

## Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Příprava a charakterizace chimérických antigenních receptorů

Autorka: Mgr Pavlína Ptáčková

1. LF UK Praha, studijní program *molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie*

Imunoterapie nádorových onemocnění je velmi aktuálním tématem s rychlým rozvojem v oblasti výzkumu i postupujícím uplatněním v klinické praxi. Jedním z imunoterapeutických nástrojů, který je v současnosti používán zejména u hematologických malignit, jsou geneticky upravené T-buňky exprimující chimerické antigenní receptory (CAR). Předložená disertační práce se zabývá konstrukcí vektorů umožňujících expresi CAR pro několik různých antigenů a analýzou vlastností lidských T-lymfocytů, které jsou pomocí těchto vektorů modifikovány (CAR T-buňky). Práce vznikla v rámci programu nedávno vzniklého specializovaného oddělení pro genovou terapii, jehož hlavním úkolem je vývoj imunoterapeutických přípravků pro použití v klinické praxi Ústavu hematologie a krevní transfuze. Autorka připravila nebo dále geneticky upravila řadu vektorů pro CAR cílící CD19, CD20, PSMA, CLL-1, GD-2 nebo BCMA, z nichž většina obsahuje další sekvence umožňující současně produkci interleukinu 21 nebo detekci, expanzi, selekci, aktivaci, případně eliminaci CAR T-buněk. Důležitou součástí práce pak bylo ověření exprese CAR v lidských T-lymfocytech zdravých dárců, do kterých byly vektory vnášeny buď pomocí lentivirů nebo pomocí transpozonového systému a elektroporace. Funkčnost připravených CAR T-buněk byla ověřována pomocí cytotoxického testu, stanovení aktivačního markeru CD69, produkce interferonu gama a měření aktivity laktát dehydrogenázy (LDH).

Teoretický úvod je zpracován přehledně, logicky, čtivým způsobem. Obsahuje všechny informace potřebné pro pochopení záměru práce a posouzení výsledků, vhodným způsobem doplněné převzatými obrázkovými schématy. Po metodické stránce je práce založena hlavně na molekulárním klonování a průtokové cytometrii, obsaženy jsou rovněž cytotoxické testy, stanovení hladiny cytokinů metodou ELISA a práce s myšimi modely. Metody jsou přiměřeně detailně popsány v příslušné kapitole. Experimentální část je rozdělena do tří tematických celků, které se věnují (i) bispecifickým receptorům, (ii) receptorům s integrovaným genem pro interleukin 21 (IL-21) a (iii) receptorům s multiepitopy, které vedle sekvencí pro cílení vybraných antigenů obsahují přídavné sekvence umožňující detekci, expanzi, selekci, aktivaci nebo eliminaci CAR T-buněk. Výsledky prvního a druhého experimentálního oddílu jsou součástí jedné prvoautorské a jedné druhoautorské publikace. Třetí experimentální oddíl je shrnutím velkého objemu experimentální práce, z níž část má publikační potenciál, tyto výsledky však zatím publikovány nebyly. Zajímavý je zejména poznatek, že některé mimotopy/epitopy původně zamýšlené jako prostředek pro aktivaci nebo selekci CAR T-buněk vyvolávají rychlou buněčnou smrt a mohly by tak být využity pro depleci CAR T-buněk v případě, že by u pacienta nastaly závažné nežádoucí účinky po jejich podání. Diskuse je strukturována analogicky, do tří částí zaměřených na jednotlivé tematické celky. Autorka v ní hodnotí dosažené výsledky zejména s ohledem na jejich možný klinický přínos, nabízí hypotetická vysvětlení pozorovaných jevů a návrh dalších experimentů, kterými by bylo možné hypotézy ověřit.

Vzhledem k tomu, že autorka pracovala v týmu, jehož hlavním úkolem je dospět ke klinicky použitelným přípravkům, není disertační práce uceleným výzkumným výsledkem, ale spíše souborem dílčích poznatků v rámci širšího tématu, kterým je vývoj CAR T-buněk a jejich uvedení do klinické praxe. To ovšem nijak nezpochybnuje autorčinu schopnost samostatné výzkumné práce, která je dle mého soudu předloženou prací dostatečně prokázána. Některé ze získaných výsledků budou pravděpodobně přímo uplatněny v praxi, na jiná zjištění je možno navázat dalšími analýzami, které prohloubí znalosti ohledně vlastností CAR T-buněk a možností jejich dalšího vylepšení.

Zřejmě největším nedostatkem celé práce je poměrně vysoká frekvence drobných gramatických nebo stylistických chyb a překlepů. Jako příklady lze uvést:

1. Časté potíže s deklinací, zejména část předmětného slovního spojení bývá v jiném pádě než zbytek (např. str. 73: "zablokovat protilátku pomocí 10% myší séra ředěném ve FACS pufru", podobných případů lze v práci najít mnoho desítek).

2. Redundantní použití slov ve spojení s některými zkratkami - TCR receptor (ve zkratce TCR je slovo receptor již obsaženo), podobně TE element (TE je zkratkou pro transpozibilní element).

3. Zavedenou zkratkou pro interferon je IFN, nikoli INF.

4. Tabulka 7: První řádek s názvem Hledání vhodných cílů CAR-T terapie obsahuje body jako "vyladění afinity CAR" nebo "indukovatelné sebevražedné spínače". Vhodnější by bylo tuto skupinu pojmenovat například Optimalizace sekvence chimerických receptorů.

5. Pro označení mikrolitru se někdy používá správnější  $\mu$ l, jindy alternativní varianta ul, někdy v těsné blízkosti obě ( $\mu$ g/ul).

6. Paragraf 4.1.7.2. v Metodách by se měl jmenovat spíše Barvení povrchových znaků než Extracelulární barvení buněk. V témže paragrafu (i potom dále v textu) je pro fluorescenční značku konjugovanou s protilátkou chybně použito označení fluorofom, což je plynná chemická látka, podobně jako chloroform. Správné označení by bylo fluorofor nebo fluorochrom.

7. Pro vymezení buněčné populace při analýze výsledků z průtokového cytometru je používán výraz "zagetovat" (odst. 4.1.7.6. a dále). Slangový výraz odvozený od anglického termínu "gate" by se dal použít ve formě "zogatovat", v českém textu by bylo ovšem vhodnější použít české označení (např. vymežit nebo vybrat).

8. Složené slovesné tvary zhusta nemají správný tvar trpného přičestí ("kity byly používáné" místo správného "byly používány").

9. Systematicky se objevuje slovo "umístnění" místo "umístění".

10. Překlep v názvu kapitoly Výsledky se propal i do obsahu, jde sice o drobnou chybu, ale vzhledem ke grafickému zvýraznění názvu rušivou.

11. Označení FACS je podle mého názoru přijatelné jako adjektivum pro materiál určený pro průtokovou cytometrii (FACS pufr, FACS zkumavky), vlastní přístroj a metoda by se ovšem měly označovat přesně, tj. jako průtokový cytometr a průtoková cytometrie.

Místy se vyskytují i hrubé gramatické chyby - například na str. 63 je věta "Pacienti, kteří relabovaly po CD19 CAR léčbě můžeme rozdělit na dvě kategorie". V jednom krátkém odstavci na str. 134-135 se sešly hned tři neshody přísudku s podmětem.

Z faktického hlediska jsem narazila na několik nepřesných nebo nejasných vyjádření, která by bylo vhodné během obhajoby práce upřesnit:

1. Na str. 60 - pod nadpisem Imunosupresivní prostředí - je uvedeno, že ho tvoří "především buňky Tregs, MDSC a makrofágy spojené s nádorem, ale i cytokiny a rozpustné faktory jako jsou TGF- $\beta$  a IL-10, stejně tak checkpoint inhibitory." Co je myšleno poslední částí věty? Checkpoint proteiny jsou buněčné povrchové receptory, například PD-1, PD-L1 nebo CTLA-4. Inhibitory checkpoint proteinů jsou obvykle protilátky, které se používají v imunoterapii a mají imunostimulační účinek.

2. Na str. 65 se uvádí, že K562 jsou buňky s morfologií lymfoblastu. Co to znamená?

3. V experimentech shrnutých na obr. 23 byly CD19/CD20 CAR T-lymfocyty kultivovány s cílovými buňkami HEK 293T exprimujícími CD19/CD20. V textu je uvedeno, že panel A shrnuje výsledky tří provedených testů, v legendě k tomuto panelu se ovšem píše, že jde o výsledek dvou experimentů. V klíči barev jsou uvedeny také cílové buňky exprimující oba antigeny, výsledky pro tyto buňky jsou ukázány v panelech B (produkce IFN-gama) a C (aktivita LDH), ale chybí v panelu A (relativní zastoupení T-lymfocytů pozitivních v CD69). Z jakého důvodu?

Jako podklad pro obecnou diskusi v rámci obhajoby práce navrhuji následující body:

1. Checkpoint inhibitory jsou v teoretické části zařazeny pod solidní nádory. Jak je to s expresí těchto receptorů (např. ligandů PD-1) na maligních lymfoblastech u ALL? (na str. 63 je zmínka, že buňky mohou uniknout zásahu CD19 CAR díky expresi PD-L1)

2. Jak byla vybrána doba inkubace CAR T-buněk s cílovými buňkami (24 h) při provádění cytotoxického testu? Během poměrně dlouhé inkubace je možné, že se zasažené cílové buňky zcela rozloží a zkreslí se tím relativní zastoupení mrtvých buněk. To mohlo nastat při vyšších poměrech E:T v experimentu s Ramos buňkami cílenými monospecifickými CD19 CAR (obr. 24). Jakkoli obr.24 jasně ukazuje účinnost všech typů CAR, srovnání mezi jednotlivými typy na základě těchto výsledků není příliš informativní.

3. Z obr. 28 plyne, že stimulace CD19 CAR buněk s inducibilní expresí IL-21 buňkami Ramos nebo protilátkami vede k produkci IFN-gama i k produkci IL-21. Zdá se ale, že množství IL-21 je přinejmenším srovnatelné, ne-li vyšší, v buňkách s nízkou produkcí IFN-gama, tedy málo aktivovaných. Je pro to nějaké vysvětlení?

4. V popisu výsledků ukázaných na obr. 37 se uvádí, že anti-myc protilátkou vázanou na plastik se podařilo připravit CAR T-lymfocyty u obou skupin elektroporovaných CAR vektorů. Ve skupině PSMA CAR myc bez H98 ale toto platí pouze po 11ti dnech, nikoli už po 17ti dnech. Podobně z obrázku dost překvapivě plyne, že nespecifická stimulace PSMA CAR myc H98 protilátkami proti CD3/CD28 vede k výraznému zastoupení CAR+ buněk až po 17ti dnech, zatímco po 11ti dnech CAR+ buňky přítomny nebyly. Docházelo k takovým situacím (značícím značnou nestabilitu kultury) v opakovaných experimentech často?

5. Ve třetí části experimentální práce byly do vektorů pro CAR receptory cílící CD19, CLL1 nebo PSMA přidány mimotopy, např. H98, který rozpoznává klinicky používaná protilátka trastuzumab. Podrobněji byl charakterizován CAR proti PSMA obsahující rovněž gen pro myc a další epitopy/mimotopy. Na obr. 33 byla intenzita signálu (MFI) anti-myc protilátky u PSMA myc receptoru zjevně nižší než u dalších receptorů obsahujících navíc H98, H98+FLAG nebo H98+CD34. Podobný výsledek je ukázán i v obr. 41, rozdíl v barvení myc mezi CAR myc a CAR myc H98 je v tomto případě i konstatován v textu. Byl podobný rozdíl v signálu anti-myc protilátky pozorován i pro CAR s jinou specifitou (CLL-1, CD19)? Lze ho vysvětlit lepší přístupností pro protilátku, pokud je epitop dále od membrány?

Závěrem s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce nepochybně prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci. Práci doporučuji k obhajobě a jako podklad k udělení titulu Ph.D. za jménem.