



**UNIVERZITA KARLOVA**  
1. lékařská fakulta  
BIOCEV  
Průmyslová 595, 252 50 Vestec

## **Oponentský posudek disertační práce**

**Autor:** Mgr. Pavlína Ptáčková

**Název:** Příprava a charakterizace chimerických antigenních receptorů

**Školitel:** MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

**Pracoviště:** Ústav hematologie a krevní transfuze, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

### **Cíle práce a hypotézy**

Cílem prezentované práce byla příprava několika variant vektorů pro chimerické antigenní receptory (CAR) s následnou modifikací primárních T-lymfocytů a ověřením jejich protinádorové účinnosti. Jednalo se o bispecifické CAR (rozpoznávající CD19 a CD20), testování přidané transgenní exprese IL-21 a modifikace CAR přidáním epitopů pro protilátky. Předpokladem bylo, že CAR bispecifita zvýší protinádorový účinek, přidaná exprese IL-21 zlepší efektorovou funkci a expanzi cytotoxických CD8+ CAR T buněk s podpůrnou modulací funkce ostatních imunitních buněk v místě nádoru a začlenění epitopů protilátek do CAR vylepší možnosti jejich výroby, jejich expanze a purifikace a umožní monitoraci CAR T-lymfocytů.

### **Formální úroveň práce**

Práce je standardně členěna. Jazyková úroveň je dobrá a obsahuje naprosté minimum technických a formálních nedostatků. Pro práci psanou v českém jazyce by bylo pouze vhodné i popisky v jednotlivých obrázcích uvádět taktéž česky a převzaté obrázky a tabulky adaptovat.

### **Hodnocení jednotlivých částí práce**

#### **1. Literární přehled**

Literární přehled je velmi hezky a přehledně zpracován a velmi pěknou formou shrnuje jak principy buněčné imunoterapie nádorů, tak jednotlivé typy a generace CAR T-lymfocytů. Stejně tak práce předkládá i zajímavý přehled cílových molekul na povrchu nádorových buněk, metody výroby CAR T-lymfocytů, principy léčby a její možné nežádoucí účinky.

Mírně nepřesný je pouze popis 4. generace CAR T-lymfocytů, který vyvolává dojem, že interleukin 12 byl zabudován přímo do CAR receptoru. Avšak toto je detailně a přesně popsáno v sekci výsledků v kapitole 5.2.

#### **2 Materiál a metody**

Materiál a metody jsou přehledně uspořádány a detailně popsány. Pouze velmi malou připomínkou je, že v případě lentivirových plazmidů psPAX2, pMD2.G a pWPXL10 se nejednalo o komerční plazmidy, ale plazmidy vytvořené v laboratoři Didiera Trona pouze sdílené přes neziskovou organizaci Addgene.

#### **3 Výsledky**

Experimenty jsou technicky dobře provedeny a výsledky dobře a přehledně shrnuty, prezentovány a popsány. Mírně méně srozumitelné je pouze označení pod posledním pravým sloupcem grafů v obr. 33 (Detekce epitopů H98, FLAG a CD34 pomocí trastuzumabu, anti-FLAG a anti-CD34), které implikuje



barvení na expresi HA98 epitopu i při použití pouze sekundární protilátky. Označení pouze jako míra fluorescence či kontrolní barvení by bylo možná jednodušeji pochopitelné. V kapitole 5.3.2., charakterizující funkčnost PSMA CAR-T lymfocytů (produkce cytokinů, exprese CD69, proliferace), jsou výsledky pouze zmíněny bez jejich grafické prezentace. Formát a prostor disertační práce by umožnily jejich detailnější prezentaci, kterou bych preferoval. Stejně se týká i dalších výsledků zmíněných pouze v textu, které by bylo lepší většinou prezentovat graficky, například na úkor možná příliš podrobného popisu designu experimentů v kapitole výsledků.

#### 4 Diskuse

Výsledky jsou hezky a relevantně diskutovány ve vztahu k současným znalostem a technologiím.

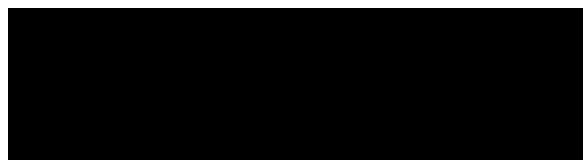
#### Splnění cílů práce a celkové hodnocení

Téma disertační práce je velmi relevantní a důležité pro další rozvoj buněčné imunoterapie. Vytčené cíle považuji za splněné. Celkově je práce hezky a uceleně zpracována. Autorka potvrdila, že bispecifické CAR mají potenciálně lepší protinádorovou aktivitu, ověřila funkčnost přídatné exprese IL-21 a vytvořila varianty CAR s přidanými epitopy. Přidané epitopy sice nezlepšily technické vlastnosti při výrobě CAR T-lymfocytů, ale ukázaly se jako využitelné k případné depleci CAR T-lymfocytů v případě potřeby. Autorka práce prokázala, že je schopná provádět technicky komplexní experimenty a jejich výsledky dobře a relevantně interpretovat a diskutovat ve vztahu k biologii a dostupným studiím. Stejně tak autorka prokázala dobré teoretické znalosti. Práci proto jednoznačně doporučuji k obhajobě.

#### Dílicí připomínky k práci a otázky do diskuse

1. Jak si vysvětlujete, že docházelo k větší aktivaci CAR T-buněk s bispecifickým CAR (proti CD19 a CD20 zároveň) ve srovnání s monospecifickými CAR (proti CD19 nebo CD20), když byl na HEK 293T buňkách exprimován a prezentován pouze CD19 nebo CD20 antigen (Obr. 23)? Předpokládám, že k větší aktivaci CAR T-buněk s bispecifickým CAR bude docházet pouze tehdy, pokud budou zároveň na povrchu nádorových buněk přítomny oba antigeny, a ne pouze jeden z nich.
2. Jedním z cílů studie bylo ukázat, že přidaná exprese IL-21 zlepší expanzi, aktivaci a efektorovou funkci CAR T buněk. Můžete více přiblížit, jaké experimenty byly pro ověření tohoto předpokladu provedeny a s jakým závěrem?
3. V kapitole 5.3.3 jsou popsány rozdílné efekty stimulace CAR T-lymfocytů protilátkami proti myc a H98. Jaká je vaše teorie pro tyto rozdíly, kdy jedna protilátka vedla k aktivaci a proliferaci CAR T-lymfocytů a druhá k jejich depleci?
4. Potenciál eliminace CAR T-lymfocytů s CAR obsahujícím H98 epitop pomocí trastuzumabu byla testována *in vivo* (Obr. 39), kdy první dávka trastuzumabu byla podána současně s CAR T-lymfocyty. Pro přiblížení modelu více klinické situací, zvažovali jste podání trastuzumabu v odstupu několika dnů po podání CAR T-lymfocytů?
5. V diskusi autorka uvádí, že funkčnost CAR T-lymfocytů s bispecifickými CAR receptory (na CD19 a CD20) by bylo třeba více charakterizovat *in vitro* a *in vivo*. Můžete uvést, o jaké experimenty by se jednalo?

Ve Vestci 31.5.2021



MUDr. Ondřej Havránek Ph.D.

