

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE CHIMERICKÝCH
ANTIGENNÍCH RECEPTORŮ**

Pavčina Ptáčková

Praha 2021

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze

Školitel: MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

1. Souhrn	3
2. Summary	4
3. Teoretický úvod	5
4. Cíle práce a výchozí hypotézy	7
5. Metodika	8
6. Výsledky a diskuze	9
7. Závěr	13
8. Publikace	14
9. Seznam použité literatury	14

1. Souhrn

Pozadí problematiky:

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

Předpoklady a cíle:

(i) Bispecifické CAR receptory, které exprimují dvě vazebné domény specifické pro dva různé antigeny, zabrání úniku maligních klonů. (ii) CAR receptory s 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 infiltrujících T-buněk v nádorových modelech nejen *in vitro*, ale i *in vivo*. CAR receptory s vloženými multi-epitopy představují slibnou strategii, jak zlepšit výrobní proces CAR-T buněk, tak i bezpečnostní pojistku při jejich klinickém použití.

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

2. 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*.

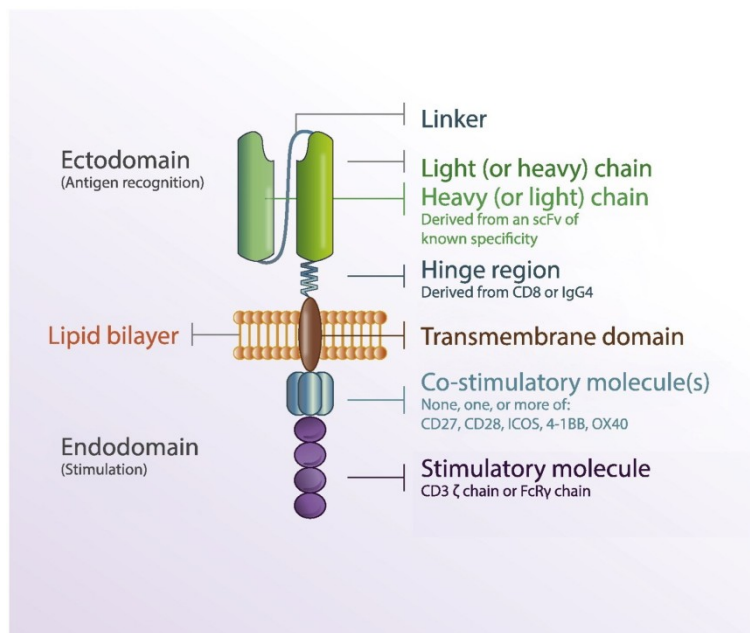
Conclusions:

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

3. Teoretický úvod

CAR-T buňky jsou lymfocyty modifikované syntetickými receptory, tzv. chimerickými antigenními receptory (CAR). Skládají se ze tří částí: ektodomény vázající antigen, který je tzv. spacerem spojen s transmembránovou doménou a endodoménou [1]. Ektodoména je nejčastěji tvořena jednořetězcovou variantou fragmentu (scFv) odvozené od protilátky a je zodpovědná za rozpoznání antigenu. Základem intracelulární domény je pak řetězec zeta molekuly CD3 T-buněk (CD3 ζ), která může být rozšířena o kostimulační domény z molekul 4-1BB nebo CD28 (**obr. 1**) [1]. T-buňky modifikované CAR receptorem pak rozeznávají cílovou buňku nezávisle na hlavním histokompatibilním komplexu molekul MHC. Lze připravit CAR receptory proti jakémukoliv antigenu na buněčném povrchu (proteiny, sacharidy, glykolipidy), proti kterému je k dispozici monoklonální protilátka.



Obr. 1: Struktura CAR receptoru. Obrázek převzat z publikace [2].

Akutní lymfoblastická leukemie je maligní klonální onemocnění krvetvorby vycházející z prekurzorových B-buněk (B-ALL). Relaps ALL postihne ve věkové skupině > 18 let až polovinu nemocných, a asi 5% pacientů má onemocnění primárně refrakterní na indukční léčbu [3]. 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 [3]. Pokud i tato terapie selže, poslední možností pro pacienty je terapie CAR-T buňkami namířenými proti antigenu CD19. S ní bylo v klinických studiích dosaženo velmi povzbudivých výsledků. V studii fáze I-IIa prováděné na dětské klinice ve Philadelphii bylo zahrnuto 60 dětí a mladých dospělých, u kterých po terapii CD19 CAR-T buňkami bylo dosaženo úplné remise u 93% pacientů. Následné čtyřleté sledování prokázalo významnou kontrolu nemoci bez další terapie [4]. Na základě těchto výsledků navazovala studie ELIANA (Novartis) 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 [5]. Výsledek této studie přispěl ke schválení FDA (Úřad pro kontrolu léčiv a potravin) v roce 2017 prvního CAR-T buněčného produktu tisagenlecleucel pro děti a mladé dospělé [6]. K letošnímu roku jsou schváleny další tři produkty pro léčbu hematologických malignit u dospělých (velkobuněčný B-lymfom, lymfom z pláštěvých buněk).

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 virové transdukce či elektroporací. Modifikované CAR-T buňky jsou *in vitro* pomnoženy na dostatečný počet a poté infuzí vráceny zpět pacientovi [7-9].

Ve srovnání s CD19 CAR-T terapií leukémií a lymfomů léčba solidních nádorů dosahuje malých klinických výsledků. Hlavními příčinami je mikroprostředí pevného nádoru, imunitní suprese CAR-T buněk, ale i fyziologické bariéry nádoru bránící infiltraci CAR-T buněk. Rovněž heterogenita nádorových antigenů přispívá k úniku nádorových buněk, ale i jejich nízká exprese na zdravých tkáních vede často k jejich napadení CAR-T buňkami [10]. Mezi další časté vedlejší účinky patří syndrom cytokinové bouře, kdy aktivované CAR-T buňky začnou proliferovat a uvolňovat řadu prozánětlivých cytokinů, které následně aktivují další

buňky imunitního systému [11, 12]. U většiny pacientů jsou příznaky mírné, ale mohou rychle přejít až do stavu ohrožení života [12].

Současný výzkum CAR-T buněk se proto zaměřuje na jejich „genetické přepracování“, aby se jejich protinádorová aktivita výrazně zvýšila, zlepšila se nejen jejich schopnost proliferace a odolnost vůči apoptóze, ale zejména jejich perzistence *in vivo*. Dalšími strategiemi je začlenění molekulárních mechanismů do CAR receptorů s cílem „deaktivovat“ podle potřeby T-lymfocyty a tím kontrolovat vedlejší účinky terapie. Důvodem je snaha o bezpečnost a dosažení léčebné odpovědi zejména v terapii pevných nádorů [13].

4. Cíle práce a výchozí 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 výraznělepší 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, snadné monitorování buněk, ale i snadnou depleci buněk *in vivo* v případě potřeby.

5. Metodika

Konstrukce CAR receptorů

Pro přípravu byly využity základní metody molekulární biologie. Při konstrukci nových vektorů se vycházelo ze stávajících plazmidů v laboratoři, do kterých pomocí restriktivního štěpení a následné ligace či metody „In-fusion“ klonování byly vkládány nové sekvence pro modifikaci a vylepšení funkce stávajících receptorů. Pozitivní bakteriální klony byly restriktivně ověřeny nebo byla DNA sekvenována.

Transdukce a elektroporace buněk

Plazmidy byly vnášeny do buněčných linií nebo primárních T-lymfocytů, které byly izolovány z periferní krve dárců. Pro přenos do buněk se využívala infekce pomocí lentivirů nebo elektroporace pomocí transpozonového systému PiggyBac. Buněčné linie byly po modifikaci plazmidy kultivovány za běžných podmínek. T-lymfocyty byly po transdukci/elektroporaci aktivovány stimulačními protilátkami a kultivovány v médiu s přidanými cytokiny.

Průtoková cytometrie

Analýzou na průtokovém cytometru byla ověřována zejména exprese CAR receptorů, ale i hodnoceny funkční testy, kdy se ověřovala cytolytická aktivita CAR-T lymfocytů, exprese aktivačního markeru CD69, intracelulární produkce cytokinů INF- γ a IL-21 a *in vitro* deplece CAR-T buněk.

Funkční testy

Pomocí metody ELISA byla sledovaná extracelulární produkce cytokinu INF- γ a IL-21, či pomocí komerčního kitu se sledovala aktivita laktát dehydrogenázy.

Pokusy na zvířatech

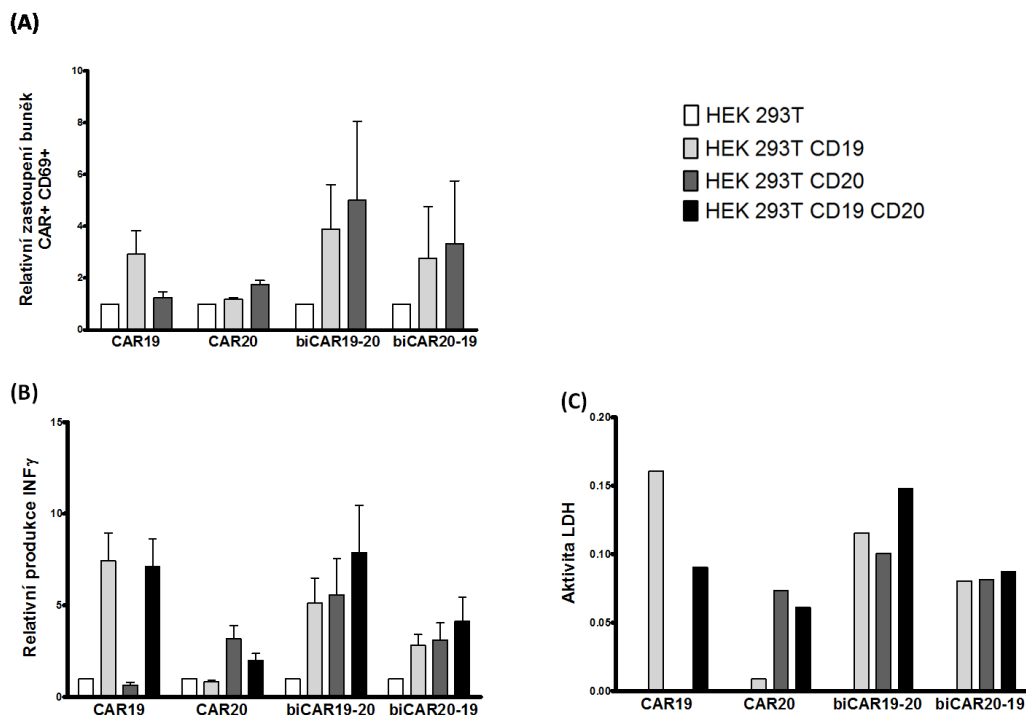
Imunodeficientním myším byly injektovány CAR-T lymfocyty následované dávkou protilátky trastuzumabu. Deplece CAR-T buněk byla monitorována v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie.

6. Výsledky a diskuze

Příprava bispecifických CAR receptorů

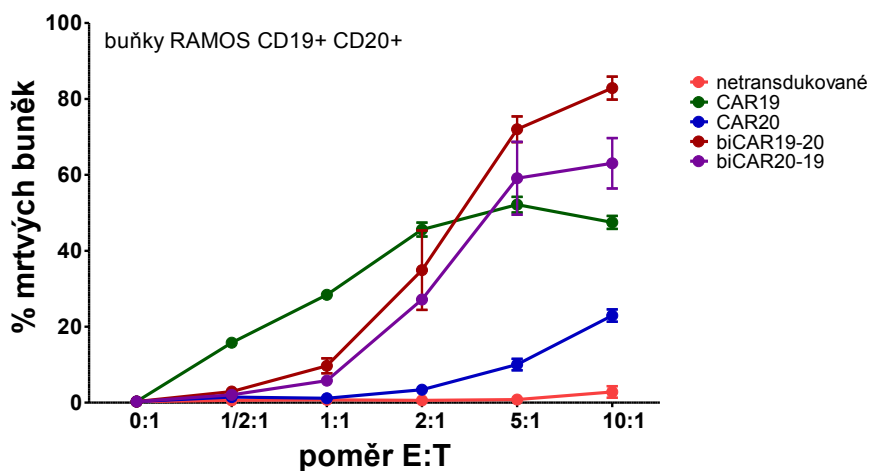
Adoptivní terapie pomocí CD19 CAR-T lymfocytů je účinnou terapií pro pacienty s B-ALL a B-buněčnými lymfomy, kteří nereagovali na konvenční léčbu nebo po ní zrelabovali. I přesto 30-60% pacientů po CD19 CAR-T terapii znovu relabuje, přičemž 10-20% relapsů je CD19 negativních. Možnosti další léčby jsou už omezené. Je tedy velkou snahou relapsům předejít, zejména těm CD19 negativním [14-16]. Jednou z možností je použití tandemových, čili bispecifických CAR receptorů specifických na dva různé antigeny [17]. Byly připraveny dva bispecifické receptory biCAR19-20 a biCAR20-19 v lentivirových vektorech. 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 [18]. Za druhé, molekula CD20 je exprimovaná na většině CD19 pozitivních ALL buňkách [19, 20]. Navíc se nepředpokládá, že by relaps onemocnění mohl být způsobem blasty, které by přestaly exprimovat oba antigeny najednou.

Byly připraveny lentivirové partikule, kterými byla infikována buněčná linie T-lymfocytů, Jurkat, s velmi vysokou účinností, téměř 100% u buněk infikovaných kontrolním proteinem GFP a účinností 50-70% u buněk infikovaných virem s bispecifickými CAR receptory. Stejným způsobem 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. Stejný efekt jsme pozorovali i u lymfocytů transdukovaných kontrolním GFP (40-50%) v porovnání s téměř 100% účinností u buněk Jurkat. Obecně platí, že řada buněčných linií je snadno a účinně transdukována pomocí lentivirů. Naproti tomu primární lidské T-buňky, zejména klidové, jsou vůči transdukci lentivirem odolnější [21]. 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 (**obr. 2**) a cytotoxická aktivita CAR-T lymfocytů (**obr. 3**) po kultivaci s nádorovými buňkami CD19+ CD20+. Všechny provedené pokusy potvrdily funkčnost bispecifických CAR receptorů. CAR-T lymfocyty měly stejnou nebo zvýšenou odpověď v porovnání s monospecifickými CAR-T buňkami. Získané výsledky naznačují, že z dvojice by lépe mohl fungovat biCAR19-20.



Obr. 2: Aktivace a cytotoxicita mono- a bispecifických CAR-T lymfocytů

- (A) Expresa 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 terčovách 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).



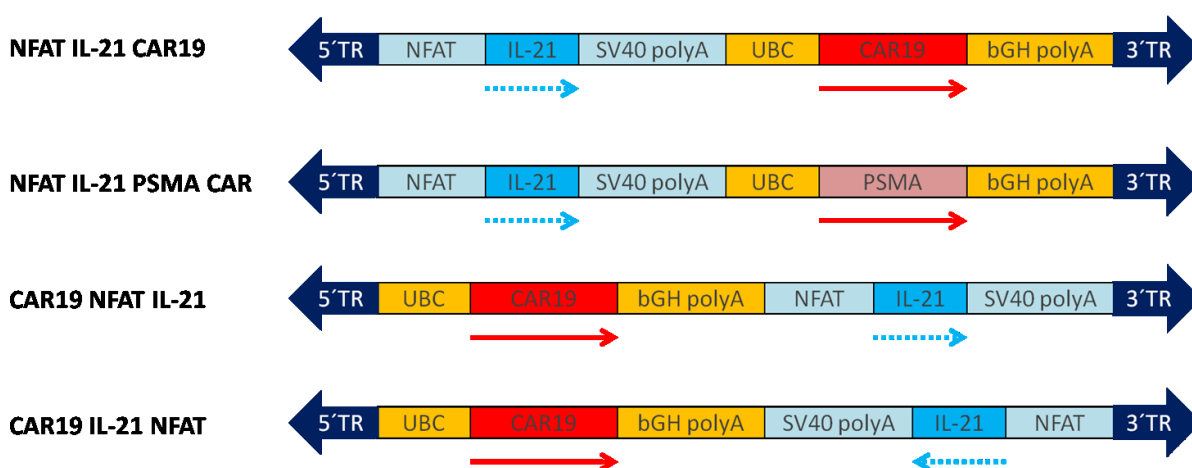
Obr. 3: Cytotoxická aktivita mono- a bispecifických CAR-T lymfocytů vůči antigenně specifické nádorové linii. CAR-T lymfocyty a kontrolní T-buňky byly kultivované v různých poměrech 24 hod s buňkami RAMOS dvojitě pozitivních na CD19 a CD20. Výsledek ze dvou biologických duplikátů. (E, efektorové buňky; T, terčové buňky)

Příprava CAR receptorů modifikovaných pro sekreci IL-21

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 [22]. Některé z těchto překážek lze překonat použitím CAR-T lymfocytů s indukovatelnou nebo konstitutivní produkcí cytokinů (tzv. TRUCK, *T-cells redirected for antigen-unrestricted cytokine-initiated killing*). Po přesměrování CAR-T buněk následovanou produkcí cytokinů dochází k indukci vrozené imunitní odpovědi, která ničí nádorové buňky, které nejsou CAR-T buňkami rozeznávány, a zároveň se spouští programové změny v imunosupresorových buňkách [22]. Byly sestrojeny 4 vektory pro CD19 CAR a sekretovaný IL-21, a to jak ve variantě indukibilního nebo konstitutivního expresního systému, a jeden vektor PSMA CAR s indukibilní sekrecí IL-21.

IL-21 byl vybrán na základě předchozích experimentů, 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 [23]. 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} [24]. Má vliv na přežití a diferenciaci B-buněk a funkci buněk dendritických [25].

Konstrukty s indukibilní expresí (**obr. 4**) byly navrženy tak, aby samotný CAR receptor a indukovatelná kazeta pro IL-21 byly součástí jednoho vektoru. Jako cílový vektor pro zaklonování byl vybrán neviróv transpozonový systém PiggyBac. 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 [26].



Obr. 4: Ilustrativní schéma konstruktů CD19 a PSMA CAR receptor s indukibilní expresí IL-21

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

U všech čtyř připravených PB vektorů byla úspěšně *in vitro* ověřena indukibilní exprese IL-21 po stimulaci receptoru CAR (resp. jeho vazbou na antigen) nebo TCR (zprostředkované protilátkou anti-CD3). Produkovaný IL-21 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 [27].

CAR19 s konstitutivní expresí (obr. 5) IL-21 byl navržen jako bicistronický vektor s jedním promotorem a dvěma transgeny, které jsou odděleny samoštěpícím peptidem T2A. Konstitutivní exprese IL-21 byla úspěšně ověřena.



Obr. 5: Ilustrativní schéma konstruktů pro CD19 CAR receptor s konstitutivní expresí IL-21

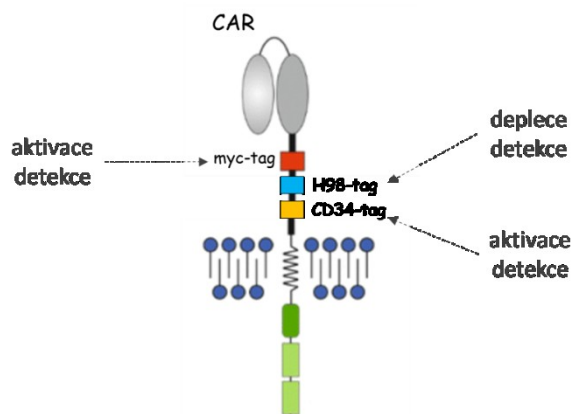
Mezi terminální repetice 5'-TR a 3'-TR PB vektoru jsou vloženy 2 transgeny, CAR19 a IL-21, které jsou odděleny sekvencí pro T2A peptid. Šipky značí směr transkripce a značí konstitutivní expresi

Příprava CAR receptorů obsahující multiepitop

K aktivaci expanze CAR-T buněk během výroby se většinou používá nespecifická stimulace pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28 [28]. V naší laboratoři používáme protokol s následnou specifickou aktivací CAR+ buněk pomocí protilátky anti-myc vázající se na myc-tag v extracelulární části chimerického receptoru. Na konci expanze dosahujeme populace o čistotě převyšující 90% CAR+ buněk v populaci [23].

Byla připravena řada vektorů pro různé CAR receptory, do kterých byly k již stávajícímu epitopu myc zaklonovány další epitopy nebo jejich kombinace. Byly začleněny do PSMA CAR, CLL-1 CAR, GD-2 CAR, CAR19 CAR a jednoho bispecifického CD19 BCMA biCAR receptoru. Byla ověřena exprese receptorů na T-buňkách i vazba protilátek na všechny epitopy, které obsahují. Konkrétně se jednalo o epitopy H98, Rp5-L, FLAG, CD34 a CD20. H98 je 12-merní peptid napodobující vazebný epitop proteinu HER2, na který se váže trastuzumab [29]. Rp5-L je také 12-merní peptid mimikující epitop CD20, který je rozeznáván rituximabem [30].

Multiepitop jako součást CAR receptoru může sloužit jako komplexní marker, který lze využít k detekci či monitorování CAR-T buněk po infuzi pacientovi, během jejich výroby k aktivaci expanze či pozitivní selekci CAR+ buněk na konci výrobního procesu, ale i jako sebevražedný gen (obr. xy). Tyto CAR receptory mají potenciální využití v genové terapii pomocí zavedených klinických činidel a terapeutik [31].



Obr. 6: Schéma CAR vektoru s vloženým multiepitopem

Jednotlivé epitopy umožňují aktivaci, detekci, selekci a depleci CAR-T buněk

1) 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. Vhodné by byly 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.

2) Původním záměrem, proč jsme se rozhodly 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 se správnou výrobní praxí by mohly být využity při rutinní výrobě CAR-T buněk v ÚHKT. Jediným nově vloženým epitopem, pomocí kterého šlo nastimulovat expanzi CAR+ buněk, byl epitop FLAG. Částečně fungoval i epitop CD34, kdy pomocí protilátky anti-CD34 imobilizované na plastik se lymfocyty aktivovaly k expanzi. Tato protilátka na rozdíl od anti-myc a anti-FLAG nefungovala v případě, kdy byla k buňkám přidaná vázaná na kuličkách. Ani pomocí protilátek trastuzumabu nebo rituximabu, ať už adheovaných 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. Druhý den po aplikaci protilátky bylo v krvi depletováno 90% CAR-T buněk, pravděpodobně mechanismem buněčné cytotoxicity závislé na protilátkách nebo cytotoxicity zprostředkované komplementem [32]. 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 [33-35]. Epitopy H98, Rp5-L a CD20 by tak mohly být využity v genové terapii ke kontrole toxicity a zajištění bezpečnosti CAR-T produktů po aplikaci pacientovi.

3) Pomocí separace založené na magnetických kuličkách s navázanou protilátkou anti-myc či anti-CD34 byla úspěšně vyzkoušena pozitivní selekce CAR-T buněk a obohacena tak buněčná populace na konci výroby.

7. Závěr

V rámci dizertační práce byly charakterizovány dva bispecifické CAR receptory a dalších 26 nových CAR receptorů bylo zkonstruováno se 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*). Sestrojené CAR receptory byly zacíleny na řadu antigenních cílů, a to proti molekulám CD19, CD20, PSMA, GD2, CLL-1 a BCMA. 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 indukibilní expresí cytokinu IL-21 výrazně zvyšovaly počet CAR-T lymfocytů v nádorových modelech *in vitro*, a ty jediné byly prozatím úspěšně publikovány.

8. Publikace

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

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.

9. Seznam použité literatury

1. 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.
2. Gill, S., M.V. Maus, and D.L. Porter, *Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25years in the making*. *Blood Rev*, 2016. **30**(3): p. 157-67.
3. 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.
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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).
11. Maude, S.L., et al., *CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2015. **125**(26): p. 4017-23.
12. Maude, S.L., et al., *Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies*. *Cancer J*, 2014. **20**(2): p. 119-22.
13. Kosti, P., J. Maher, and J.N. Arnold, *Perspectives on Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy for Solid Tumors*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1104.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Shah, N.N., et al., *Multi Targeted CAR-T Cell Therapies for B-Cell Malignancies*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 146.
18. Otahal, P., et al., *Lenalidomide enhances antitumor functions of chimeric antigen receptor modified T cells*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(4): p. e1115940.
19. 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.
20. 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.
21. Verhoeyen 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.*
22. 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.
23. 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*. *Cytherapy*, 2018. **20**(4): p. 507-520.

24. Santegoets, S.J., et al., *IL-21 in cancer immunotherapy: At the right place at the right time*. Oncoimmunology, 2013. **2**(6): p. e24522.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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).
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Spiridon, C.I., S. Guinn, and E.S. Vitetta, *A comparison of the in vitro and in vivo activities of IgG and F(ab')₂ fragments of a mixture of three monoclonal anti-Her-2 antibodies*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3542-51.
33. 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.
34. Brudno, J.N. and J.N. Kochenderfer, *Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management*. Blood, 2016. **127**(26): p. 3321-30.
35. 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.