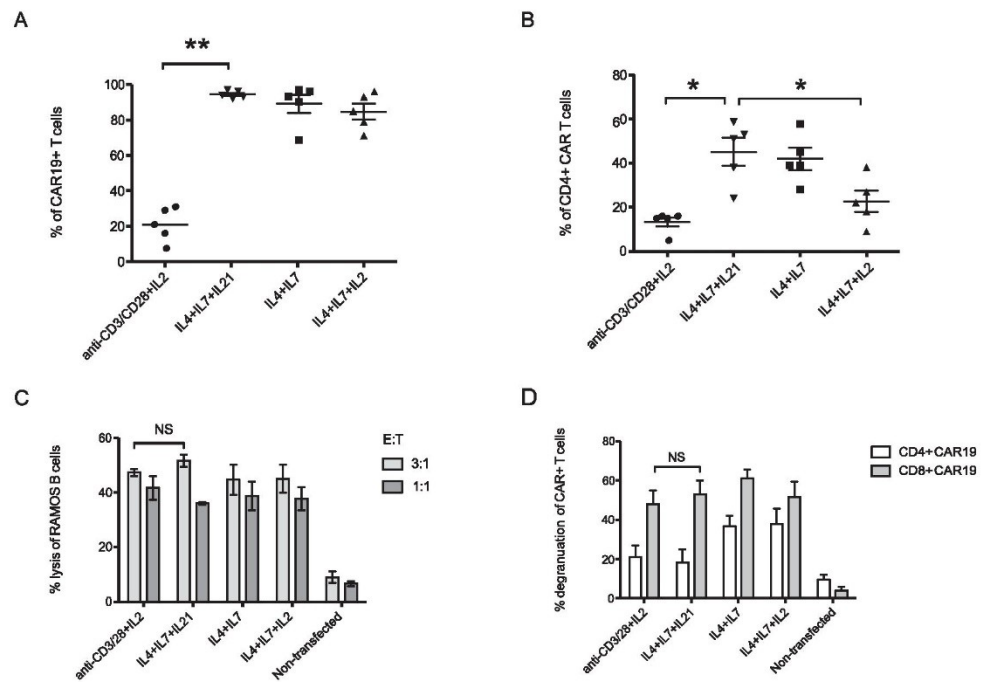


Figure 3. Cultivation in the presence of IL-4 + IL-7 results in almost pure population of cytotoxic CAR19 T cells. Cells prepared in Figure 2 were further analyzed to determine the percentage of CAR19 T cells and their functionality. The graphs show the percentage of CAR19⁺ cells (A) and the percentage of CD4⁺ CAR19 T cells (B) out of all live cells. The effector functions of CAR19 T cells were determined by cytotoxic assay against Ramos B cell line (C). Effector to target ratio (E:T) is 3 and 1. (D) The graph shows the level of degranulation of both CD4⁺ and CD8⁺ subtypes of CAR19 T cells after co-incubation with Ramos B cells. Before these two assays, CAR⁺ T cells from anti-CD3/CD28+IL-2 group were sorted with magnetic beads to obtain a homogenous population of pure CAR19 T cells (>90%). Non-transfected control cells are anti-CD3/28 activated T cells grown in the presence of IL-2, n = 5.

Supplementation of culture medium with cytokines such as IL-2, IL-7, IL-15 and IL-21 has been shown to influence the phenotype and expansion of CAR T cells [16,17]. Similarly, we have performed a comprehensive FACS analysis to determine variations in the differentiation status of CAR19 T cells. The central memory T cells (T_{cm}) were identified as CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁺, the effector memory T cells (T_{em}) were CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁻, the memory stem cell T cells (T_{scm}) were CD45RA⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD95⁺CD27⁻CD28⁺ and the effector T cells were CD45RA⁺CD45RO⁻CCR7⁻CD95⁺, (naive CD45RA⁺CD95⁻ T cells were not detected; data not shown). Additionally, we determined the expression of inhibitory receptors TIM-3, LAG-3 and PD-1 on CAR19 T cells.

We found that CD8⁺ CAR19 T cells cultivated in the presence of IL-4 + IL-7 + IL-21 were mostly of T_{cm} phenotype. In addition, they contained more T_{scm} and fewer T_{em} than cells grown under other experimental conditions (Figure 6). When we analyzed the expression of antigens CD27 and CD28 (Figure 7), we found that approximately 75–80% of CD8+CAR19

T cells generated in the presence of IL-4 + IL-7 + IL-21 were highly positive for both antigens, whereas 10-fold fewer cells were similarly positive in cultures generated under anti-CD3/CD28+IL-2 conditions. Most interestingly, we observed (Figure 8) that both CD4⁺ and CD8+CAR19 T cells in cultures supplemented with IL-21 expressed undetectable amounts of TIM-3, whereas CAR19 T cells grown under anti-CD3/CD28+IL-2 conditions had approximately 40% TIM-3 positive CD8+CAR19 and 20% TIM-3 positive CD4⁺ CAR19 T cells. A similar, albeit less pronounced, effect was observed for PD-1, but no significant effect was found for LAG-3. We did not detect any CTLA-4⁺ cells (data not shown).

IL-21 prevents terminal differentiation of CAR19 T cells *in vitro*, helps them maintain an immature phenotype and prevents upregulation of inhibitory receptors TIM-3 and PD-1.

We have demonstrated that CAR19 T cells expand in the presence of autologous B cells. To further analyze the mechanisms of CAR T activation *in vitro*, we have transduced T cells with a CAR specific for an antigen that is not expressed by PBMCs to eliminate the

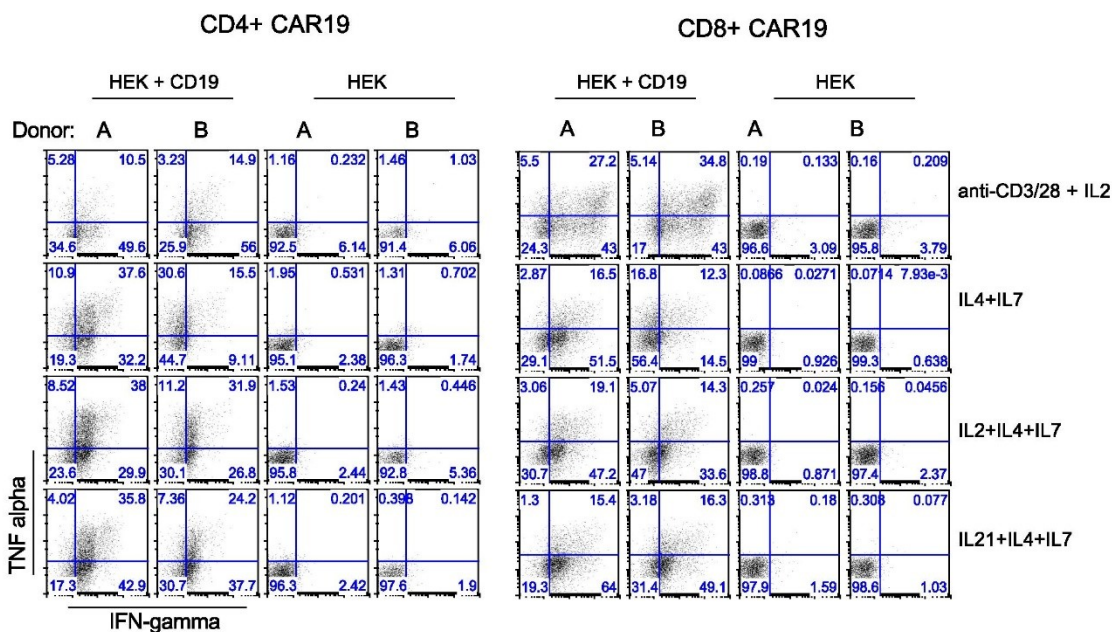


Figure 4. CAR19 T cells produce effector cytokines IFN- γ and TNF- α following activation through CAR. HEK293 cells were transfected with CD19 cDNA and used as stimulators for CAR19 T cells manufactured in the presence of cytokines as indicated in the figure. After overnight incubation in the presence of brefeldin A, cells were stained for CAR, fixed and stained for cytokines CD4 and CD8. HEK293 cells transfected with a control plasmid served as a negative control. The numbers in each quadrant indicate the percentage out of CD4⁺ or CD8⁺ CAR19 T cells. Two of five representative donors are shown.

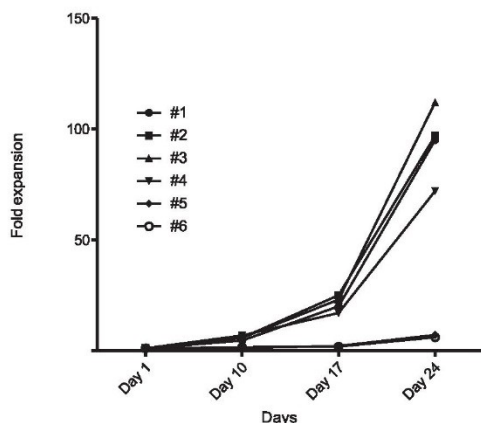


Figure 5. CAR19 T cells can be generated from PBMCs obtained from patients undergoing chemotherapy for non-Hodgkin lymphoma. Fresh blood samples (5 mL) were subjected to a Ficoll gradient centrifugation and electroporated (4×10^5 cells in 10- μ L tips) with CAR19 transposon. After electroporation, cells were cultivated in the presence of IL-4 + IL-7 for 24 days. The graph shows the fold expansion of each sample. Two of six samples did not expand, possibly due to the low number B cells due to previous rituximab (anti-CD20 Ab) therapy.

priming by endogenously expressed target cells. We selected the PSMA CAR [18], which is not expressed on the surface of PBMCs. The structure of the PSMA CAR is identical to CAR19 except for the extracellular part encoding the anti-PSMA scFv and a Myc tag located after the scFv. The amino acid sequence of both CARs is provided earlier in the Methods section.

The data in Figure 9 show the results of an experiment in which the PBMCs were electroporated with PSMA CAR transposon followed by activation with immobilized anti-Myc tag antibody that reacts with extracellular part of PSMA CAR or were activated polyclonally with anti-CD3/28 antibodies. After activation, cells were cultivated in the presence of IL-4 + IL-7 for 24 days. We found that anti-Myc-treated cells expanded to significantly higher numbers than anti-CD3/28-treated cells, whereas no significant expansion was detected in the third group of anti-Myc treated cells grown in the absence of exogenous cytokines (Figure 9A). Next, we found that anti-Myc-treated cells contained >95% of PSMA CAR⁺ T cells, while the anti-CD3/28 treated cells contained only ~10% of PSMA CAR⁺ T cells (Figure 9B). Both types

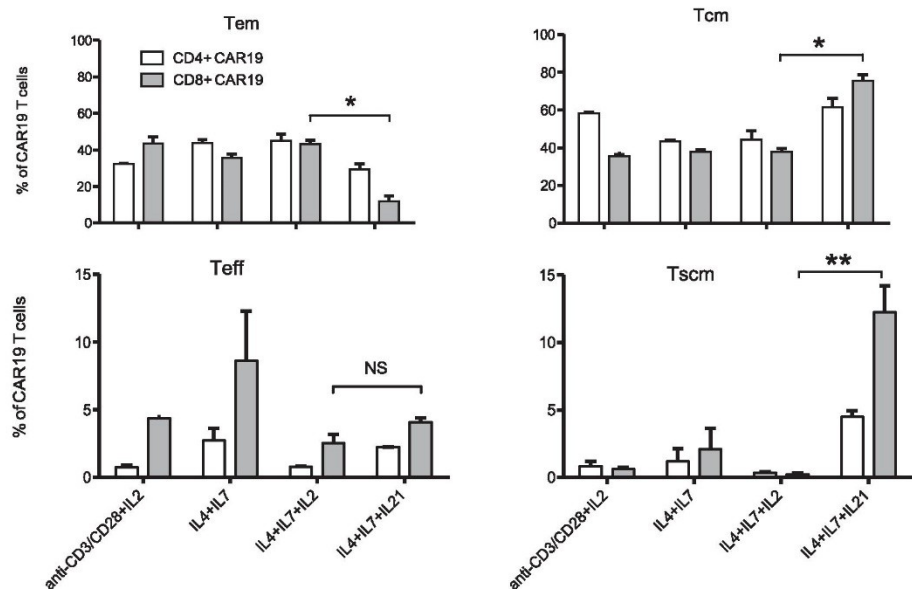


Figure 6. Combination of cytokines IL-4 + IL-7 + IL-21 enhances the expansion of a less differentiated CAR19 T cells with Tcm and Tscm phenotypes. Cells were grown in the presence of indicated cytokines for 24 days and then were analyzed by FACS to determine the differentiation status of CD4⁺ CAR19 T cells and CD8⁺ CAR19 T cells. The central Tcm were identified as CD45RA⁻CD45RO⁻CCR7⁺; the Tem were CD45RA⁺CD45RO⁺CCR7⁻; the Tscm were CD45RA⁻CD45RO⁺CCR7⁻CD95⁺CD27⁺CD28⁺, the effector T cells were CD45RA⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD95⁺, naive CD45RA⁻CD95⁻ T cells were not detected (data not shown), n = 5.

of PSMA CAR T cells specifically killed PSMA⁺ target cell line LnCAP (Figure 9C,D) at similar levels.

We thus provide evidence that signaling via the CAR transgene in the presence of IL-4 and IL-7 enables efficient and selective expansion of transduced T cells and their differentiation into cytotoxic CAR T cells. The addition of IL-21 helps maintain their immature phenotype and reduces the expression of inhibitory receptors TIM-3 and PD-1 without negative effects on the cytotoxic functions of CAR T cells.

Discussion

Significant improvements of electroporation-based genetic modification of T cells was achieved in the past through the use of genetically modified feeder cell lines expressing various co-stimulatory and cytokine ligands [2]. The expansion of CAR T in the presence of modified K562 cells expressing CD19, 4-1BB ligand and IL-15 was effective but required many days of culture [2]. For GMP-grade manufacturing, the master cell banks of the artificial antigen presenting cells had to be prepared and extensively characterized, which increases costs and limits the widespread use of this technique. In contrast, we found that the electroporation of CAR19 transposon triggers a spontaneous activation of transfected T cells through recognition of B cells and results in their proliferation

in the presence of cytokines IL-4 and IL-7. If IL-21 is added with IL-4 + IL-7 to the cell medium, proliferating CAR19 T cells maintain their early memory phenotype and express low amounts of inhibitory receptors TIM-3 and PD-1 compared with cells generated under anti-CD3/28 + IL-2 conditions. This mechanism also works using an anti-CAR antibody to initiate CAR T activation, which makes this technique universally applicable to CARs specific to other antigens. We successfully generated approximately $100\text{--}150 \times 10^6$ CAR T cells from one electroporation of 4×10^6 PBMCs after 24 days *in vitro* and this process can be easily scaled up to produce a clinical dose of about 1×10^9 CAR T cells.

There are several approaches to specifically expand transduced CAR T cells without any additional manipulation, such as magnetic bead sorting. An elegant method developed by Ramanayake *et al.* [3] is based on a repeated re-stimulation of CAR19 T cells with irradiated autologous PBMCs, and it most likely works through stimulation of CAR19 T cell through B cells similarly as we have observed. Another nice molecular trick described by Wilkie *et al.* uses a chimeric cytokine receptor composed of extracellular IL-4 fused with the intracellular IL-2 chain that is co-expressed with CAR. This artificial receptor delivers an IL-2-specific mitogenic signal upon culture in IL-4, resulting in expansion of a pure population of CAR T cells [19].

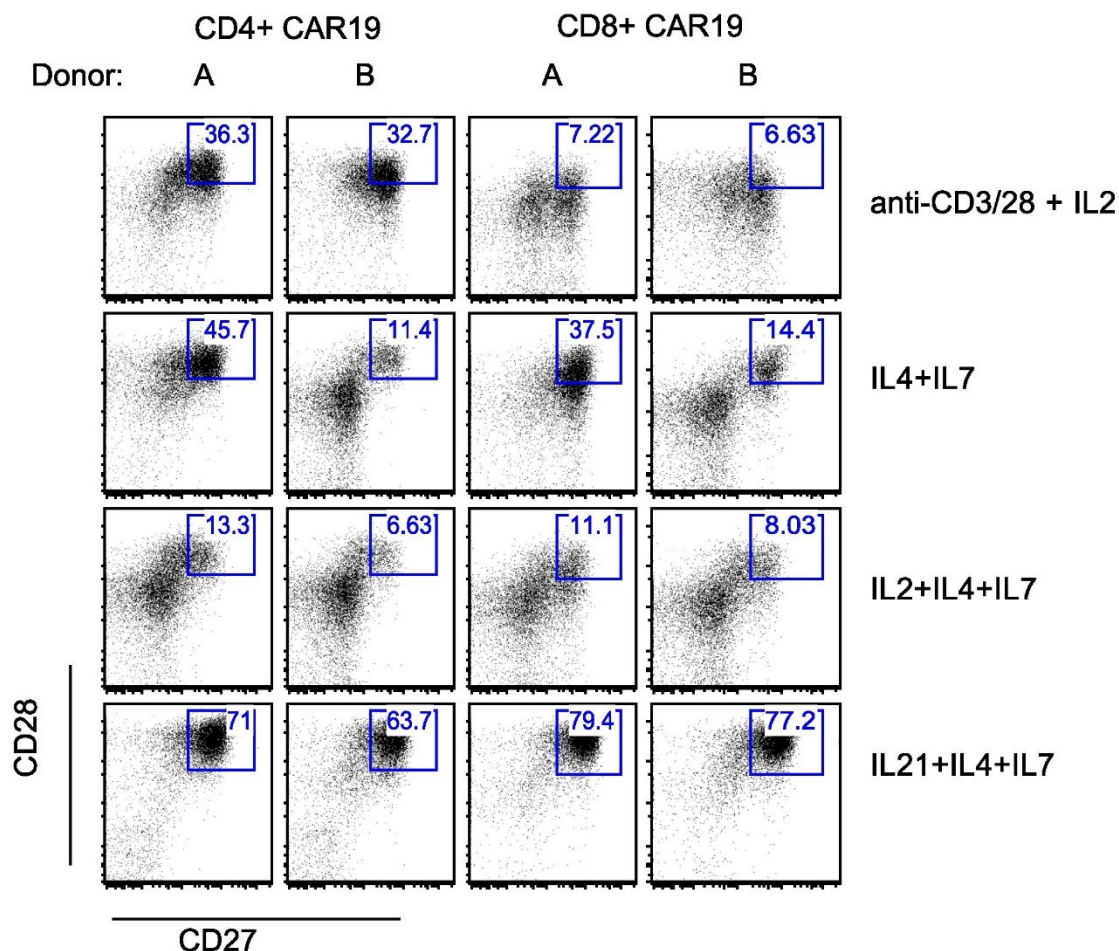


Figure 7. Cultivation of CAR19 T cells in the presence of IL-4 + IL-7 + IL-21 supports the expansion of immature CD27(high)CD28(high) population of CAR19 T cells. The numbers in each dot plot indicate the percentage of cells within the gate out of all CD4⁺ or CD8⁺ CAR19 T cells. Two of five representative donors are shown.

Our data show that similar results can be achieved through a simple step that is based on a TCR-like activation of transduced CAR T cells via ligation of the CAR. We constructed a PSMA CAR that can be easily activated with anti-Myc tag antibody and is not spontaneously activated after electroporation into PBMCs. Similar to experiments shown in Figure 1B, we found that anti-Myc tag antibody induces activation of PSMA CAR T cells and their intensive proliferation in the presence of IL-4 + IL-7. Thus, our approach, based on a selective activation of transduced CAR T cells with anti-CAR antibody or, with a physiological ligand (i.e., B cells) in the case of CAR19, also effectively induces expansion of CAR T cells. Interestingly, however, this method works only if CAR T cells are cultivated in the presence of IL-4 + IL-7;

supplementation of cell medium with only IL-2 was insufficient (Figure 2).

The combination of cytokines IL-4 and IL-7 was shown to be superior to IL-2 to manufacture clinical-grade antiviral T cells [9]. IL-7 is mainly produced by non-hematopoietic cells such as specialized lymphoid stromal subsets in lymphoid organs. It is absolutely required for the development of secondary lymphoid tissues and for the development of T cells in the thymus [20]. In addition to its role in lymphoid development, it also promotes the maintenance of activated T cells recruited into the secondary lymphoid organs and has strong pro-survival effects on T cells *in vitro* [21]. IL-4 is produced by T cells, mast cells and basophils and primarily shapes the immune response by inducing Th2 type differentiation

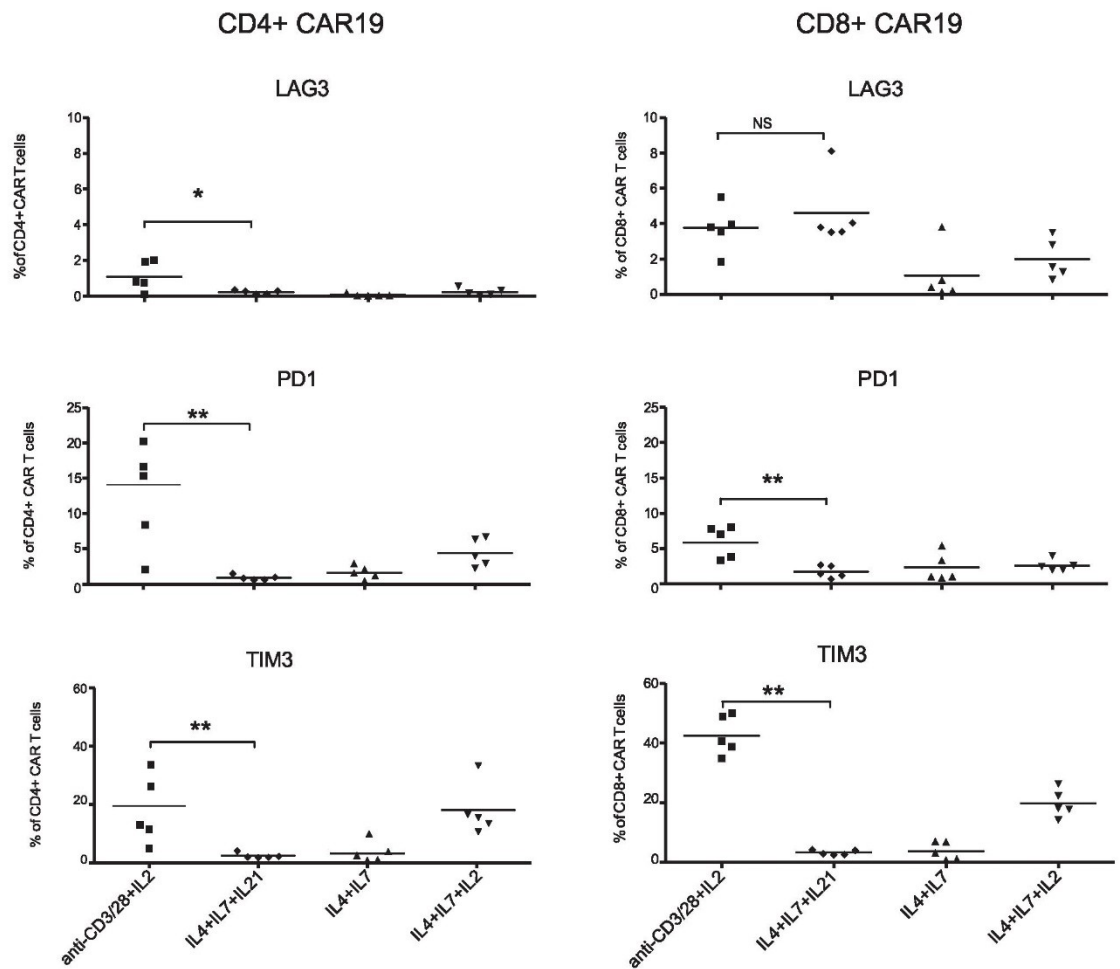


Figure 8. Cultivation in the presence of IL-4 + IL-7 + IL-21 reduces the expression of inhibitory receptors PD-1 and TIM-3 on CD4⁺ CAR19 T cells (left) and CD8⁺ CAR19 T cells (right), n = 5.

of T cells. In addition to T-cell effects, it stimulates the proliferation of activated B cells accompanied by immunoglobulin class switching and production of immunoglobulin E and G1. Besides its well-known TH2-polarizing ability, IL-4 also delivers a strong pro-survival signal to T cells and can inhibit apoptosis of activated T cells similarly to cytokines IL-7, IL-15 and IL-2 [21,22]. IL-21 does not have such well-defined effects on T cells; it is mainly produced by activated T cells but targets a broad range of lymphoid and myeloid cells of the immune system and therefore is able to regulate innate and acquired immune responses [23]. In contrast to IL-2, it is not a T-cell-specific growth factor, but it seems that IL-21 can block terminal differentiation of T cells (similarly to Wnt pathway activation) and also support T-cell proliferation [8]. The addition of IL-21 to the cocktail

of IL-4 and IL-7 thus inhibits terminal differentiation of rapidly proliferating CAR T cells. In agreement with these observations, our analysis of the phenotypes of CAR19 T cells revealed that cultivation in the presence of IL-4 + IL-7 + IL-21 favors the expansion of T_{em} and T_{scm} and increases the proportion of CD4⁺ CAR19 T cells. The majority of CAR19 T cells generated under these conditions was also highly positive for CD27 and CD28, which suggests that they were of immature phenotype. Similar findings were reported by Kaartinen *et al.* [11], who demonstrated that low IL-2 concentration in combination with anti-CD3/28-based activation favored the development of early memory CAR T cells. This suggests that high IL-2 concentrations drive T cells toward the terminal developmental stages. In accordance with that study, we similarly found that high concentrations

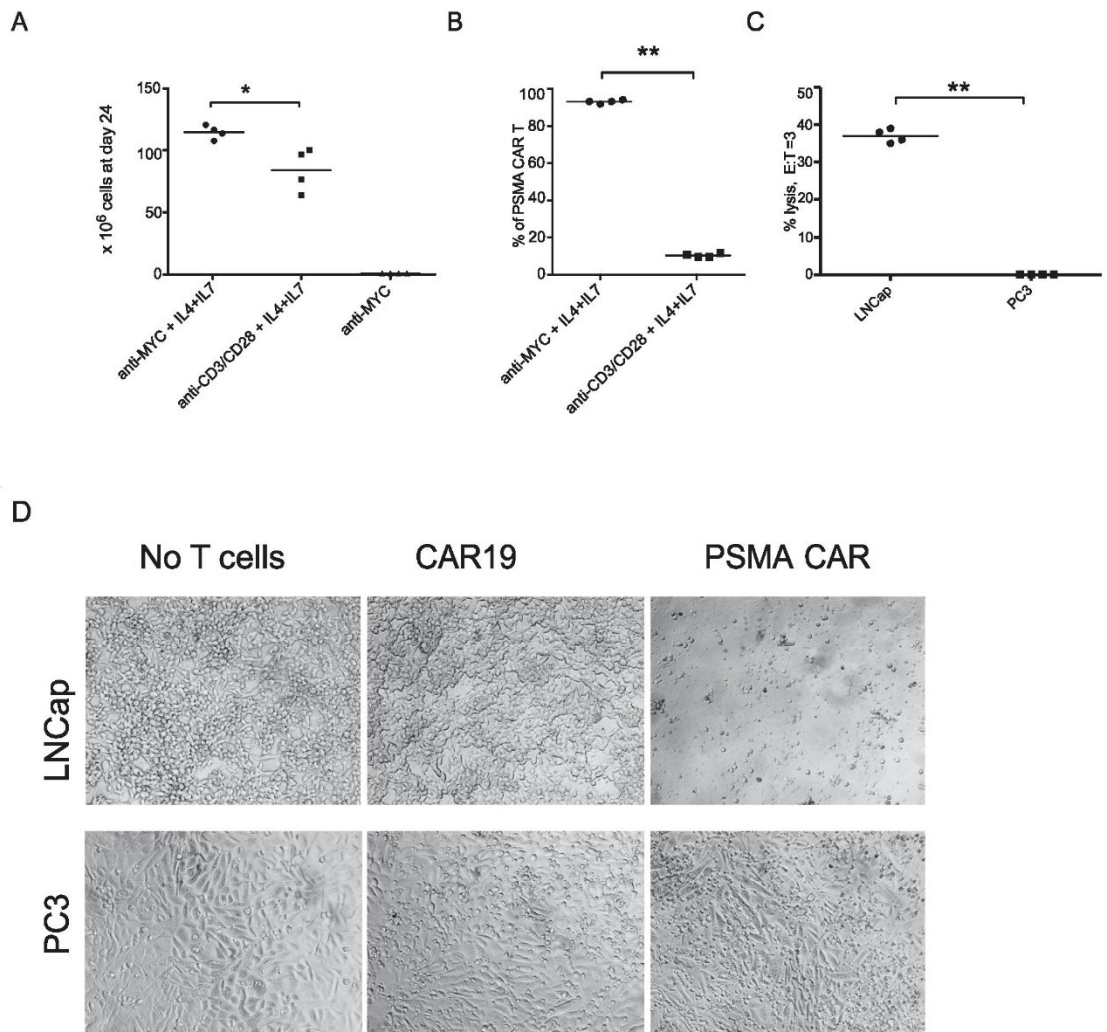


Figure 9. Signaling via CAR in the presence of IL-4 + IL-7 enables selective expansion of PSMA CAR T cells and acquisition of their effector functions. PBMCs were electroporated with PSMA CAR (4×10^6 cells in 100- μ L tips per sample) and activated with immobilized anti-Myc or anti-CD3/28 antibodies, followed by cultivation in media supplemented with IL-4 + IL-7, or were activated with anti-Myc antibody but without addition of exogenous cytokines. The graphs show cell number (A) after 24 days of culture and the percentage (B) of PSMA CAR T cells determined by staining with anti-Myc antibody. (C) Cytotoxicity of PSMA CAR T cells was determined against PSMA⁺ cell line LnCap using carboxyfluorescein succinimidyl ester-based FACS assay, PC3 are PSMA⁻ cells. (D) Cytotoxicity was similarly determined by a 3-day co-culture with LNCap or PC3 cells. CAR19 T cells were used as a negative control. (D) The images show that PSMA CAR T cells destroyed monolayers of LNCap cells, whereas PC3 cells remained intact (one representative donor is shown), $n = 4$.

of IL-2 supported terminal differentiation of CART cells (Figure 7).

Tscm are thought to better repopulate recipients, survive longer *in vivo* and be less susceptible to tumor suppression mechanisms; therefore, it is believed that adoptive T-cell therapy will be more effective with this T-cell subtype. Singh *et al.* [13] showed that exogenous IL-21 helps to generate CART cells with

a less differentiated phenotype. Similarly, a recent report [8] showed that the Wnt signaling pathway, in combination with IL-21, is important for Tscm generation. The addition of the glycogen synthase-3 β inhibitor TWS119 into *in vitro* cultures of CAR19 T cells together with IL-21 and IL-7 resulted in expansion of Tscm CART cells. Our data show that CAR19 T cells generated under IL-4 + IL-7 + IL-21 conditions

contained approximately 10% of CD8⁺Tscm CAR19 T cells, while CAR19 T cells generated under IL-4 + IL-7 + IL-2 contained none. Our data thus show similar effects of IL-21 on T-cell development as those described by Sabatino *et al.* We are currently studying the effects of TWS119 on CAR T-cell differentiation using our experimental system. The ability of IL-21 to block differentiation of CAR T cells toward terminal phenotypes is certainly a unique feature of IL-21, and this cytokine will be most likely included in future expansion protocols.

We also found that the cultivation of CAR19 T cells in the presence of IL-4 and IL-7 supports expansion of CD4⁺ CAR19 T cells (Figure 3B). The antitumor role of CD4⁺ CAR T has not been clearly determined yet, but it has been shown that CD4⁺ CAR T cells are cytotoxic [24], and the existence of cytolytic CD4⁺ T cells is also a well-known fact because they play important role in antiviral cytotoxic T-cell responses. Our data show that both CD4⁺ and CD8⁺ CAR19 T cells were cytotoxic because they degranulated (Figure 3D) and produced IFN- γ and TNF- α after stimulation with CD19⁺ target cells. It is believed that CAR T cells should contain both CD4⁺ and CD8⁺ subsets because there are reports suggesting that CD4⁺ CAR T cells might provide help and support the antitumor functions of CD8⁺ CAR T cells [25].

In conclusion, we have developed a simple method for manufacturing CAR19 T cells based on the electroporation of piggyBac transposon vector and cultivation in the presence of cytokines IL-4, IL-7 and IL-21. The manufacturing process does not require special feeder cells and was specifically designed to be compatible with current GMP rules. We are now preparing a clinical trial to test the efficiency of CAR19 T cells prepared via this protocol.

Acknowledgments

This work was supported by grants AZV NV15-34498A, UK Primus/MED/34, MH CZ-DRO (Institute of Hematology and Blood Transfusion, IN-00023736) and gifts from the Heřmanský Foundation (Czech Republic) to Pavel Otáhal.

Disclosure of interests: The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies described in this article.

References

[1] Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:1531–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008322108>.

[2] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using sleeping beauty system and artificial antigen presenting cells. *PLoS ONE* 2013;8:e64138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064138>.

[3] Ramanayake S, Bilton IAN, Bishop D, Dubosq M, Blyth E, Clancy L, et al. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice grade CD19-specific chimeric antigen receptor expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy* 2015;17:1251–67. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.05.013>.

[4] Field A-C, Vink C, Gabriel R, Al-Subki R, Schmidt M, Goulden N, et al. Comparison of lentiviral and sleeping beauty mediated $\alpha\beta$ T cell receptor gene transfer. *PLoS ONE* 2013;8:e68201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068201>.

[5] Kakarla S, Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J* 2014;20:151–5. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000032>.

[6] Duong CPM, Yong CSM, Kershaw MH, Slaney CY, Darcy PK. Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: from the bench to the clinic. *Mol Immunol* 2015; <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.12.009>.

[7] Crompton JG, Sukumar M, Restifo NP. Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunol Rev* 2014;257:264–76. <https://doi.org/10.1111/imr.12135>.

[8] Sabatino M, Hu J, Sommariva M, Gautam S, Fellowes V, Hocker JD, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8⁺ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood* 2016;128:519–28. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-683847>.

[9] Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, Yanagisawa R, Christin AS, Huye LE, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther* 2009;20:1622–32. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.130>.

[10] Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, Tzannou I, Liu H, Martinez C, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med* 2014;6:242ra83. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008825>.

[11] Kaartinen T, Luostarinen A, Maliniemi P, Keto J, Arvas M, Belt H, et al. Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion. *Cytotherapy* 2017;19:689–702. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.067>.

[12] Deniger DC, Yu J, Huls MH, Figliola MJ, Mi T, Maiti SN, et al. Sleeping Beauty transposition of chimeric antigen receptors targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor-1 (ROR1) into diverse memory T-cell populations. *PLoS ONE* 2015;10:e012815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128151>.

[13] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, Switzer K, et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res* 2011;71:3516–27. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3843>.

[14] Whilding LM, Parente-Pereira AC, Zabinski T, Davies DM, Petrovic RMG, Kao YV, et al. Targeting of aberrant $\alpha\beta$ 6 integrin expression in solid tumors using chimeric antigen receptor-engineered T cells. *Mol Ther* 2017;25:259–73. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.10.012>.

[15] Otáhal P, Průková D, Král V, Fabry M, Vočková P, Latečková L, et al. Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells. *Oncoimmunology*

Publikace 2

Stach M, **Ptackova P**, Mucha M, Musil J, Klener P, Otahal P: Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy* 2020;22:744-754. Impakt faktor 4,218.

Podíl na práci:

Konstrukce vektorů NFAT IL-21 CAR19 a NFAT IL-21 PSMA CAR, ověření jejich exprese. Izolace PBMCs, elektroporace a kultivace lymfocytů. Částečně podíl na imunofenotypové charakteristice CAR-T lymfocytů. Podíl na proliferačních experimentech *in situ*, podíl na kokultivačních experimentech *in vitro* a podíl na experimentech *in vivo*. Částečně podíl na přípravě publikace.

Vztah k dizertační práci

Příprava vektorů NFAT IL-21 CAR19 a NFAT IL-21 PSMA CAR v druhé části práce.



FULL-LENGTH ARTICLE

Translational Research

Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells


 Martin Štách^{1,3}, Pavlína Ptáčková^{1,2}, Martin Mucha^{1,3}, Jan Musil¹, Pavel Klener², Pavel Otáhal^{1,2,*}
¹ Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic² First Department of Medicine, Department of Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic³ Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article History:
 Received 22 January 2020
 Accepted 13 August 2020

Key Words:
 CAR T cells
 chronic lymphocytic leukemia
 interleukin 21
 piggyBac transposon

ABSTRACT

Background: The efficiency of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell-based therapies depends on a sufficient expansion of CAR T cells *in vivo* and can be weakened by intra-tumoral suppression of CAR T cell functions, leading to a failure of therapy. For example, certain B-cell malignancies such as chronic lymphocytic leukemia are weakly sensitive to treatment with CAR T cells. Co-expression of proinflammatory cytokines such as IL-12 and IL-18 by CAR T cells have been shown to enhance their antitumor function. We similarly engineered CAR T cell to co-express IL-21 and studied the effects of IL-21 on CAR T cells specific to CD19 and prostate-specific membrane antigens using an *in vitro* co-culture model and NSG mice transplanted with B-cell tumors.

Results: IL-21 enhanced the expansion of CAR T cells after antigenic stimulation, reduced the level of apoptosis of CAR T cells during co-culture with tumor cells and prevented differentiation of CAR T cells toward late memory phenotypes. In addition, induced secretion of IL-21 by CAR T cells promoted tumor infiltration by CD19-specific CAR (CAR19) T cells in NSG mice, resulting in reduced tumor growth. By co-culturing CAR19 T cells with bone-marrow fragments infiltrated with CLL cells we demonstrate that IL-21 reduces the immunosuppressive activity of CLL cells against CAR19 T cells.

Conclusions: CAR19 T cells armed with IL-21 exhibited enhanced antitumor functions. IL-21 promoted their proliferation and cytotoxicity against chronic lymphocytic leukemia (CLL). The results suggest that arming CAR T cells with IL-21 could boost the effectiveness of CAR T-mediated therapies.

© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of International Society for Cell & Gene Therapy.

Introduction

Various strategies are currently being explored to improve the functionality of chimeric antigen receptor (CAR) T cells and enhance their survival *in vivo*. In addition to T-cell receptor engagement and co-stimulatory signaling, cytokines play a critical role in modulating T-cell function. Therefore, an appealing strategy is to engineer CAR T cells to produce cytokines that enhance anti-tumor responses by acting on tumor stroma or influence CAR T cells directly in a paracrine/autocrine manner. Several pro-inflammatory cytokines, including IL-12, IL-15 and IL-18, that are co-expressed by CAR T cells have been shown to modulate their anti-tumor functions [1–3], supporting this strategy. The authors studied another relevant cytokine as a potential enhancer of CAR T cells, IL-21. IL-21 is a pleiotropic cytokine that acts on many lymphocyte subsets but in natural T cells and CAR T cells promotes

expansion and the maintenance of the early memory phenotype [4]. Interestingly, the effects of IL-21 are counteracted by high concentrations of IL-2, which directs CAR T cells toward terminal memory phenotypes and, eventually, activation-induced cell death (AICD) [5]. It is thought that such early memory CAR T cells (CD62L+/CCR7+/CD45RA+/CD28+/CD27+/CD95+/PD-1–) have enhanced *in vivo* persistence and provide greater anti-tumor effects than the more differentiated T-cell subsets [6,7]. These experimental observations were further verified by the outcomes of clinical studies with CD19-specific CAR (CAR19) T cells in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), showing that more efficient treatment correlated with an increased number of less differentiated CAR T cells with early memory phenotype [8]. Although CAR19 T cells have been shown to be highly effective against B-ALL, their efficiency against indolent B-cell lymphoproliferative diseases, such as chronic lymphocytic leukemia (CLL), is significantly weaker [9]. Recently, CLL cells were shown to directly inhibit proliferation of CAR19 T cells [10] and impede their functions. The efficiency of CAR T cells against solid tumors is even worse, as solid tumors induce

* Correspondence.
 E-mail address: otahal@uhkt.cz (P. Otáhal).

<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.08.005>

1465–3249/© 2020 Published by Elsevier Inc. on behalf of International Society for Cell & Gene Therapy.

abortive activation and apoptosis of infiltrating lymphocytes, which prevents their long-term expansion [11].

These facts led the authors to further study the effects of IL-21 on memory differentiation of CAR T cells. The authors hypothesized that the efficiency of CAR T cells can be augmented by modulating their memory differentiation by inducing the expression of IL-21. The authors constructed an artificial nuclear factor of activated T cells (NFAT) promoter, as described for IL-12 or IL-18 [1,3,12], which becomes activated upon anti-genic stimulation of CAR T cells. The authors prepared human CAR T cells to react to prostate-specific membrane antigen (PSMA) and CD19 antigen co-expressing NFAT-regulated IL-21 (NFAT IL-21). CAR T cells were manufactured via electroporation of piggyBac transposon vector, followed by *in vitro* expansion in a cocktail of cytokines containing IL-4, IL-7 and IL-21, as the authors described previously [6], resulting in a homogeneous population of >90% CAR+ T cells with an early memory phenotype. CAR T cells were then repeatedly restimulated with tumor cells *in vitro* or analyzed in NSG mice transplanted with B-cell lymphoma cells. To study the effects of CAR19 T cells against CLL, the authors developed an *in vitro* model based on co-cultivation of CAR19 T cells with bone marrow (BM) fragments obtained from patients with CLL that were infiltrated by CLL cells.

The authors found that IL-21 inhibited terminal differentiation of CAR T cells after anti-genic restimulation with tumor cells and promoted their expansion and the development of effector functions. By contrast, IL-2 enhanced the expansion of CAR T cells to lower levels, with opposite effects on memory differentiation, producing terminally differentiated CAR T cells expressing significantly more PD-1. CAR T cells engineered with induced secretion of IL-21 had increased anti-tumor effects against B-cell tumors transplanted in NSG mice and enhanced activity against CLL cells compared with non-armed CAR19 T cells. In summary, the authors' results show that IL-21 is an important regulator of T-cell memory development and suggest that modification of CAR19 T cells to secrete IL-21 upon their activation could be another way to enhance their therapeutic potency—for example, against weakly sensitive B-cell malignancies, such as CLL.

Methods

Cell source

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats obtained from blood donors. The use of all human materials was approved by the institutional review board, and all donors signed informed consent for the use of biological materials. Ramos is a CD19+ Burkitt lymphoma cell line (American Type Culture Collection CRL-1596). LNCaP is a prostate carcinoma cell line positive for PSMA (American Type Culture Collection CRL-1740). BM fragments were obtained by trephine biopsy from donors with newly diagnosed CLL, and 20–90% infiltration of the BM was verified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) and immunohistochemistry.

DNA plasmids and sequences

CAR19 and PSMA CAR constructs have been described previously [6,13]. Both CARs have the same design and contain a 4-1BB co-stimulatory domain and T-cell receptor zeta domain. The hyperactive piggyBac transposase is driven by a cytomegalovirus promoter [14]. To construct the NFAT IL-21 vector, the promoter was synthesized containing $\times 6$ NFAT binding motif, minimal IL-2 promoter, human full-length IL-21 and SV40 polyA. This segment was cloned behind the CAR sequence in the same direction as the CAR gene into CAR19 and PSMA CAR vectors via XhoI-SalI. All CAR constructs were cloned into the piggyBac vector behind the ubiquitin C promoter. For fluorescent labeling of T cells, green fluorescent protein (GFP) was cloned into a piggyBac vector in a manner similar to that used for the CAR

constructs. Plasmids were purified by standard techniques using EndoFree kits (Qiagen, Germany). The sequences of PSMA CAR and NFAT promoter are provided in the supplementary material. The sequence of CAR19 has been published previously [13].

Cell culture, electroporation and antibody stimulation

For all experiments, the authors used CellGro media (CellGenix, Germany) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, USA) and the antibiotics penicillin and streptomycin (Gibco, USA). PBMCs were isolated from buffy coats or fresh blood samples by gradient centrifugation using Ficoll-Paque premium (GE Healthcare). After separation, cells were transfected with a Neon electroporator (Thermo Fisher Scientific, USA); 1×10^7 cells were resuspended in 100 μ L buffer T and mixed with 5 μ g plasmid DNA (2:1 mixture of piggyBac vector expressing CAR and a plasmid expressing a hyperactive piggyBac transposase) and electroporated for 20 ms at 2300 V using 100- μ L tips. Cells then rested overnight in cell media with cytokines. The next day, the cells were stimulated with immobilized antibodies or left unstimulated. To manufacture GFP+ CAR T cells, a 2- μ g GFP pPB vector was added to a mixture of plasmids. Virtually all GFP+ cells were positive for CAR and GFP— cells negative for CAR (data not shown).

To stimulate T cells with antibodies, both anti-CD3 and anti-CD28 mouse monoclonal antibodies (Miltenyi Biotec, Germany) and mouse anti-myc-tag antibody clone 9E10 (Exbio, Czech Republic) were diluted in phosphate-buffered saline at a concentration of 1 mg/mL and adhered onto a cell culture plate for 1 h at 37°C. The cells were washed with phosphate-buffered saline and used for cell activation. After 3 days of stimulation, cells were replated onto new culture plates.

Cell media were supplemented with cytokines as follows: 1000 U/mL IL-2 (Proleukin; Roche), 20 ng/mL IL-4 (Miltenyi Biotec), 10 ng/mL IL-7 (Miltenyi Biotec) and 40 ng/mL IL-21 (Miltenyi Biotec). Cells were fed with fresh media containing cytokines every 3–4 days according to growth rate. To sort cells by FACS, the authors used fluorescently labeled antibodies and isolated on a FACSAria instrument (BD Biosciences, USA).

Antibodies, FACS and enzyme-linked immunosorbent assay

Mouse anti-human CD3 APC-Cy7, CD45RA Alexa Fluor 488, CCR7 BV605, CD45RA-BUV737 (clone HI100), CD62L-BV650 (clone DREG-56), CD56-BUV563 (clone NCAM16.2), CD244-APC (clone 2-69), BTLA-BV421 (clone J168-540), CD3-BV786 (clone UCHT1), Tim3-BV480 (clone 7D3), CD160-PE (clone B455), PD1-BB700 (clone EH12.1), TIGIT-BV421 (clone 741182) and LAG3-PE (clone T47-530) were purchased from BD Biosciences (USA). LAG3-PE-eFluor610 (clone 3DS223H) and LAG3-APC (clone 3DS223H) were purchased from eBioscience (USA). TIGIT-PE-Cy7 (clone A151536), CD4-qDOT605 (clone S3.5), CD28-PE-Cy7 (clone CD28.2) and PD1-PE (clone EH12.2H7) were purchased from BioLegend (USA). CD8-AF700 (clone MEM-31), CD27-PE-Dy590 (clone LT27), Myc-FITC (clone 9E10), CD107a-PE (clone H4A3) and Annexin V-Phycoerythrin were purchased from Exbio. CD57-APC-Vio7701 (130-104-197), Myc-FITC (120-003-159), CD28 (clone 15E8) and CD3 (130-093-387) were purchased from Miltenyi Biotec. CD4-PB (clone RPA-T4) was obtained from Sony (USA). Live cells were identified using a fixable blue dead cell stain kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

To detect the CAR transgene, cells were stained with Alexa-647- or Alexa-488-labeled Fab2 fragment from goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, UK). This polyclonal antibody reacts with mouse anti-CD19 scFv in CAR19. To detect PSMA CAR, cells were labeled with anti-myc-tag antibody clone 9E10 (Exbio). Cells were labeled with goat anti-mouse antibody, washed twice and blocked with 10% mouse serum and then stained with fluorescently labeled

mouse monoclonal antibodies. The specificity of staining was extensively tested to rule out possible binding of mouse antibodies to cells due to the goat anti-mouse antibodies used to detect CAR.

To visualize *in situ* proliferation of CAR19 T cells, Ramos cells were adhered onto polylysine-coated (Merck, USA) chambered glass coverslips (Labtek, USA), and adherent LNCaP cells were directly grown on glass slides. Next, cells were briefly co-incubated with CAR T cells at a low E:T ratio and then overlaid with 0.5% agarose prepared in cell media. Cells were imaged using a fluorescent microscope with a digital camera (Olympus, Japan).

To determine the degranulation of CAR T cells, cells were incubated with or without Ramos B cells at a 1:1 ratio for 4 h. Phycoerythrin-labeled anti-CD107a antibody (Exbio) was added to the cell media at the beginning of the co-incubation. After 4 h, cells were harvested and labeled with anti-CD8 and anti-CD4 antibodies and analyzed by FACS on a FACS LSRFortessa instrument (BD Biosciences). To detect apoptotic cells, fluorescent caspase-3/7 substrate (Life Sciences, USA) was added to the cells for 30 min before FACS analysis.

To detect IL-21, CAR T NFAT 21 cells were stimulated overnight with anti-CD3 antibody or Ramos cells. After incubation, cells were freeze-thawed twice and the supernatants centrifuged to remove cell debris. The samples were then analyzed using an IL-21 enzyme-linked immunosorbent assay kit (BioLegend, USA). Absorbances were determined on an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader and concentrations of IL-21 calculated against IL-21 standards provided with the kit using an Excel spreadsheet.

The production of interferon gamma was determined using a cytokine capture kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Briefly, T cells cultured in the presence of CLL cells for 7 days were restimulated with Ramos B cells for 4 h in the presence of an interferon gamma labeling reagent. The cells were then washed and labeled with an interferon gamma detection reagent and monoclonal antibodies. FACS samples were analyzed using the LSRFortessa instrument (BD Biosciences) and FACS data processed using FlowJo software. Statistical analysis was performed using Prism software (GraphPad). The gating strategy for the phenotype analysis is provided in supplementary Figure 1.

In vitro co-cultivation assays

CAR T cells were cultured together with their tumor target cells at a 1:5 E:T ratio without cytokines or with the addition of IL-2 or IL-21. Ramos cells were used for CAR19 and LNCaP cells for PSMA CAR. The CAR T cells were restimulated with cells two to three times every 3–4 days depending on the experiment. To restimulate CAR T cells with BM fragments, a BM specimen obtained by trephine biopsy was cut with a blade into several pieces approximately 2 mm in size. BM fragments were cultured in a suspension of CAR19 T cells (1 million/mL) for 24 h and then gently washed with fresh media and cultured for 12 days in media without cytokines. Microscopic images of GFP+ cells were taken during the culture using a confocal microscope to assess infiltration of the BM. At the end of the experiments, BM fragments were washed with media and dissociated by pipetting and then used for functional assays and FACS analysis. The differences between groups were analyzed by a two-tailed unpaired *t*-test using Prism software (GraphPad).

In vivo experiments and statistical analysis

In vivo studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Immunodeficient NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, or NSG, mice (Jackson Laboratory) were maintained in individually ventilated cages under specific pathogen-free conditions. Groups of five or six mice aged 6–12 weeks and of the same sex were injected subcutaneously with 5×10^6 Ramos B cells. After 12 days, when large macroscopic tumors had formed, the mice

received one intravenous dose of 5×10^6 CAR T cells. Both CAR19 NFAT IL-21 and control CAR19 T cells were grown in IL-4, IL-7 and IL-21. After another 18 days, the mice were killed, tumors excised and weighed and tumor tissues mechanically dissociated by pipetting and analyzed by flow cytometry for the presence of human CD4 and CD8 T cells. The differences between groups were analyzed by a two-tailed unpaired *t*-test. Mice were also analyzed by one-way analysis of variance with Dunnett's multiple comparison post-test using Prism software (GraphPad). All animal work was performed under approved ethical guidelines.

Results

To characterize the prepared cells, the authors determined the percentage of CAR19 T cells with early memory phenotype or a stem cell memory-like (Tscm-like) phenotype, characterized by expression of antigens CD45RA, CD62L, CD27 and CD28 [7]. The data in Figure 1A show that the majority of CAR19 T cells cultivated in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21 were mostly of the early memory phenotype. Both cultivation methods produced CAR19 T cells with an activated phenotype, as the authors detected upregulation of antigen CD95 (Figure 1F). The expansion of CAR19 T cells did not require anti-CD3/CD28 stimulation because the transduced T cells were activated by B cells, which were present in the mixture of electroporated PBMCs. Omitting anti-CD3/CD28 activation enabled selective expansion of the modified T cells, yielding >90% CAR+ T cells [6], and did not significantly influence the phenotype of CAR19 T cells. By contrast, cultivation in the presence of IL-2 plus activation with anti-CD3/CD28 antibodies yielded a population with a very low number of Tscm-like CAR19 T cells (Figure 1A).

CAR19 T cells grown in IL-4, IL-7 and IL-21 had significantly better viability than CAR19 T cells grown in the presence of IL-2 with anti-CD3/CD28 after anti-genic restimulation with Ramos B cells (Figure 1B). The addition of IL-2 or IL-21 during co-cultivation with Ramos B cells improved their expansion, but the effects of IL-21 were stronger (Figure 1C). The authors noted minimal expansion of CAR19 T cells grown in the presence of IL-2 with anti-CD3/CD28 in the absence of exogenously added cytokines. Subsequently, the authors determined the memory phenotype (Figure 1D) and expression of exhaustion marker PD-1 (Figure 1E) on CAR19 T cells after restimulation with Ramos B cells. The addition of IL-21 maintained the Tscm-like phenotype of proliferating cells, whereas the addition of IL-2 induced the expansion of more differentiated CAR19 T cells expressing high levels of PD-1 compared with non-restimulated CAR19 T cells (Figure 1E). These results suggest that IL-21 promotes not only the expansion of CAR19 T cells but also the maintenance of early memory phenotype and improves their survival after anti-genic restimulation with tumor cells.

In the next experiment, the authors sorted CD8+ CAR19 T cells expressing CD62L+ and CD45RA+ (Figure 2A) and restimulated them twice with Ramos B cells in the presence of IL-2 or IL-21. Similar to previous experiments, the addition of IL-21 significantly enhanced expansion more than the addition of IL-2 (Figure 2B), and the CAR19 T cells restimulated in the presence of IL-21 retained their immature phenotype (>90% of cells were CD27+CD28+CD62L+) (Figure 2C). By contrast, the addition of IL-2 during restimulation resulted in a significant loss of expression of CD62L, CD27 and CD28, indicating that although IL-2 promotes the expansion of CAR19 T cells, it induces their differentiation toward effector CD8+ T cells.

Next, the authors assessed the effects of IL-21 on CAR19 T cells grown in the presence of IL-2 and vice versa. Unsorted CAR19 T cells grown in the presence of IL-2 with anti-CD3/CD28 were co-cultured with Ramos B cells in the presence of IL-21, and CAR19 T cells grown in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21 were co-cultured with Ramos B cells in the presence of IL-2 (Figure 2D). IL-21 enhanced the expansion of Tscm-like CAR T cells during co-culture, but the upregulation

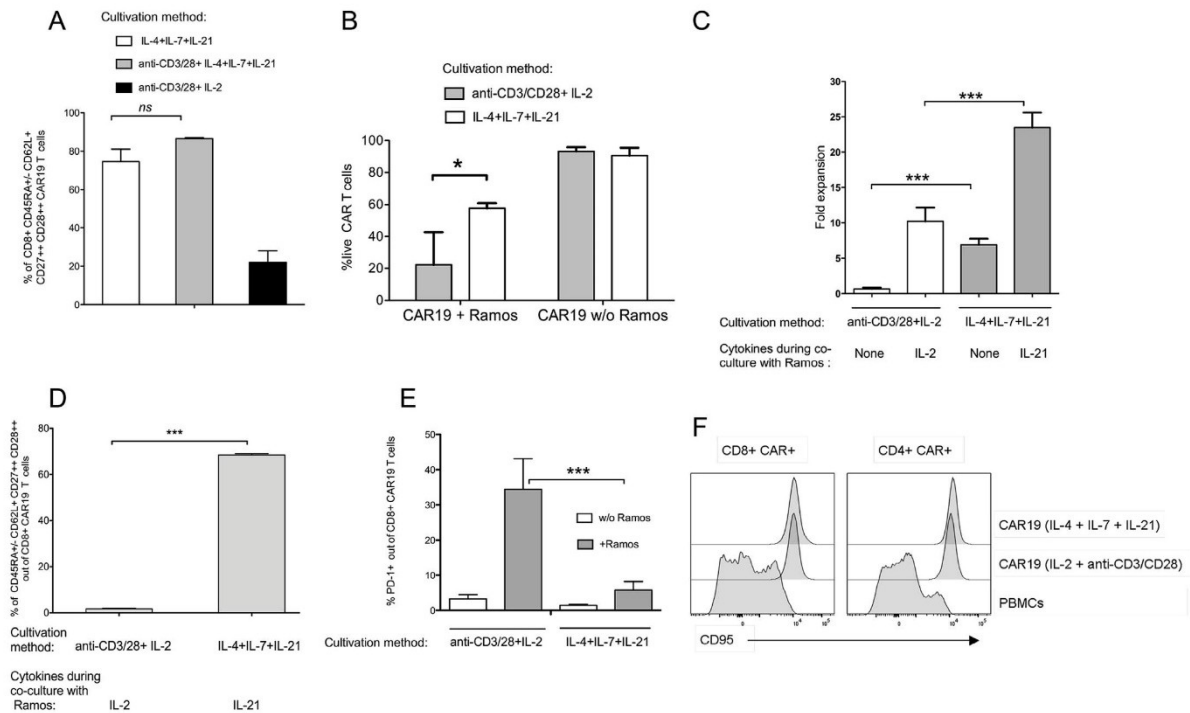


Figure 1. IL-21 promotes expansion of CAR19 T cells and maintenance of early memory phenotype after anti-genic restimulation. (A) Percentage of Tscm-like (CD45RA+/-CD62L+CD27+CD28++) CAR19 T cells in the product obtained by cultivating in a mixture of IL-4, IL-7 and IL-21 or a mixture of IL-4, IL-7 and IL-21 plus activation with anti-CD3/28 antibodies or CAR19 T cells manufactured by cultivation in IL-2 activated with anti-CD3/28 antibodies. (B) Percentage of viable (non-apoptotic) CAR T cells after co-cultivation with Ramos cells for 5 days. No exogenous cytokines were added to the cells in this experiment. The viability was determined with fluorescent caspase-3/7 substrate and a DNA dye (DAPI). (C) The fold expansion after two rounds of restimulation with Ramos cells in the presence or absence of IL-2 or IL-21. (D) Percentage of Tscm-like CD8+ CAR T cells after two rounds of restimulation with Ramos cells in the presence of IL-2 or IL-21. (E) Percentage of PD-1+CD8+ CAR T cells after two rounds of restimulation with Ramos cells in the presence or absence of IL-2 or IL-21. The white bar shows the expression of PD-1 on the product without restimulation with Ramos cells. N = 3; error bars indicate SEM. Significance was determined by unpaired *t*-test. (F) Histogram of the expression of CD95 on non-co-cultivated CD4+ and CD8+ CAR T cells in one representative donor compared with CD4+ and CD8+ T cells from a healthy donor. ns (not significant) $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ns, not significant; SEM, standard error of the mean; w/o, without.

of PD-1 depended on the presence of IL-2. If IL-2 was added during the co-culture of CAR T cells prepared in IL-4+IL-7+IL-21, it induced the downregulation of CD62L, CD27 and CD28 but did not induce the upregulation of PD-1 (Figure 2D, middle panel). By contrast, the addition of IL-21 during the co-culture of CAR T cells prepared in IL-2 did not prevent upregulation of PD-1 but enabled expansion and maintenance of the early memory phenotype (CD62L+CD27+CD28+) (Figure 2D, bottom panel). Thus, the upregulation of PD-1 depends on previous exposure of CAR T cells to IL-2.

The authors decided to investigate whether the effects of IL-21 were also observed using CAR T cells targeting tumor cells of non-hematological origin. The authors tested CAR T cells specific for antigen PSMA, which specifically recognizes the LNCaP carcinoma cell line. The PSMA CAR construct contains a myc-tag epitope between scFv and a transmembrane domain, and activation of transduced T cells with immobilized myc-tag-specific antibody (clone 9E10) leads to selective expansion of PSMA CAR T cells. Total T-cell expansion was equal regardless of whether cells were activated via anti-myc antibody or anti-CD3/CD28 antibodies or whether IL-2 or a cocktail of IL-4, IL-7 and IL-21 was used during *in vitro* culture (Figure 3A). However, anti-myc activation produced >90% CAR+ cells, whereas polyclonal activation with anti-CD3/CD28 antibodies produced only about 15% CAR+ T cells (Figure 3C). The phenotype of PSMA CAR T cells also depended on the cytokines used for the expansion, as the authors have shown in previous experiments [6]. Cultivation in IL-2 yielded approximately 5% Tscm-like CD8+ PSMA CAR T cells (CD45RA

+/-CD62L+CD27+CD28++), whereas cultivation in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21 yielded approximately 60–70% Tscm-like PSMA CAR T cells after anti-myc activation and approximately 85% Tscm-like CD8+ PSMA CAR T cells after anti-CD3/CD28 activation (Figure 3B). The authors noted a slightly higher number of Tscm-like cells after anti-CD3/CD28 activation in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21, similar to what was observed with CAR19 T cells (Figure 1A).

Next, the authors hypothesized that IL-21 may enable the expansion of Tscm-like PSMA CAR T cells after restimulation with LNCaP cells, similar to what has been observed in previous experiments. Instead of using PSMA CAR T cells expanded in IL-4, IL-7 and IL-21, the authors tested whether the small number of Tscm-like cells detected after expansion in IL-2+ anti-myc (Figure 3B) could be “rescued” by IL-21. Thus, the authors determined the phenotype (Figure 3D) and level of expansion (Figure 3E) of PSMA CAR T cells (prepared in IL-2) after two rounds of restimulation with LNCaP in the presence of IL-21 or IL-2 or without any exogenous cytokines. PSMA CAR T cells expanded roughly 2.5 times more in the presence of IL-21 than in the presence of IL-2 (Figure 3E), whereas no expansion was observed in the absence of exogenous cytokines; therefore, it was not possible to reliably determine the phenotype of remaining cells. FACS analysis showed (Figure 3D) that CD8+ PSMA CAR T cells expanded in the presence of IL-2 were late-stage T cells, the majority of which were Temra (CD62L-CD45RA+CD27-CD28-) cells. By contrast, co-cultivation in the presence of IL-21 led to a stronger expansion of PSMA CAR T cells, and a significant proportion of

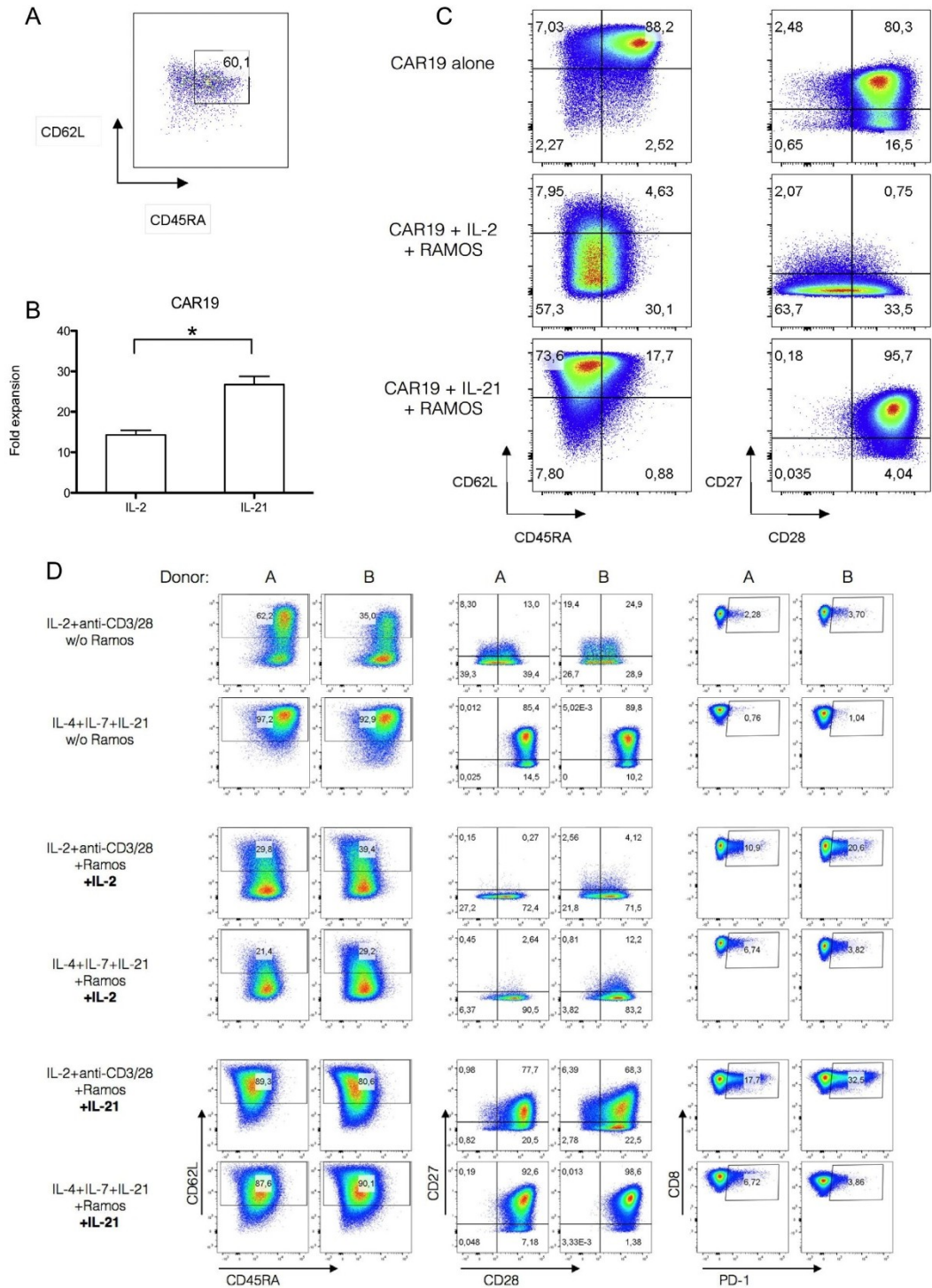


Figure 2. IL-2 supports proliferation of CAR19 T cells but does not promote maintenance of early memory phenotype. (A) CAR19 T cells cultivated in IL-4, IL-7 and IL-21 were sorted by FACS to isolate early memory T cells (CD62L⁺CD45RA⁺) and then restimulated with Ramos B cells in the presence of exogenous IL-2 or IL-21 or left in media with cytokines without Ramos cells. After 7 days, CAR19 T cells were counted and their developmental status determined by FACS. (B) Fold expansion of sorted CAR19 T cells after co-cultivation with Ramos cells in the presence of IL-2 or IL-21. N = 2; error bars indicate SEM. Significance was determined by unpaired *t*-test. (C) Dot plot showing the phenotype of CD8⁺ CAR19 T cells after restimulation for one representative donor out of two. Both donors had almost identical results. (D) CAR19 T cells were obtained by cultivation in a mixture of IL-4, IL-7 and IL-

these expanded cells were CD62L+CD28+; some were also positive for CD27. Notably, the initial population contained very low numbers of Tscm-like CD8+ T cells because PSMA CAR T cells were cultured in IL-2.

Next, the authors analyzed the sensitivity of differently expanded PSMA CAR T cells to apoptosis after restimulation with LNCaP cells (Figure 3F). Apoptotic cells were identified by staining cells with a fluorescent caspase-3/7 substrate after 1 day, 2 days or 3 days of restimulation. The data show that the least sensitive cells to apoptosis were PSMA CAR T cells expanded in IL-4, IL-7 and IL-21 and restimulated with LNCaP cells in the presence of exogenous IL-21. Thus, PSMA CAR T cells with Tscm-like phenotype are significantly more resistant to AICD than the more differentiated cells, and exogenous IL-21 can improve their survival. These findings are in agreement with similar data presented in Figure 1B,C.

As the authors' data suggested a positive effect of IL-21 on the viability and expansion of CAR T cells, CAR T cells were engineered to secrete IL-21 after T-cell activation using an NFAT-regulated artificial promoter [3] to drive the expression of IL-21. In T cells, the antigen receptor stimulation activates the Ca²⁺-calmodulin pathway, resulting in dephosphorylation of NFAT family transcription factors via phosphatase calcineurin, inducing them to translocate to the nucleus, where they bind NFAT response elements and modulate gene expression [15]. Artificial promoters containing NFAT response elements activate transcription similar to endogenous NFAT promoters and are commonly used to regulate gene expression in an activation-dependent manner [3]. The promoter DNA sequence is provided in supplementary Figure 1C,D.

To characterize the functionality of the NFAT IL-21 gene, the authors determined the production of IL-21 by CAR19 NFAT IL-21 T cells after activation via anti-CD3 antibody or Ramos B cells (Figure 4A). IL-21 was produced after anti-CD3 activation and at lower amounts after activation with Ramos cells. The functionality of PSMA CAR NFAT IL-21 T cells was similarly verified by measuring the production of IL-21 after activation (data not shown). To determine whether transgenic production of IL-21 enhances the expansion of CAR T cells, the authors prepared GFP-labeled CAR19 T cells and restimulated them with Ramos cells in a soft agar matrix. The growth of the CAR19 T cells was then monitored under a fluorescent microscope by measuring the size of proliferating cell clusters. The images in Figure 4B show an example of representative GFP+ clusters after 7 days. Estimation of the cell number per cluster shows that the majority of clusters in the CAR19 NFAT IL-21 sample were composed of more than five cells, whereas the clusters in the CAR19 T cell sample were small, with one or two cells per cluster (Figure 4C). The authors performed a similar experiment with GFP-labeled PSMA CAR NFAT IL-21 T cells (see supplementary Figure 2A,B), which similarly showed that expansion was stimulated by endogenously secreted IL-21.

Next, the authors determined the effect of induced IL-21 secretion on the phenotype of CAR19 T cells after restimulation with Ramos B cells (Figure 4D). FACS analysis showed that majority of CAR19 NFAT IL-21 T cells were CD62L+CD27++CD28++ compared with non-armed CAR19 T cells (~56% versus 13%). Repeated anti-genic restimulation may result in inhibition of effector functions; therefore, the authors tested the functionality of co-cultivated CAR19 NFAT IL21 cells via degranulation assay (see supplementary Figure 3B). This experiment revealed that CAR19 NFAT-21 cells were functional. In addition, the authors tested the production of pro-inflammatory cytokines by CAR19 NFAT IL-21 T cells and non-armed CAR19 T cells before and

after co-cultivation with Ramos cells using a Bio-Plex assay (see supplementary Figure 4). These results indicate that CAR19 NFAT IL-21 remained functional and retained the ability to secrete pro-inflammatory cytokines upon repeated anti-genic challenge. Thus, the authors demonstrated that induced secretion of IL-21 is biologically active and enhances the expansion of functional early memory CAR T cells.

Next, the authors determined whether CAR19 NFAT IL-21 T cells have enhanced anti-tumor functions using NSG mice transplanted with Ramos B cells (Figure 5A). Transgenic expression of IL-21 enhanced the anti-tumor activity of CAR19 NFAT IL-21 cells (Figure 5B) and significantly enhanced the infiltration of tumors by CD8+ CAR19 NFAT IL-21 (Figure 5D) compared with non-armed CAR19 T cells. The infiltration by CD4+ CAR T cells was approximately 10-fold lower than the infiltration by CD8+ CAR T cells (Figure 5C,E). Analysis of the immunophenotype of T cells recovered from tumors revealed that CAR19 NFAT IL-21 maintained the early memory phenotype (see supplementary Figure 5). These results further demonstrate the enhancement of CAR T-cell functions by induced secretion of IL-21.

The authors' next goal was to try to assess CAR19 NFAT IL-21 T-cell functions in a more physiological manner against directly isolated malignant human B cells. The microscopy images in Figure 6A show the representative samples after 3 days and 10 days of cultivation. The graph in Figure 6B shows the percentage of GFP+ cells in paired samples (the same PBMC donors tested against the same CLL patients). Both the microscopic images and the FACS results show that CAR19 NFAT IL-21 T cells infiltrated the BM to much higher levels than non-armed CAR19 T cells. The FACS analysis of cells recovered from BM fragments showed that induced secretion of IL-21 promoted maintenance of the Tscm-like phenotype (Figure 6C). However, no changes in the CD8:CD4 ratio between CAR19 and CAR19 NFAT IL-21 T cells were detected in these samples (Figure 6F). Interestingly, when testing the functionality of infiltrating CAR19 T cells in degranulation assays, the authors found that the non-armed CAR19 T cells had reduced degranulation, whereas CAR19 NFAT IL-21 T cells efficiently degranulated after challenge with Ramos cells (Figure 6E). In addition, the cytotoxic test against Ramos cells revealed that NFAT IL-21 CAR T cells recovered from BM fragments were functional (Figure 6D), similar to control CAR19 NFAT IL-21 T cells cultivated in media without BM fragments. To further demonstrate the ability of IL-21 to counteract the immunosuppressive effects of CLL cells, the authors determined the production of interferon gamma by CAR T cells co-cultured with CLL cells. CAR19 NFAT IL-21 T cells produced significantly more interferon gamma than CAR19 T cells not armed with IL-21 after anti-genic restimulation (0% versus 53%) (Figure 6G). The basis of this inhibition is not yet known, but the suppressed CAR19 T cells did not express inhibitory receptors PD-1, TIM-3 or LAG-3, and they were not senescent, as they did not express CD57 (data not shown). These data suggest that IL-21 enhances the activity of CAR19 T cells against CLL by stimulating their proliferation.

In conclusion, the data show that IL-21 augments the anti-tumor functions of CAR T cells via modification of their memory differentiation. IL-21 promotes maintenance of the early memory phenotype (CD62L+CD27++CD28++PD-1-) after anti-genic restimulation, which supports the survival and expansion of functional CAR T cells. These findings suggest that arming CAR T cells with inducible secretion of IL-21 could be a reasonable strategy for boosting the effectiveness of CAR T cell-mediated therapies.

21 or in IL-2 plus activation with anti-CD3/28 antibodies. The dot plots show the memory phenotype and expression of PD-1 antigen by CD8+ CAR19 T cells before co-culture with Ramos B cells (top two rows), after co-culture with Ramos B cells in the presence of IL-2 (middle two rows) or in the presence of IL-21 (bottom two rows). Two representative donors are shown. The experiment was repeated once with similar results. **P* < 0.05. SEM, standard error of the mean; w/o, without. (Color version of figure is available online).

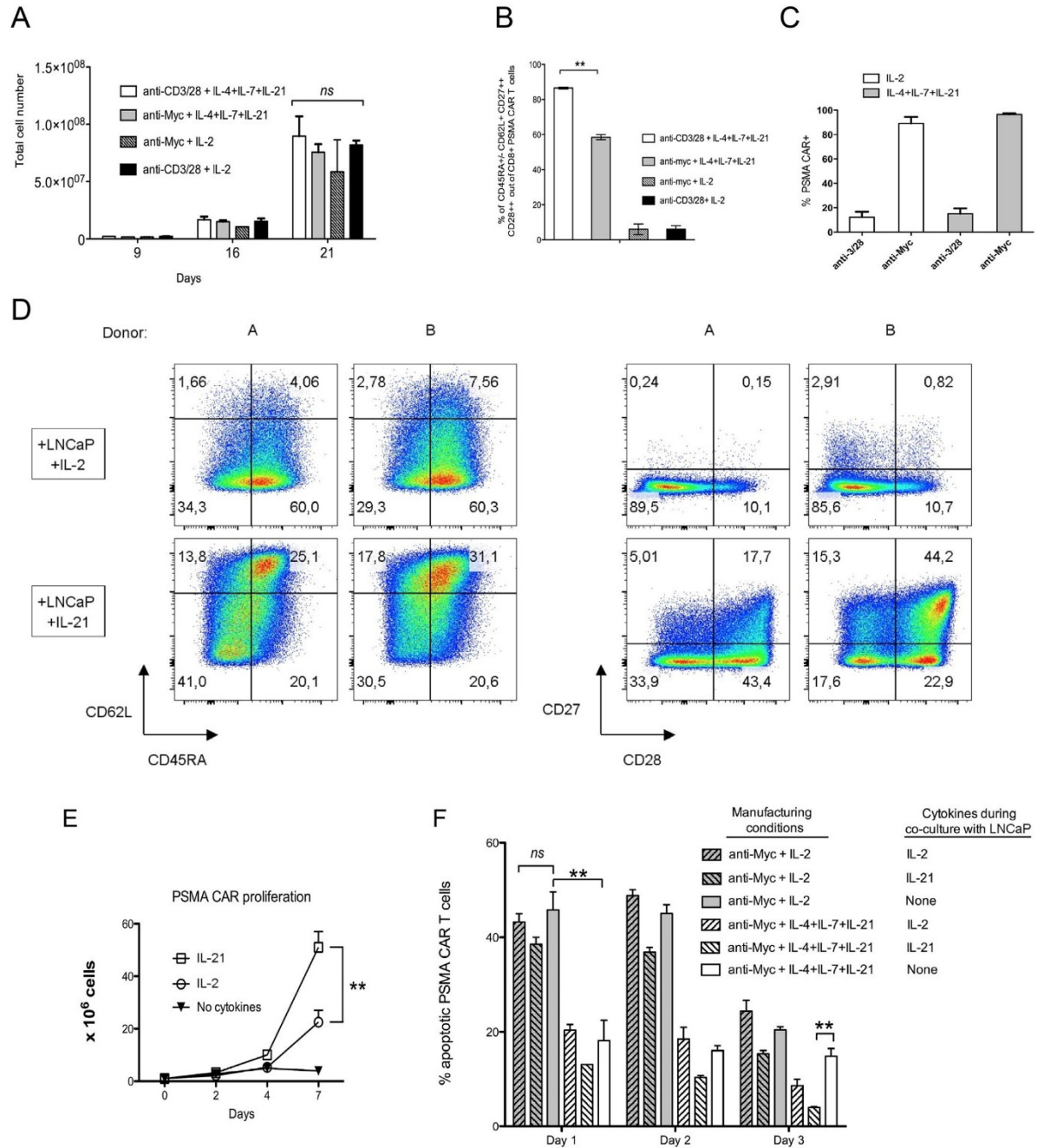


Figure 3. IL-21 enhances expansion of Tscm-like PSMA CAR T cells and reduces their apoptosis after anti-genic restimulation. (A–C) Characterization of manufactured PSMA CAR T cells. PBMCs were electroporated with DNA plasmids and activated with anti-CD3/CD28 antibodies or anti-Myc antibody, followed by expansion in the presence of IL-4, IL-7, IL-21 or IL-2. The expansion of all cells (A), percentage of CD8⁺ PSMA CAR T cells with Tscm-like phenotype after 21 days (B) and percentage of transduced T cells after 21 days (C) are shown. N = 3. (D) PSMA CAR T cells generated with anti-CD3/28 and IL-2 were co-cultured for 7 days with LNCaP cells in the presence of exogenous IL-2 or IL-21. Two representative donors are shown. The experiment was performed twice with similar outcomes. Importantly, PSMA CAR T cells before co-cultivation were manufactured in IL-2 and contained <10% Tscm-like T cells, as shown in (B). The image shows the memory phenotype. (E) Expansion of PSMA CAR T cells in the presence of IL-2 or IL-21 compared with PSMA CAR T cells co-cultivated with LNCaP without any exogenously added cytokines. N = 3; error bars indicate SEM. Significance was determined by unpaired *t*-test. (F) PSMA CAR T cells were manufactured under various indicated conditions and then restimulated with LNCaP cells in the presence of IL-2, IL-21 or no cytokines. The graph shows the percentage of apoptotic PSMA CAR T cells at the indicated time points. N = 3; error bars indicate SEM. Significance was determined by unpaired *t*-test. *ns* (not significant) $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$; SEM, standard error of the mean. (Color version of figure is available online).

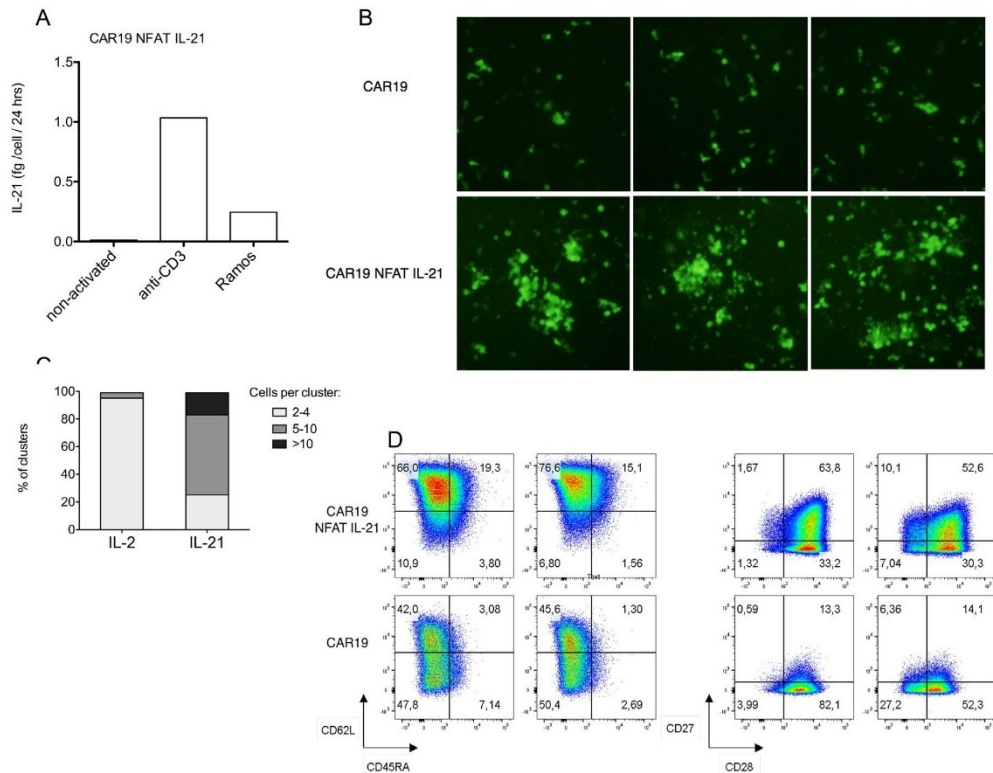


Figure 4. Inducible secretion of IL-21 stimulates the proliferation of CAR T cells after co-culture with tumor cells. (A) CAR19 T cells expressing IL-21 as a transgene under an artificial NFAT promoter produce IL-21 upon T-cell activation by anti-CD3 antibody or after co-cultivation with Ramos B cells. (B) CAR19 T cells and CAR19 NFAT IL-21 T cells were stably transduced with GFP-expressing transposon. CAR T cells were then co-incubated with Ramos B cells immobilized on the coverslip via polylysine and overlaid with soft agarose to immobilize cell clusters. After 7 days, the cell clusters were visualized by microscopy and their size determined by calculating the number of cells per cluster. The image shows examples of three areas containing the largest clusters. (C) The number of clusters containing two to four, five to 10 or more than 10 cells was calculated per bright field, and approximately 50 clusters were analyzed for each CAR19 construct. One representative donor is shown. The experiment was performed twice with similar results. (D) CAR19 T cells were restimulated twice at day 0 and day 4) with Ramos B cells to determine the effect of induced IL-21 on the phenotype of CAR19 T cells. The dot plots show the immunophenotype of CAR19 T cells or CAR19 NFAT IL-21 T cells at day 7. No exogenous cytokines were added to the cells in this experiment. Two representative donors are shown. The experiment was repeated twice with similar results. w/o, without. (Color version of figure is available online).

Discussion

Except for B-cell tumors treated with CD19 CAR T cells, a major limitation of current CAR T-cell approaches is insufficient expansion and persistence of infused T cells [11,16]. IL-21 has been shown to regulate T-cell homeostasis by promoting the proliferation and maintenance of the early memory phenotype of T cells. The rationale for the authors' study is to enhance CAR T-cell proliferation and utilize IL-21 as a growth-promoting cytokine to boost anti-tumor effects toward cancer cells that suppress the activity of CAR T cells.

The significance of the memory phenotype of CAR T cells in therapeutic efficiency is demonstrated by the results of recent clinical studies showing that an increased number of CAR T cells with a Tscm phenotype (CCR7+, CD62L+, CD27+, CD28+, CD45RA+ and PD-1-) correlates with greater persistence and expansion *in vivo* and better efficiency [8]. Various cytokine cocktails containing IL-2, IL-7, IL-15 and IL-21, or the addition of signaling pathway modulators, such as PI3K inhibitor or GSK3-beta inhibitor [7,17], have been shown to increase the number of Tscm CAR T cells during culture. By contrast, cultivation of CAR T cells in a high concentration of IL-2 promotes terminal memory differentiation of CAR T cells [18]. These findings led the authors to optimize the composition of the cytokine cocktail used during *in vitro* expansion, and it was found that a mixture of cytokines (i. e., IL-4, IL-7 and IL-21) enables efficient expansion of early memory CAR

T cells [6]. The authors also found that activation of transduced T cells with antigen (or anti-CAR antibody) instead of polyclonal activation with anti-CD3/CD28 antibodies selectively expands only the transduced T cells, yielding almost a pure population of CAR T cells. A similar approach has been described previously [19].

Because the authors used alternative methods of T-cell activation (via natural antigen or anti-CAR antibodies), as opposed to the commonly used anti-CD3/CD28 Dynabeads, the nature of CAR T-cell activation may influence their function and yield different results than activation via anti-CD3/CD28. The authors' data show that stimulation of PSMA CAR T cells via anti-myc or anti-CD3/CD28 antibodies produced functional CAR T cells with similar immunophenotypes and growth rates (Figure 3B,E). The authors did not detect any significant differences in regard to their cytotoxic functions, and similar findings were observed for CAR19 T cells (Figure 1). However, the authors found that CAR T cells cultivated in the presence of IL-2 performed poorly after antigenic restimulation compared with cells prepared in IL-4, IL-7 and IL-21, most likely because they had a more differentiated memory phenotype (Figures 1A, 3B).

Several published studies have shown similar effects of IL-21. For example, Singh *et al.*[20] showed that IL-21 enhances the development of less differentiated CAR T cells *in vitro*, but the effects were much weaker than those seen in the current study because Singh

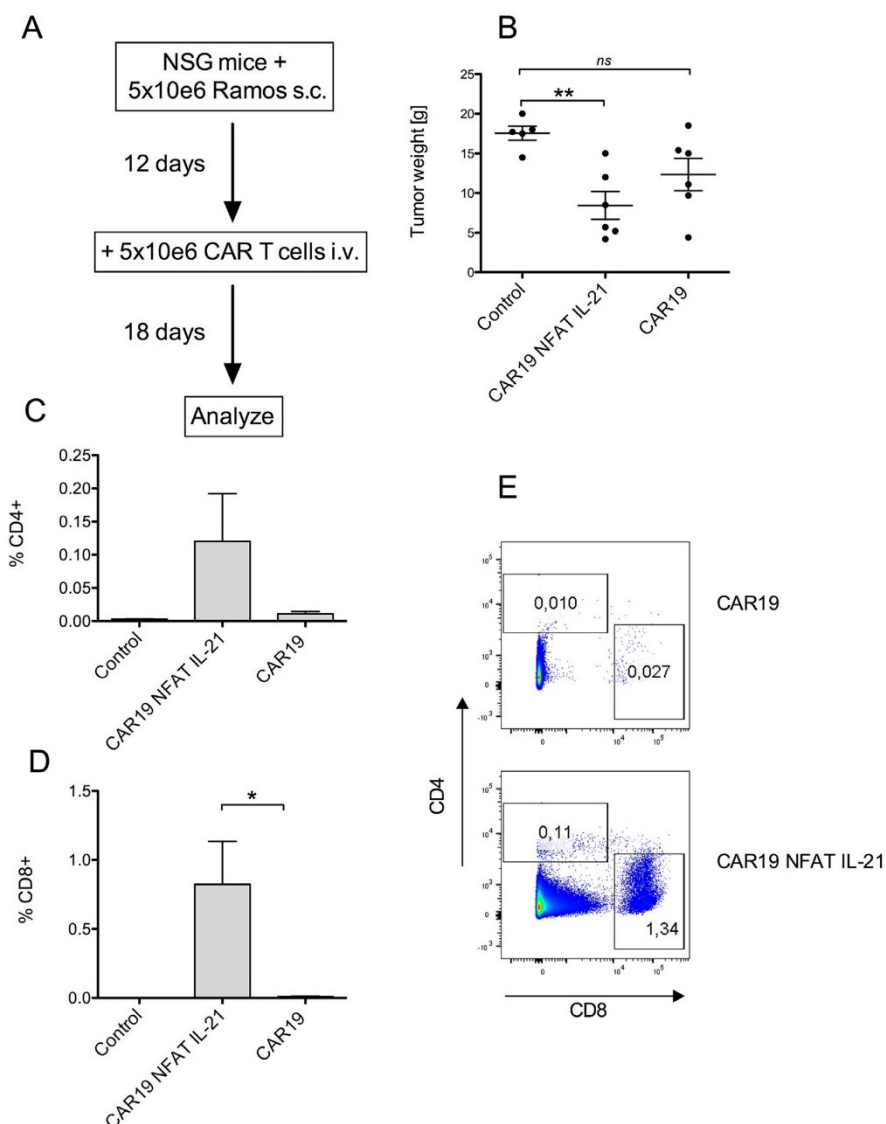


Figure 5. CAR19 T cells armed with IL-21 have enhanced anti-tumor efficacy *in vivo*. (A) Immunodeficient NSG mice were transplanted subcutaneously with 5 million Ramos cells. After 12 days, when macroscopic tumors had formed, mice received 5 million CAR T cells intravenously. (B) The treatment response was assessed by measuring the tumor weight at the end of the experiment and comparing it with a control group. N = 6; error bars indicate SEM. Significance was determined by unpaired *t*-test. (C–D) Level of infiltration of tumors by CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells. (E) Representative dot plot of tumors stained for CD4 and CD8. N = 6; error bars indicate SEM. Significance was determined by unpaired *t*-test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ns (not significant) *P* > 0.05 i.v., intravenously; s.c., subcutaneously; SEM, standard error of the mean. (Color version of figure is available online).

et al. cultured CAR T cells in IL-21 and IL-2, which may have had antagonistic effects. Furthermore, IL-2 and IL-21 have been shown to confer opposing differentiation programs on CD8⁺ T cells for adoptive immunotherapy, and IL-21 plays a key role in the development and maintenance of central memory T cells by inducing an early differentiation phenotype [5]. Markley *et al.* [21] found that CAR19 T cells co-expressing IL-21 have an enhanced anti-tumor effect in mice compared with CAR T cells co-expressing IL-2, but they accumulated very poorly *in vitro* upon repeated anti-genic stimulation. The major difference between this study and the authors' observations is that Markley *et al.* used CAR19 T cells with a CD28 zeta signaling motif that secreted IL-21 constitutively, whereas the authors' CAR T cells

contained the 4-1BB zeta signaling motif, and IL-21 was inducible after anti-genic stimulation.

The authors compared the effects of IL-2 and IL-21 on sorted CD8⁺ CAR19 T cells with the Tscm phenotype (CD45RA⁺CD62L⁺) after stimulation with CD19⁺ cells. IL-2 induced downregulation of CD62L, CD27 and CD28, which is consistent with their differentiation toward effector memory T cells. Conversely, IL-21 enabled their expansion, as well as maintenance of the Tscm phenotype, which suggests that IL-21 can block the transition from early to late memory subtypes.

Next, the authors hypothesized that the results of anti-genic stimulation of CAR T cells may depend on the phenotype and origin of the tumor cells. Therefore, several experiments were performed with PSMA CAR T cells challenged with LNCaP cells because this is a

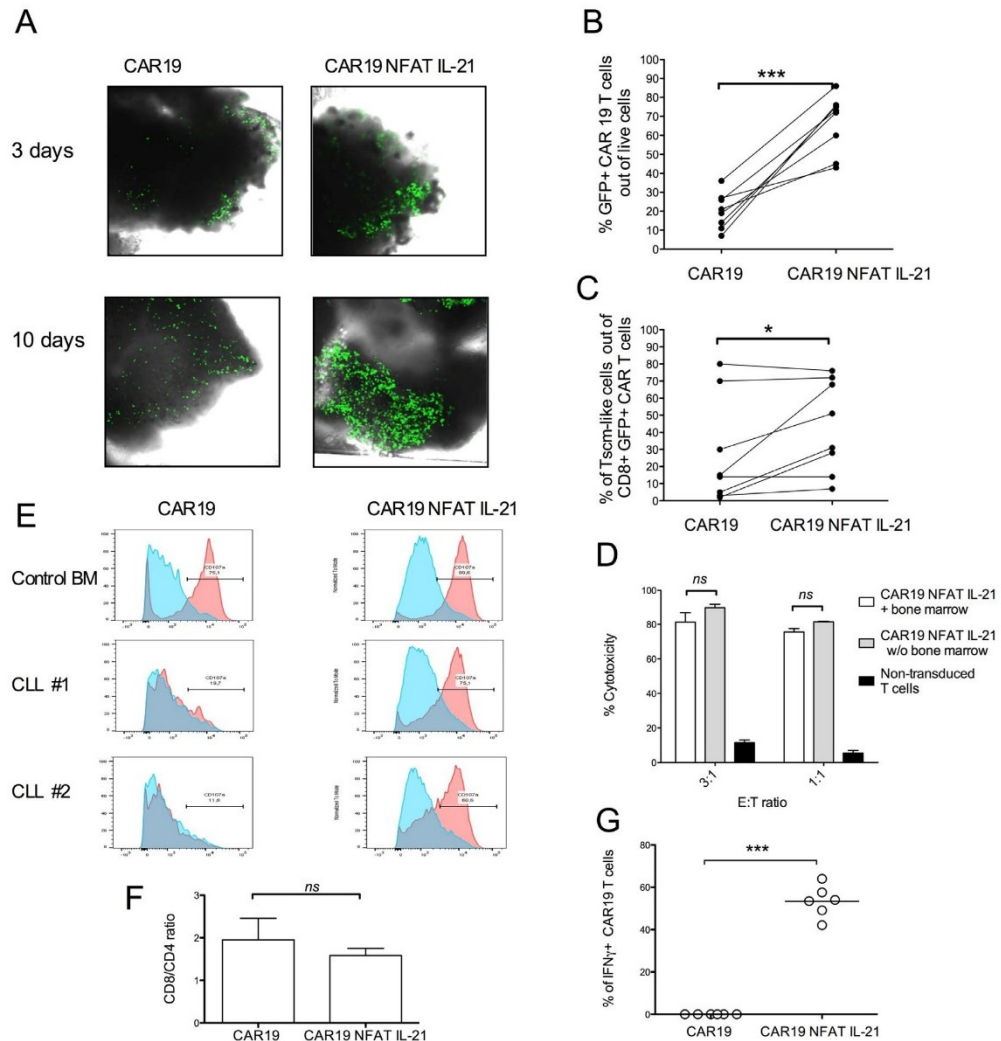


Figure 6. CAR19 T cells armed with IL-21 are resistant to immunosuppression induced by CLL cells. (A) GFP-expressing CAR19 T cells were co-cultivated with BM fragments obtained from CLL patients. The images show infiltration by GFP+ cells after 3 days and 10 days in one representative sample. The images are taken from different areas of the bone fragments $\times 200$ magnification. (B) The level of infiltration by GFP+ CAR T cells in each sample was analyzed by FACS. $N = 8$; error bars indicate SEM. Significance was determined by paired *t*-test. (C) Percentage of CD8+ CAR T cells with Tscm-like phenotype (CD45RA⁺/CD62L⁺CD27⁺CD28⁺). $N = 8$; error bars indicate SEM. Significance was determined by paired *t*-test. (D) Cytotoxicity of CAR T cells against Ramos cells and comparison of CAR T cells co-cultivated with BM to control CAR T cells grown *in vitro* in the presence of cytokines without BM. $N = 3$. (E) Histograms showing the level of degranulation of CAR T cells recovered from BM fragments after 10 days. Control BM is a sample obtained from an otherwise healthy patient without significant pathology in the BM. Red histograms indicate results after challenging with Ramos cells. Blue histograms represent non-challenged CAR T cells (negative control). This experiment was repeated once with similar results. (F) CD8:CD4 ratio among CAR19 T cells infiltrating BM fragments. $N = 8$. (G) CAR19 T cells were co-cultivated with CLL cells and analyzed for the production of IFN γ by cytokine capture assay after anti-genic restimulation with Ramos B cells. The graph shows the percentage of IFN γ + CAR19 T cells. $N = 6$; error bars indicate SEM. Significance was determined by paired *t*-test. *ns* (not significant) $P > 0.05$, * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$. IFN γ , interferon gamma; *ns*, not significant; SEM, standard error of the mean; w/o, without. (Color version of figure is available online).

common CAR T cell model [22]. Furthermore, LNCaP is an adherent carcinoma cell line that does not express any co-stimulatory molecules [23]. Gargett *et al.* [11] similarly studied GD2-specific CAR T cells co-cultured with GD2-positive neuroblastoma cells and observed significant AICD of CAR T cells after repeated antigen stimulation with tumor cells. Natural antigen-specific effector T cells are more prone to apoptosis than memory T cells because of elevated levels of caspase 3, which indicates that sensitivity to apoptosis after anti-genic stimulation differs among various T-cell memory subsets [21]. Accordingly, the authors found that PSMA CAR T cells with effector phenotype (i.e., cultivated in the presence of IL-2) were

significantly more sensitive to apoptosis after anti-genic restimulation than PSMA CAR T cells with a Tscm-like immunophenotype grown in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21 (Figure 3F). The beneficial effects of IL-21 on CAR T-cell survival and expansion are further demonstrated by the findings that CAR19 NFAT IL-21 T cells were superior to non-armed CAR19 T cells in NSG mice bearing established human lymphoma tumors.

The authors developed an *in vitro* model of CLL, which was selected mainly because of good availability of tumor tissues and because all patients with lymphocytosis in the blood have highly infiltrated BM. In addition, CLL is far more resistant to CAR19-based

therapies than B-ALL. Recent studies have shown that CLL cells can directly inhibit the proliferation and effector functions of CAR19 T cells [10] and initiate abortive activation of CAR T cells, resulting in very low proliferation upon *in vitro* restimulation with CLL cells [23]. However, the molecular mechanism has not been clearly determined and is currently being studied by several groups, including the authors'. This *in vitro* co-cultivation model using directly isolated human primary CLL cells is a useful biological model for studying CAR19 T-cell functions. The authors' opinion is that it may provide interesting data that are useful for better understanding tumor-induced immunosuppression of CAR T cells, especially when targeting solid tumors, which are mostly refractory to CAR T cells. Moreover, IL-21 potentiated the activity of CAR19 T cells against CLL B cells and significantly enhanced their expansion compared with non-armed CAR19 T cells. In conclusion, the authors' data suggest that arming CAR T cells with inducible IL-21 could be another possible strategy to counteract tolerance mechanisms by which tumor cells evade CAR T-cell therapies.

Funding

This work was supported by grants AZV NV15-34498A, Primus/MED/34, AZV NV19-08-00144, OPVVV 16_025/0007428 and NV19-08-00147.

Declaration of Competing Interest

The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

Author Contributions

Conception and design of the study: PO, JM, PK. Acquisition of data: MS, PP, MM. Analysis and interpretation of data: PO, MS. Drafting or revising the manuscript: PO, MS. All authors have approved the final article.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jcyt.2020.08.005.

References

- [1] Pegram HJ, Lee JC, Hayman EG, Imperato GH, Tedder TF, Sadelain M, et al. Tumor-targeted T cells modified to secrete IL-12 eradicate systemic tumors without need for prior conditioning. *Blood* 2012;119:4133–41.
- [2] Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 2010;24:1160–70.
- [3] Chmielewski M, Abken H. CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bet^{high} FoxO1^{low} Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep* 2017;21:3205–19.
- [4] Tian Y, Zajac AJ. IL-21 and T Cell Differentiation: Consider the Context. *Trends Immunol* 2016;37:557–68.
- [5] Hinrichs CS, Spolski R, Paulos CM, Gattinoni L, Kerstann KW, Palmer DC, et al. IL-2 and IL-21 confer opposing differentiation programs to CD8+ T cells for adoptive immunotherapy. *Blood* 2008;111:5326–33.
- [6] Ptáčková P, Musil J, Stach M, Lesný P, Němečková Š, Král V, et al. A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7 and IL-21. *Cytotherapy* 2018;20:507–20.
- [7] Sabatino M, Hu J, Sommariva M, Gautam S, Fellowes V, Hocker JD, et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8+ memory stem cells for the treatment of human B-cell malignancies. *Blood* 2016;128:519–28.
- [8] Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with *in vivo* expansion of CAR-CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood* 2014;123:3750–9.
- [9] Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:725–33.
- [10] Van Bruggen JAC, Martens AWJ, Fraietta JA, Hofland T, Tonino SH, Eldering E, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells impair mitochondrial fitness in CD8+ T cells and impede CAR T-cell efficacy. *Blood* 2019;134:44–58.
- [11] Gargett T, Yu W, Dotti G, Yvon ES, Christo SN, Hayball JD, et al. GD2-specific CAR T Cells Undergo Potent Activation and Deletion Following Antigen Encounter but can be Protected from Activation-induced Cell Death by PD-1 Blockade. *Mol Ther* 2016;24:1135–49.
- [12] Pulè MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther* 2005;12:933–41.
- [13] Otáhal P, Pruková D, Král V, Fabry M, Vočková P, Latečková L, et al. Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells. *Oncoimmunology* 2016;5:e1115940.
- [14] Yusa K, Zhou L, Li MA, Bradley A, Craig NL. A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:1531–6.
- [15] Smith-garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation n.d. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132706
- [16] Hege KM, Bergsland EK, Fisher GA, Nemunaitis JJ, Warren RS, McArthur JG, et al. Safety, tumor trafficking and immunogenicity of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells specific for TAG-72 in colorectal cancer. *J Immunother Cancer* 2017;5:22.
- [17] Perkins MR, Grande S, Hamel A, Horton HM, Garrett TE, Miller SM, et al. Manufacturing an enhanced car T cell product by inhibition of the PI3K/AKT pathway during T cell expansion results in improved *in vivo* efficacy of anti-BCMA car T cells. *Blood* 2015;126:1893.
- [18] Kaartinen T, Luostarinen A, Maliniemi P, Keto J, Arvas M, Belt H, et al. Low interleukin-2 concentration favors generation of early memory T cells over effector phenotypes during chimeric antigen receptor T-cell expansion. *Cytotherapy* 2017;19:689–702.
- [19] Ramanayake S, Bilton IAN, Bishop D, Dubosq M, Blyth E, Clancy L, et al. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy* 2015;17:1251–67.
- [20] Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Huls H, Olivares S, Switzer K, et al. Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res* 2011;71:3516–27.
- [21] Markley JC, Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood* 2010;115:3508–19.
- [22] Santoro SP, Kim S, Motz GT, Alatzoglou D, Li C, Irving M, et al. T cells bearing a chimeric antigen receptor against prostate-specific membrane antigen mediate vascular disruption and result in tumor regression. *Cancer Immunol Res* 2015;3:68–84.
- [23] Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983;43:1809–18.

11. PŘÍLOHY

Příloha č. 1 - Seznam plazmidů používaných v práci

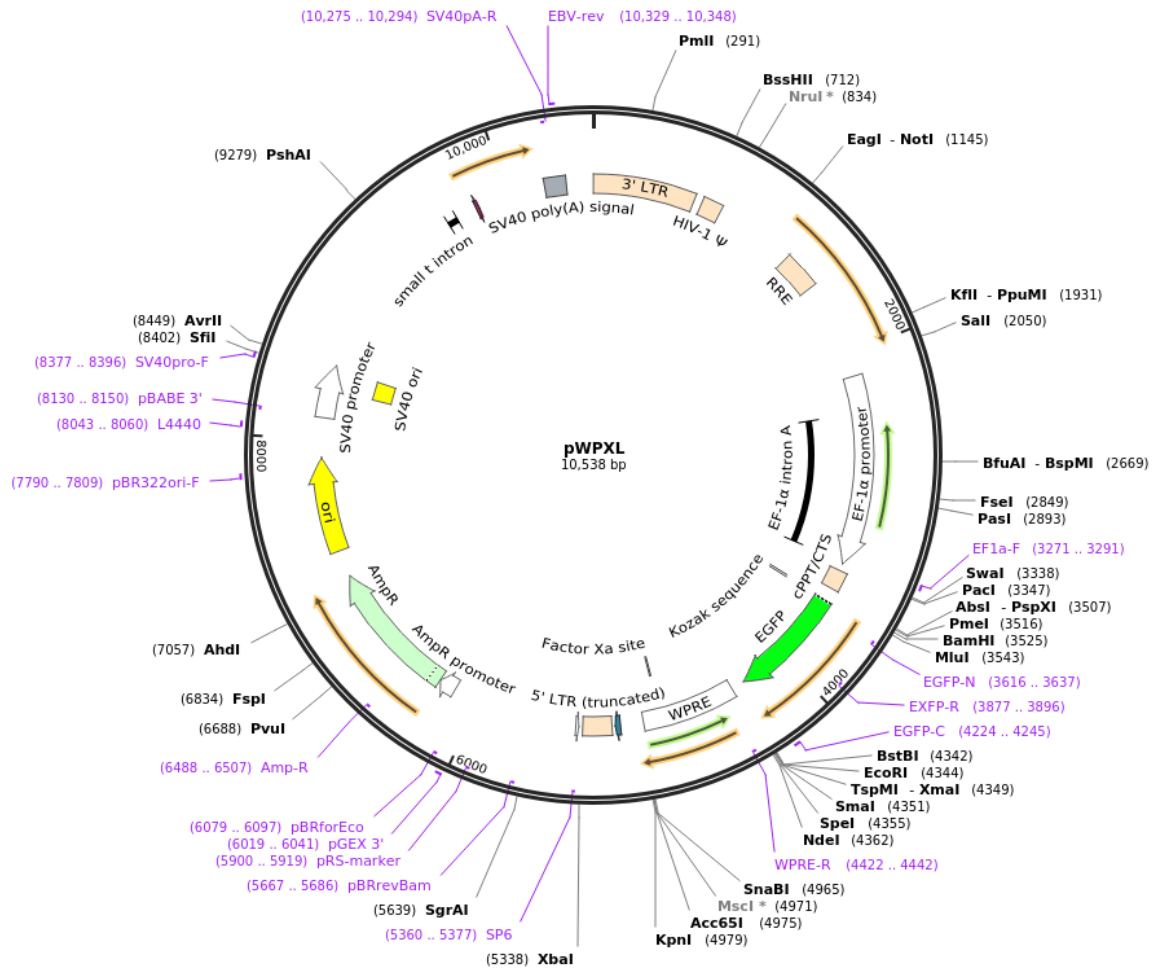
	Název vektoru	Zkrácený název používaný v textu	Protein, který kóduje	Typ	Zdroj/ Přípraven
1.	psPAX2		Obalový protein GAG, reverzní transkriptáza a integráza	LV pomocný	Addgene
2.	pmD2.G		Obalový protein VSV-G	LV pomocný	Addgene
3.	pWPXL³²		GFP	LV	Addgene
	<i>od něj odvozeny:</i>				
	pLV CD19	CAR19	anti-CD19 CAR	LV	[204]
	pLV CD20	CAR20	anti-CD20 CAR	LV	[204]
	pLV biCAR19-20	biCAR19-20	anti-CD19 a anti-CD20 tandemový CAR receptor	LV	dr.Šroller
	pLV biCAR20-19	biCAR20-19	anti-CD19 a anti-CD20 tandemový CAR receptor	LV	dr.Šroller
4.	PiggyBac Transposase	pBASE	Super-piggyBac transpozáza	PB pomocný	Hera Biolabs
5.	PiggyBac Transposon³³	pPB UBC	Prázdný klonovací vektor	PB	Hera Biolabs
	<i>od něj odvozeny:</i>				
5.1	PB19	CAR19	anti-CD19 CAR	PB	dr.Šroller, [205]
	<i>od něj dále odvozeny:</i>				
	pPB NFAT IL-21 CAR19	NFAT IL-21 CAR19	anti-CD19 CAR, IL-21	PB	nově zkonstruován
	pPB IL-21 NFAT CAR19	IL-21 NFAT CAR19	anti-CD19 CAR, IL-21	PB	nově zkonstruován
	pPB CAR19 NFAT IL-21	CAR19 NFAT IL-21	anti-CD19 CAR, IL-21	PB	nově zkonstruován
	pPB CAR19 IL-21 NFAT	CAR19 IL-21 NFAT	anti-CD19 CAR, IL-21	PB	nově zkonstruován
	pubc19_T2A		anti-CD19 CAR, PD1 del, TIM3 del, TGFbRII	PB	dr. Pokorná
	pPB CAR19 T2A IL-21	CAR19 T2A IL-21	anti-CD19 CAR, IL-21	PB	nově zkonstruován
	pPB GFP		GFP	PB	dr. Pokorná
	pPB mCherry		OFp	PB	dr. Pokorná
	pPB CAR19 myc H98	CAR19 myc H98	anti-CD19 CAR	PB	Genescript
	pPB CAR19 myc H98 PH	CAR19 myc H98 PH	anti-CD19 CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB 12P CAR19 myc H98	12P CAR19 myc H98	anti-CD19 CAR	PB	nově zkonstruován
5.2	pPB-CLL	CLL-1 CAR myc	anti-CLL-1 CAR	PB	dr. Šroller, dr. Pokorná
	<i>od něj dále odvozeny:</i>				
	pPB CLL-1 CAR myc H98	CLL-1 CAR myc H98	anti-CLL-1 CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB CLL-1 CAR myc H98 FLAG	CLL-1 CAR myc H98 FLAG	anti-CLL-1 CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB CLL-1 CAR myc H98 CD34	CLL-1 CAR myc H98 CD34	anti-CLL-1 CAR	PB	nově zkonstruován
5.3	pPB PSMA CAR myc	PSMA CAR myc	anti-PSMA CAR	PB	[205]
	<i>od něj dále odvozeny:</i>				
	pPB NFAT IL-21 PSMA CAR	NFAT IL-21 PSMA CAR	anti-PSMA CAR, IL-21	PB	nově zkonstruován

³² Mapa vektoru je součástí přílohy č. 2

³³ Mapa vektoru je součástí přílohy č. 3

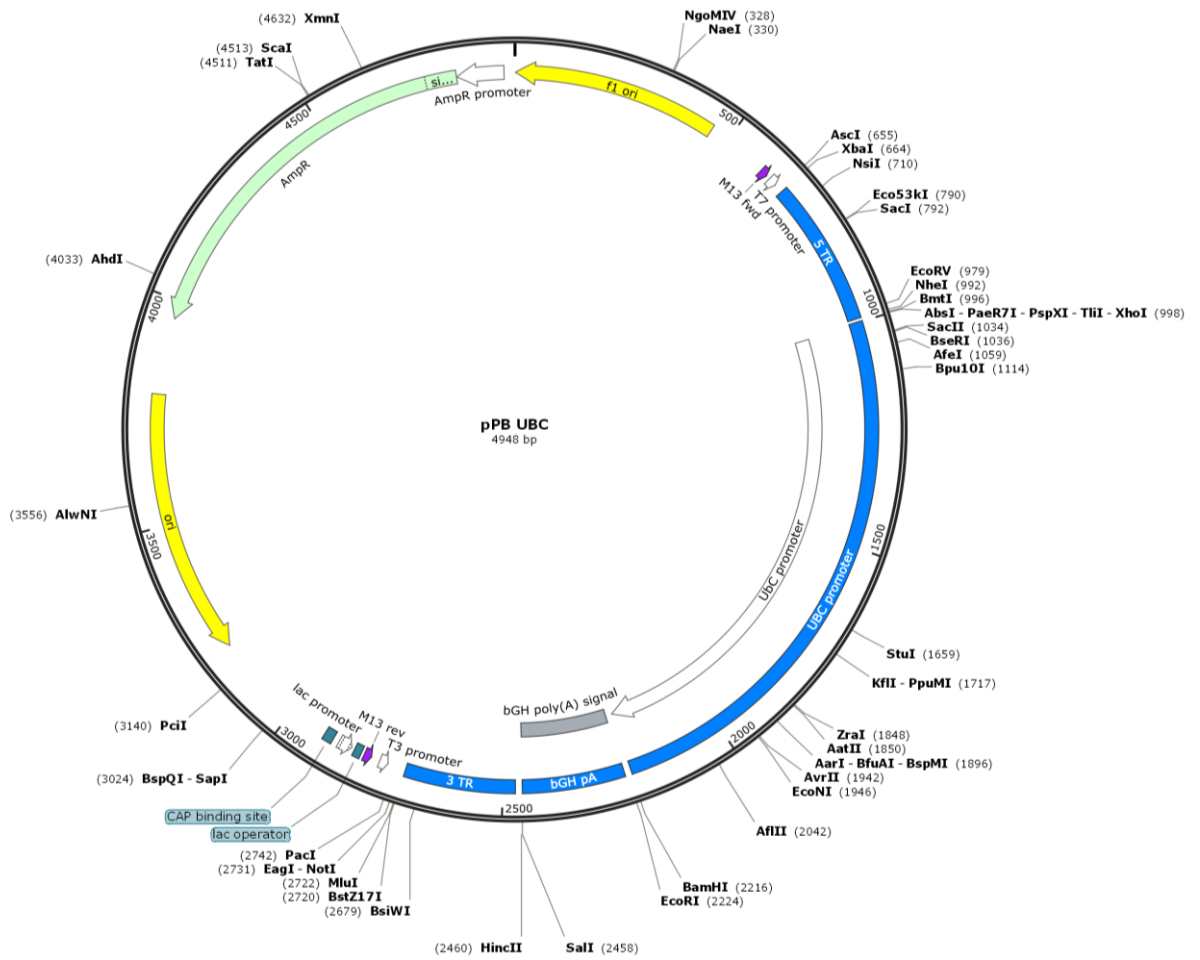
	pPB PSMA CAR myc H98	PSMA CAR myc H98	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc 12P	PSMA CAR myc 12P	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc D12	PSMA CAR myc D12	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc E72	PSMA CAR myc E72	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc CD25a mimotop	PSMA CAR myc CD25a mimotop	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc CD25a neoepitop	PSMA CAR myc CD25a neoepitop	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc CD25a mimotop	PSMA CAR myc CD25a mimotop	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc CD20 mimotop	PSMA CAR myc CD20 mimotop	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc CD25a epitop 2	PSMA CAR myc CD25a epitop 2	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc Rp5-L	PSMA CAR myc Rp5-L	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc H98 FLAG	PSMA CAR myc H98 FLAG	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc H98 3x FLAG	PSMA CAR myc H98 3x FLAG	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
	pPB PSMA CAR myc H98 CD34	PSMA CAR myc H98 CD34	anti-PSMA CAR	PB	nově zkonstruován
5.4	pPB GD2 CAR myc H98 CD34	GD2 CAR myc H98 CD34	anti-GD2 CAR	PB	nově zkonstruován
5.5	pPB CD19 BCMA biCAR myc H98 CD34	CD19 BCMA biCAR myc H98 CD34	anti-CD19 a anti-BCMA tandemový CAR receptor	PB	nově zkonstruován
5.6	pPB NFAT cytokiny		GFP, IL-12, IL-18, IL-21	PB	nově zkonstruován
6.	pCMV6-XL5-CD19		CD19	expresní	Origene
7.	pCMV-Neo-Bam-CD20		CD20	expresní	Addgene

Příloha č. 2 - Mapa vektoru pWPXL



- prázdný lentivirový vektor 2. generace určený pro přenos transgenů do buněk (firma Addgene)
- konstitutivní expresi zajišťuje promotor EF-1 alfa s vloženým intronem pro vysokou expresi a zajištění efektivnějšího transportu RNA z jádra
- jako tag je ve vektoru vložen gen pro zelený fluorescenční protein (GFP)

Příloha č. 3 - Mapa vektoru pPB UBC



- prázdný vektor pro přenos transgenů do buněk pomocí transpozonového systému PiggyBac (firma Hera Biolabs)

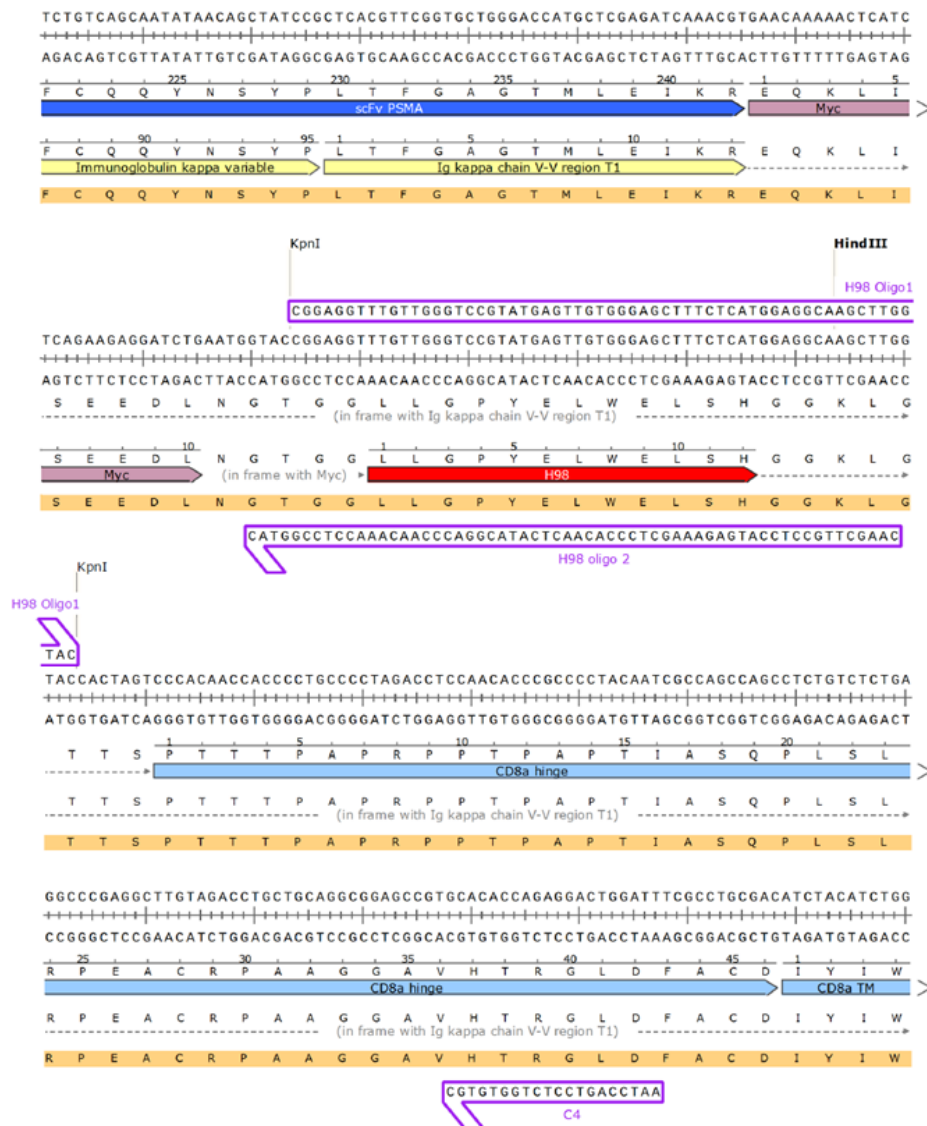
Příloha č. 4 – Nukleotidová sekvence NFAT-IL-21-SV40 polyA





- navržená nukleotidová sekvence pro syntetický promotor složený z 6-ti vazebných míst pro NFAT a minimálního promotoru pro IL-2, za kterým následuje gen pro IL-21 a terminační sekvence SV40 polyA
- sekvenci ohraničují krátké oddělovací sekvence, které byly převzaty z mapy plazmidu pTre-Tight-luciferase-HygR (firma Addgene)
- na obou koncích jsou vložena restriční místa pro NheI a SalI pro vyštěpení a vkládání do cílových vektorů
- sekvence byla nasyntetizována firmou Genewiz a vložena do klonovacího vektoru PUC57

Příloha č. 5 – Schéma vložení mimotopu H98 do CAR receptoru



- do původního vektoru PSMA CAR myc se do restrikčního místa KpnI vložil mimotop H98 pomocí dvou oligonukleotidů H98 oligo 1 a H98 oligo 2
- vnesením H98 ve vektoru vzniklo unikátní restrikční místo HindIII, které sloužilo pro ověření vložení H98 a v dalších krocích se do tohoto místa vkládaly další epitopy (CD34, FLAG)
- PCR pomocí primerů H98 oligo 1 a C4 sloužila k ověření počtu vložení H98
- sekvenace pomocí primeru C4 ověřila správnou orientaci vloženého H98

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

**Prohlášení zájemce o nahlédnutí
do závěrečné práce absolventa studijního programu
uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze**

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis