

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Martin Mucha

**Optimalizace CAR T lymfocytů
pro imunoterapii hematologických malignit**

**Optimizing chimeric antigenic receptors (CARs) T-cells
for immunotherapy of hematological malignancies**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Pavel Otáhal, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.08.2021

Martin Mucha

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli MUDr. Pavlu Otáhalovi, Ph.D. za podnětné nápady a vedení diplomové práce.

Dále velmi děkuji RNDr. Martině Petráčkové, Ph.D. za významnou pomoc nejen s korekturou a neutuchající trpělivost při vysvětlování cytotoxického testu. Rovněž děkuji i všem dalším kolegům z Oddělení genové imunoterapie, Mgr. Kristýně Šmilauerové, Mgr. Martinu Štachovi, Mgr. Janě Rychlé a Martině Kulíškové, za veškerou pomoc, rady, a především vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Nemohu opomenout skvělou práci a častou výpomoc kolegů z Oddělení imunomonitoringu a průtokové cytometrie. Tímto děkuji jmenovitě RNDr. Janu Musilovi, PhD., Mgr. Šárce Vaníkové, Mgr. Abhiskovi Koladyia a Patriku Dvořákovi.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svojí rodině za podporu během psaní diplomové práce i celého studia.

Abstrakt

Imunoterapie založená na T lymfocytech exprimujících chimerické antigenní receptory (CAR) se ukázala být velice úspěšnou v léčbě akutní lymfoblastické leukémie (ALL), což vedlo ke snaze vyvinout imunoterapeutické postupy založené na CAR T lymfocytech i pro další hematologické malignity. V současné době je snaha vylepšit modifikace T lymfocytů tak, aby léčba pacientů byla efektivnější. Pokaždé je pak třeba tuto modifikaci empiricky ověřit v pokusech *in vitro*. Rozhodli jsme se studovat efekt cytokinu IL-21 na protinádorovou funkci CD19 specifických CAR T lymfocytů pomocí *in vitro* testů. Do T buněk byl vnesen konstrukt, který koexprimoval IL-21 pod kontrolou inducibilního NFAT promotoru společně s CAR proti CD19. V sérii experimentů byly porovnávány vlastnosti těchto buněk po kokultivaci s nádorovými B buněčnými liniemi a buňkami CLL získané od pacientů. Z výsledků vyplývá, že CAR T buňky, které exprimují IL-21, lépe proliferují a lépe se aktivují, a to i po opakované stimulaci leukemickými buňkami.

Kromě CARů specifických proti molekule CD19 jsme se zabývali i CARy specifickými proti molekule CLL1, která je v literatuře popisována jako jeden ze slibných targetů pro léčbu AML. Připravili jsme CAR T buňky proti CLL1 produkující IL-21. Pro tento účel bylo třeba připravit plazmid, který kromě sekvence pro CAR obsahuje i gen pro IL-21 pod kontrolou NFAT promotoru. Funkčnost plazmidu byla ověřena transfekcí buněk PBMC a kultivací CAR T buněk, které exprimovali daný CAR a zároveň IL-21. Koncentrace IL-21 byla změřena ELISA testem. Použití interleukinu 21 v CAR T terapii by mohlo přinést pozitivní účinky.

Klíčová slova: Imunoterapie, CAR T buňky, CD19, ALL, CLL1, NFAT, IL-21, hematologické malignity

Abstract

Immunotherapy based on chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T lymphocytes has proven to be highly successful in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), leading to development of CAR-based immunotherapies for other hematologic malignancies. Currently, efforts are underway to refine T cell modifications to make patient treatment more effective. Each time, this modification then needs to be empirically validated in *in vitro* experiments. We decided to study the effect of the cytokine IL-21 on the antitumor function of CD19-specific CAR T cells using *in vitro* assays. A construct that co-expressed IL-21 under the control of the inducible NFAT promoter together with CARs against CD19 was introduced into T cells. In a series of experiments, the properties of these cells were compared after coculture with tumor B cell lines and CLL cells obtained from patients. The results showed that CAR T cells that express IL-21 proliferate and activate better, even after repeated stimulation with leukemia cells.

In addition to CARs specific against the CD19 molecule, we also investigated CARs specific against the CLL1 molecule, which has been described in the literature as one of the promising targets for the treatment of AML. We prepared CAR T cells against CLL1 producing IL-21. For this purpose, we had to prepare a plasmid that contains the IL-21 gene under the control of the NFAT promoter in addition to the sequence for CAR. The functionality of the plasmid was verified by transfecting PBMCs and culturing CAR T cells expressing the given CAR and IL-21. The concentration of IL-21 was measured by ELISA. The use of interleukin-21 in CAR T therapy could yield positive effects.

Key words: Immunotherapy, CAR T cells, CD19, ALL, CLL1, NFAT, IL-21, hematologic malignancies

Seznam zkratek

Zkratka	Český význam	Anglický význam
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie	Acute Lymphoblastic Leukemia
AML	Akutní myeloidní leukémie	Acute Myeloid Leukemia
AP-1	Aktivátorový protein 1	Activator Protein 1
BCR-ABL	Fúzní gen z filadelfského chromozomu	Philadelphia Chromosome Fusion Gen
CAR	Chimerický antigenní receptor	Chimeric Antigenic Receptor
CG	CellGro médium	CellGro medium
CLL	Chronická lymfocytární leukémie	Chronic Lymphocytic Leukemia
CLL1	Molekula 1 podobná C typu lektinu	C-type Lectin Like molecule-1
CML	Chronická myeloidní leukémie	Chronic Myeloid Leukemia
DAG	Diacylglycerol	Diacylglycerol
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFP	zesílený zelený fluorescentní protein	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetální bovinní sérum	Fetal bovine serum
GaM	Kozí anti myší protilátka	Goat-anti-Mouse antibody
GvL	Reakce štěpu proti nádorovým buňkám	Graft versus Leukemia
HF	Vysoká účinnost	High-Fidelity
IFN	Interferon	Interferon
IL	Interleukin	Interleukin
IP3	Inositoltrifosfát	Inositol trisphosphate
ITAM	Aktivační motiv imunitního receptoru	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	Major Histocompatibility Complex

NFAT	Nukleární faktor aktivovaných T buněk	Nuclear Factor of Activated T cells
PBMC	Mononukleární buňky z periferní krve	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok	Phosphate Buffered Saline
PIP3	Fosfatidylinositol-3-fosfát	Phosphatidylinositol-trisphosphate
PSMA	Prostatický specifický membránový antigen	Prostate-specific Membrane Antigen
RPM	Otáčky za minutu	Revolutions Per Minute
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“ médium	RPMI medium
scFv	Jednořetězcový variabilní fragment	Single-chain variable fragment
TAA	Antigeny asociované s nádory	Tumor-Associated Antigens
TBE	Tris-borátový-EDTA pufr	Tris-Borate-EDTA buffer
TKI	Inhibitor tyrozin kináz	Tyrosine kinase inhibitor
TSA	Antigeny specifické pro nádory	Tumor-Specific Antigens

Obsah

1	Úvod	10
2	Přehled literatury	12
2.1	Imunitní systém a rakovina	12
2.2	Hematologické malignity	13
2.3	Konvenční léčba hematologických malignit	14
2.4	T buněčná odpověď a její regulace	15
2.4.1	Struktura a signalizace	15
2.5	Imunoterapie hematologických malignit	18
2.6	Chimerický antigenní receptor	18
2.6.1	Struktura našeho CAR	19
2.7	Genetická modifikace T buněk	20
2.7.1	PiggyBac transpozonový systém	21
3	Cíl práce	22
4	Materiál a metody	23
4.1	Materiál	23
4.1.1	Buněčné kultury	23
4.1.2	Bakteriální kmeny	23
4.1.3	Plazmidové DNA vektory (piggyBac transpozonový systém)	23
4.1.4	Protilátky	23
4.1.5	Antibiotika	24
4.1.6	Cytokiny	24
4.1.7	Kultivační média	25
4.1.8	Enzymy	25
4.1.9	Roztoky	25
4.1.10	Pufry	26
4.1.11	Chemikálie	26
4.1.12	Přístroje	27
4.2	Metody	28
4.2.1	Sterilizace a likvidace infekčního odpadu	28
4.2.2	Práce s tkáňovými kulturami	28
4.2.3	Práce s bakteriálními kulturami	31
4.2.4	Práce s DNA	34
4.2.5	Transfekce lidských buněčných kultur	36

4.2.6	Příprava buněk pro průtokovou cytometrii.....	37
4.2.7	Měření buněčných vzorků na cytometru BD LSRFortessa	37
4.2.8	Sekreční analýza IFN- γ průtokovou cytometrií.....	38
4.2.9	ELISA IL-21	38
5	Výsledky.....	41
5.1	Příprava CAR T buněk, kultivace a ověření exprese	41
5.2	Výroba CAR T buněk a ověření vlivu kultivačních podmínek na frekvenci CAR pozitivních buněk	44
5.3	Výroba CAR T buněk proti CD19 a ověření jejich cytotoxicity.....	46
5.4	Kultivace CAR T buněk a ověření schopnosti degranulace po opakované stimulaci terčovými buňkami.....	52
5.5	Příprava plazmidu pPB-NFAT IL-21 CLL1	58
5.5.1	Ověření úspěšnosti ligace.....	59
5.5.2	Výroba plazmidu pPB-NFAT IL-21 CLL1 pro transfekční experimenty.....	61
5.5.3	Příprava CAR T buněk proti molekule CLL1	62
5.5.4	Ověření schopnosti CAR T buněk produkce interleukinu 21.....	63
6	Diskuze.....	67
7	Závěr	73
8	Použitá literatura	74
9	Přílohy.....	78
9.1	Plazmidy piggyBac vektorů.....	78
9.1.1	pBase	78
9.1.2	pPB-CAR19.....	79
9.1.3	pPB-NFAT IL-21 CAR19	79
9.1.4	pPB-CLL1.....	80
9.1.5	pPB-NFAT IL-21 CLL1.....	80
9.2	DNA sekvence transpozonu pPB-NFAT IL-21 CAR19	81
9.3	Aminokyselinová sekvence CAR19	83

1 Úvod

Hematologické malignity jsou častým nádorovým onemocněním dětských i dospělých pacientů. Standardní léčba se skládá z nescifických terapeutických přístupů jako je chemoterapie, a v případě neúspěchu této léčby z transplantace krvetvorných buněk, která s sebou přináší imunosupresivní režim pro pacienta. Kvůli vysoké míře relapsů a množství negativních efektů, které má standardní léčba na zdravotní stav pacienta, se řada studií zaměřuje na alternativní terapeutické přístupy.

V posledních desetiletích došlo k obrovskému nárůstu znalostí o imunitním systému, signalizačních drahách i o nádorových buňkách a nádorovém prostředí. Imunitní systém je standardně schopen rozpoznávat a ničit buňky, u kterých došlo k nebezpečným mutacím ještě dříve, než dojde ke klinickým projevům. Tato funkce imunitního systému je popsána jako imunitní dohled a byla ustanovena na základě výzkumů zvýšené incidence rakovin u imunosuprimovaných pacientů, i když předpoklad imunitního dohledu je již sto let starý. Nicméně nádorové buňky jsou schopny imunitnímu dohledu uniknout. Nádorové buňky na svém povrchu exprimují antigeny, vůči kterým byla stanovena centrální tolerance adaptivní části imunitního systému. Kromě toho využívají nádorové buňky další mechanismy, jak uniknout rozpoznání imunitními buňkami, kam patří snížení povrchové exprese MHC molekul, zvýšení povrchové exprese inhibičních molekul jako je PD-L1 a CTLA-4. Dále je to sekrece inhibičních molekul (TGF- β) a podpora regulačních T buněk. Všechny uvedené mechanismy přispívají ke vzniku nádorového mikroprostředí, které má za cíl inaktivaci imunitního systému a podporu růstu nádorových buněk.

Na základě uvedených zjištění se zájem přesunul k alternativnímu přístupu léčby, který by dokázal podpořit imunitní systém v rozpoznání a destrukci nádorových buněk. Obor imunoterapie tak zažil výrazný posun během poslední let a poskytl nové imunoterapeutické přístupy v léčbě rakoviny.

Vývoj v oblasti přípravy monoklonálních protilátek umožnil specifitější přístup k léčbě podáváním protilátek proti specifickým antigenům nádorových buněk. Například monoklonální protilátka Rituximab, specifická proti antigenu CD20, se podává k eliminaci B buněk ne Hodgkinského lymfomu (Ribatti, 2014). Kromě monoklonálních protilátek se výzkum zaměřil i na přípravu tzv. checkpoint inhibitorů, z nichž byla již celá řada úspěšně testována a schválena pro terapii různých typů nádorových onemocnění.

Slibným imunoterapeutickým přístupem je příprava geneticky modifikovaných T buněk, které na svém povrchu exprimují chimérický antigenní receptor (CAR). Molekula CAR obsahuje extracelulární část, odvozenou z myší protilátky, která rozpoznává příslušný nádorový antigen, a intracelulární signální doménu, odvozenou z T buněčného receptoru. Současná generace CARů navíc obsahuje

v intracelulární části jednu nebo více domén kostimulačních molekul. T buňky s tímto chimerickým antigenním receptorem (CAR T buňky) jsou aktivovány na základě rozpoznání příslušného antigenu, bez potřeby zapojení MHC molekul, které jsou u nádorových buněk sníženy.

V rámci této práce krátce shrnuji současné poznatky o hematologických malignitách a jejich konvenční léčbě, a poznatky o možných imunoterapeutických přístupech. Dále podrobněji informuji o imunoterapii hematologických malignit pomocí CAR T buněk, o jejich struktuře, způsobu signalizace a o dalších možnostech jejich modifikace.

Experimentální část této práce je rozdělena na dvě části. První část je zaměřena na přípravu, kultivaci a ověření funkčnosti CAR T buněk se specifitou proti molekule CD19. K tomu jsou využity plazmidy, které byly připraveny mými kolegy z laboratoře Oddělení vývoje genové imunoterapie ÚHKT. Ve druhé části své práce se zaměřím na přípravu plazmidu obsahujícího CAR specifický proti molekule CLL1 metodami molekulární biologie a na jeho následné ověření.

2 Přehled literatury

2.1 Imunitní systém a rakovina

Rakovina je po kardiovaskulárních chorobách celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí a současný trend předpokládá nárůst počtu diagnostikovaných pacientů s rakovinou (Siegel et al., 2013). Bez ohledu na pohlaví, nejběžněji diagnostikovaná je rakovina plic, následuje rakovina prsu, prostaty a kolorektální karcinom (Bray et al., 2018). V případě dětských pacientů se jedná o hematologické malignity, rakoviny mozku a lymfatických uzlin (Ward et al., 2014). Pojem rakovina zahrnuje mnoho onkologických onemocnění, které se vyznačují vysokou heterogenitou (Meacham & Morrison, 2013).

Imunitní systém je zjednodušeně dělen na vrozený a adaptivní, které vzájemně spolupracují a svými úlohami se doplňují a překrývají. Základní funkcí imunitního systému je schopnost rozlišovat vlastní molekuly od molekul cizího původu, např. bakterie, viry a toxiny. Navíc je imunitní systém schopen na základě rozdílné biochemické struktury, přítomnosti neo-antigenů, rozdílné exprese antigenů a na základě změn v chování buňky rozlišit fyziologické buňky od buněk pozměněných, ať již virovou infekcí nebo maligními změnami (Pardoll, 2015).

Představu imunitního dohledu rakoviny poprvé představil v roce 1909 P. Ehrlich, který navrhnul, že imunitní systém je schopen neustále rozpoznávat a ničit vyvíjející se nádorové buňky. Teorii poté rozšířil v roce 1970 F. MacFarlane Burnet, který předpokládal, že výskyt genetických změn v buňkách je běžný jev a imunitní systém je schopen inaktivovat nebo zničit potenciálně nebezpečné mutované buňky (Burnet, 1970). Až později přinesly podporu uvedené teorii studie, ve kterých byla zkoumána incidence výskytu rakoviny u pacientů po alogenní transplantaci, kteří podstupovali imunosupresivní terapii. Stejně tak studie myši s imunodeficiencemi vrozené i adaptivní imunity ukázaly signifikantní zvýšení výskytu nádorů (Thibodeau et al., 2012).

Skutečnost, že ke vzniku maligních nádorů dochází i u pacientů s funkčním imunitním systémem dokazuje, že teorie imunitního dohledu není schopna zcela vysvětlit interakci mezi imunitním systémem a rakovinou. Na jejím základě postupně vznikla teorie imunitní editace (imunoeditace), která popisuje dynamickou interakci imunitního systému a nádorů. Tato interakce je pak rozdělena do tří fází: eliminace, rovnováha a únik (Mittal et al., 2014).

Eliminace vyjadřuje stav, kdy je funkční imunitní dohled schopen rozpoznat vznikající nádor a následně jej imunitními mechanismy odstranit. V případě, že je nádor zcela odstraněn, další fáze imunitní editace nenastává. Pokud však nejsou všechny nádorové buňky odstraněny, mohou přejít do fáze rovnováhy. V této fázi je imunitní systém schopen zabránit dalšímu vývoji a množení nádorových buněk, ale

nádorové buňky zároveň přežívají v klidovém stavu. Fáze rovnováhy může trvat mnoho let, jak naznačují data transplantovaných pacientů (Gasparri et al., 2017).

Poslední fází je únik před imunitní kontrolou, kdy nádorové buňky rostou bez omezení, což následně vede až ke klinickému projevu. Únikové mechanismy nádorových buněk zahrnují snížení vlastní imunogenicity a zvýšení rezistence proti útokům imunitních buněk. Nádory jsou také schopny vytvořit imunosupresivní mikroprostředí a posilovat imunitní buňky specificky podporující růst a rozvoj nádoru (Fridman et al., 2014).

2.2 Hematologické malignity

Hematologické malignity je možné rozlišovat podle typu tkáně, ze které vznikají. Dle klasifikace podle WHO rozlišujeme lymfoidní a myeloidní nádory, a dále nádory původně vzniklé z dendritických buněk (Bell & Gaillard, 2016). Leukémie je označení pro choroby vznikající z maligní změny buněk krvetvorby, které také rozlišujeme na lymfoidní a myeloidní. Podle klinického průběhu dále dělíme tyto dvě kategorie na akutní a chronické.

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je nejčastější hematologickou malignitou dětí, nicméně přibližně u 90 % případů je dosaženo remise. ALL zahrnuje leukémie B-buněčné i T-buněčné, ale B-buněčné ALL je třikrát častější (Hunger & Mullighan, 2015). Nádorové buňky B-buněčné ALL jsou navíc vždy pozitivní na molekuly CD19 a podle zralosti exprimují i další molekuly (CD10, CD20, CD22), které jsou využity k podrobnější diagnóze a určení vhodné léčby (Wood et al., 2007).

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) postihuje nejčastěji dospělé pacienty v pozdním věku. K odhalení často dochází při rutinních krevních testech v asymptomatické fázi onemocnění. Část pacientů zůstává v asymptomatické fázi, proto se terapie soustředí především na případy, kdy dochází k vývoji nemoci. Nádorové buňky v případě CLL vznikají ze zralých, avšak nefunkčních B buněk, které unikly apoptóze, a kromě klasických povrchových molekul CD19 a CD20, mají i vysokou expresi molekuly CD5 (Chiorazzi et al., 2005). Transplantace kostní dřeně je jediný typ trvale účinné léčby CLL.

Akutní myeloidní leukémie (AML) je zhoubné onemocnění myeloidní krevní řady, které nejčastěji postihuje dospělé pacienty. Navzdory agresivní léčbě téměř 70 % pacientů nepřežije déle než jeden rok od diagnózy (Meyers et al., 2013). Příčinou relapsu bývá minimální reziduální nemoc, tedy určité nízké procento leukemických buněk, které je schopno přežít chemoterapeutickou léčbu, a poté se začít množit. Minimální reziduální nemoci je možné předcházet využitím genové terapie pomocí CAR T buněk cílených na zbytkové buňky nádorové linie (Ma et al., 2019). Pro chronickou myeloidní leukémii (CML) je charakteristická chromozomální translokace, která vede ke vzniku Filadelfského chromozomu, který se v menší míře může vyskytovat u ostatních typů leukemie (Sawyers, 1999). CML je heterogenní

choroba mezi jejíž příznaky patří narušení poměrů buněčných složek krve, leukocytóza, trombocytóza, anémie a splenomegalie (Faderl et al., 1999).

2.3 Konvenční léčba hematologických malignit

Zvolení správné terapie pro pacienty s hematologickými malignitami se odvíjí od několika faktorů – typu onemocnění, stupně progresu, zdravotního stavu a věku pacienta. Standardní léčba ALL vychází z kombinace inhibitorů tyrosinkináz (TKI), steroidů a chemoterapeutik (Prednisol, Vincristin). V případě infiltrace CNS nebo přítomnosti lymfadenopatií je léčba doprovázena radioterapií. U pacientů s nepříznivou prognózou se přistupuje k transplantaci kostní dřeně. U primárně rezistentních chorob, nebo v případě relapsu, se využívají monoklonální protilátky proti povrchovým antigenům (CD3/CD19 – Blinatumomab, CD22), TKI 2. a 3. generace (Dasatinib, Ponatinib) a purinové analogy (Nelarabin) (Brown et al., 2017).

V případě CLL je průběh asymptomatické choroby pouze monitorován, bez terapeutického zásahu. Pouze při prokázání aktivity CLL je přistoupeno k terapii, která standardně začíná chemoterapií (fludarabine, cyklofosfamid) společně s monoklonální anti-CD20 protilátkou (Rituximab). Kromě toxických chemoterapeutik existují i lépe snášené přípravky se stejnou účinností jako např. Bendamustine nebo kinázové inhibitory (Idelalisib). Všechna tato terapeutika mají vysokou úspěšnost, přesto jedinou dlouhodobě účinnou terapií zůstává transplantace kostní dřeně (Fischer et al., 2012).

Pro terapii AML je základem intenzivní chemoterapeutická indukční léčba (Cytarabin, anthracykliny), která vede k indukci remise. Příznivá prognóza vede k dalším 3-5 cyklům konsolidační chemoterapie. Naopak špatná prognóza onemocnění by s vysokou pravděpodobností vedla k relapsu, a proto se přistupuje k transplantaci kostní dřeně. Transplantace je spojená s reakcí štěpu proti leukemii (GvL – Graft versus Leukemia), kdy transplantované nově vznikající buňky imunitního systému dárce jsou schopny likvidovat zbývající rakovinné buňky v těle příjemce (Tallman et al., 2019). Určité prognostické markery vedou k úpravě léčby, a kromě chemoterapie jsou přidána i další léčiva, například přítomnost FLT3 mutace indikuje přidání léčiva Midostaurin. Přítomnost CD33 pozitivních blastů indikuje použití léčiva gemtuzumab ozogamicin (Hills et al., 2014; Stone et al., 2017).

Terapie CML je založena na inhibitech tyrosinkináz (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib), které vedou ke snížení exprese BCR-ABL1 produktu. Pro případ rezistence vůči určité TKI je nasazen jiný typ TKI, případně kombinace několika TKI. Neúspěch léčby pomocí TKI vede k indikaci na transplantaci kostní dřeně, u rizikových pacientů k podávání interferonu alfa. S nástupem TKI druhé a třetí generace je četnost transplantací nižší, protože tyto inhibitory jsou dobře tolerovány a mají vysokou účinnost (Faderl et al., 1999; Sawyers, 1999).

2.4 T buněčná odpověď a její regulace

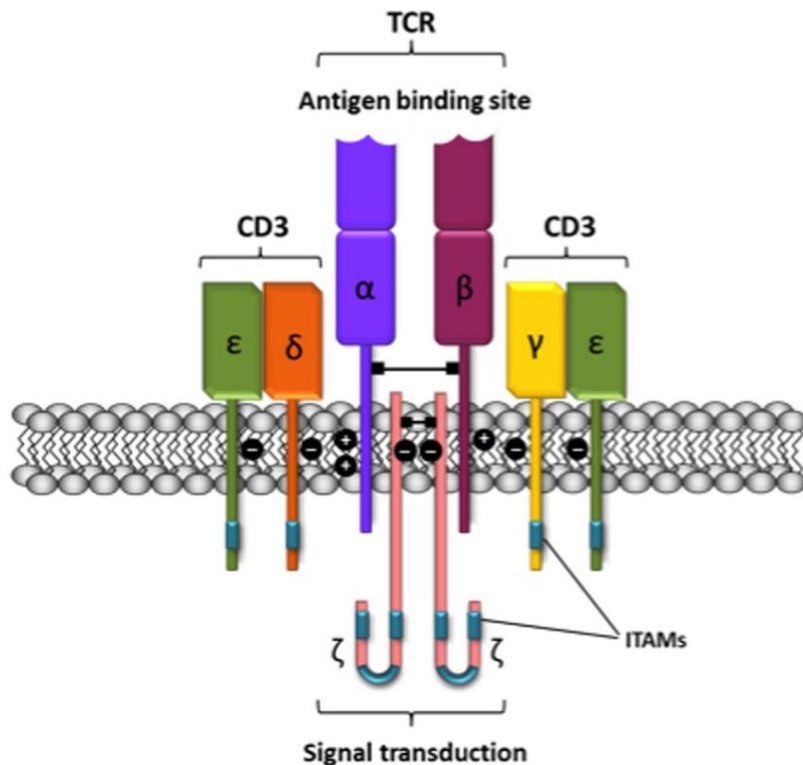
V protinádorové imunitě se uplatňují především T buňky. Ty jsou schopny na povrchu nádorových buněk rozpoznávat tumor specifické antigeny (TSA) a s tumorem asociované antigeny (TAA) v komplexu s glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (Major Histocompatibility Complex – MHC) (Kelderman & Kvistborg, 2016). T buňky rozpoznávají uvedené antigeny, respektive antigenní peptidy, prostřednictvím povrchového T buněčného receptoru (TCR). Kromě TCR se na rozpoznávání komplexu MHC-peptid podílí i tzv. koreceptorové molekuly CD4 nebo CD8, na jejichž základě jsou T buňky rozlišovány (Garcia, Scott, et al., 1996). CD4⁺ T buňky jsou označovány jako pomocné T buňky, jejich hlavní úlohou je modulace imunitní odpovědi pomocí sekrece řady cytokinů, ačkoli i u nich byla popsána cytotoxická funkce (Takeuchi & Saito, 2017). Primární protinádorovou imunitu zajišťují CD8⁺ T buňky, jejich cytotoxické funkce jsou však důsledně regulovány. Aktivace těchto buněk vyžaduje prozánětlivé cytokinové prostředí, přítomnost kostimulačních molekul a rozpoznání specifického peptidu v komplexu MHC molekul I. třídy.

Právě regulačních principů imunitního systému využívají ve svůj prospěch nádorové buňky, které se brání před imunitním systémem například snížením počtu MHC glykoproteinových molekul na svém povrchu (Algarra et al., 2004), zvýšenou rezistencí vůči produktům cytotoxických lymfocytů (Kearney et al., 2018), produkcí inhibičních molekul (PD-1) nebo sekrecí protizánětlivých cytokinů (TGF- β) (Juneja et al., 2017; Thomas & Massague, 2005). V případě hematologických malignit se nejčastěji uplatňuje snížená exprese MHC molekul a exprese inhibičních molekul (Ramsay et al., 2012; Taghiloo & Asgarian-Omran, 2021).

2.4.1 Struktura a signalizace

Molekula TCR se skládá ze dvou variabilních řetězců α a β (pomineme-li $\gamma\delta$ T buňky, které se skládají z řetězců γ a δ) propojených disulfidickými můstky. TCR molekulu v cytoplazmatické membráně kotví její hydrofobní část a extracelulární část molekuly se dělí na variabilní a konstantní oblast. Variabilní část obsahuje v N terminální části tři hypervariabilní smyčky zvané komplementaritu určující oblasti (Complementarity Determining Regions – CDRs), které rozpoznávají komplex MHC-peptid (Garcia, Degano, et al., 1996). Heterodimérové řetězce jsou asociovány s komplexem CD3 (Marrack & Kappler,

1987). Komplex CD3 tvoří čtyři transmembránové proteiny (γ , ϵ , δ , ϵ), které asociují přímo s α a β řetězci, k nim jsou dále přidruženy dva intracelulární řetězce zeta (Dong et al., 2019).



Obrázek č. 1: Struktura T-buněčného receptoru (Franco et al., 2016)

Intracelulární domény transmembránových proteinů i dvou zeta řetězců obsahují tyrozinové aktivační motivy ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), které jsou po aktivaci TCR fosforylovány na tyrozinových zbytcích aminokyselin a spouští signalizaci dovnitř buňky (Dushek et al., 2012). Názorně je struktura TCR komplexu zobrazena na obrázku č. 1.

K fosforylaci intracelulárních domén komplexu CD3, a tedy k úspěšné signalizaci dochází pouze pokud TCR rozpozná s dostatečnou afinitou komplex MHC-peptid a zároveň dojde ke stimulaci přes kostimulační molekuly, případně přes cytokinové receptory (van der Merwe & Dushek, 2011).

Stimulace vede k fosforylaci ITAM motivů intracelulárních domén CD3 komplexu pomocí Lck kinázy (Kane et al., 2000). S fosforylovanými místy asociuje protein ZAP70 přes interakci SH2 domén, následně dochází k aktivaci ZAP70, který fosforyluje transmembránový protein LAT, ten slouží jako „dokovací stanice“ pro SH2 domény dalších komponent signalizační kaskády. Odtud je signál do jádra přenášen několika způsoby (Samelson, 2002).

Jednou z hlavních komponent T buněčné signalizační kaskády je enzym fosfolipáza Cy , která hydrolýzou fosfatidylinositol-3-fosfátu (PIP3) produkuje dvě klíčové molekuly druhých posílů – inositoltrifosfát (IP3)

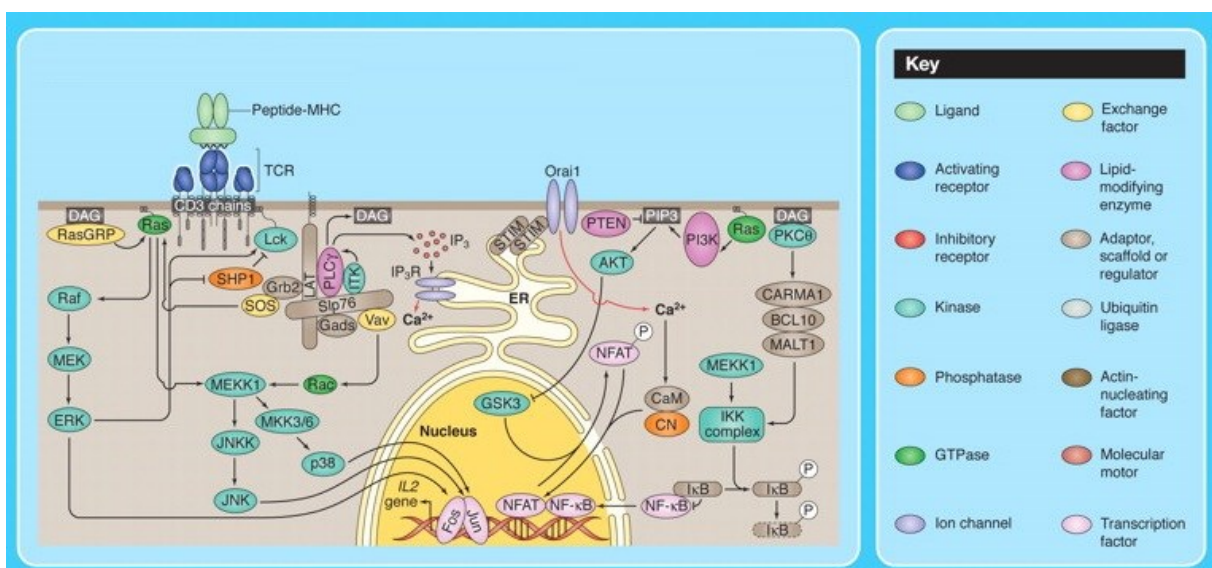
a diacylglycerol (DAG). Navázáním vzniklého IP₃ na kalciové kanály endoplazmatického retikula (ER) dojde k vylití vápenatých iontů do cytoplazmy.

Na základě poklesu koncentrace Ca²⁺ v ER dochází k otevření vápníkových kanálů plazmatické membrány a navýšení jeho koncentrace v cytoplazmě. Vysoce koncentrovaný vápenatý iont se váže na enzym kalmodulin, který aktivuje fosfatázu kalcineurin. Substrátem kalcineurinu jsou transkripční faktory rodiny NFAT (nukleární faktor aktivovaných T buněk), které jsou za klidové stavu fosforylovány, což brání jejich přechodu do jádra a spuštění transkripce (Oh-hora & Rao, 2008).

Druhým produktem hydrolýzy PIP₃ je molekula DAG, která zůstává navázaná v plazmatické membráně a spouští kaskádu vazeb a aktivací dalších proteinů, která začíná zapojením proteinkinázy Cθ a končí degradací inhibitoru NFκB. Následně dochází k translokaci NFκB do jádra a spuštění exprese příslušných proteinů. Jedním z proteinů, které se začnou produkovat je i represor NFκB, čímž dochází k vytvoření regulační smyčky, která brání nadměrné aktivaci (Nelson et al., 2004).

Třetí a poslední cesta aktivačního signálu využívá malé GTPázové molekuly Ras a Rac, ty mohou být do signalizace zapojeny dvěma způsoby, buď přes zmíněný LAT signalosom nebo pomocí membránově vázaného DAG. Aktivita těchto enzymů vede ke spuštění kinázové kaskády MAPK/ERK. Následuje fosforylace proteinu Jun, změna jeho konformace a navázání proteinu Fos. Vzniká tak dimer AP-1 (activator protein 1), který funguje jako transkripční faktor. Signalizační kaskáda MAPK/ERK také vede k aktivaci transkripčních faktorů, které zvyšují exprese Fos a Jun a umožňují tak zesílení signálu (Rincón et al., 2001). Signalizační dráhy T receptoru jsou přehledně znázorněny na obrázku č. 2.

Dosavadní znalosti funkcí T buněk, jejich regulačních mechanismů a interakcí s nádorovými buňkami vedly k výzkumu cílené protinádorové terapie pomocí geneticky upravených T buněk.



Obrázek č. 2: Přehled signalizačních drah T buněčného receptoru, upraveno podle (Huse, 2009)(adaptováno)

2.5 Imunoterapie hematologických malignit

Imunoterapie využívá přirozených mechanismů imunitního systému k posílení imunity pacienta a ke zničení nádorových buněk. Nejstarší imunoterapií je alogenní transplantace krvetvorných buněk, která byla poprvé provedena již v roce 1968 a až do dnešních dní zůstává v mnoha případech hematologických malignit jediným dlouhodobým řešením léčby choroby. Současná doba přináší na poli imunoterapie hematologických malignit řadu terapeutických možností.

Již v roce 1997 byla schválena první anti-CD20 monoklonální protilátka – Rituximab, pro použití k terapii B buněčných malignit. Jejím navázáním na molekulu CD20 dochází k rozpoznání a k zabití buňky pomocí komplementu nebo pomocí buněk imunitního systému.

Zajímavou kapitolou jsou bispecifické protilátky aktivující T buňky (Bispecific T cell engagers – BiTEs), které obsahují dva variabilní protilátkové fragmenty. Jeden z nich obsahuje anti-CD3 specifitu, na tento fragment je pak vázán linker s částí, která rozpoznává povrchový antigen nádorové buňky. Tímto způsobem jsou T buňky a nádorové buňky po navázání bispecifické protilátky fyzicky připojeny a může dojít k vytvoření imunologické synapse. Spuštění T buňky pak probíhá na MHC molekulách nezávislým způsobem. Jedním z prvních přípravků byl Blinatumomab, obsahující dvojitou specifitu vůči molekulám CD3 a CD19, tento přípravek je součástí klinických studií pro terapii refrakterní ALL (Wu et al., 2015).

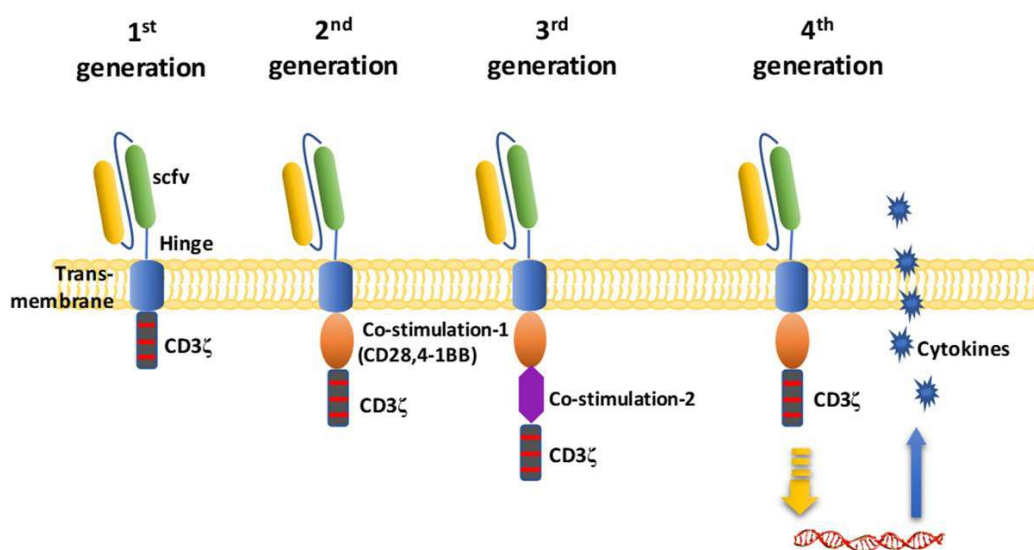
Další terapeutický přístup vychází z porozumění, jakým způsobem jsou nádorové buňky schopny bránit se imunitnímu dohledu a zneužívat regulační mechanismy imunitního systému. Jedním z těchto mechanismů je exprese inhibičních molekul na povrchu nádorových buněk, tzv. checkpointů. Na základě těchto zjištění byly připraveny checkpoint inhibitory, jejichž využití je v současné době především u pevných nádorů (Postow et al., 2015)(melanom a nemalobuněčný karcinom plic), nicméně použití inhibitorů PD-1/PD-L1 má úspěch i v léčbě Hodgkinova lymfomu (Armand, 2015).

Další možností je využít buněk imunitního systému, které zajišťují protinádorovou imunitu. Jsou to především T lymfocyty a NK buňky. Tyto buňky lze in vitro expandovat, geneticky modifikovat a poté podat pacientovi. Tato imunoterapeutická metoda se nazývá adoptivní transfer T lymfocytů (nebo NK buněk). Zdrojem těchto buněk mohou být imunitní buňky pacienta (autologní buňky) nebo buňky od vhodného zdravého dárce (alogenní buňky), jde tudíž o personalizovanou buněčnou terapii.

2.6 Chimerický antigenní receptor

Pro úspěšnou protinádorovou léčbu T lymfocyty je ideální namnožit T lymfocyty specifické proti antigenu, které nádorové buňky exprimují na svém povrchu. Pomocí genetické modifikace T lymfocytů lze takovou specifitu buňkám dát, a navíc ovlivnit jejich aktivační a proliferační potenciál. K těmto účelům byly zkonstruovány tzv. chimerické antigenní receptory (CARy).

Chimerické antigenní receptory jsou uměle připravené receptory, jejichž specifita je získaná z monoklonální protilátky. Jednotlivé části receptoru jsou různého původu, odtud název chimerický. Nejčastější struktura CAR kombinuje extracelulární část tvořenou vazebným místem pro antigen z monoklonální protilátky a intracelulární doménu T-buněčného receptorového komplexu (TCR), jako například CD3 ζ řetězec. První CAR byl připraven v letech 1989-1993 (Eshhar et al., 1993; Gross et al., 1989). CAR T lymfocyty jsou schopné rozpoznávat antigeny na nádorových buňkách nezávisle na jejich prezentaci přes MHC molekulu (Rossig & Brenner, 2004). V průběhu vývoje CARů se do jejich struktury přidala jedna nebo více domén kostimulačních molekul jako je CD28 nebo 4.1-BB. Tato úprava umožňuje delší přežívání CAR T buněk v krvi pacienta a zlepšuje protinádorovou aktivitu. Struktura a různé vývojové stupně (generace) molekuly CAR jsou shrnuty v obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Vývoj struktury molekuly CAR (L. Zhao & Cao, 2019)(adaptováno)

Intracelulární signalizační doména CAR molekuly se s časem měnila.

První generace obsahovala pouze molekulu CD3 ζ , která byla dostatečná pro přenos aktivačního signálu.

Následující generace pak vnesly kostimulační molekulu, respektive molekuly.

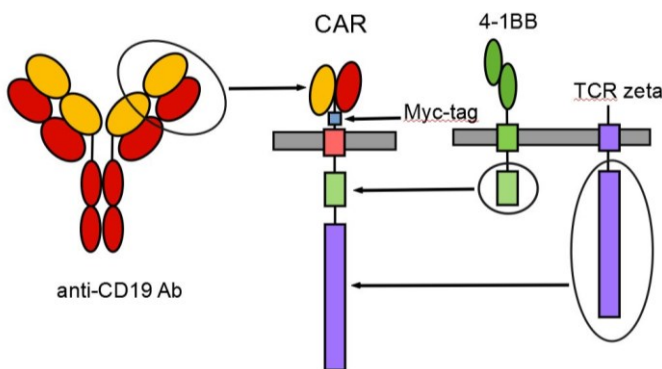
Současná čtvrtá generace má další modifikace, které např. aktivují transkripční faktory pro cytokiny poté co CAR rozpozná antigen

2.6.1 Struktura našeho CAR

V naší laboratoři pracujeme se strukturou molekuly CAR, která vychází z druhé generace. Intracelulární signalizační část obsahuje pouze jednu kostimulační molekulu, v našem případě intracelulární doménu z molekuly 4.1-BB (CD137) a dále signalizační molekulu CD3 ζ .

Transmembránová část a hinge oblast byla odvozena z molekuly CD8. Do hinge oblasti je v případě některých CAR molekul (např. proti molekule PSMA nebo molekule CLL1) vložena krátká aminokyselinová sekvence zvaná Myc-tag (Terpe, 2003), která je využívána pro detekci molekuly CAR, zároveň může sloužit ke specifické stimulaci CAR T buněk.

Zbytek extracelulární domény tvoří jednořetězcový variabilní fragment (single-chain Fragment variable – scFv), který obsahuje variabilní část lehkého a variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinové molekuly, které jsou spojeny přes krátkou sekvenci aminokyselin zvanou linker. Extracelulární doména zajišťuje specifitu celé CAR molekuly, zjednodušená struktura CAR molekuly proti CD19 je na obrázku č. 4. V rámci práce byly použity CAR molekuly se třemi různými specifitami. PSMA specifických CAR (Zuccolotto et al., 2014), CLL1 specifický CAR (Ma et al., 2019) a CD19 specifický CAR (Sadelain, 2017).



Obrázek č. 4: Obecná struktura molekuly CAR19 používaná v naší laboratoři

2.7 Genetická modifikace T buněk

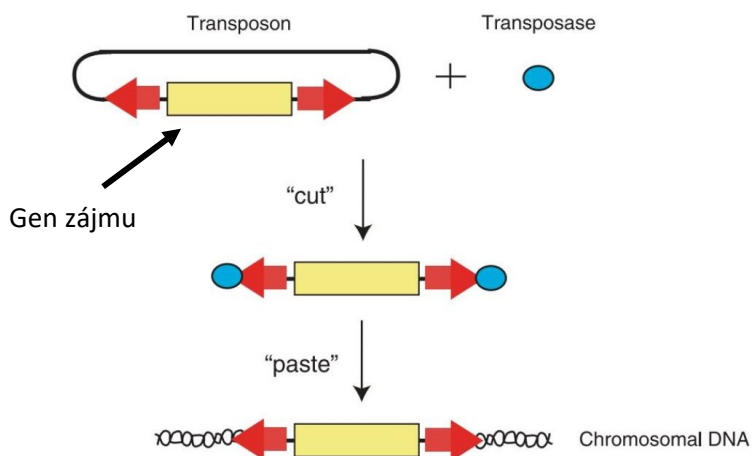
Jak již bylo zmíněno, specifitu T buněk lze zajistit genetickou modifikací. Do DNA T buněk je možné vnášet další geny, jako například zmíněný CAR nebo gen pro exogenní optimalizovaný T receptor známé specifity. Oba tyto přístupy byly testovány v klinických studiích a oba prokázaly svou efektivitu v protinádorové imunitě (Morgan et al., 2010). Hlavním tématem výzkumu tedy zůstává, jakým způsobem nejefektivněji a nejbezpečněji vkládat genetickou informaci do cílových buněk a jak vylepšit efektivitu takto modifikovaných imunitních buněk *in vivo*.

K doručení genu do buněk bývají používány retrovirové nebo lentivirové vektory (Stanislowski et al., 2001), ale ty jsou limitovány velikostí přenášené DNA sekvence. Navíc práce s těmito vektory vyžaduje specifické bezpečnostní protokoly, což vede k navýšení výrobní ceny. Další možností je elektroporace dané genetické informace v podobě mRNA, ale tento postup je limitován nestabilitou mRNA a její expresí v modifikovaných buňkách. Také by bylo složité mRNA přístup dimenzovat pro velkovýrobu za účelem klinického použití (Y. Zhao et al., 2006).

V současné době se hodně využívá transpozonových vektorů obsahujících elementy pro integraci do hostitelské DNA pomocí enzymu transpozázy na základě „cut and paste“ systému.

2.7.1 PiggyBac transpozonový systém

Systém modifikace T buněk pomocí transpozonů umožňuje použití inzertů bez omezení velikosti. To umožňuje vkládání značně komplexních genů, které obsahují kromě CAR i gen pro sekreci cytokinu a další modifikující sekvence. Použitím transpozonového systému je v porovnání s ostatními metodami ekonomičtější, nevyžaduje využití virů a umožňuje dlouhodobou expresi, díky integraci DNA. K tomu se využívá enzym transpozáza, která je schopna danou sekvenci DNA integrovat do genomu modifikované buňky. Nevýhodou systému je náhodnost umístění vkládaného genu, která s sebou přináší riziko mutace, ale při správně nastavených kultivačních podmínkách jsou selektovány pouze žádoucí buňky. V současnosti je více než deset užívaných transpozonů, které byly izolovány z různých organismů (Ivics et al., 2009). Piggy Bac transpozonový systém využívaný v naší laboratoři je založen na expresním vektoru pBase, který obsahuje gen pro piggyBac transpozázu a plazmid s inzertem, na jehož obou stranách jsou invertované terminální sekvence (ITR). Tyto ITR sekvence transpozáza rozpozná, v těchto místech inzert vyštěpí a integruje ho do hostitelské DNA (viz obrázek č. 5).



Obrázek č. 5: Schéma integrace genu zájmu do genomu buňky

3 Cíl práce

V rámci této práce byly zvoleny tři cíle.

Prvním z nich byla příprava CAR T buněk specifických proti molekule CD19. Pro tento účel byly zvoleny dva plazmidy se sekvencí CAR proti CD19, z nichž jeden obsahoval navíc gen pro interleukin 21 a druhý nikoli. Na základě tohoto rozdílu pak byla porovnána funkčnost připravených CAR T buněk.

Druhým cílem bylo zjistit, zda po elektroporaci plazmidu se sekvencí CAR spolu s plazmidem se sekvencí genu pro EGFP dojde k integraci obou inzertů a zda lze procento EGFP pozitivních buněk zaměnit za procento CAR T pozitivních buněk.

Třetím cílem bylo zkonstruovat chimérický antigenní receptor specifický proti molekule CLL1, který by obsahoval gen pro interleukin 21, a následně ověřit jeho funkčnost.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Buněčné kultury

Primární (pacientské vzorky), kostní dřeň

- **PBMC** (získané od dárců ÚHKT): zpracování viz Metody
- **Plná krev pacientů s CLL**: zpracování viz Metody

Buněčná linie

- **RAMOS**: B lymfocyty lidského Burkittova lymfomu (ATCC® CRL-1596™)

4.1.2 Bakteriální kmeny

- **TaKaRa Stellar competent cells** (*Escherichia coli HST08*) (TaKaRa Clontech)

4.1.3 Plazmidové DNA vektory (piggyBac transpozonový systém)

- **pBASE**: vektor kódující transpozázu pro integraci vybraného genu do genomu buňky
- **pPB-CAR19**: vektor kódující CAR se specifitou proti molekule CD19
- **pPB-NFAT IL-21 CAR19**: vektor kódující CAR proti molekule CD19 obsahující část pro inducibilní sekreci IL-21 pod NFAT promotorem
- **pPB-CLL1**: vektor kódující CAR se specifitou proti molekule CLL1
- **pPB-NFAT IL-21 CLL1**: vektor kódující CAR proti molekule CLL1 obsahující část pro inducibilní sekreci IL-21 pod NFAT promotorem
- **pPB-PSMA**: vektor kódující CAR se specifitou proti molekule PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen)
- **pPB-EGFP**: vektor kódující molekulu EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)

4.1.4 Protilátky

Nekonjugované

- **α -CD3** (Miltenyi Biotec): CD3 Pure – Functional Grade, Human, Clone OKT3 – myší monoklonální protilátka typu IgG2a κ proti lidské molekule CD3; 100 μ g/ml
- **α -CD28** (Miltenyi Biotec): CD28 Pure – Functional Grade, Human, Clone 15E8 – myší monoklonální protilátka typu IgG1 proti lidské molekule CD28; 100 μ g/ml
- **α -Myc** (Exbio): Anti-c-Myc tag Purified, Human, Clone 9E10 – myší monoklonální protilátka typu IgG1 proti molekule Myc-tag; 1 mg/ml

Konjugované s fluorochromem

- **Goat anti-Mouse-Alexa Fluor 647** (Jackson ImmunoResearch): kozí polyklonální F(ab')₂ fragment typu IgG (H+L) proti myší protilátce, konjugovaný s fluorochromem Alexa Fluor 647
- **Anti-CD3-BV786** (BD Biosciences): BV786 Mouse Anti-Human CD3, Human, Clone UCHT1 – myší monoklonální protilátka typu IgG1 proti molekule CD3, konjugovaná s fluorochromem BV786
- **Anti-CD8-PE-Cy7** (Exbio): Anti-Hu CD8 PE-Cy7, Human, Clone MEM-31 – myší monoklonální protilátka typu IgG2a proti molekule CD8, konjugovaná s fluorochromem PE-Cy7
- **Anti-CD69-PE** (Exbio): Anti-Hu CD69 PE, Human, Clone FN50 – myší monoklonální protilátka typu IgG1 proti molekule CD69, konjugovaná s fluorochromem PE
- **Anti-CD107a-APC** (Exbio): Anti-Hu CD107a APC, Human, Clone H4A3 – myší monoklonální protilátka typu IgG1 kappa proti molekule CD107a, konjugovaná s fluorochromem APC
- **Anti-CLL1** (BioLegend): APC Anti-human CD371 (CLEC12A), Human, Clone 50C1 – myší monoklonální protilátka typu IgG2 proti molekule CD371, konjugovaná s fluorochromem APC
- **Anti-Myc-FITC** (Exbio): Anti-c-Myc tag FITC, Human, Clone 9E10 – myší monoklonální protilátka typu IgG1 proti molekule Myc-tag, konjugovaná s fluorochromem FITC; 1 mg/ml

4.1.5 Antibiotika

- **Pro selekci bakterií**
 - **Ampicilin** (BIOTIKA 0,5): koncentrace v médiu 100 µg/ml
 - **Kanamycin** (Thermo Fisher Scientific): koncentrace v médiu 50 µg/ml
- **Do kultivačních médií**
 - **Penicilin-Streptomycin** (Thermo Fisher Scientific): koncentrace v médiu 100 U/ml Penicilinu, 100 µg/ml Streptomycinu; zásobní roztok (P 10 000 U/ml, Streptomycin 10 000 µg/ml)

4.1.6 Cytokiny

- **Lidský IL-2** (R&D Systems): rekombinantní lidský IL-2, koncentrace v médiu 1 000 U/ml; zásobní roztok 1 000 000 U/ml
- **Lidský IL-4** (BIOMEDICA ČS, s.r.o.): rekombinantní lidský IL-4, koncentrace v médiu 40 ng/ml; zásobní roztok 100 µg/ml
- **Lidský IL-7** (BIOMEDICA ČS, s.r.o.): rekombinantní lidský IL-7, koncentrace v médiu 20 ng/ml; zásobní roztok 100 µg/ml
- **Lidský IL-21** (BIOMEDICA ČS, s.r.o.): rekombinantní lidský IL-21, koncentrace v médiu 50 ng/ml; zásobní roztok 100 µg/ml

4.1.7 Kultivační média

Pro tkáňové kultury

- **CellGro® GMP DC Medium** (CellGenix):
 - Doplněno 10 % fetálního bovinního séra (FBS) a 1 % ATB (PenStrep)
- **DMEM** (Sigma-Aldrich)
 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose
 - Doplněno 10 % FBS a 1 % ATB
- **RPMI-1640** (Sigma-Aldrich)
 - Roswell Park Memorial Institute Medium
 - Doplněno 10 % FBS a 1 % ATB

Pro bakterie

- **LB agar** (Duchefa Biochemie)
 - Do 300 ml ddH₂O 10,5 g agaru (LB Broth High Salt) => sterilizace v autoklávu
- **LB médium** (Duchefa Biochemie)
 - Do 300 ml ddH₂O 6 g agaru (LB Broth Low Salt) => sterilizace v autoklávu
- **S.O.C. médium** (TaKaRa Bio)
 - 2 % trypton, 0,5 % extrakt z kvasinek, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ a 20 mM glukóza

4.1.8 Enzymy

- **Restrikční enzymy a pufr** (New England BioLabs)
 - **Apal**: 10 000 U/ml
 - **BamHI**: 20 000 U/ml
 - **EcoRI-HF**: 20 000 U/ml
 - **CutSmart® Buffer** (10x)
 - **T4 DNA Ligase Buffer s 10 mM ATP** (10x)
- **rSAP** (New England BioLabs)
 - Shrimp Alkaline Phosphatase, koncentrace 1000 U/ml
- **T4 DNA Ligase** (New England BioLabs): koncentrace 400 000 U/ml

4.1.9 Roztoky

- **FACS pufr**: 1 % BSA, 0,1 % Azid Sodný, doplněno 1x PBS do 400 ml
- **1x PBS** (Lonza): Zásobní roztok 10x PBS (0,017 M KH₂PO₄, 0,05 M Na₂HPO₄, 1,5 M NaCl, pH 7,4) ředěno desetkrát ddH₂O na 1x PBS => sterilizace v autoklávu

- **TBE pufr** (Duchefa Biochemie): 17,02 g TBE na 1 l ddH₂O
- **Roztok Trypsin-EDTA**: 0,05 % trypsin, 0,5 mM EDTA, doplněno 1x PBS do 100 ml

4.1.10 Pufry

Komerční soupravy a reagensie

- **ELISA Kit Human IL-21** (BioLegend)
- **GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain** (Biotium)
- **MassRuler DNA Loading Dye (6x)** (Thermo Fisher Scientific)
- **Metafectene®** (Biontex)
- **Neon™ Transfection System 100 µl Kit** (Invitrogen)
- **QIAprep Spin Miniprep Kit** (QIAGEN)
- **QIA Plasmid Midi/Maxi KIT** (QIAGEN)
- **QIAquick Gel Extraction Kit** (QIAGEN)

4.1.11 Chemikálie

- **Aceton** (Lach-Ner)
- **Agaróza SeaKem®** (Lonza)
- **Azid sodný** (Sigma-Aldrich)
- **BSA**, bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich)
- **CFSE** (Sigma-Aldrich)
- **dH₂O**, deionizovaná voda
- **DMSO**, dimethyl sulfoxid (Sigma-Aldrich)
- **DAPI**, 4',6-diamidin-2-fenylindol (Sigma-Aldrich), ředění 1:2000
- **EDTA** (Lachema)
- **Ethanol** (PENTA s.r.o.)
- **FBS** (Thermo Fisher Scientific)
- **Ficoll Paque Plus** (GE HealthCare)
- **Glycerol** (Sigma-Penta)
- **H₂SO₄** (Lach-Ner)
- **HEPES** (Sigma-Aldrich)
- **Isopropylalkohol** (PENTA s.r.o.)
- **L-glutamin** (Thermo Fisher Scientific): koncentrace v médiu 2 mM; zásobní roztok 100 ml (200 mM)
- **Trypan Blue Solution** (Sigma-Aldrich)

4.1.12 Přístroje

- **BD LSRFortessa™** (BD Biosciences) – průtokový cytometr s 5 lasery (355 nm, 405 nm, 488 nm, 561 nm a 640 nm)
- **Bio-Rad Sunrise** (TECAN) – ELISA reader
- **Heraeus Labofuge 400R** (HERAEUS) – stolní centrifuga pro práci s tkáňovými kulturami
- **Heraeus Multifuge 3 S-R** (HERAEUS) – velká stolní centrifuga s chlazením a výměnnými rotory
- **HeraSafe HS12** (HERAEUS) – laminární box pro práci s bakteriálními kulturami
- **HeraSafe 2030i** (Trigon Plus) – laminární box pro práci s tkáňovými kulturami
- **Leica DMI1** (Leica Microsystems) – invertovaný mikroskop pro buněčné kultury
- **M-24** (Boeco Germany) – malá stolní centrifuga bez chlazení
- **NanoDrop® One** (ThermoFisher Scientific) – spektrofotometr pro měření koncentrace DNA
- **Neon® Transfection System** (Invitrogen) – elektroporátor pro transfekci PBMC
- **Orbitální inkubátor IST-4075** (JeioTech) – třepačka s nastavitelnou rychlostí a teplotou
- **Uvidoc HD6** (Uvitec) – UV transiluminátor pro pozorování gelů po elektroforéze

4.2 Metody

4.2.1 Sterilizace a likvidace infekčního odpadu

- Sterilizace roztoků a skla byla prováděna ústavními laboranty v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 215 kPa po dobu 30 minut. Roztoky, které není možné sterilizovat v autoklávu, jsou filtrovány přes 0,22 µm filtr.
- Infekční odpad byl sterilizován v autoklávu za stejných podmínek uvedených výše, GMO odpad zpracováván specializovanou firmou.

4.2.2 Práce s tkáňovými kulturami

Všechna práce s tkáňovými kulturami byla prováděna v laboratoři tkáňových kultur v laminárním boxu za aseptických podmínek.

Izolace PBMC z plné krve

- Transfúzní vaky s plnou krví (objem cca 50 ml) byly získány od zdravých dárců z transfúzního oddělení ÚHKT.
- V laminárním boxu byla sterilními nůžkami nastřížena hadička transfúzního vaku a obsah přenesen do lahvičky, z lahvičky bylo odebráno 30–50 ml plné krve, která se naředí 1x PBS v poměru 1:1.
- Do 50 ml plastových centrifugačních zkumavek se napipetovalo 15 ml Ficoll Paque Plus, na jeho hladinu se pak po stěně nádoby opatrně navrstvilo 25 ml ředěné plné krve tak, aby se tyto tekutiny nepromíchaly.
- Zkumavky byly vloženy do centrifugy, a točeny 30 minut při pokojové teplotě rychlostí 800 g (2000 RPM) bez brzdy (bez podpory zrychlování a zpomalování).
- Po centrifugaci a vytvoření hustotního gradientu byla odstraněna horní vrstva tvořená krevní plazmou a do čistých 50 ml zkumavek byl odebrán bílý prstenec obsahující PBMC.
- Izolovaný prstenec PBMC byl doplněn 1x PBS do objemu 40 ml.
- Následná centrifugace buněčné suspenze probíhala 10 minut při pokojové teplotě rychlostí 800 g (2000 RPM) s brzdou.
- Supernatant byl po centrifugaci odlit, peleta PBMC opět promyta naředěním v 1x PBS do objemu 40 ml.
- Poslední promývací centrifugace probíhala 10 minut při pokojové teplotě rychlostí 200 g (1000 RPM) s brzdou.
- Po odstranění supernatantu byly pelety PBMC z více zkumavek spojeny do jedné a naředěny do objemu 10 ml 1x PBS.

- Z buněk byl odebrán vzorek pro počítání buněk.
- Pro kultivaci byly buňky centrifugovány, odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v kultivačním médiu CellGro na koncentraci 15-20 x 10⁶ buněk na ml. Poté byly přeneseny do kultivační lahve a umístěny do inkubátoru CO₂ s 37 °C a 5 % CO₂.

Zamrazení buněk

Dlouhodobé uchování tkáňových kultur a PBMC bylo zajištěno umístěním buněk v mrazícím médiu do kontejnerů v tekutém dusíku (- 196 °C). Spočítané buňky byly mrazeny v množství 20–50 x 10⁶ buněk v mrazících zkumavkách o objemu 1 ml.

- S předstihem byl v lednici vychlazen mrazící kontejner Mr. Frosty (Nalgene®).
- Na požadované množství buněk bylo připraveno mrazící médium (90 % FBS + 10 % DMSO) v 10 % nadbytku.
- Buňky byly centrifugovány 5 minut při pokojové teplotě rychlostí 300 g (1200 RPM), po centrifugaci byl odstraněn supernatant.
- Buňky byly promíchány v požadovaném množství mrazícího média a přeneseny do mrazících zkumavek, které byly následně vloženy do mrazícího kontejneru.
- Mrazící kontejner byl následně přenesen do mrazícího boxu – 80 °C.
- Za 24 hodin byl mrazící kontejner vyndán z mrazícího boxu a zkumavky byly přesunuty do krabiček v kontejneru v tekutém dusíku. Mrazící kontejner byl poté ponechán v pokojové teplotě, osušen a před dalším použitím v něm byl zkontrolován obsah isopropanolu.

Rozmrazení buněk

- Před samotným rozmražením bylo připraveno vytemperované médium RPMI (pro tkáňové kultury), případně CellGro (pro PBMC dárců nebo pacientů) na 37 °C a připravena vodní lázeň stejné teploty.
- Z kontejneru v tekutém dusíku bylo odebráno potřebné množství mrazících zkumavek obsahující buňky, které byly postupně rozmrazeny ve vodní lázni. Obsah zkumavky byl přenesen do 15 ml centrifugační zkumavky, mrazící zkumavka byla propláchnuta 1 ml temperovaného média, který byl přidán do centrifugační zkumavky.
- Do centrifugační zkumavky byly postupně za stálého promíchávání přidány 4 ml temperovaného média.
- Buňky byly následně centrifugovány 5 minut při pokojové teplotě rychlostí 300 g (1200 RPM), po stočení byl odebrán supernatant. Buňky byly promíchány v 5 ml temperovaného média a následně zpracovány či kultivovány.

Pasážování

- **Kultivace CAR T lymfocytů**

CAR T lymfocyty byly kultivovány dle množství buněk v kultivačních destičkách různých objemů (3 ml, 6 ml, 15 ml), případně kultivačních lahvích s plochou dna 25 cm².

Pasážování buněk bylo prováděno 3x týdně. Optimální koncentrace buněk byla v rozmezí 1–2 x 10⁶ buněk na ml CG média. Do média se přidávaly cytokiny IL-2 nebo IL-4 a IL-7 nebo IL-4, IL-7 a IL-21, podle druhu experimentu.

Pasážované buňky byly udržovány v maximálním objemu 8–10 ml odebráním části média s buňkami a přidáním čerstvého média s cytokiny.

- **Pasážování buněčných linií**

Použita byla lidská buněčná linie RAMOS.

Pasáž byla prováděna 2x týdně. Optimální koncentrace buněk byla v rozmezí 1–2 x 10⁶ buněk na ml média. Buňky byly udržovány ve 20–30 ml RPMI média odebráním části média s buňkami a přidáním čerstvého média.

Aktivace CAR T lymfocytů a PBMC

- Aktivace byla prováděna pomocí protilátek adheovaných na povrchu kultivační destičky.
- V laminárním boxu byla do prázdné jamky 24 jamkové destičky pipetována směs protilátek (2 μl CD3 + 2 μl αCD28, nebo 2 μl αMYC) ve 200 μl 1x PBS.
- Destička byla poté inkubována 1 hodinu v CO₂ inkubátoru při 37 °C.
- Následně bylo z jamky opatrně odebráno PBS s protilátkami, jamka byla dvakrát opatrně promyta 1 ml čistého PBS (přidáno po stěně, aby proud kapaliny neodmyl protilátky na dně).
- Do prázdné jamky s adheovanými protilátkami bylo ihned pipetováno médium s buňkami určenými k aktivaci.

Počítání buněk v Bürkerově komůrce

Buňky byly počítány v Bürkerově komůrce po barvení trypanovou modří.

- Z důkladně promíchané suspenze buněk bylo odebráno 30 μl a naředěno 120 μl PBS v jamce 96 jamkové destičky s kulatým dnem. Směs byla dobře promíchána pipetováním a z ní bylo 30 μl přeneseno do jamky s 30 μl trypanové modře. Vzorek byl promíchán a cca 30 μl napipetováno do Bürkerovy komůrky. Tímto způsobem bylo získáno ředění 10x.
- Pod mikroskopem bylo počítáno množství neobarvených buněk v pěti velkých čtvercích rámovaných dvojitou čarou, zároveň byly počítány pouze buňky dotýkající se dvou krajních dvojitých čar každého velkého čtverce.

- Výpočet množství buněk na ml je následovný:
(počet buněk/množství počítaných čtverců) × ŘEDĚNÍ × 10⁴ = počet b/ml

4.2.3 Práce s bakteriálními kulturami

Práce s bakteriálními kulturami byla prováděna v bakteriální laboratoři, v laminárním boxu a na pracovním stole.

Příprava bakteriálních misek

- Pro přípravu misek pro bakteriální kultivaci byl využíván LB agar.
- V mikrovlnné troubě byl pevný agar opatrně zahříván a průběžně promícháván, až do úplného rozpuštění.
- Nádoba s LB agarem byla následně ponechána k vychladnutí. Poté bylo přidáno odpovídající množství antibiotika:
Ampicilin ředěn 1000x (výsledná koncentrace 100 µg/ml)
Kanamycin ředěn 400x (výsledná koncentrace 50 µg/ml)
- Směs byla promíchána a poté nalita na prázdné Petriho misky, po zatuhnutí byly misky popsány datem přípravy a použitým typem antibiotika.

Transformace bakterií

- Jako kompetentní buňky byly použity **TaKaRa Stellar competent cells**, uchovávané v –80 °C.
- Kompetentní buňky byly společně s prázdnými mikrozkuvkami vloženy do nádoby s ledem, buňky byly ponechány přibližně 10 minut na ledu k rozmrazení. Zároveň bylo temperováno S.O.C. médium na teplotu 37 °C.
- Kompetentní buňky byly opatrně promíchány a v objemu 50 µl byly pipetovány do čisté vychlazené mikrozkuvky.
- K buňkám byly přidány 2 µl plazmidové DNA, respektive směsi DNA po ligaci.
- Mikrozkuvka byla ponechána 30 minut na ledu, pak byla šokově zahřáta na teplotu 42 °C po dobu přesně 45 vteřin a poté vrácena na 1–2 minuty na led. Po uplynutí této doby bylo k buňkám přidáno 300 µl temperovaného S.O.C. média a mikrozkuvka s buňkami byla inkubována hodinu při teplotě 37 °C.
- Z inkubovaných buněk bylo 50 µl následně rozetřeno na misky s agarem a s příslušným antibiotikem. Misky byly přes noc inkubovány v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C.

Kultivace

- Z bakteriálních misek se pomocí sterilního párátko nebo špičky jednotlivě vypíchly narostlé kolonie a byly jimi zainokulovány skleněné erlenmeyerovy baňky se 100 ml tekutého LB média a příslušným antibiotikem.
- Baňky byly přesunuty do třepačky, kde byly ponechány přes noc při teplotě 37 °C a rychlosti 200 RPM.
- Namnožené bakterie byly použity k tvorbě bakteriálních konzerv, případně přípravě mini, midi či maxi DNA prepů.

Příprava bakteriálních konzerv

- Do čisté mikrozkušavky bylo pipetováno 500 µl 30 % glycerolu a 500 µl namnožených bakterií v LB médiu, obsah mikrozkušavky byl převrácením rychle promíchán a mikrozkušavka byla vložena do nádoby s ledem. Vzniklá bakteriální konzerva příslušného plazmidu byla skladována v – 80 °C.

Příprava miniprepů

- K izolaci DNA byla použita souprava QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit, pufr P2 s obsahem **LyseBlue** (modrý indikátor úspěšné lýzy)
- Ke všem centrifugacím byla použita stolní centrifuga M-24 a centrifugace byly prováděny při pokojové teplotě.
- Z média s namnoženými bakteriemi byl odebrán 1 ml směsi do mikrozkušavky a centrifugován 5 minut rychlostí 10 000 g.
- Supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována v 200 µl pufru P1.
- Do zkumavky bylo přidáno 200 µl pufru P2 a promícháno otáčením mikrozkušavky, poté byla zkumavka ponechána 5 minut při pokojové teplotě. Dostatečná lyzace byla ověřena vizuálně podle modré barvy roztoku.
- Dále bylo do zkumavky přidáno 200 µl pufru P3 a zkumavka byla promíchána až do zblednutí roztoku.
- Zkumavka byla centrifugována 5 minut rychlostí 15 000 g, supernatant byl přenesen do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a k němu byl přidán 1 ml 96 % ethanolu. Směs byla následně vložena na 30 minut do mrazicího boxu (- 20 °C).
- Zkumavka byla centrifugována 15 minut rychlostí 15 000 g, supernatant byl odstraněn. Peleta byla resuspendována v 500 µl 70 % ethanolu. Po centrifugaci 5 minut rychlostí 15 000 g byl odstraněn supernatant.

- Mikrozkušavka byla otočena dnem vzhůru a položena na buničinu, takto byla peleta sušena do zprůhlednění. Nakonec byla peleta resuspendována ve 25 μ l sterilní dH₂O.

Příprava midiprepů a maxiprepů

- K izolaci DNA byla použita souprava QIAGEN Plasmid Midi Kit **(A)**, nebo QIAGEN Plasmid Maxi Kit **(B)** a pufr P2 s obsahem **LyseBlue** (modrý indikátor úspěšné lýzy).
- Médium s namnoženými bakteriemi bylo přepipetováno do 50 ml centrifugačních zkumavek, zkumavky byly centrifugovány 15 minut rychlostí 6000 g při teplotě 4 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant.
- Bakteriální pelet byl resuspendován ve 4 ml (A), respektive 10 ml (B) pufru P1. Následně byl přidán objem 4 ml (A), respektive 10 ml (B) pufru P2 (roztok zmodrá), centrifugační zkumavky byly promíchány otáčením a ponechány 5 minut při pokojové teplotě. Dále k nim bylo přidáno 4 ml (A), respektive 10 ml (B) roztoku P3, zkumavky byly opět promíchány otáčením do zblednutí roztoku, poté byly zkumavky inkubovány na ledu 15 minut (A), respektive 20 minut (B).
- Zkumavky byly centrifugovány 30 minut rychlostí 10 000 g při teplotě 4 °C. V mezičase byla připravena QIAGEN kolona 100 (A), respektive 500 (B), do stojánku, pod ni byla vložena centrifugační zkumavka objemu 50 ml. QIAGEN kolona byla navlhčena objemem 4 ml (A), respektive 10 ml (B) pufru QBT. Průchozí pufr byl zachycen v odpadní zkumavce pod kolonou.
- Po centrifugaci byl přelit supernatant do připravené kolony (čistou špičkou bylo bráněno vstupu bílých shluků do kolony). Po průchodu supernatantu kolonou byla kolona propláchnuta 2x 10 ml (A), respektive 2x 30 ml (B) pufru QC (odpadní zkumavka byla průběžně vyprazdňována).
- Pod kolonu byla připravena čistá centrifugační zkumavka o objemu 15 ml (A), respektive 50 ml (B). Pomocí 5 ml (A), respektive 15 ml (B) pufru QF byla z kolony vymyta DNA.
- Následně byla DNA vysrážena přidáním 3,5 ml (A), respektive 10,5 ml (B) isopropanolu pokojové teploty, směs byla silně protřepána a poté centrifugována 1 hodinu rychlostí 5000 g při 4 °C.
- Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a peleta s DNA byla promyta 2 ml (A), respektive 5 ml (B) 70 % ethanolu pokojové teploty. Poté byla směs centrifugována 1 hodinu rychlostí 5000 g při 4 °C.
- Následně byl odstraněn supernatant a peleta byla sušena do zprůhlednění.
- Na závěr byla peleta resuspendována v 50 μ l (A), respektive 200 μ l (B) sterilní dH₂O a vložena do 1,5 ml mikrozkušavky.

4.2.4 Práce s DNA

Restrikční štěpení

- Ke štěpení plazmidové DNA byly využity restrikčními enzymy společnosti NEB (New England Biolabs), štěpení bylo prováděno 60-120 minut v termobloku při teplotě odpovídající danému enzymu, nejčastěji 37 °C.
- Ve směsi pro enzymatické štěpení byla obsažena DNA, 10x ředěný pufr dle enzymu, restrikční enzym nebo enzymy (10–20 U enzymu na reakci) a dH₂O pro doplnění do celkového objemu 40 µl.

Defosforylace štěpeného plazmidu

- V případě restrikčního štěpení jedním enzymem byla provedena defosforylace kompatibilních konců, aby bylo zabráněno opětovného uzavření lineárního plazmidu.
- K defosforylaci vektoru byla použita fosfatáza rSAP v množství 1 U na štěpicí směs (8 µg DNA), fosfatáza byla přidána po restrikčním štěpení ke štěpicí směsi s vektorem.
- Defosforylace byla prováděna 30 minut při teplotě 37 °C, následně byla fosfatáza inaktivována inkubací směsi 15 minut při teplotě 65 °C.

Příprava gelu a DNA elektroforéza

- Pro práci s DNA byl používán 1 % agarózový gel. Ke 40 ml TBE pufru bylo přidáno 0,4 g agarózy, směs byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Dále byly přidány 2 µl GEL RED, směs byla promíchána v nádobě a obsah byl přelit do připravené vaničky. Následně byl do gelu vložen hřebínek (10 zubů pro izolaci, 12 zubů pro ověření štěpení) a gel se nechal ztuhnout.
- Vanička s gelem byla vložena do elektroforetické vany a zalita TBE puftrem, aby byl gel ponořený. Opatrně se vyndal hřebínek díky němuž v gelu vznikly jamky pro nanášení DNA.
- Do první jamky byly pipetovány 2 µl markeru (MassRuler DNA Ladder Mix). Následně byla do jamek pipetována směs vzorků a MassRuler DNA **Loading Dye 6x** (40 µl vzorku + 8 µl LD 6x).
- Elektroforetická vana byla zapojena do zdroje a pustil se elektrický proud při stejnosměrném napětí 100 V přibližně na 45 minut.
- Po ukončení elektroforézy byl gel s rozdělenou DNA přenesen pod kameru a pod UV zářením byl gel vyfocen a zdokumentován.

Izolace DNA z gelu

- K izolaci DNA z gelu byl využíván QIAquick Gel Extraction Kit, centrifugace byla prováděna v stolní centrifuze při pokojové teplotě.
- Na UV transluminátor byl vložen gel s DNA a pod UV zářením.

- Čistým ostrým skalpelem byly z gelu vyříznuty potřebné fragmenty DNA, které byly vybrány na základě porovnání velikosti s markerem. Takto vyřezané gelové fragmenty byly přeneseny do mikrozkuvek. Jednotlivé mikrozkuvky s fragmenty byly zváženy a váha byla zapsána. Na základě váhy gelu byly následně fragmenty zpracovány izolačním kitem, maximální přípustná váha gelu byla 300 mg na mikrozkuvku.
- Do mikrozkuvky byly přidány 3 díly pufru QG na 1 díl gelu (100 mg odpovídá přibližně 100 μ l).
- Poté byly mikrozkuvky inkubovány 10 minut při teplotě 50 °C, pro lepší rozpuštění gelu byly zkuvky průběžně vortexovány.
- Po úplném rozpuštění gelu byl přidán 1 díl isopropanolu na 1 díl gelu, roztok byl několikrát promíchán převrácením mikrozkuvky.
- Dále byla připravena speciální kolonka MinElute do 2 ml sběrné zkuvky.
- Do kolonky bylo pipetováno 700 μ l rozpuštěného gelu. Kolonka se sběrnou zkuvkou byla centrifugována 1 minutu rychlostí 17 900 g při pokojové teplotě. Sběrná zkuvka byla poté vylita a postup byl opakován do zpracování celého objemu rozpuštěného gelu.
- Do kolonky bylo přidáno 500 μ l pufru QG, kolonka se sběrnou zkuvkou byla centrifugována 1 minutu rychlostí 17 900 g při pokojové teplotě. Sběrná zkuvka byla vylita. Kolonka byla dále promyta přidavkem 700 μ l pufru PE, ponechána 3 minuty při pokojové teplotě a následně centrifugována 1 minutu rychlostí 17 900 g při pokojové teplotě.
- Kolonka MinElute byla přendána do čisté 1,5 ml mikrozkuvky. Doprostřed membrány kolonky bylo pipetováno 10 μ l sterilní dH₂O, následně byla 4 minuty ponechána v pokojové teplotě. Nakonec byla zkuvka s kolonkou centrifugována 1 minutu rychlostí 17 900 g při pokojové teplotě. V mikrozkuvce byl získán vyříznutý fragment DNA.

Ligace DNA fragmentů

- Ligace DNA fragmentů byla prováděna pomocí T4 DNA ligázy (New England Biolabs).
- Standardně bylo používáno 100 ng vektorové DNA na ligační reakci v poměru 1:3 (vektor: inzert). V ligační směsi byly dále obsaženy 2 μ l pufru pro T4 DNA ligázu (10x ředěný), 1 μ l T4 DNA ligázy a dH₂O (do 20 μ l).
- Připravená ligační směs byla inkubována přes noc při teplotě 16 °C a následně byla použita pro transformaci bakterií.

Stanovení koncentrace plazmidové DNA na přístroji NanoDrop®

- K měření byl využíván přístroj NanoDrop®.
- Po zapnutí přístroje a programu, byl přístroj kalibrován nanesením 2 µl dH₂O na měřicí terčík. Následně byly měřeny 2 µl blanku (roztok, ve kterém byla rozpuštěna DNA), v našem případě sterilní dH₂O. Poté byly měřeny vzorky opět o objemu 2 µl. Vzorky byly měřeny dvakrát, případně třikrát, výsledná koncentrace byla stanovena jako průměr měření. Na konci byl měřicí terčík očištěn vodou a přístroj byl vypnut.

4.2.5 Transfekce lidských buněčných kultur

Elektroporace – příprava CAR T buněk

- K elektroporaci byl použit přístroj Neon® a Neon™ Transfection System 100 µl Kit, zajišťující přenos plazmidů do PBMC buněk.
- Pro jednu elektroporaci bylo třeba 5 µg DNA a 100 µl T pufru a 10 × 10⁶ buněk. Protože elektroporovaný objem je jen 100 µl, což je limitující, většinou se jeden vzorek elektroporoval na několikrát – 2 až 5 elektroporací na vzorek. Proto se připravilo 2,5 až 5,5 krát víc DNA a pufru a buněk pro daný vzorek.
- K elektroporaci byly použity PBMC izolované čerstvě z krve dárců, maximálně však den po izolaci, které byly kultivovány v CG médiu bez cytokinů
- Buňky byly spočítány a byl odebrán objem s odpovídajícím počtem buněk.
- , následně byly buňky promyty PBS, centrifugovány 5 minut rychlostí 300 g (1200 RPM) při pokojové teplotě. Supernatant byl důkladně odstraněn a peleta buněk byla resuspendována v směsi T pufru a DNA.
- Do laminárního boxu byl připraven elektroporátor Neon®, elektroporační pipeta (pevný objem 100 µl), elektroporační špičky, kyvety a pufr E2. Kyveta byla naplněna pufr E2 nad elektrodu kyvety (přibližně 2,5 ml E2 pufru) a vložena do přístroje.
- Elektroporační pipetou byla důkladně promíchána směs PBMC a plazmidové DNA, bylo odebráno 100 µl směsi bez bublin (jejich přítomnost vede ke snížení efektivity elektroporace) a pipeta byla umístěna do elektroporační kyvety v přístroji. Buňky byly vystaveny elektrickému pulsu po dobu 20 ms při napětí 2300 V. Elektroporovaná směs v pipetě byla poté přenesena do mikrozkuhavky s 500 µl čistého média CellGro pokojové teploty.
- Na závěr byly centrifugovány elektroporované PBMC 5 minut při rychlosti 300 g (1200 RPM) při pokojové teplotě. Poté byl odstraněn supernatant, přidáno čisté médium s cytokiny a buňky přeneseny do 24 jamkové destičky, kde byly poté kultivovány při teplotě 37 °C v CO₂ inkubátoru.

4.2.6 Příprava buněk pro průtokovou cytometrii

Odběr buněk

- Buňky, které byly kultivovány v kultivačních lahvích, byly pipetováním řádně promíchány a spočítány. Pro cytometrickou analýzu bylo odebráno do FACS zkumavek $1,5 - 5 \times 10^6$ buněk, v závislosti na zastoupení hledané populace.

Promývání a barvení buněk

- Odebrané a spočítané buňky byly ve FACS zkumavkách promyty přidáním 1 ml PBS. Následně byly buňky centrifugovány 5 minut rychlostí 600 g při pokojové teplotě, poté byl odstraněn supernatant. Buňky byly opakovaně promyty 1 ml PBS, centrifugovány stejným způsobem a znovu byl odstraněn supernatant.
- Ke peletě buněk bylo přidáno 50 μ l protilátkového mixu v PBS. Pipetou byla promíchána peleta buněk a následně byla ponechána 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po nabarvení byly vzorky promyty přidáním 2 ml PBS, centrifugovány 5 minut rychlostí 600 g při pokojové teplotě, a byl odstraněn supernatant.
- Nakonec bylo přidáno 400 μ l čistého PBS a dále 100 μ l PBS s DAPI (výsledné ředění 1:2000). Vzorky byly takto připraveny k měření na průtokovém cytometru.

4.2.7 Měření buněčných vzorků na cytometru BD LSRFortessa

- Před samotným měřením byl zapnut průtokový cytometr BD LSRFortessa (společnost BD Biosciences) a systém fluidiky, dále byl spuštěn počítač a následně program BD FACSDiva. Před použitím byl přístroj propláchnut po dobu 5 minut dH_2O filtrovanou přes 0,22 μ m filtr.
- V mezičase byl nastaven program pro měřené vzorky, připraveny grafy se sledovanými parametry. Následným srovnáním nebarvených a plně barvených vzorků bylo nastaveno napětí na detektorech.
- V rámci samotného experimentu byly měřeny nebarvené kontroly, jednobarevné kontroly, FMO kontroly (barvený vzorek s jednou chybějící protilátkou) a plně barvené vzorky. Po ukončení měření byla data exportována ve formátu FCS k následné analýze. Přístroj byl po měření propláchnut 10 minut roztokem BD FACS Clean, 10 minut roztokem FACS Rinse a 10 minut filtrovanou dH_2O .
- Nakonec byly postupně vypnuty program FACSDiva, průtokový cytometr, počítač a systém fluidiky.
- Naměřená data byla poté analyzována v programu FlowJo.

4.2.8 Sekreční analýza IFN- γ průtokovou cytometrií

- Pro experiment byl použit IFN- γ Secretion Assay – Detection Kit (PE) (Miltenyi Biotec). Na lymfocyty se naváže „chytací“ protilátka (IFN- γ Catch Reagent), která vychytává IFN- γ sekretovaný lymfocyty do okolí. Pomocí fluorescenčně značené protilátky proti IFN- γ se poté buňky analyzují na průtokovém cytometru.
- Pomocí IFN- γ kitu byla ověřena schopnost CAR T buněk produkovat IFN- γ po stimulaci terčovými buňkami (RAMOS pro CAR T buňky se specifitou proti molekule CD19).
- Příprava kitu před použitím: Zásobní roztok MACS® BSA byl 20x ředěn autoMACS™ Rinsing roztokem. Dále bylo připraveno čisté médium RPMI (bez FCS nebo BSA). Část média a pufru byly ponechány na ledu při teplotě 2-8 °C. Část média byla temperovaná na teplotu 37 °C.
- Stimulace buněk: Efektorové CAR T buňky, u kterých byla zjišťována sekrece IFN- γ , byly stimulovány přidáním terčových buněk (RAMOS) v poměru 1:1. Buňky byly společně inkubovány 4 hodiny při 37 °C, 5 % CO₂.
- Po skončení inkubace bylo 10⁶ buněk/vzorek promyto 1 ml vychlazeného pufru a centrifugováno rychlostí 300 g (1200 RPM) 10 minut při 2-8°C. Pelet buněk byl resuspendován ve 90 μ l vychlazeného média, poté bylo k buňkám pipetováno 10 μ l **IFN- γ Catch** reagensie. Směs byla důkladně promíchána a 5 minut inkubovaná na ledu.
- Následně byl k buňkám pipetován 1 ml temperovaného RPMI média a buňky byly inkubovány 45 minut při 37 °C za občasného míchání.
- Poté se zkumavky s buňkami daly do ledu, byly promyty vychlazeným pufrům a centrifugovány rychlostí 300 g (1200 RPM) 10 minut při teplotě 2-8 °C. Po odpipetování supernatantu byla peleta buněk resuspendována v 90 μ l vychlazeného pufru. Ke směsi bylo pipetováno 10 μ l **IFN- γ Detection Antibody (PE)**
- Buňky byly důkladně promíchány a 10 minut inkubovány na ledu. Následně byly promyty 2 ml vychlazeného pufru, centrifugovány rychlostí 300 g (1200 RPM) 10 minut při teplotě 2-8 °C.
- Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v celkovém objemu 500 μ l PBS s DAPI (ředění 1:2000) a analyzovány na průtokovém cytometru.

4.2.9 ELISA IL-21

- Pro experiment byl použit ELISA Kit Human IL-21 (BioLegend).
- Pomocí ELISA kitu byla ověřena schopnost buněk produkovat IL-21 do média. Pro ELISA metodu se použije supernatant z buněk, které byly v definovaném počtu a v definovaném objemu média kultivovány, eventuálně stimulovány.

- Příprava kitu před použitím: Zásobní 20X Wash Buffer byl ředěn v dH₂O za vzniku 1X Wash Buffer.
- Vzorky byly analyzovány bez ředění.
- Postup: Všechny reagenty byly vytemperovány na pokojovou teplotu. Pro analýzu bylo přichystáno odpovídající množství pre-coatovaných jamek destičky, nadbytečné byly ponechány k pozdějšímu užití. Kalibrační řada se nanáší v duplikátech, vzorky v duplikátech či triplikátech.
- Lyofilizovaný lidský IL-21 byl rekonstituován v 200 ul Assay Buffer A za vzniku zásobního roztoku standardu o koncentraci 20 ng/ml. Rekonstituovaný interleukin byl ponechán 15 minut v pokojové teplotě, následně byl krátce vortexován.
- Připravily se zkušební skleničky pro kalibrační řadu St1 – St7 a Blank. Do zkušební skleničky St1 se napipetovalo 450 ul Assay Buffer A, do zkušebních skleniček St2 – St7 a do zkušební skleničky Blank se napipetovalo 250 ul Assay Buffer A.
- Ze zásobního roztoku standardu se 50ul napipetovalo do St1
- Zkušební sklenička St1 se zvortexovala, odebralo se z ní 250 ul do St2. Takto se ředěním dvojkovou řadou připravily i ostatní standardy, ve zkušební skleničce Blank zůstal pouze pufr.
- Tímto způsobem byla připravena kalibrační řada standardu IL-21 o koncentracích 2 000 pg/ml, 1 000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml a 31,3 pg/ml.
- Destička byla čtyřikrát promyta 1X Wash Buffer o objemu 300 μl na jamku, obsah jamek byl vždy vyklepnut do odpadu a následně lehce odklepnut na absorpční papír, všechna následná promytí byla provedena stejně.
- Do všech jamek bylo napipetováno 50 μl Assay Buffer A
- Do destičky byly podle předem navrženého schématu nanесeny po 50 ul St1 – St7 s blankem a vzorky, ty se před nanесením vždy zvortexovaly
- destička byla přelepena ochrannou fólií a následující 2 hodiny byla umístěna na třepačku s rychlostí 200 RPM při pokojové teplotě.
- Po odstranění ochranné folie byl obsah jamek vyklepnut do odpadu a destička byla čtyřikrát promyta výše uvedeným způsobem.
- Poté bylo do destičky napipetováno po 100 μl detekční protilátky do všech jamek, destička byla znovu přelepena ochrannou fólií a inkubována 1 hodinu na třepačce při pokojové teplotě.
- Po odstranění ochranné folie, byl obsah jamek vyklepnut do odpadu a destička byla čtyřikrát promyta. Dále bylo přidáno 100 μl roztoku Avidin-HRP D do všech jamek, destička byla přelepena ochrannou fólií a inkubována 30 minut na třepačce při pokojové teplotě.

- Po odstranění ochranné folie z destičky byl obsah jamek vyklepnut do odpadu, destička byla pětkrát promyta, při tomto konečném promývání, byl ponechán 1X Wash Buffer v destičce vždy 30–60 vteřin před vyklepnutím.
- Poté bylo přidáno 100 μ l Substrate Solution E do všech jamek a destička byla inkubována 20 minut ve tmě. Barva jamek, obsahujících lidský IL-21, se po promíchání s roztokem změnila na modrou, intenzita zbarvení byla úměrná koncentraci.
- Reakce byla zastavena přidáním 100 μ l Stop Solution do všech jamek, barva roztoku se pak změnila z modré na žlutou.
- Nakonec byla na přístroji ELISA reader proměřena absorbance při vlnové délce 450 nm, software readeru sestrojil kalibrační křivku a odečetl z ní hodnoty koncentrací příslušných jamek.

5 Výsledky

Experimentální část diplomové práce se zabývá výrobou CAR T buněk a jejich testováním. Jsou to T buňky získané z lymfocytů zdravého dárce, které jsou geneticky modifikovány tak, aby exprimovaly chimerický antigenní receptor specifický proti určité molekule. V této práci se jednalo o molekulu CD19 a CLL1. Pro modifikaci T buněk byl použit PiggyBac transpozonový systém. Plazmidy s inzertem obsahují repetitivní sekvence, které rozpozná transpozáza. Gen pro transpozázu je kódován v plazmidu pBase. Plazmidy se pak společně vnášejí do buněk elektroporací. Transpozáza zajistí integraci inzertu do genomové DNA buněk a jejich stabilní expresi. Výhoda PiggyBac vektorového systému je možnost vkládat dlouhé inzerty DNA. Jeden z použitých plazmidů byl připraven v rámci této diplomové práce. Buňky jsou pak kultivovány v prostředí podporujícím expanzi T-buněk a po 8-15 dnech se zjišťuje, zda expandované buňky jsou CAR pozitivní. Zároveň se zjišťuje i podrobný fenotyp buněk. Výsledky fenotypizace nejsou uvedeny v této práci, autor je sám nezhotoval, ale jsou uvedeny v článku „*Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells*“, jehož je spoluautorem.

5.1 Příprava CAR T buněk, kultivace a ověření exprese

Cílem experimentu byla výroba CAR T buněk specifických proti molekule CD19. Připraveny byly dva typy buněk. První typ (1) obsahoval pouze gen pro expresi CAR proti molekule CD19. Druhý typ (2) obsahoval navíc gen pro expresi fluorescenčního proteinu EGFP. Ten umožňuje snadnější identifikaci CAR pozitivních buněk průtokovou cytometrií nebo pod fluorescenčním mikroskopem. Pro tyto účely byly použity tyto kombinace plazmidů:

(1) pPB-CAR19 + pBase (poměr 2:1).

(2) pPB-CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1).

Z krve dárce byly izolovány PBMC (viz 4.2.2 Izolace PBMC z plné krve), následně byly buňky spočítány a požadované množství bylo odebráno do mikrokumavek pro elektroporaci.

Elektroporace

Do T pufru z transfekčního kitu byla pipetována směs plazmidové DNA a pBase viz poměry výše. K peletu buněk byla přidána směs plazmidů v T pufru a buňky byly elektroporovány v přístroji Neon při 2300 V 20 ms (viz 4.2.5 Elektroporace – příprava CAR T buněk). Transfekované buňky

byly kultivovány v 24 jamkové kultivační destičce v médiu CellGro (CG). Do destičky byla přidána negativní kontrola v podobě netransfekovaných buněk.

Kultivace

Kultivační prostředí, podporující selekci CAR T buněk, bylo zajištěno přidáním interleukinů 4 a 7 do média CG. Netransfekované buňky byly standardně kultivovány v přítomnosti interleukinu 2, který vede k pomnožení T-buněk.

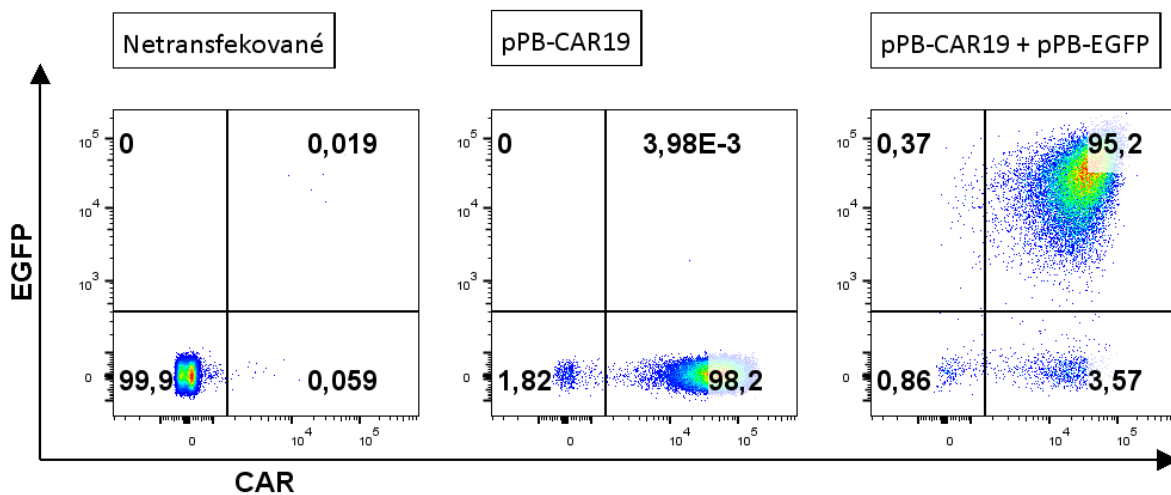
Po 24 hodinách byl růst netransfekovaných buněk podpořen stimulací protilátkami anti-CD3 a anti-CD28, které aktivují T-lymfocyty. Protilátky byly adherovány na dno prázdné jamky 24 jamkové destičky, jamka byla promyta a následně byly do této jamky pipetovány netransfekované buňky.

Vyrobené buňky, obsahující CAR se specifitou proti molekule CD19, nejsou standardně stimulovány pomocí žádných protilátek. Původní PBMC, které byly při výrobě CAR T buněk elektroporovány, obsahují B lymfocyty exprimující na svém povrchu molekulu CD19. Molekula CD19 je pomocí CAR rozeznávána a připravené buňky jsou tak specificky stimulovány. Tato metoda stimulace byla v naší laboratoři opakovaně ověřena a zároveň vede k vysoké frekvenci CAR T buněk v kultivané směsi.

Po deseti dnech kultivace buněk v médiu s cytokiny, byla část buněk odebrána a zpracována pro ověření exprese CAR na průtokovém cytometru.

Ověření exprese CAR proti CD19 a exprese EGFP v transfekovaných buňkách

Buňky byly barveny polyklonální protilátkou Goat-anti-Mouse APC (ředění 1:200). Tato protilátka se váže na extracelulární část molekuly CAR, která je odvozena z protilátky myšího původu. Viabilita byla detekována barvením pomocí DAPI (ředění 1:2000). Exprese EGFP byla ověřena v kanále FITC. Výsledná analýzy viz obrázek č. 6.



Obrázek č. 6: Ověření exprese CAR receptoru a fluorescenčního proteinu EGFP

Na základě dat z průtokového cytometru byla potvrzena exprese CAR na povrchu připravených buněk. Na základě vysoké exprese EGFP a současně povrchové exprese CAR, můžeme konstatovat vysokou účinnost transfekce i v případě souběžného použití dvou plazmidů.

5.2 Výroba CAR T buněk a ověření vlivu kultivačních podmínek na frekvenci CAR pozitivních buněk

Cílem experimentu byla optimalizace kultivačních podmínek elektroporovaných buněk. Pro tento experiment byly vyrobeny CAR T buňky z PBMC zdravého dárce, specifické proti molekule CD19. Pro elektroporaci byla použita následující kombinace plazmidů:

(1) pPB-CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)

(2) pPB-NFAT IL-21 CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)

Takto vyrobené CAR T buňky byly rozděleny na poloviny do dvou skupin. Pro každou skupinu byl zvolen jiný postup aktivace a kultivační podmínky. Předpokládáme, že na základě rozdílných kultivačních podmínek se bude lišit frekvence CAR pozitivních buněk v kultivované směsi, což bude ověřeno pomocí průtokové cytometrie.

Elektroporace

Elektroporace byla provedena stejně jako v kapitole 3.1. Transfekované buňky byly následně rozděleny na poloviny do dvou skupin a kultivovány v 24 jamkové kultivační destičce v médiu CellGro (CG). Do destičky byla přidána negativní kontrola v podobě netransfekovaných buněk.

Kultivace

První skupina **(A)** vyrobených buněk byla kultivována v prostředí interleukinu 2, který je standardním cytokinem pro stimulaci T lymfocytů.

Druhá skupina **(B)** buněk byla kultivována v prostředí interleukinů 4, 7 a 21. Netransfekované buňky byly standardně kultivovány v přítomnosti interleukinu 2.

Po 24 hodinách byl podpořen růst skupiny **(A)** a netransfekovaných buněk pomocí protilátek anti-CD3, anti-CD28. Protilátky byly adherovány na dno prázdných jamek kultivační 24 jamkové destičky. Po adhezi protilátek a promytí jamek byly do jamek napipetovány uvedené buňky.

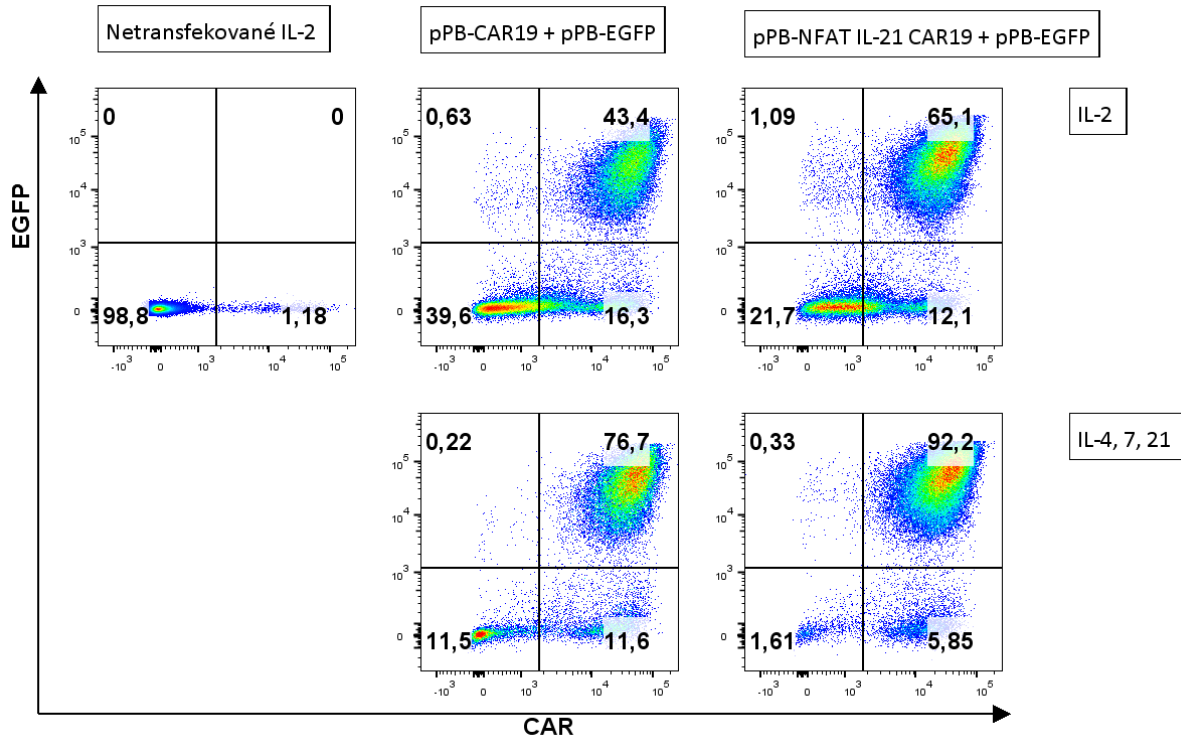
Buňky skupiny **(B)** nebyly stimulovány pomocí protilátek, ale byla předpokládána jejich stimulace přes molekulu CD19 na povrchu B lymfocytů přítomných ve směsi transfekovaných PBMC.

Po osmi dnech kultivace buněk v médiu s cytokiny, byla část buněk odebrána a zpracována pro ověření exprese CAR na průtokovém cytometru.

Ověření exprese CAR proti CD19 a exprese EGFP v kultivovaných buňkách

Následně byly buňky standardním způsobem připraveny pro analýzu na průtokovém cytometru (viz 4.2.6 Příprava buněk pro průtokovou cytometrii) BD LSRFortessa. Buňky byly barveny polyklonální protilátkou Goat-anti-Mouse APC (ředění 1:200), která se váže na

extracelulární část molekuly CAR. Pro detekci viability byla použita barva DAPI (ředění 1:2000). Exprese EGFP byla ověřena v kanále FITC. Výsledná exprese u jednotlivých skupin buněk v různém kultivačním prostředí je zobrazena na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7: Ověření exprese CAR receptoru při kultivaci v interleukinu 2 nebo směsi interleukinů 4, 7 a 21

Na základě analýzy získaných dat z průtokového cytometru můžeme konstatovat, že kultivační prostředí cytokinů IL 4, 7 a 21 vede k vyšší frekvenci CAR pozitivních buněk. A naopak, nescifická aktivace směsi transfekovaných buněk pomocí protilátek anti-CD3 a anti-CD28, společně s kultivací v prostředí cytokinu IL-2, vede k nižší frekvenci CAR pozitivních buněk.

5.3 Výroba CAR T buněk proti CD19 a ověření jejich cytotoxicity

Cílem experimentu bylo ověřit cytotoxicitu CAR T buněk a jejich schopnost proliferovat v nadbytku terčových leukemických buněk. Pro účely experimentu byly vyrobeny CAR T buňky specifické proti molekule CD19, které exprimovaly EGFP. Jako negativní kontrola byly připraveny CAR T buňky specifické proti prostatické molekule PSMA, které exprimovaly EGFP. Pro výrobu buněk byly použity následující kombinace plazmidů:

- (1) pPB-CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)
- (2) pPB-NFAT IL-21 CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)
- (3) pPB-PSMA + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)

Jako terčové buňky byly v experimentu použity buňky získané z krve dvou pacientů diagnostikovaných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL).

Elektroporace

Elektroporace byla provedena stejně jako v kapitole 3.1. Transfekované buňky byly následně rozděleny na poloviny do dvou skupin a kultivovány v 24 jamkové kultivační destičce v médiu CellGro (CG). Do destičky byla přidána negativní kontrola v podobě netransfekovaných buněk.

Kultivace

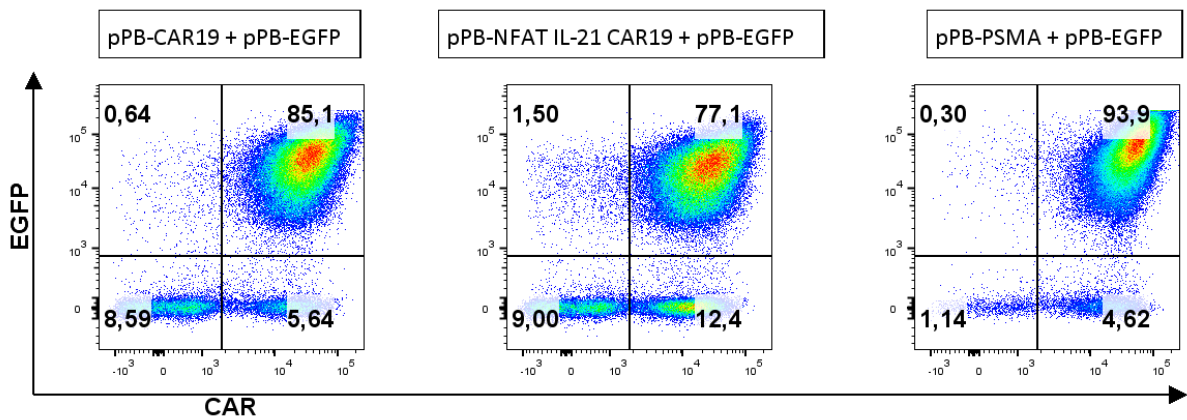
Kultivační prostředí, podporující selekci CAR T buněk, bylo zajištěno přidáním interleukinů 4 a 7 do média CG. Netransfekované buňky byly standardně kultivovány v přítomnosti interleukinu 2 používaného pro pomnožení T-lymfocytů. Po 24 hodinách byl růst netransfekovaných buněk podpořen přidáním protilátek anti-CD3, anti-CD28. Růst CAR T buněk specifických proti molekule PSMA byl podpořen protilátkou anti-c-Myc, která se váže na Myc-Tag přítomný v extracelulární části CAR molekuly.

Buňky s CAR specifickým proti CD19 nebyly stimulovány pomocí protilátek. V jejich případě byla předpokládána stimulace přes molekulu CD19 na povrchu B lymfocytů přítomných ve směsi transfekovaných PBMC. Po dvanácti dnech kultivace, byla část buněk odebrána a zpracována pro ověření exprese CAR a EGFP na průtokovém cytometru.

Ověření exprese CAR proti molekule CD19 a exprese EGFP v transfekovaných buňkách

Pro účely našeho experimentu bylo třeba ověřit, zda je možné % CAR pozitivních buněk určovat nepřímou, na základě exprese GFP. Předpokládá se tedy, že do buněk se integruje jak plazmid s CAR inzertem, tak i plazmid s EGFP a buňky budou dvojitě pozitivní CAR+GFP+. Pro tyto účely byly tedy buňky barveny polyklonální protilátkou Goat-anti-Mouse APC (ředění 1:200), která se váže na extracelulární část molekuly CAR. Exprese EGFP byla ověřena v kanále FITC. Pro

detekci viability byla použita barva DAPI (ředění 1:2000). Výsledná exprese CAR a EGFP u buněk je zobrazena v dot blotech viz obrázek č. 8.



Obrázek č. 8: Ověření exprese CAR receptoru a fluorescenčního proteinu EGFP

Většina transfekovaných buněk exprimuje jak CAR, tak i EGFP. Jen 5-12 % buněk je CAR+ EGFP- a mizivé procento je jen EGFP+. Na základě analýzy dat z průtokového cytometru je tedy možné konstatovat, že CAR pozitivní buňky lze rozlišit na základě detekce EGFP s tím, že procento CAR pozitivních buněk bude o něco nižší než skutečnost (o 5-10 %).

Kultivace leukemických terčových buněk s efektorovými CAR T buňkami

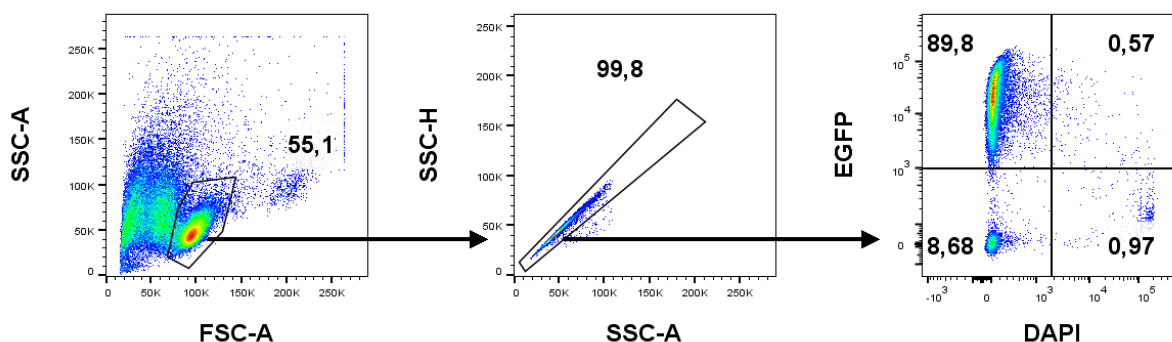
Z krve dvou pacientů, kterým byla diagnostikována chronická lymfocytární leukemie (CLL), byly izolovány PBMC. Většina těchto buněk má fenotyp B-buněk exprimujících na povrchu molekulu CD19. Proto budou použity jako terčové buňky (T) pro ověření cytotoxicity CAR T buněk specifických proti CD19. Terčové buňky byly spočítány a definované množství bylo odebráno pro společnou kultivaci s efektorovými CAR T buňkami (E). Kultivace buněk byla provedena v 1 ml CG média ve 24 jamkové destičce a bez přítomnosti cytokinů. Kultivace vždy obsahovala nadbytek terčových buněk, konkrétně v poměrech 1:2, 1:10 a 1:50 vůči množství buněk efektorových (CAR T buňky). Tabulka č. 1 obsahuje poměry a počty buněk. Kromě výše uvedených kultivací byly bez cytokinů kultivovány samotné terčové buňky pacientů v množství 1×10^6 , aby bylo možné hodnotit jejich spontánní úmrtnost.

	Pacient A			Pacient B		
POMĚRY BUNĚK E:T	1:2	1:10	1:50	1:2	1:10	1:50
pPB-CAR19	$1 \cdot 10^5 : 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 : 1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 : 1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 5 \cdot 10^6$
pPB-NFAT IL-21 CAR19	$1 \cdot 10^5 : 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 : 1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 : 1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 5 \cdot 10^6$
pPB-PSMA	$1 \cdot 10^5 : 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 : 1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 2 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 : 1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^5 : 5 \cdot 10^6$

Tabulka č. 1: Přehled množství a poměrů kultivovaných efektorových a cílových buněk

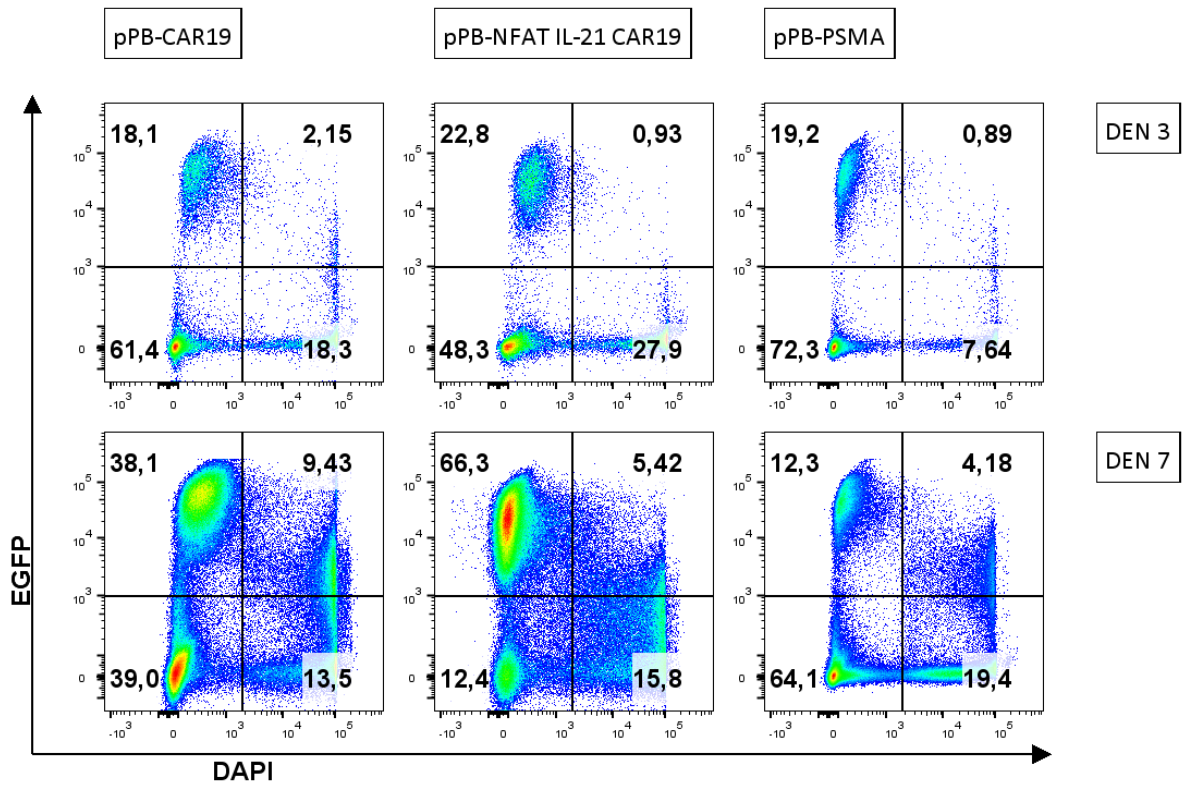
Ověření proliferace efektorových buněk v nadbytku nádorových buněk

Následně byly ve dvou časových intervalech, v Den 3 a Den 7 kokultivace E:T odebrány buňky pro analýzu na průtokovém cytometru. CAR T buňky byly definovány jako EGFP+ buňky. Viabilita buněk byla zjištěna pomocí DAPI (ředění 1:2000). Pro analýzu proliferace efektorových buněk byl nejprve použit gate „cells“, který odstraní debris a část mrtvých buněk. Poté byl použit gate „singlets“ a z něj se pak rozlišují EGFP+ a DAPI+ buňky viz obrázek č. 9.

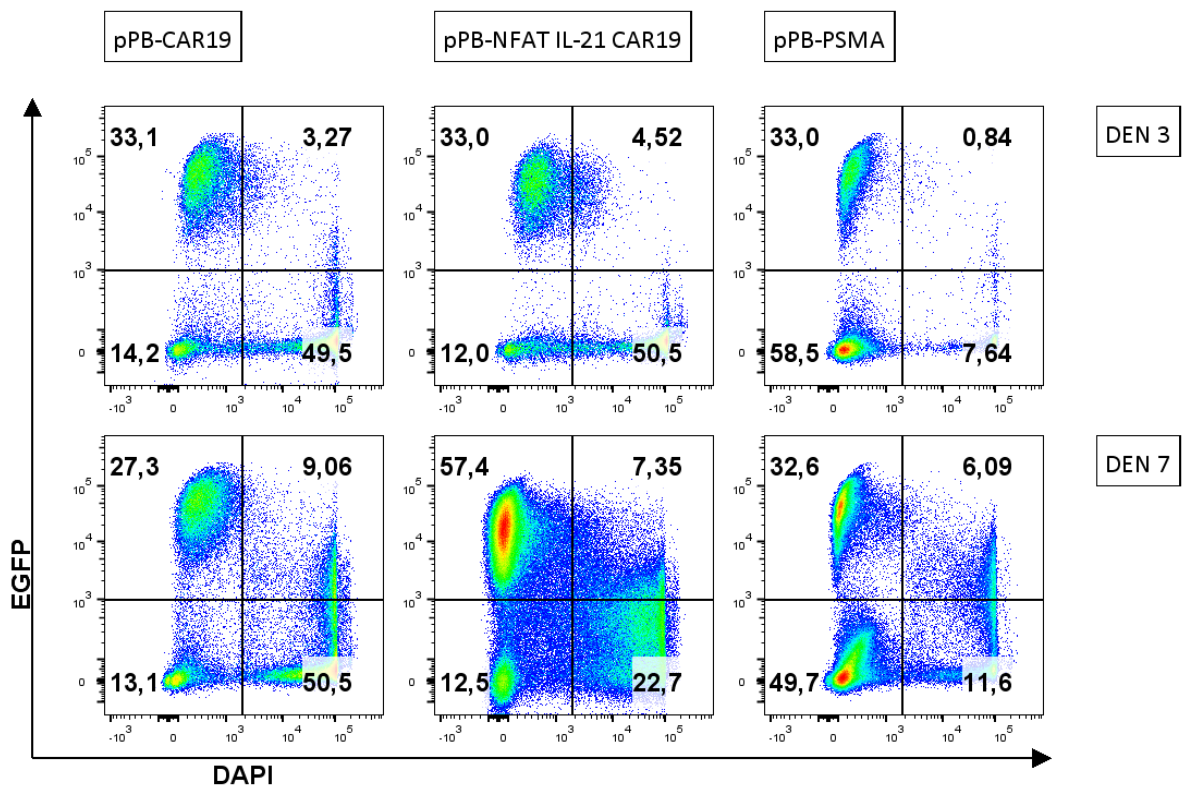


Obrázek č. 9: Gatovací strategie pro ověření proliferace efektorových buněk

Mezi poměry buněk E:T 1:2, 1:10 a 1:50 nebyly výrazné rozdíly ve výsledcích, proto dále prezentujeme jen výsledky pro poměr buněk 1:10. Dot ploty pro oba časové intervaly Den 3 a Den 7 pro terčové buňky pacienta A a pacienta B je možné vidět na obrázku č. 10 a obrázku č. 11.



Obrázek č. 10: Pacient A - kultivace E:T v poměru 1:10

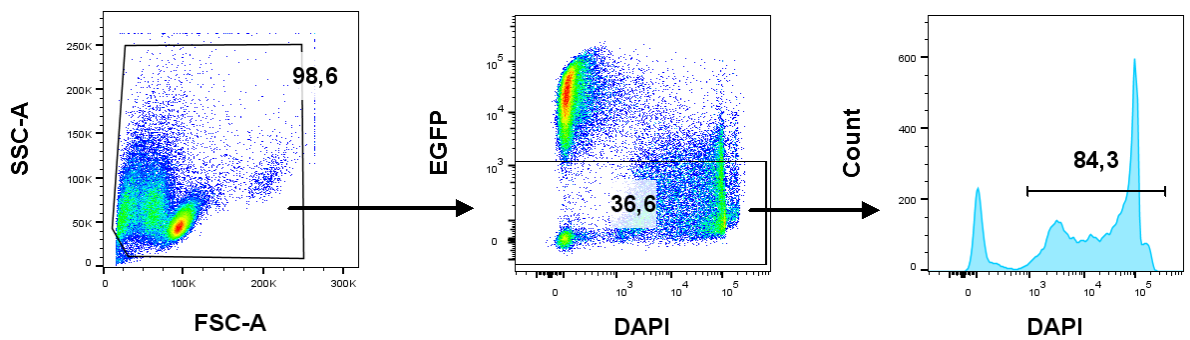


Obrázek č. 11: Pacient B - kultivace E:T v poměru 1:10

Analýzou naměřených výsledků bylo potvrzeno, že efektorové buňky s CAR specifitou proti molekule CD19 jsou schopny úspěšně proliferovat v přítomnosti cílových buněk, viz levý horní kvadrant. Proliferace je navíc výraznější u CAR T buněk obsahující gen pro sekreci IL-21 pod NFAT promotorem. To jsme předpokládali, IL-21 podporuje aktivitu a proliferaci T buněk. Funkčnost tohoto plazmidu i schopnost sekrece cytokinu byla v naší laboratoři již dříve ověřena.

Ověření cytotoxicity efektorových buněk vůči terčovým buňkám z CLL pacientů

Pro ověření cytotoxicity byly použita měření z intervalů Den 3 a Den 7. Byla zvolena jiná gatovací strategie: Buňky => Terčové buňky => Mrtvé terčové buňky, viz obrázek č. 12. Pro správný výpočet cytotoxicity efektorových buněk byla důležitá hodnota spontánně mrtvých terčových buněk. Ta byla zjištěna na základě měření viability kontrolních buněk pacientů v Den 3 a Den 7.



Obrázek č. 12: Gatovací strategie pro ověření cytotoxicity efektorových buněk.

Pro výpočet cytotoxicity byl použit následující vzorec:

$$\text{Cytotoxicita} = \frac{\text{Mrtvé terčové buňky} - \text{Spontánně mrtvé terčové buňky}}{100 - \text{Spontánně mrtvé terčové buňky}} * 100$$

Pomocí vzorce byly vypočteny procentuální hodnoty cytotoxicity, které je možné nalézt v tabulce č. 2.

Poměr 1:10	Pacient A		Pacient B	
	Den 3	Den 7	Den 3	Den 7
pPB-CAR19	12,7 %	0 %	43,3 %	35,8 %
pPB-NFAT IL-21 CAR19	26,8 %	32,3 %	46,7 %	28,3 %
pPB-PSMA	0 %	0 %	0 %	0 %

Tabulka č. 2: Cytotoxicita efektorových buněk vůči terčovým buňkám

- Na základě výsledných procentuálních hodnot cytotoxicity můžeme konstatovat, že vyrobené buňky exprimující CAR specifický proti molekule CD19 jsou cytotoxické vůči terčovým nádorovým buňkám, lepší cytotoxicity proti terčovým buňkám pacienta A dosáhly CAR T buňky produkující IL-21, u pacienta B se tento efekt nepotvrdil.

5.4 Kultivace CAR T buněk a ověření schopnosti degranulace po opakované stimulaci terčovými buňkami

Cílem experimentu bylo porovnání vlastností CAR T buněk proti CD19 produkujících IL-21 (CAR19-IL21 T buňky) a neprodukujících IL-21 (CAR19 T buňky). Buňky měly být opakovaně stimulovány leukemickými buňkami a na závěr zjišťována jejich schopnost proliferace, degranulace a produkce IFN- γ . Pro účely experimentu byly vyrobeny CAR T buňky specifické proti molekule CD19, které exprimovaly EGFP. Pro výrobu buněk byly použity následující kombinace plazmidů:

(1) pPB-CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)

(2) pPB-NFAT IL-21 CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1)

Obě kombinace byly transfekovány do PBMC dvou různých dárců krve.

Elektroporace

Elektroporace byla provedena stejně jako v kapitole 3.1. Transfekované buňky byly následně rozděleny na poloviny do dvou skupin a kultivovány v 24 jamkové kultivační destičce v médiu CellGro (CG). Do destičky byla přidána negativní kontrola v podobě netransfekovaných buněk.

Kultivace

Kultivační prostředí, podporující selekci CAR T buněk, bylo zajištěno přidáním interleukinů 4 a 7 do média CG. Netransfekované buňky byly standardně kultivovány v přítomnosti interleukinu 2, který vede k pomnožení T-buněk.

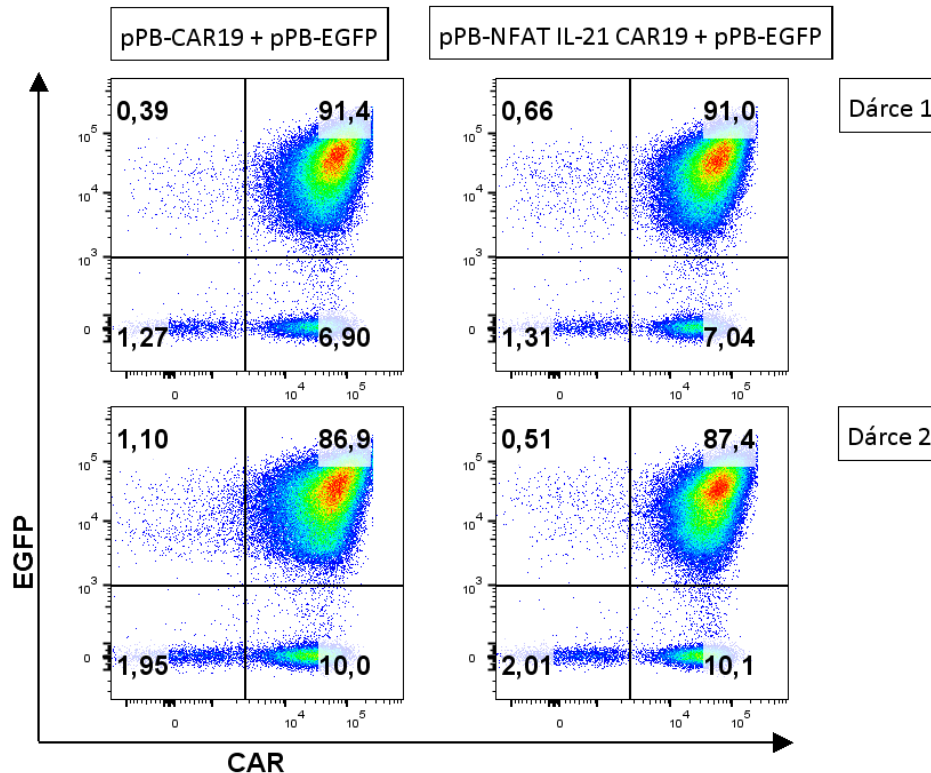
Po 24 hodinách byl růst netransfekovaných buněk podpořen stimulací protilátkami anti-CD3 a anti-CD28. Ty byly adherovány na dno prázdné jamky 24 jamkové destičky, následně po promytí byly do této jamky pipetovány netransfekované buňky.

Buňky s CAR specifickým proti CD19 nebyly stimulovány pomocí protilátek. V jejich případě byla předpokládána stimulace přes molekulu CD19 na povrchu B lymfocytů přítomných ve směsi transfekovaných PBMC.

Po patnácti dnech kultivace, byla část buněk odebrána a zpracována pro ověření exprese CAR a EGFP na průtokovém cytometru.

Ověření exprese CAR proti molekule CD19 a exprese EGFP v transfekovaných buňkách

Následně byly buňky standardním způsobem připraveny pro analýzu na průtokovém cytometru BD LSRFortessa. Buňky byly barveny polyklonální protilátkou Goat-anti-Mouse APC (ředění 1:200). Pro detekci viability byla použita barva DAPI (ředění 1:2000). Exprese EGFP byla ověřena v kanále FITC. Výsledná exprese CAR a EGFP u jednotlivých skupin buněk je zobrazena v dot plotech viz obrázek č. 13.



Obrázek č. 13: Ověření exprese CAR receptoru a fluorescenčního proteinu EGFP

Většina transfekovaných buněk exprimuje jak CAR, tak i EGFP. Procento CAR pozitivních buněk definovaných na základě exprese EGFP bude mírně nižší než ve skutečnosti (o 6-10 %), což odpovídá výsledkům z předchozích experimentů. V následujících analýzách tohoto experimentu budou CAR T buňky definovány jako EGFP+ buňky.

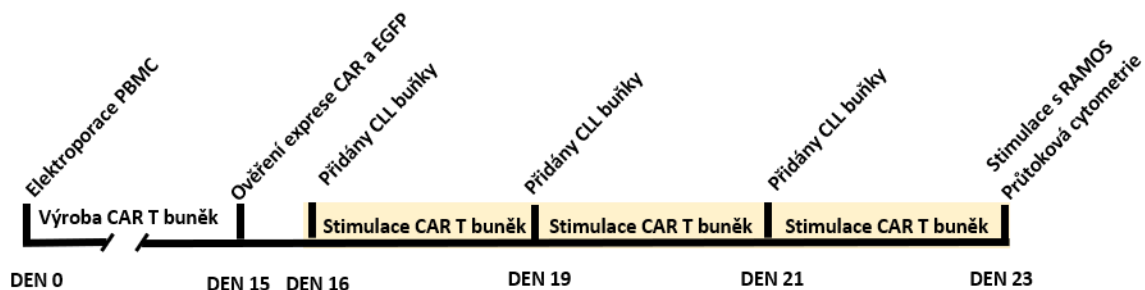
Stimulace CAR T buněk leukemickými buňkami

Z krve pacientů, kterým byla diagnostikována chronická lymfocytární leukemie, byly izolovány PBMC obsahující převážně leukemické buňky. Tyto buňky byly použity ke stimulaci CAR T buněk v našem experimentu.

CLL buňky se přidávaly v den 16, v den 19 a v den 21. V den 23 se zjišťovala proliferace CAR T buněk a polovina buněk v jednotlivých skupinách byla stimulována buňkami RAMOS. Buňky RAMOS mají na svém povrchu molekulu CD19 a velmi silně stimulují CAR19 T buňky.

Pro lepší přehlednost tohoto experimentu je k dispozici obrázek č. 14 s časovou osou experimentu. Celý experiment byl proveden jak s CAR T buňkami dárce 1, tak s CAR T buňkami dárce 2, porovnávaly se mezi sebou CAR19-IL21 T buňky a CAR19 T buňky.

Leukemické buňky i buňky RAMOS se ke CAR T lymfocytům přidávaly v poměru 10:1. Tato kokultivace probíhala 4 hod v médiu bez přidaných cytokinů.



Obrázek č. 14: Schéma experimentu stimulace CAR T buněk leukemickými buňkami

Ze všech sledovaných skupin byly připraveny vzorky pro průtokovou analýzu. Zjišťovala se proliferace buněk, schopnost buněk produkovat IFN- γ a schopnost degranulace. Pro ověření produkce IFN- γ byl použit IFN- γ Secretion Assay – Detection Kit (PE) od společnosti Miltenyi Biotec (viz. Metody 4.2.8) s protilátkou IFN- γ PE (ředění 1:10).

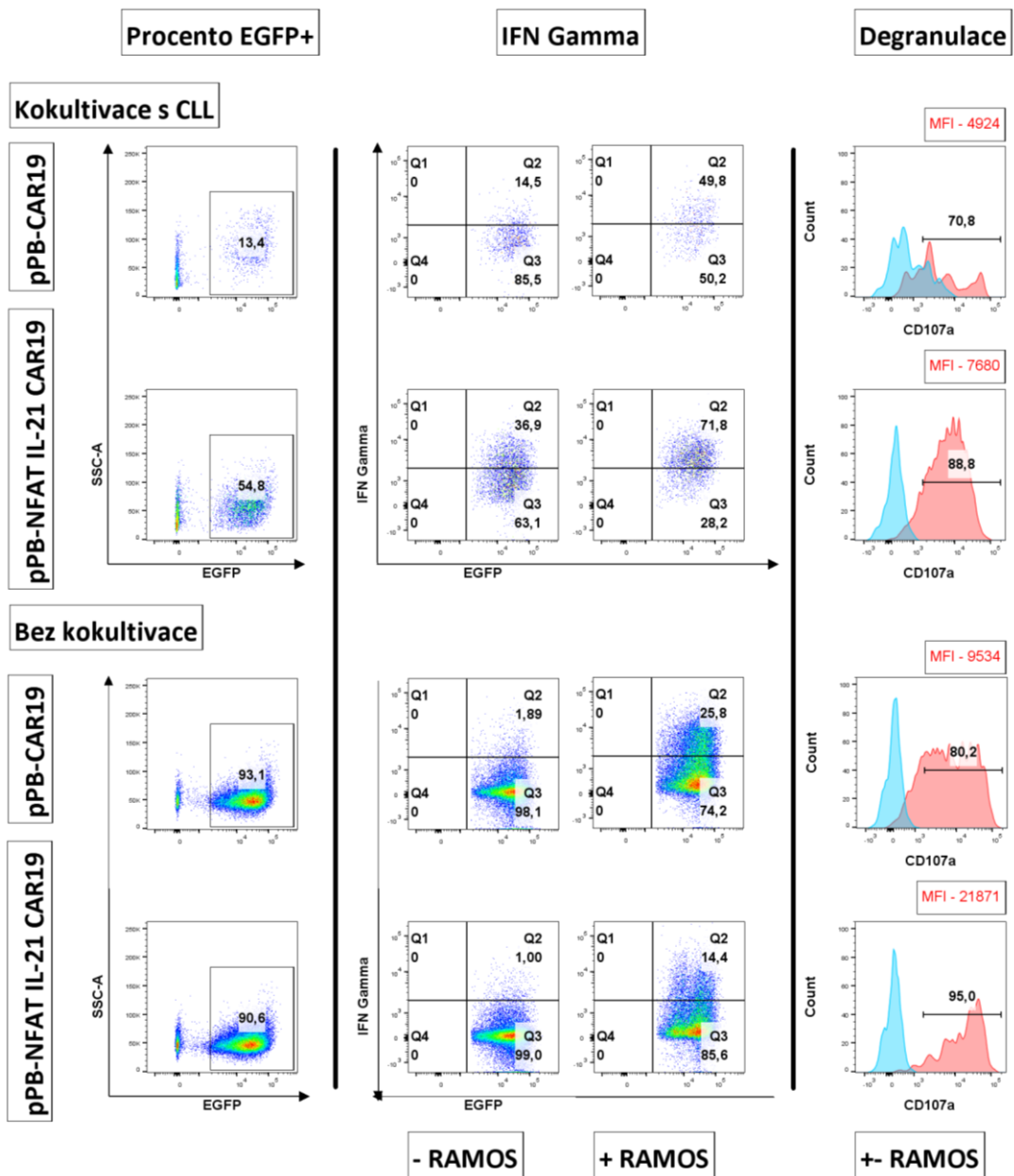
Pro ověření schopnosti degranulace CAR T buněk byly buňky barvené protilátkou CD107a (ředění 1:100). Buňky byly dále barveny protilátkou CD8 PE-Cy7 (ředění 1:50) a viabilita buněk byla zjištěna pomocí DAPI (ředění 1:2000).

Výsledky analýzy buněk průtokovou cytometrií se výrazně nelišily mezi buňkami CAR T vyrobenými z PBMC dárce 1 nebo 2.

Proliferace CAR T buněk

Po 23 dnech kultivace CAR T buněk se porovnálo procento CAR T pozitivních buněk mezi sledovanými skupinami, respektive se určilo procento EGFP+ buněk. Výsledky jsou u dárce 1 zobrazeny na obrázku 15, v levé části. Pokud obě skupiny CAR T buněk, tj. CAR19-IL21 T a CAR19 T, nejsou stimulované v průběhu kultivace leukemickými buňkami, proliferují stejně

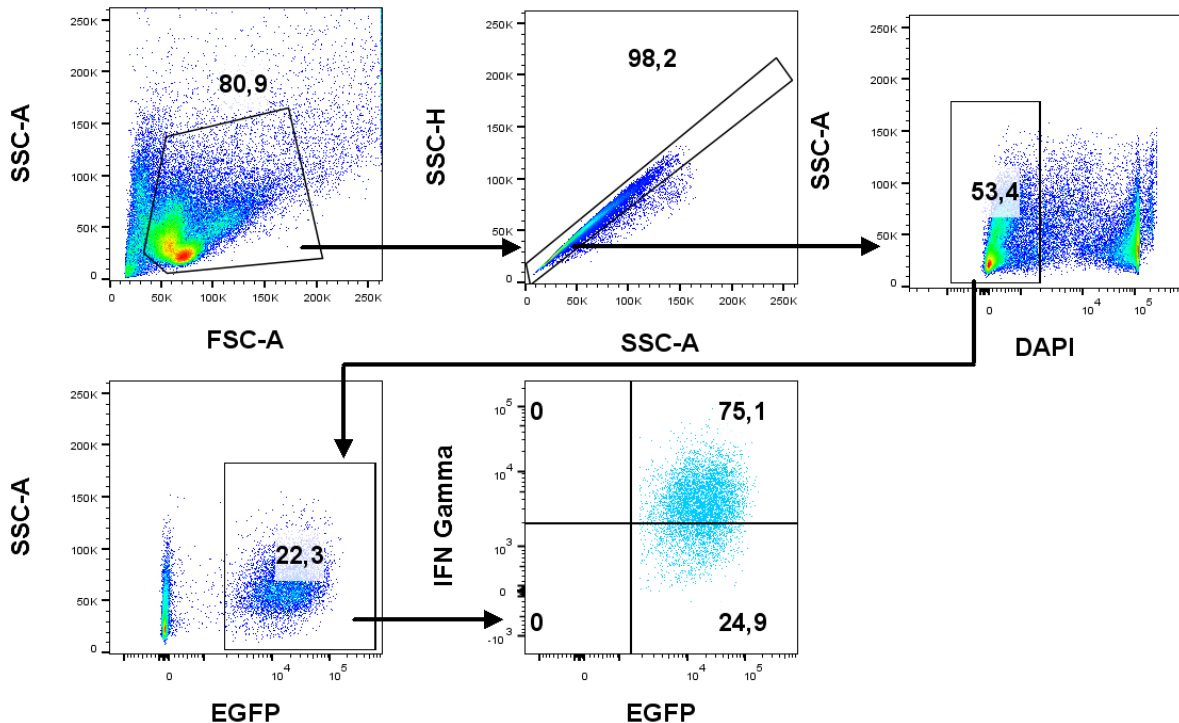
(91 vs 93 %). Pokud jsou obě skupiny CAR T buněk stimulované leukemickými buňkami, dojde k větší proliferaci u CAR19-IL21 T buněk v porovnání s CAR19 T (55 vs 13 %).



Obrázek č. 15: Porovnání dat z průtokové cytometrie buněk CAR T dárce 1 transfekovaných plazmidem pPB-CAR19 nebo plazmidem pPB-NFAT IL-21 CAR19: Degranulace – Modrý histogram = bez RAMOS, Červený histogram = s RAMOS.

Ověření schopnosti CAR T buněk produkovat IFN- γ

Pro ověření produkce IFN- γ byla zvolena gatovací strategie: Buňky => Singlety => Živé buňky => EGFP+ => EGFP+ a IFN- γ +, viz obrázek č. 16.



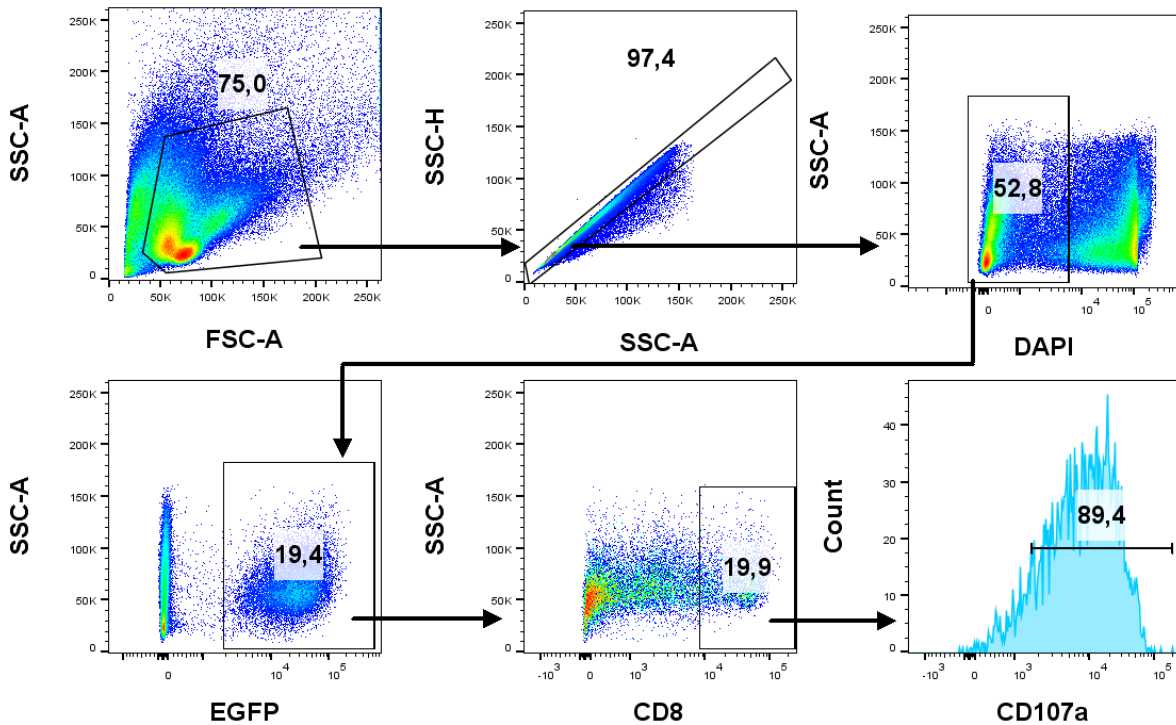
Obrázek č. 16: Gatovací strategie pro analýzu schopnosti sekrece IFN- γ CAR T buňkami

Reprezentační dot ploty jsou na obr. č. 15. Při analýze získaných dat jsme porovnávali odpovídající vzorky po stimulaci buňkami RAMOS a stejné vzorky bez stimulace. Co se týká CAR T bez kokultivace s CLL buňkami, které nebyly stimulovány buňkami RAMOS, neočekávali jsme produkci IFN- γ , což se potvrdilo. Po stimulaci buňkami RAMOS došlo k produkci IFN- γ jak u CAR19 T buněk, tak i u CAR19-IL-21 T buněk (26 vs 14 % IFN- γ + buněk).

Pokud byly obě skupiny CAR T buněk stimulovány buňkami CLL, produkovaly buňky IFN- γ i bez stimulace buňkami RAMOS. V tomto případě bylo CAR19-IL21 T buněk produkujících IFN- γ 2x více než CAR19 T buněk. Po stimulaci CAR T buněk buňkami RAMOS došlo k výraznému navýšení buněk produkujících IFN- γ . CAR19-IL-21 T buněk produkujících IFN- γ bylo opět více než CAR19 T buněk.

Ověření degranulace

Pro ověření degranulace byla použita gatovací strategie: Buňky => Singlety => Živé buňky => EGFP+ => CD8+ => Histogram CD107a+, viz obrázek č. 17.



Obrázek č. 17: Gatovací strategie pro analýzu schopnosti degranulace CAR T buněk

Při analýze získaných dat jsme porovnávali schopnost degranulace mezi vzorky dané skupiny, které se lišily pouze stimulací buňkami RAMOS. Z výsledných histogramů těchto vzorků jsme poté vytvořili překryv viz obrázek č. 15. Z CD107a pozitivní populace jsme získali střední intenzitu fluorescence (MFI).

CAR19-IL21 T buňky mají lepší schopnost degranulace, jednak vykazují vyšší procento CD107a pozitivních buněk a také tato pozitivní populace vykazuje vyšší MFI, tedy vyšší intenzitu degranulace, než CAR19 T buňky.

Na základě získaných dat je možné tvrdit, že buňky, které jsou schopny po stimulaci produkovat interleukin 21, mají lepší proliferaci, schopnost produkce IFN- γ a degranulace v prostředí nádorových buněk CLL pacientů. Výsledky získané z tohoto experimentu byly statisticky zpracovány MUDr. Otáhem a prezentovány v rámci naší publikace (Stach et al., 2020), viz přílohy.

5.5 Příprava plazmidu pPB-NFAT IL-21 CLL1

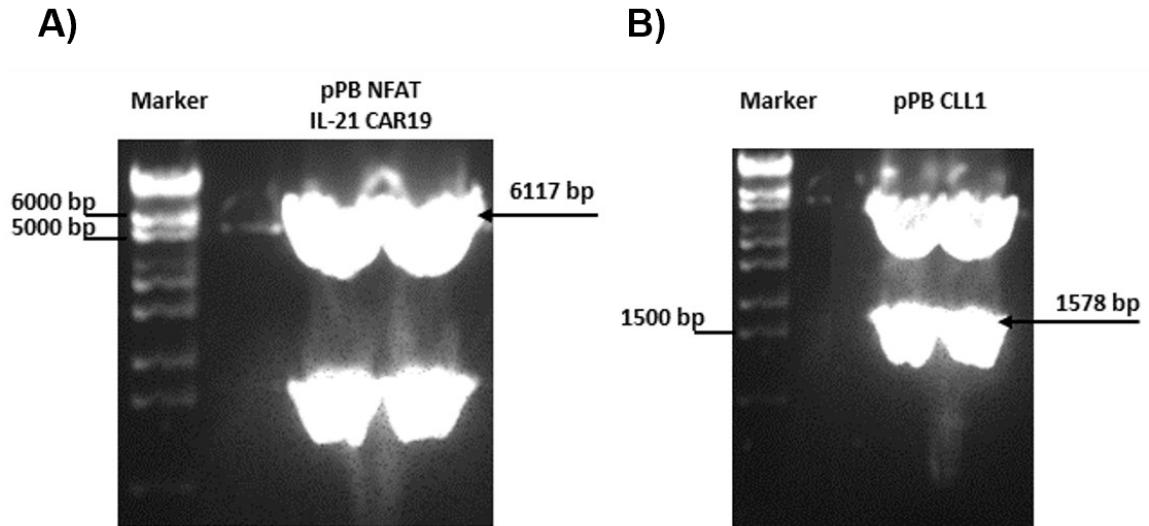
Cílem experimentu byla příprava plazmidu, obsahující gen pro IL-21, gen pro CAR specifický proti molekule CLL1 a molekulu Myc-tag pro snadnou detekci transfekovaných buněk a jejich specifickou stimulaci. K dispozici byly plazmidy pPB-NFAT IL-21 CAR19 (1) a pPB-CLL1 (2) vyrobené na našem oddělení. Plazmidy byly odvozeny od PiggyBac vektoru. Ten obsahuje ITR sekvence, které rozpoznává transponáza kódovaná v plazmidu pBase. Ta umožňuje po transfekci buněk vyštěpit inzert plazmidu ohraničený ITR sekvencemi a integrovat ho do hostitelské DNA. Gen pro IL-21 je pod inducibilním promotorem NFAT, a proto dochází k sekreci IL-21 po stimulaci buněk.

Plazmid 1 obsahuje gen pro IL-21 pod inducibilním promotorem NFAT a gen pro CAR specifický proti molekule CD19. Transfekované buňky produkují IL-21 až po jejich specifické stimulaci. Z plazmidu byla restriční štěpením vyštěpena extracelulární doména CAR se specifitou proti molekule CD19.

Plazmid 2 obsahuje gen pro CAR specifický proti molekule CLL1. Z plazmidu 2 byla stejným způsobem vyštěpena extracelulární doména specifická proti molekule CLL1. Ta byla poté klonována do plazmidu 1 místo původní extracelulární domény specifické proti molekule CD19.

Oba původní plazmidy byly štěpeny pomocí restričního enzymu Eco RI HF (High Fidelity) v pufru CutSmart při 37 °C. Po štěpení byl k plazmidu 1 přidán enzym rSAP, který defosforylací zabránil samovolnému uzavření plazmidu.

Následně byly štěpené plazmidy rozděleny elektroforézou na 1 % agarózovém gelu a byla ověřena velikost vzniklých fragmentů. Ze štěpeného plazmidu 1 byl izolován fragment F1 o velikosti 6117 bp (vektor), z plazmidu 2 fragment F2 velikosti 1578 bp (inzert), viz obrázek č. 18.



Obrázek č. 18: DNA fragmenty izolované z gelu a použité pro ligaci pPB CLL1 do plazmidu pPB NFAT IL-21 CAR19. A) Linearizovaný vektor (6117 bp) z plazmidu pPB NFAT IL-21 CAR19; B) Inzert štěpený z plazmidu pPB CLL1

Po izolaci DNA fragmentů z gelu a jejich purifikaci byla na přístroji NanoDrop ověřena koncentrace fragmentů. Následně byla provedena jejich ligace v poměru 1:1 (vektor:inzert) pomocí T4 ligázy, přes noc při 16 °C. Ligáza byla deaktivována zahřátím 10 minut na 65 °C. Ligační směs byla transformována do kompetentních bakterií *E. coli*. Bakterie byly poté množeny na misce s LB agarem a příslušným antibiotikem (ATB), v našem případě ATB Ampicilin. Následující den bylo z misky vybráno 10 bakteriálních kolonií, ty byly přeočkovány do kultivační destičky a samostatně množeny v LB médiu s ATB. Z namnožených bakterií bylo pomocí QIAprep Spin Miniprep Kitu provedeno 10 miniprepů (M1-M10). DNA získaná z miniprepů byla následně použita k ověření úspěšnosti ligace.

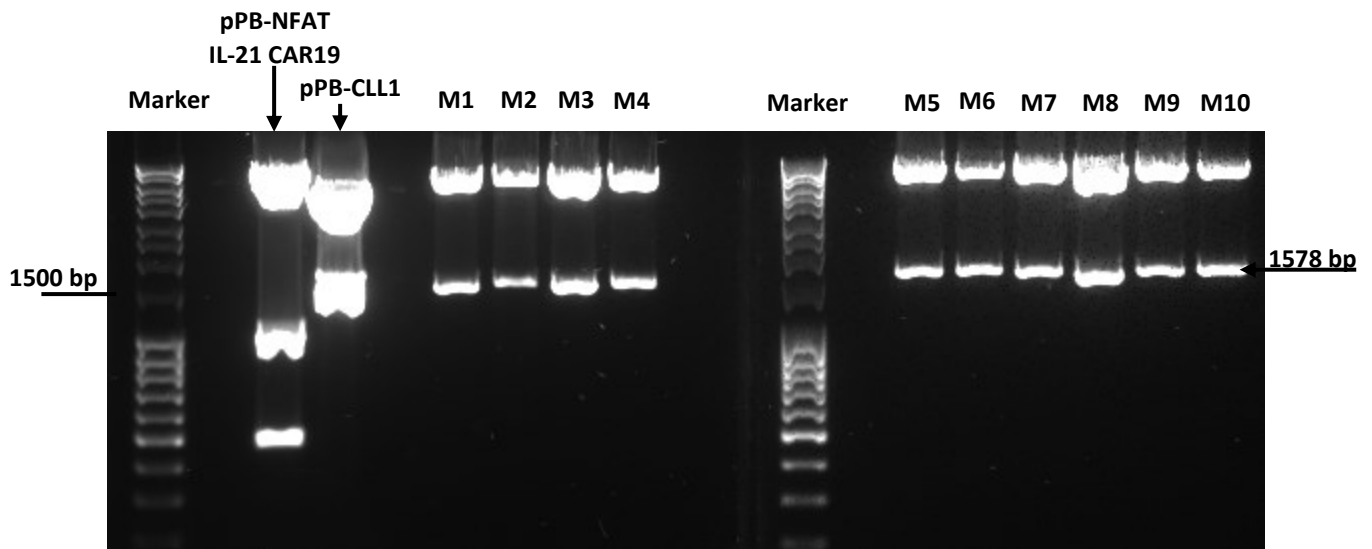
5.5.1 Ověření úspěšnosti ligace

Pro ověření úspěšné ligace a správné orientace vloženého inzertu v kostře vektoru byla provedena restriční štěpení vzorků DNA, stejně jako původních plazmidů.

- **K 1. restričnímu štěpení** byly použity enzymy Bam HI a Eco RI.
 - Cílem 1. restričního štěpení bylo ověřit, zda byl do vektoru vložen inzert o odpovídající velikosti.
 - V případě úspěšné ligace inzertu do vektoru, vede restriční štěpení ke vzniku tří fragmentů o velikostech 8, 1578 a 4943 bp.
 - Pro porovnání, štěpení původního plazmidu pPB NFAT IL-21 CAR19 vede ke vzniku pěti fragmentů o velikostech 8, 15, 465, 1071 a 6109 bp.

- Výsledek viz obrázek č. 19:

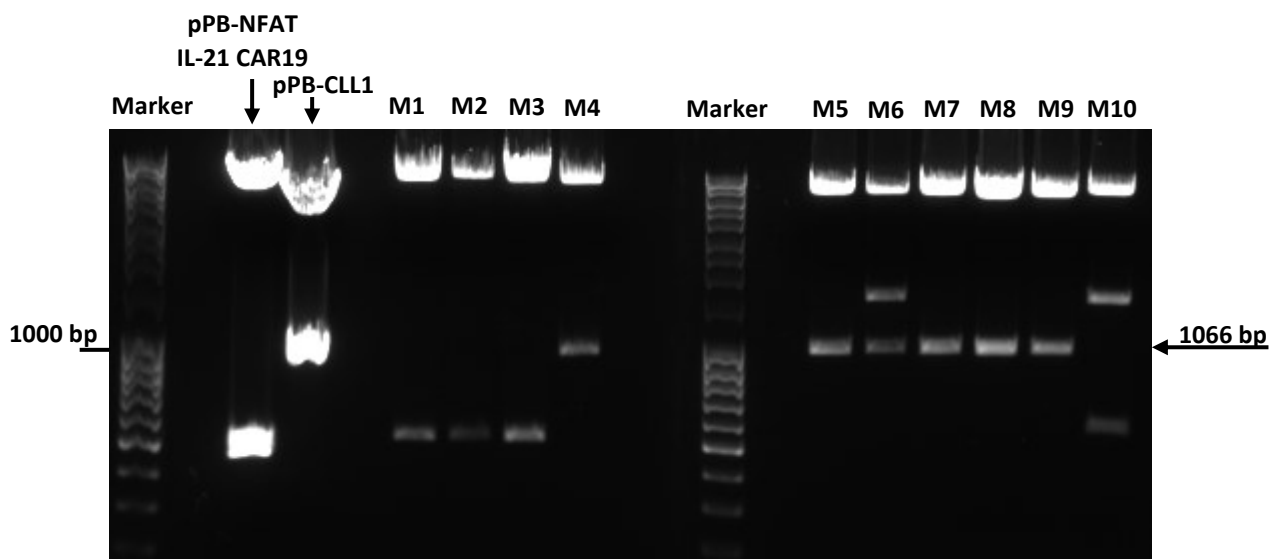
Všechny vzorky miniprepů dávají po restričním štěpení vzniknout fragmentům požadované velikosti (1578 bp). Posun fragmentů z miniprepů M3 a M8 mohl být způsoben rozdílnou koncentrací DNA ve vzorku. Na základě 1. restričního štěpení jsme zjistili, že všechny vzorky DNA obsahovaly inzert o odpovídající velikosti.



Obrázek č. 19: Štěpné produkty původních plazmidů a miniprepů (M1-M10) po 1. restričním štěpení pro ověření ligace

K 2. restričnímu štěpení byly použity enzymy Bam HI a Apa I.

- Cílem 2. restričního štěpení bylo rozeznání vzorku, kde byl do plazmidu vložen inzert ve správné orientaci.
- V případě správné orientace inzertu (orientace shodná s orientací CAR19 domény původního plazmidu pPB-NFAT IL-21 CAR19), vede restriční štěpení ke vzniku fragmentů o velikostech 1033 a 6662 bp.
- V případě opačné orientace inzertu, vede restriční štěpení ke vzniku fragmentů o velikostech 561 a 7134 bp.
- Výsledek viz obrázek č. 20:
Miniprepy M1, M2, M3 a M10 obsahují inzert v opačné orientaci.
Miniprepy M4, M5, M7 a M9 obsahují správnou orientaci inzertu.



Obrázek č. 20: Štěpné produkty původních plazmidů a miniprepů (M1-M10) po 2. restrikčním štěpení pro ověření ligace

Na základě výsledků z obou restrikčních štěpení byl k další práci vybrán miniprep M7, který obsahuje námi vložený inzert a ve správné orientaci.

5.5.2 Výroba plazmidu pPB-NFAT IL-21 CLL1 pro transfekční experimenty

Pro opakované transfekční experimenty je třeba mít dostatečné množství plazmidu. Proto byl vzorek M7 transformován do bakterií a ty pomnoženy v 300 ml LB média s příslušným antibiotikem. Po namnožení bakterií byla plazmidová DNA izolována pomocí QIA Plasmid Maxi Kitu. Množství získaného plazmidu pPB-NFAT IL-21 CLL1 bylo po izolaci v rozmezí 200-600 µg. Toto množství bylo pro transfekční experimenty dostačující.

5.5.3 Příprava CAR T buněk proti molekule CLL1

Cílem experimentu byla výroba CAR T buněk specifických proti molekule CLL1. Pro tyto účely byl použit plazmid pPB-NFAT IL-21 CLL1, který byl elektroporován do PBMC. Kultivované buňky by měly mít na povrchu CAR proti CLL1 a měly by sekretovat IL-21. To bylo následně ověřeno, pro účely pozitivní kontroly exprese CAR byly připraveny i buňky elektroporované již ověřeným plazmidem pPB-CLL1. Z krve dárce byly izolovány PBMC (viz 4.2.2 Izolace PBMC z plné krve), následně byly buňky spočítány a požadované množství bylo odebráno do mikrozkmavek pro elektroporaci.

Elektroporace

V mezičase byla do T pufru z transfekčního kitu pipetována směs plazmidové DNA:

pPB-NFAT IL-21 CLL1 + pBase (v poměru 2:1)

pPB-CLL1 + pBase (v poměru 2:1) jako pozitivní kontrola.

K peletu buněk byla přidána směs plazmidů v T pufru a buňky byly elektroporovány v přístroji Neon při 2300 V 20 ms.

Transfekované buňky byly kultivovány v 24 jamkové kultivační destičce v médiu CG. Do destičky byla přidána také negativní kontrola v podobě netransfekovaných buněk.

Kultivace

Kultivační prostředí, podporující selekci CAR T buněk, bylo zajištěno přidáním interleukinů 4 a 7 do média CG. Netransfekované buňky byly standardně kultivovány v přítomnosti interleukinu 2, používaného pro pomnožení T-lymfocytů.

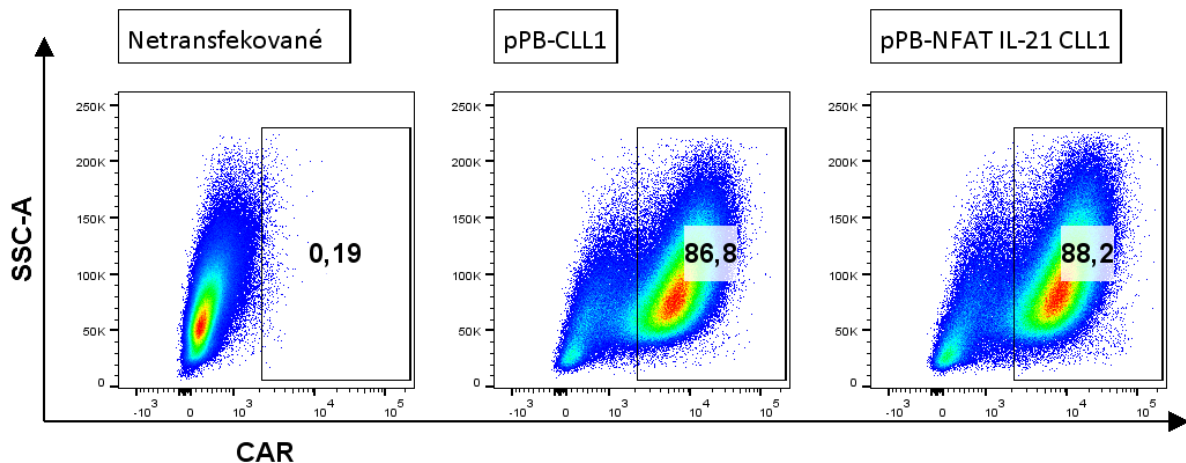
Po 24 hodinách byly transfekované buňky stimulovány tak, aby přednostně expandovaly buňky obsahující CAR. Proto byla použita protilátka anti-c-Myc, která se váže na molekulu Myc-tag, obsaženou v extracelulární části CAR. Růst netransfekovaných buněk byl podpořen stimulací protilátkami anti-CD3, anti-CD28. Protilátky byly adherovány na dno prázdných jamek 24 jamkové destičky a po jejich promytí k nim byly napipetovány buňky z původních jamek.

Po osmi dnech kultivace buněk v médiu s cytokiny, byla část buněk odebrána a zpracována pro ověření exprese CAR na průtokovém cytometru, a po sedmnácti dnech kultivace byly odebrány buňky na ověření sekrece IL-21.

Ověření exprese CAR proti CLL1 v transfekovaných buňkách

Buňky byly barveny protilátkou anti-c-Myc FITC (ředění 1:100), viabilita byla detekována barvením pomocí DAPI (ředění 1:2000).

Výsledná analýza CAR T buněk je na obrázku č. 21.



Obrázek č. 21: Ověření exprese chimérického antigenního receptoru

Na základě dat z průtokového cytometru byla potvrzena exprese CAR na povrchu transfekovaných buněk.

5.5.4 Ověření schopnosti CAR T buněk produkce interleukinu 21

Cílem experimentu bylo ověření funkčnosti plazmidu pPB-NFAT IL-21 CLL1 a schopnosti transfekovaných buněk produkovat interleukin 21 (IL-21). IL-21 se bude zjišťovat ze supernatantu CAR T buněk pomocí metody ELISA.

Buňky obsahující testovaný plazmid s inducibilní sekrecí IL-21 pod promotorem NFAT by měly být schopny po stimulaci exprimovat interleukin 21 a sekretovat jej do média. Zároveň víme, že druhý typ buněk transfekovaných pPB-CLL1 tuto schopnost postrádá.

Stimulace buněk

Na dno jamek 24 jamkové kultivační destičky byly adherovány protilátky anti-CD3 nebo anti-c-Myc, každá v objemu 2 μ l do 200 μ l PBS. Po následném promytí jamek byl do jamek přidán 1 milion buněk v 1 ml média CG. Jako negativní kontrola byl do prázdné jamky bez protilátek přidán 1 milion buněk v 1 ml média CG (viz tabulka níže). Nebyly použity žádné externí cytokiny.

Následně byly buňky kultivovány v CO₂ inkubátoru po dobu 24 hodin. Poté byly buňky odebrány do centrifugačních mikrozkuvek, centrifugovány rychlostí 300 g (1200 RPM) 5

minut při pokojové teplotě. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a rozdělen na alikvoty, které byly poté zamrazeny při – 80 °C.

ELISA IL-21 test

S využitím získaných alikvotů byl proveden ELISA IL-21 test (viz 4.2.9 ELISA IL-21). Ředící řada standardů IL-21 byla měřena ve dvojicích, vzorky měřeny ve trojicích. Schéma standardů a vzorků, společně s výslednými hodnotami optické denzity (OD), jsou uvedeny v tabulce č. 3.

STANDARD (pg/ml) OD	STANDARD (pg/ml) OD	VZOREK OD	VZOREK OD	VZOREK OD
BLANK 0,027	BLANK 0,031	C1 + α CD3 0,022	C1 + α CD3 0,026	C1 + α CD3 0,026
Standard 7 (31,3) 0,037	Standard 7 (31,3) 0,049	C1 + α MYC 0,026	C1 + α MYC 0,036	C1 + α MYC 0,031
Standard 6 (62,5) 0,09	Standard 6 (62,5) 0,089	C1 unstim. 0,038	C1 unstim. 0,032	C1 unstim. 0,035
Standard 5 (125) 0,195	Standard 5 (125) 0,163	C1N + α CD3 0,355	C1N + α CD3 0,382	C1N + α CD3 0,52
Standard 4 (250) 0,39	Standard 4 (250) 0,431	C1N + α MYC 3,836	C1N + α MYC 3,807	C1N + α MYC 3,881
Standard 3 (500) 0,78	Standard 3 (500) 0,767	C1N unstim. 0,208	C1N unstim. 0,185	C1N unstim. 0,228
Standard 2 (1000) 1,89	Standard 2 (1000) 1,815			
Standard 1 (2000) 3,157	Standard 1 (2000) 3,139			

Tabulka č. 3: Schéma ELISA testu a výsledná optická denzita (OD)

C1 = buňky s pPB-CLL1; C1N = buňky s pPB-NFAT IL-21 CLL1

Standardy IL-21 (pg/ml)	OD (MEAN)	Koncentrace
Blank (0)	0,029	<MIN
ST 7 (31,3)	0,043	35,45
ST 6 (62,5)	0,0895	87,377
ST 5 (125)	0,179	160,71
ST 4 (250)	0,4105	297,02
ST 3 (500)	0,7735	471,66
ST 2 (1000)	1,8525	991,21
ST 1 (2000)	3,148	>MAX

Tabulka č. 4: Ředící řada standardů a průměr jejich optické density

Typ buněk	Stimulace	OD (Mean)	Koncentrace (pg/ml) (Mean)
pPB-CLL1	Anti-CD3	0,025	<MIN
pPB-CLL1	Anti-c-Myc	0,031	<MIN
pPB-CLL1	Nestimulované	0,035	<MIN
pPB-NFAT IL-21 CLL1	Anti-CD3	0,419	300,66
pPB-NFAT IL-21 CLL1	Anti-c-Myc	3,841	>MAX
pPB-NFAT IL-21 CLL1	Nestimulované	0,207	179,79

Tabulka č. 5: Typ buněk, druh stimulace a jejich výsledný průměr optické density

Na základě optické density kalibrační křivky v tabulce č. 4, byla vypočítána koncentrace vyprodukovaného IL-21 v supernatantu stimulovaných buněk, viz tabulka č. 5.

Hodnoty optické density pro buňky s pPB-CLL1 se i v případě stimulovaných buněk pohybovali kolem hodnoty optické density blanku, na základě toho můžeme konstatovat, že buňky nejsou schopny produkce cytokinu IL-21, což odpovídá našim předpokladům.

Koncentrace IL-21 v supernatantu buněk s pPB-NFAT IL-21 CLL1 se zásadně lišily podle způsobu stimulace. Stimulací protilátkou anti-CD3 bylo dosaženo téměř dvojnásobné produkce IL-21 než v buňkách nestimulovaných (301 vs 180 pg/ml). Avšak při specifické stimulaci protilátkou anti-c-Myc byla koncentrace IL-21 tak vysoká, že nešla odečíst z kalibrační křivky, tedy koncentrace byla vyšší než 2000 pg/ml, to znamená, že byla minimálně desetkrát vyšší než u nestimulovaných buněk.

Na základě těchto výsledků byla potvrzena schopnost produkce interleukinu 21 stimulovanými buňkami, které byly připraveny zkoumaným plazmidem pPB-NFAT IL-21 CLL1.

6 Diskuze

Ačkoli se CAR T terapie hematologických malignit dostala až do fáze klinického hodnocení (Kymriah®, Yescarta®), její efektivita je stále přímo závislá na expanzi CAR T buněk *in vivo* a schopnosti odolat supresivnímu vlivu nádorového mikroprostředí, který v mnoha případech vede k neúspěchu terapie. Z toho důvodu jsou zkoumány možnosti, jak podpořit funkčnost CAR T buněk i jejich proliferaci. Jednou možností je využití cytokinů, které by byly schopny podpořit protinádorovou odpověď. Standardně jsou CAR T buňky kultivovány v selektivním prostředí, které podporuje proliferaci žádaných T lymfocytů, například přidávkem interleukinu 2 do kultivačního média. Tento postup však vede k diferenciaci CAR T buněk do terminálně efektorového fenotypu s nízkou schopností proliferace (Crompton et al., 2014). Jednou z možných alternativ je využití interleukinů 4, 7 nebo 21. Konkrétně směs interleukinů 4 a 7 byla v naší laboratoři testována a následně využita jako standardní kultivační směs, protože vede ke specifické expanzi transfekovaných buněk a udržuje vyšší proliferační potenciál zvýšenou expresí antiapoptotických molekul (Papadopoulou et al., 2014).

Dalším zvažovaným cytokinem, který by byl schopen ovlivnit funkci CAR T buněk je interleukin 21. Interleukin 21 podporuje proliferaci a předpokládá se jeho pozitivní vliv na protinádorové účinky CAR T buněčné terapie. Tato hypotéza vychází z poznatků, že účinnost CAR T buněčné terapie je ovlivněna T buněčným fenotypem efektorových buněk. Terminální efektorová diferenciaci T buněk snižuje jejich proliferační schopnosti. Naopak význam paměťového fenotypu CAR T buněk prokázala klinická studie, kde byla zvýšená frekvence CAR T buněk s T_{SCM} fenotypem spojena s vyšší mírou přežívání a proliferací *in vivo*, a také s vyšší účinností (Xu et al., 2014). Právě IL-21 je slibným prostředkem, jak ovlivnit stupeň diferenciaci směrem k ranému paměťovému fenotypu.

Pro účely testování této hypotézy *in vivo* byl v naší laboratoři připraven konstrukt, který umožňuje exprimovat na povrchu T buněk CAR specifický proti molekule CD19 a zároveň je schopen produkovat do svého okolí interleukin 21.

V rámci této práce byly stanoveny dva cíle. Prvním byla příprava, kultivace a testování CAR T buněk specifických proti molekule CD19. Zde byly použity dva konstrukty, které byly mezi sebou porovnány. Pro přípravu geneticky modifikovaných CAR T buněk byly použity již připravené konstrukty v podobě piggybac plazmidů pPB-CAR19 a pPB-NFAT IL-21 CAR19. Oba plazmidy obsahují gen pro expresi CAR se specifitou proti molekule CD19. Druhý zmíněný plazmid navíc obsahuje gen pro sekreci IL-21 pod NFAT promotorem. CAR T buňky připravené elektroporací zmíněnými dvěma plazmidy byly pak mezi sebou porovnávány.

Druhým cílem této práce byla konstrukce plazmidu specifického proti molekule CLL1 se schopností sekrece interleukinu 21 a následné ověření jeho funkčnosti v transfekovaných buňkách.

Pro genetickou modifikaci buněk je v naší laboratoři dlouhodobě úspěšně používán transpozonový systém piggyBac. Plazmidy jsou vnášeny do buněk elektroporací, zkusili jsme elektroporovat i dva plazmidy najednou. PBMC pro elektroporaci byly získávány z buffy coatů zdravých dárců krve.

Dále jsme se v rámci experimentální části pokoušeli zjistit, zda je možné integrovat naráz více inzertů z různých plazmidů do izolovaných PBMC. Takto by bylo teoreticky možné připravit CAR T buňky s expresí CARů dvou různých specifit případně další kombinace. Pro tento pokus jsme využili plazmidy obsahující CAR molekulu a dále plazmid s expresní kazetou pro fluorescenční protein, v našem případě EGFP. Standardní poměr plazmidů pro transfekci buněk je 2:1 pro plazmid vůči pBase, pro integraci dvou plazmidů a pBase byl upraven na poměr 1:1:1, ale bez změny množství DNA, tedy celkem bylo použito 5 µg pro jednu elektroporaci.

Elektroporované buňky byly aktivovány specificky přes molekulu Myc-Tag (CAR specifický proti molekule PSMA) nebo pomocí CD19 pozitivních B buněk přítomných ve směsi transfekovaných PBMC (CAR specifický proti molekule CD19). Po standardní kultivaci v prostředí interleukinů 4, 7 a 21, byly buňky spočítány, barveny na povrchovou expresi CAR a viabilitu, a následně analyzovány na průtokovém cytometru. V rámci diplomové práce byly provedeny dva nezávislé experimenty, každý s použitím PBMC z jiného dárce, kde se elektroporoval najednou plazmid pPB-CAR19 + pBase (poměr 2:1), nebo pPB-CAR19 + pPB-EGFP + pBase (poměr 1:1:1). Zajímalo nás, zda dojde k integraci obou inzertů a k expresi genů, které obsahují. Pokud by to tak bylo, mohlo by se k detekci CAR T buněk průtokovou cytometrií použít definování EGFP + populace buněk. Pro detekci exprese CARu byla použita polyklonální protilátka Goat-anti-Mouse APC, která se váže na extracelulární část molekuly CAR odvozené z protilátky myšího původu. Buňky produkující EGFP byly rozpoznány na základě jejich fluorescence měřené ve FITC kanálu průtokového cytometru.

Na obrázcích 8 a 13 je možné vidět, že 80–90 % buněk elektroporovaných třemi plazmidy je dvojitě pozitivní, tedy exprimují jak gen pro CAR, tak i EGFP (CAR+EGFP+). Jen kolem 5–12 % buněk je pouze CAR pozitivní populace (CAR+EGFP-) a 5-12 % je populace dvojitě negativních buněk (CAR-EGFP-). Zaujalo nás zcela mizivé procento pouze EGFP pozitivní populace (CAR-EGFP+). Původní vysvětlení bylo, že pokud se do buňky integroval pouze plazmid produkující EGFP a buňky pak nebyly během kultivace stimulovány B buňkami, přerostly je buňky obsahující CAR, které díky stimulaci daleko více proliferovaly. Avšak v souvislosti s experimentem v kapitole 5.2 bylo zjištěno, že absence populace EGFP pozitivních buněk se projevila i v případě, kdy byly buňky skupiny A podpořeny k růstu protilátkami anti-CD3 a anti-CD28. Na druhou stranu byly kultivovány v médiu s IL-2, kde je po kultivaci víc jak třetina buněk CAR-EGFP-.

Původní hypotéza, že je možné integrovat naráz inzerty z více plazmidů, však byla potvrzena. Jak již bylo zmíněno ve výsledkové části, na základě dosažené účinnosti jsme se rozhodli expresi EGFP

používat jako indikátor přítomnosti povrchové CAR molekuly. Snížení frekvence CAR pozitivních buněk o 5-12 % je pro účely našich experimentů přijatelná odchylka. Zároveň můžeme konstatovat, že dosahujeme srovnatelných výsledků kultivovaných elektroporovaných buněk, kde většina z nich jsou CAR T buňky. Postup elektroporace a kultivace je dobře optimalizován. CAR T buňky mají zároveň požadovaný fenotyp diferenciaci viz (Stach et al., 2020).

V pokusu 5.2 jsem porovnal transfekované buňky kultivované v médiu s IL-2 nebo v médiu s IL-4, 7 a 21. Jednoznačně buňky kultivované v médiu s IL-4, 7 a 21 lépe proliferovaly a obsahovaly o 20 % víc CAR+EGFP+ buněk. Výsledky jsou srovnatelné s těmi, které kolegové z našeho oddělení prezentovali v článku viz (Ptackova et al., 2018). V tomto článku dále hodnotili vliv počáteční stimulace transfekovaných buněk na následnou proliferaci, což jsem v experimentu neověřoval.

V pokusu 5.3 byla porovnávána proliferace a cytotoxicita CAR T buněk připravených transfekcí plasmidu pPB-CAR19 (CAR19 T buňky) nebo plasmidu pPB-NFAT IL-21 CAR19 (CAR19-IL21 T buňky), které byly kultivovány několik dní s nadbytkem leukemických buněk bez přítomnosti cytokinů. Jako kontrolní buňky byly připraveny CAR T buňky transfekované plazmidem obsahující CAR proti prostatické molekule PSMA. Pro účely experimentu byly izolovány PBMC z krve dvou pacientů (A a B), kteří byli diagnostikováni na chronickou lymfocytární leukemii. Tyto buňky pak byly použity jako terčové buňky v cytotoxickém testu a zároveň jako stimulans pro proliferaci CAR T buněk.

Pro kokultivaci jsme zvolili poměr efektorových a terčových buněk E:T 1:2, 1:10 a 1:50 vždy v nadbytku terčových buněk viz tabulka č. 1. Pokus byl hodnocen ve dvou časových bodech – Den 3 a Den 7, mezi kterými byla ukázaná významná změna složení kultivované směsi buněk. Jak bylo již zmíněno výše, pro účely hodnocení experimentu jsme použili expresi EGFP jako indikátor přítomnosti povrchové CAR molekuly.

Pro správné vyhodnocení našich dvou zjišťovaných parametrů byla zvolena jiná gatovací strategie pro porovnání proliferace CAR T buněk (obrázek č. 9) a pro zjištění cytotoxicity (obrázek č. 12).

Procento živých CAR T buněk se v den 7 zvýšilo, jak je možné vidět na obrázcích 10 a 11, což odpovídalo našim předpokladům. Nejlépe proliferovaly CAR19-IL21 T buňky, výrazná proliferace byla pozorována po stimulaci buněk obou pacientů. Tato skutečnost byla pozorována i v naměřených datech ostatních poměrů E:T. V porovnání s tím, výsledky proliferace CAR19 T buněk, se lišily mezi pacienty a nebyly tak jednoznačné. CAR T buňky proti PSMA dle očekávání prakticky neproliferovaly.

Nejpřímějším důkazem cytotoxicity vyrobených CAR T buněk je prokázat jejich schopnost zabíjet buňky nádorové, v tomto případě buňky CLL. Terčové CLL buňky byly od CAR T buněk odlišeny na základě absence fluorescence EGFP. Poté se zjišťovalo procento mrtvých terčových buněk. Cytotoxicita se vypočítala na základě vzorce uvedeného ve výsledkové části. Bylo zapotřebí zohlednit spontánně mrtvé terčové buňky, které by falešně zvyšovaly dosažená procenta cytotoxicity. Výsledky cytotoxicity byly

shrnuty v tabulce č. 2. V první řadě jsme na základě kontrolních buněk CAR T proti PSMA (0% cytotoxicity) ověřili, že vyrobené CAR T buňky specifické proti molekule CD19 jsou cytotoxické vůči terčovým buňkám. Lépe byly rozeznány CLL buňky pacienta B než pacienta A a cytotoxicita byla přes 40 %, což považujeme za velice dobrý výsledek. Při porovnání našich dvou CAR T buněk proti CD19 dosáhly ty se sekrecí IL-21 lepší cytotoxicity pouze proti buňkám pacienta A. V případě pacienta B byly hodnoty cytotoxicity přibližně stejné.

Cytotoxická reakce je dynamický proces, který probíhá spíše v rámci hodin než dní, proto nás nepřekvapilo, že v den 7 se naměřily spíše nižší hodnoty cytotoxicity než v den 3. Na základě experimentu 5.3 můžeme konstatovat, že ve schopnosti proliferace měli výhodu CAR T buňky sekretující IL-21. Tyto buňky měli stejnou, ne-li lepší schopnost cytotoxicity proti primárním CLL buňkám.

V následujícím experimentu 5.4 jsme se rozhodli ověřit vlastnosti CAR T buněk opakovaně stimulovaných leukemickými buňkami. Jednak jsme opět pozorovali proliferaci CAR T buněk a schopnost produkce IFN- γ a degranulace po krátké kokultivaci (4 hod) s buňkami RAMOS. Jde o B-buněčnou linii odvozenou z buněk Burkittova lymfomu, která exprimuje na svém povrchu mimo jiné i CD19 a výrazně stimuluje cytotoxicitu CAR19 T buněk. Pro ověření produkce IFN- γ jsme použili kit pro jeho sekreční analýzu průtokovým cytometrem (Miltenyi Biotec), degranulace byla ověřena na základě povrchové exprese molekuly CD107a na povrchu CAR T buněk. V experimentu byly porovnány CAR T buňky proti molekule CD19, produkující IL-21 (CAR19-IL21 T) a neprodukující IL-21 (CAR19 T), tyto buňky byly vyrobeny z PBMC získaných od dárců 1 a 2. Výsledky měření CAR T buněk od obou dárců byly srovnatelné, proto jsme dále prezentovali pouze výsledná data CAR T buněk od dárců 1.

Jako terčové buňky byly opět použity PBMC izolované z krve pacienta s CLL. Leukemické buňky se v nadbytku (poměr 1:10) opakovaně přidávaly ke kultivovaným CAR T buňkám. Konkrétně šlo o den 16, den 19 a den 21 po přípravě CAR T buněk.

Nakonec v den 23 byla část buněk stimulována přidáním buněčné linie RAMOS, opět v poměru 1:10. Poté byl použit kit pro sekreční analýzu IFN- γ , buňky byly barveny a následně analyzovány na průtokovém cytometru. Pro lepší přehlednost průběhu experimentu byla vytvořena časová osa na obrázku č. 14. Pro správné vyhodnocení našich zjišťovaných parametrů jsme opět použili rozdílné gatovací strategie, pro produkci IFN- γ (obrázek č. 16) a pro degranulaci (obrázek č. 17).

Reprezentativní dot ploty pro porovnání CAR19 T a CAR19-IL21 T buněk jsou na obrázku č. 15. V případě, že jsou obě skupiny CAR T buněk kultivovány bez stimulace leukemickými buňkami, jejich schopnost proliferace se neliší, v případě že jsou obě skupiny stimulovány kokultivací s leukemickými buňkami, CAR19-IL21 T buňky prolifерují více než CAR19 T buňky (55 vs 13 % CAR T+). Opět je tedy vidět pozitivní vliv IL-21 na proliferaci CAR T buněk a tento závěr koresponduje se závěrem výše

uvedeného experimentu 5.3. V případě sekreční analýzy IFN- γ byly porovnávány odpovídající vzorky po stimulaci buňkami RAMOS se stejnými vzorky bez stimulace.

V případě, že CAR T buňky nebyly stimulovány leukemickými buňkami, ani linií RAMOS jsme produkci IFN- γ neočekávali, což bylo potvrzeno. Po stimulaci buněčnou linií RAMOS došlo u CAR19-IL21 T buněk i CAR19 T buněk ke zvýšení procent IFN- γ pozitivních buněk (14 vs 26 %).

Opakovaná stimulace leukemickými buňkami vedla i bez stimulace buněčnou linií RAMOS k produkci IFN- γ . V tomto případě bylo CAR19-IL21 T buněk produkujících IFN- γ 2x více než CAR19 T buněk. Po stimulaci buňkami RAMOS došlo k výraznému navýšení buněk produkujících IFN- γ u obou CAR T buněk. CAR19-IL21 T buněk produkujících IFN- γ bylo opět více než CAR19 T buněk.

Hodnocení degranulace bylo také provedeno srovnáním vzorků stimulovaných buňkami RAMOS se vzorky bez stimulace. Vyhodnocení bylo prezentováno formou překryvu histogramů, kde červený histogram reprezentuje stimulovaný vzorek a modrý histogram odpovídající vzorek bez stimulace. Přesto, že CAR19 T buňky po opakované stimulaci leukemickými buňkami méně proliferovaly, procentuální vyjádření CD107a pozitivní populace se mezi vzorky CAR19 T a CAR19-IL21 T buněk příliš nelišilo. Proto jsme se rozhodli prezentovat navíc i MFI CD107a pozitivní populace u vzorků po stimulaci buňkami RAMOS. Tímto způsobem je lépe vidět, že intenzita degranulace je u CAR19-IL21 vyšší než u odpovídajících vzorků CAR19 T buněk.

Na základě prezentovaných dat můžeme znovu potvrdit naši hypotézu, že IL-21 produkovaný našimi CAR T buňkami podporuje jejich proliferaci v prostředí nádorových buněk CLL pacientů. K tomu jsme si navíc ověřili, že jsou uvedené buňky schopny lepší produkce IFN- γ a degranulace porovnání s CAR19 T buňkami.

Druhá část práce byla zaměřena na přípravu plazmidu obsahující gen pro CAR se specifitou proti molekule CLL1. Tato molekula označovaná také jako CLEC12A byla v několika studiích prezentována jako vhodný target pro CAR T buněčnou terapii akutní myeloidní leukémie (Zhang et al., 2020; Zhou & Chng, 2014).

Mým úkolem bylo použít již připravený konstrukt pPB-CLL1 a vložit do něj gen pro produkci IL-21 pod NFAT promotorem. Tento gen byl získán z plazmidu pPB-NFAT IL-21 CAR19. Na základě analýzy plazmidových map byl navržen postup přípravy plazmidu tak, že byla ponechána kostra plazmidu pPB-NFAT IL-21 CAR19 a byla pouze vyměněna CAR doména se specifitou proti molekule CD19 za doménu se specifitou proti molekule CLL1. Tento postup byl proveden jednoduchým restričním štěpením pomocí enzymu Eco RI HF, viz obrázek č. 18.

Po štěpení byly vzniklé fragmenty rozděleny pomocí elektroforézy a z gelu byla vyříznuty fragmenty ke konstrukci plazmidu. Po izolaci DNA z gelu a jejím pročištění byla provedena ligace. Vzniklá ligační směs byla teplotním šokem transformována do bakterií, které byly inokulovány na misku s LB médiem s ATB.

Následující den bylo vybráno 10 kolonií, které byly očkované do skleněných zkumavek s LB médiem s ATB. Ze všech namnožených bakterií pak byla pomocí QIAGEN kitu izolována a přečištěna DNA, která byla následně použita pro ověření úspěšnosti ligace. Použitím dalších restričních štěpení bylo ověřeno, který z deseti vzorků izolované DNA obsahuje inzert správné velikosti a v požadovaném směru, protože vkládaný inzert mohl být ligován oběma směry díky kompatibilním koncům. Na základě provedených restričních štěpení, viz obrázky 19 a 20, byl vybrán vhodný vzorek miniprepu. Ten bylo třeba pro elektroporační pokusy namnožit „na veliko“, proto byla DNA znovu použita pro transformaci bakterií. Ze 100 ml bakteriální kultury bylo vyizolováno 200–600 µg plazmidové DNA.

Následné ověření funkčnosti plazmidu bylo provedeno na buňkách, které byly plazmidem transfekovány. Základní otázkou bylo, zda bude plazmid funkční a zda budou tudíž transfekované buňky exprimovat na povrchu CAR molekulu a sekretovat IL-21. Za tímto účelem byly izolovány PBMC z plné krve dárce a do nich byly elektroporovány plazmidy obsahující CAR se specifitou proti molekule CLL1, náš nově zkonstruovaný plazmid pPB-NFAT IL-21 CLL1 a původní plazmid pPB-CLL1. CAR proti molekule CLL1 obsahuje ve své extracelulární části molekulu Myc-Tag. Na základě přítomnosti této molekuly můžeme buňky specificky stimulovat protilátkou anti-c-Myc a pomocí protilátky anti-c-Myc s fluorochromem jsme schopni CAR proti CLL1 detekovat na průtokovém cytometru.

Připravené CAR T buňky byly tedy stimulovány anti-c-Myc protilátkou a kultivovány v přítomnosti cytokinů 4 a 7.

Po osmi dnech kultivace buněk byla ověřena exprese CAR proti CLL1 barvením protilátkou anti-c-Myc FITC (ředění 1:100), výsledné dot ploty jsou vidět na obrázku č. 21. Z nich je patrné, že buňky transfekované nově zkonstruovaným plazmidem exprimují na svém povrchu CAR proti CLL1 a proliferují stejně dobře jako CAR T buňky elektroporované plazmidem pPB-CLL1.

Pro úplné ověření funkčnosti plazmidu bylo třeba ještě ověřit produkci IL-21 po stimulaci CAR T buněk. K tomuto účelu byla část připravených CAR T buněk odebrána a důkladně promyta. Následně byly testované CAR T buňky stimulovány protilátkou anti-CD3, nebo anti-c-Myc nebo byly ponechány bez stimulace. Jako negativní kontrola byly do experimentu zařazeny i CAR T buňky transfekované plazmidem pPB-CLL1. Po 24 hodinách byly buňky stočeny a byl odebrán supernatant.

Ten byl následně analyzován na přítomnost produkovaného IL-21 pomocí testu ELISA.

Na základě vyhodnocení testu ELISA, viz tabulka č. 5, můžeme konstatovat, že námi připravený plazmid pPB-NFAT IL-21 CLL1 je funkční. Nejvyšší míry produkce IL-21 je dosaženo specifickou aktivací těchto CAR T buněk přes molekulu Myc-tag, která vedla k produkci IL-21 o koncentraci vyšší než 2000 pg/ml.

7 Závěr

Autor této diplomové práce si osvojil práci s tkáňovými kulturami, naučil se zpracovávat vzorky krve, transfekovat buňky s využitím transpozonového systému, stimulovat je a kultivovat. Naučil se zpracovávat buňky pro analýzu na průtokovém cytometru nebo pro metodu ELISA. Také si osvojil molekulární metody potřebné k izolaci, štěpení a ligaci DNA a k transformaci bakterií. Zároveň se orientoval v problematice imunoterapie CAR T buňkami. Několik typů CAR T buněk připravil a analyzoval, sám zkonstruoval plazmid pro CAR proti CLL1 a pro indukovanou sekreci IL-21 a ověřil ho. Dále se seznámil s principem cytotoxických testů, jejich návrhem, přípravou a analýzou.

Jak již bylo řečeno, účinek CAR T buněčné terapie je tlumen sníženou proliferací efektorových buněk *in vivo* v důsledku supresivního nádorového prostředí řady hematologických malignit jako je CLL. Na základě provedených experimentů předpokládáme, že použití CAR T buněk sekretujících interleukin 21 by mohlo vést ke zvýšení potence CAR T buněčné terapie.

8 Použitá literatura

- Algarra, I., Garcia-Lora, A., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., & Garrido, F. (2004). The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*, *53*(10), 904-910. doi:10.1007/s00262-004-0517-9
- Armand, P. (2015). Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood*, *125*(22), 3393-3400. doi:10.1182/blood-2015-02-567453
- Bell, D. J., & Gaillard, F. (2016). WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Retrieved from <https://radiopaedia.org/articles/who-classification-of-tumours-of-haematopoietic-and-lymphoid-tissues-1>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, *68*(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brown, P. A., Shah, B., Fathi, A., Wieduwilt, M., Advani, A., Aoun, P., Barta, S. K., Boyer, M. W., Bryan, T., Burke, P. W., Cassaday, R., Coccia, P. F., Coutre, S. E., Damon, L. E., DeAngelo, D. J., Frankfurt, O., Greer, J. P., Kantarjian, H. M., Klisovic, R. B., Kupfer, G., Litzow, M., Liu, A., Mattison, R., Park, J., Rubnitz, J., Saad, A., Uy, G. L., Wang, E. S., Gregory, K. M., & Ogba, N. (2017). NCCN Guidelines Insights: Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 1.2017. *J Natl Compr Canc Netw*, *15*(9), 1091-1102. doi:10.6004/jnccn.2017.0147
- Burnet, F. M. (1970). The Concept of Immunological Surveillance. *Progress in Tumor Research*, 1-27. doi:10.1159/000386035
- Crompton, J. G., Sukumar, M., & Restifo, N. P. (2014). Uncoupling T-cell expansion from effector differentiation in cell-based immunotherapy. *Immunological Reviews*, *257*(1), 264-276. doi:<https://doi.org/10.1111/imr.12135>
- Dong, Zheng, L., Lin, J., Zhang, B., Zhu, Y., Li, N., Xie, S., Wang, Y., Gao, N., & Huang, Z. (2019). Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature*, *573*(7775), 546-552. doi:10.1038/s41586-019-1537-0
- Dushek, O., Goyette, J., & van der Merwe, P. A. (2012). Non-catalytic tyrosine-phosphorylated receptors. *Immunological Reviews*, *250*(1), 258-276. doi:<https://doi.org/10.1111/imr.12008>
- Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G., & Schindler, D. G. (1993). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(2), 720-724. doi:10.1073/pnas.90.2.720
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M. (1999). The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *341*(3), 164-172. doi:10.1056/nejm199907153410306
- Fischer, K., Cramer, P., Busch, R., Bottcher, S., Bahlo, J., Schubert, J., Pfluger, K. H., Schott, S., Goede, V., Isfort, S., von Tresckow, J., Fink, A. M., Buhler, A., Winkler, D., Kreuzer, K. A., Staib, P., Ritgen, M., Kneba, M., Dohner, H., Eichhorst, B. F., Hallek, M., Stilgenbauer, S., & Wendtner, C. M. (2012). Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*, *30*(26), 3209-3216. doi:10.1200/JCO.2011.39.2688
- Franco, R., Martinez-Pinilla, E., Lanciego, J. L., & Navarro, G. (2016). Basic Pharmacological and Structural Evidence for Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization. *Front Pharmacol*, *7*, 76. doi:10.3389/fphar.2016.00076
- Fridman, W. H., Remark, R., Goc, J., Giraldo, N. A., Becht, E., Hammond, S. A., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., & Sautes-Fridman, C. (2014). The immune microenvironment: a major player in human cancers. *Int Arch Allergy Immunol*, *164*(1), 13-26. doi:10.1159/000362332

- Garcia, K. C., Degano, M., Stanfield, R. L., Brunmark, A., Jackson, M. R., Peterson, P. A., Teyton, L., & Wilson, I. A. (1996). An $\alpha\beta$ T Cell Receptor Structure at 2.5 Å and Its Orientation in the TCR-MHC Complex. *Science*, 274(5285), 209-219. doi:10.1126/science.274.5285.209
- Garcia, K. C., Scott, C. A., Brunmark, A., Carbone, F. R., Peterson, P. A., Wilson, I. A., & Teyton, L. (1996). CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature*, 384(6609), 577-581. doi:10.1038/384577a0
- Gasparri, M. L., Ruscito, I., Taghavi, K., Farooqi, A. A., Papadia, A., Focaccetti, C., Barnaba, V., Panici, P. B., & Mueller, M. D. (2017). The Immunobiology of Cancer: From Tumor Escape to Cancer Immunoediting Towards Immunotherapy in Gynecologic Oncology. In *Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements* (pp. 193-204).
- Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 10024-10028. doi:10.1073/pnas.86.24.10024
- Hills, R. K., Castaigne, S., Appelbaum, F. R., Delaunay, J., Petersdorf, S., Othus, M., Estey, E. H., Dombret, H., Chevret, S., Ifrah, N., Cahn, J.-Y., Récher, C., Chilton, L., Moorman, A. V., & Burnett, A. K. (2014). Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials. *The Lancet Oncology*, 15(9), 986-996. doi:10.1016/s1470-2045(14)70281-5
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373(16), 1541-1552. doi:10.1056/NEJMra1400972
- Huse, M. (2009). The T-cell-receptor signaling network. *J Cell Sci*, 122(Pt 9), 1269-1273. doi:10.1242/jcs.042762
- Chiorazzi, N., Rai, K. R., & Ferrarini, M. (2005). Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 352(8), 804-815. doi:10.1056/NEJMra041720
- Ivics, Z., Li, M. A., Mates, L., Boeke, J. D., Nagy, A., Bradley, A., & Izsvak, Z. (2009). Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods*, 6(6), 415-422. doi:10.1038/nmeth.1332
- Juneja, V. R., McGuire, K. A., Manguso, R. T., LaFleur, M. W., Collins, N., Haining, W. N., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2017). PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity. *J Exp Med*, 214(4), 895-904. doi:10.1084/jem.20160801
- Kane, L. P., Lin, J., & Weiss, A. (2000). Signal transduction by the TCR for antigen. *Current Opinion in Immunology*, 12(3), 242-249. doi:[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00083-2)
- Kearney, C. J., Vervoort, S. J., Hogg, S. J., Ramsbottom, K. M., Freeman, A. J., Lalaoui, N., Pijpers, L., Michie, J., Brown, K. K., Knight, D. A., Sutton, V., Beavis, P. A., Voskoboinik, I., Darcy, P. K., Silke, J., Trapani, J. A., Johnstone, R. W., & Oliaro, J. (2018). Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Science Immunology*, 3(23), eaar3451. doi:10.1126/sciimmunol.aar3451
- Kelderman, S., & Kvistborg, P. (2016). Tumor antigens in human cancer control. *Biochim Biophys Acta*, 1865(1), 83-89. doi:10.1016/j.bbcan.2015.10.004
- Ma, H., Padmanabhan, I. S., Parmar, S., & Gong, Y. (2019). Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy. *J Hematol Oncol*, 12(1), 41. doi:10.1186/s13045-019-0726-5
- Marrack, P., & Kappler, J. (1987). The T cell receptor. *Science*, 238(4830), 1073-1079. doi:10.1126/science.3317824
- Meacham, C. E., & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), 328-337. doi:10.1038/nature12624
- Meyers, J., Yu, Y., Kaye, J. A., & Davis, K. L. (2013). Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs. *Appl Health Econ Health Policy*, 11(3), 275-286. doi:10.1007/s40258-013-0032-2
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*, 27, 16-25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004

- Morgan, R. A., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2010). Adoptive cell therapy: genetic modification to redirect effector cell specificity. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, *16*(4), 336-341. doi:10.1097/PPO.0b013e3181eb3879
- Nelson, D. E., Ihekwaba, A. E., Elliott, M., Johnson, J. R., Gibney, C. A., Foreman, B. E., Nelson, G., See, V., Horton, C. A., Spiller, D. G., Edwards, S. W., McDowell, H. P., Unitt, J. F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D. B., & White, M. R. (2004). Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, *306*(5696), 704-708. doi:10.1126/science.1099962
- Oh-hora, M., & Rao, A. (2008). Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, *20*(3), 250-258. doi:10.1016/j.coi.2008.04.004
- Papadopoulou, A., Gerdemann, U., Katari, U. L., Tzannou, I., Liu, H., Martinez, C., Leung, K., Carrum, G., Gee, A. P., Vera, J. F., Krance, R. A., Brenner, M. K., Rooney, C. M., Heslop, H. E., & Leen, A. M. (2014). Activity of Broad-Spectrum T Cells as Treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 Infections after HSCT. *Science Translational Medicine*, *6*(242), 242ra283-242ra283. doi:10.1126/scitranslmed.3008825
- Pardoll, D. (2015). Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*, *42*(4), 523-538. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.05.003
- Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, *33*(17), 1974-1982. doi:10.1200/JCO.2014.59.4358
- Ptackova, P., Musil, J., Stach, M., Lesny, P., Nemeckova, S., Kral, V., Fabry, M., & Otahal, P. (2018). 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*, *20*(4), 507-520. doi:10.1016/j.jcyt.2017.10.001
- Ramsay, A. G., Clear, A. J., Fatah, R., & Gribben, J. G. (2012). Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood*, *120*(7), 1412-1421. doi:10.1182/blood-2012-02-411678
- Ribatti, D. (2014). From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: an historical reappraisal. *Immunol Lett*, *161*(1), 96-99. doi:10.1016/j.imlet.2014.05.010
- Rincón, M., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2001). Signal transduction by MAP kinases in T lymphocytes. *Oncogene*, *20*(19), 2490-2497. doi:10.1038/sj.onc.1204382
- Rossig, C., & Brenner, M. K. (2004). Genetic modification of T lymphocytes for adoptive immunotherapy. *Mol Ther*, *10*(1), 5-18. doi:10.1016/j.ymthe.2004.04.014
- Sadelain, M. (2017). CD19 CAR T Cells. *Cell*, *171*(7), 1471. doi:10.1016/j.cell.2017.12.002
- Samelson, L. E. (2002). Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol*, *20*, 371-394. doi:10.1146/annurev.immunol.20.092601.111357
- Sawyers, C. L. (1999). Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *340*(17), 1330-1340. doi:10.1056/nejm199904293401706
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, *63*(1), 11-30. doi:10.3322/caac.21166
- Stach, M., Ptackova, P., Mucha, M., Musil, J., Klener, P., & Otahal, P. (2020). Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy*, *22*(12), 744-754. doi:10.1016/j.jcyt.2020.08.005
- Stanislawski, T., Voss, R.-H., Lotz, C., Sadovnikova, E., Willemsen, R. A., Kuball, J., Ruppert, T., Bolhuis, R. L. H., Melief, C. J., Huber, C., Stauss, H. J., & Theobald, M. (2001). Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nature Immunology*, *2*(10), 962-970. doi:10.1038/ni1001-962
- Stone, R. M., Mandrekar, S. J., Sanford, B. L., Laumann, K., Geyer, S., Bloomfield, C. D., Thiede, C., Prior, T. W., Dohner, K., Marcucci, G., Lo-Coco, F., Klisovic, R. B., Wei, A., Sierra, J., Sanz, M. A., Brandwein, J. M., de Witte, T., Niederwieser, D., Appelbaum, F. R., Medeiros, B. C., Tallman, M. S., Krauter, J., Schlenk, R. F., Ganser, A., Serve, H., Ehninger, G., Amadori, S., Larson, R. A., & Dohner, H. (2017). Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*, *377*(5), 454-464. doi:10.1056/NEJMoa1614359

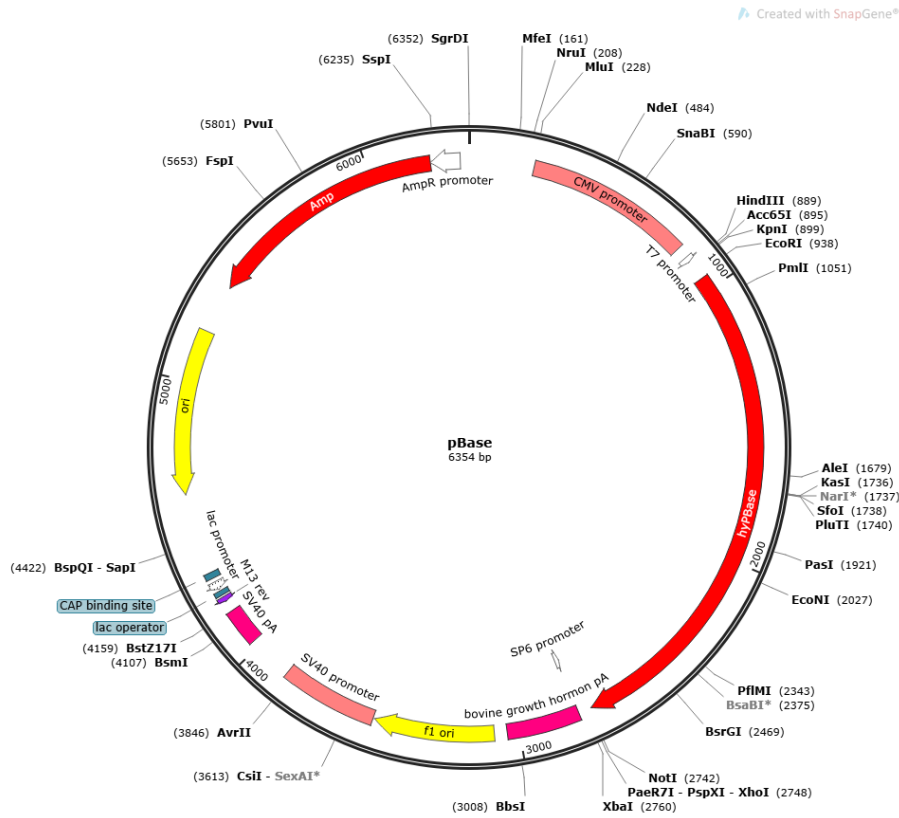
- Taghiloo, S., & Asgarian-Omran, H. (2021). Immune evasion mechanisms in acute myeloid leukemia: A focus on immune checkpoint pathways. *Crit Rev Oncol Hematol*, *157*, 103164. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.103164
- Takeuchi, A., & Saito, T. (2017). CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function. *Front Immunol*, *8*, 194. doi:10.3389/fimmu.2017.00194
- Tallman, M. S., Wang, E. S., Altman, J. K., Appelbaum, F. R., Bhatt, V. R., Bixby, D., Coutre, S. E., De Lima, M., Fathi, A. T., Fiorella, M., Foran, J. M., Hall, A. C., Jacoby, M., Lancet, J., LeBlanc, T. W., Mannis, G., Marcucci, G., Martin, M. G., Mims, A., O'Donnell, M. R., Olin, R., Peker, D., Perl, A., Pollyea, D. A., Pratz, K., Prebet, T., Ravandi, F., Shami, P. J., Stone, R. M., Strickland, S. A., Wieduwilt, M., Gregory, K. M., Ocn, Hammond, L., & Ogba, N. (2019). Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, *17*(6), 721-749. doi:10.6004/jnccn.2019.0028
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, *60*(5), 523-533. doi:10.1007/s00253-002-1158-6
- Thibodeau, J., Bourgeois-Daigneault, M. C., & Lapointe, R. (2012). Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, *1*(6), 908-916. doi:10.4161/onci.21205
- Thomas, D. A., & Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, *8*(5), 369-380. doi:10.1016/j.ccr.2005.10.012
- van der Merwe, P. A., & Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol*, *11*(1), 47-55. doi:10.1038/nri2887
- Ward, E., DeSantis, C., Robbins, A., Kohler, B., & Jemal, A. (2014). Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, *64*(2), 83-103. doi:10.3322/caac.21219
- Wood, B. L., Arroz, M., Barnett, D., DiGiuseppe, J., Greig, B., Kussick, S. J., Oldaker, T., Shenkin, M., Stone, E., & Wallace, P. (2007). 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom*, *72 Suppl 1*, S14-22. doi:10.1002/cyto.b.20363
- Wu, J., Fu, J., Zhang, M., & Liu, D. (2015). Blinatumomab: a bispecific T cell engager (BiTE) antibody against CD19/CD3 for refractory acute lymphoid leukemia. *J Hematol Oncol*, *8*, 104. doi:10.1186/s13045-015-0195-4
- Xu, Y., Zhang, M., Ramos, C. A., Durett, A., Liu, E., Dakhova, O., Liu, H., Creighton, C. J., Gee, A. P., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Savoldo, B., & Dotti, G. (2014). 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*, *123*(24), 3750-3759. doi:10.1182/blood-2014-01-552174
- Zhang, H., Gan, W. T., Hao, W. G., Wang, P. F., Li, Z. Y., & Chang, L. J. (2020). Successful Anti-CLL1 CAR T-Cell Therapy in Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*, *10*, 685. doi:10.3389/fonc.2020.00685
- Zhao, L., & Cao, Y. J. (2019). Engineered T Cell Therapy for Cancer in the Clinic. *Front Immunol*, *10*, 2250. doi:10.3389/fimmu.2019.02250
- Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C. J., Gattinoni, L., Palmer, D. C., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2006). High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther*, *13*(1), 151-159. doi:10.1016/j.ymthe.2005.07.688
- Zhou, J., & Chng, W. J. (2014). Identification and targeting leukemia stem cells: The path to the cure for acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells*, *6*(4), 473-484. doi:10.4252/wjsc.v6.i4.473
- Zuccolotto, G., Fracasso, G., Merlo, A., Montagner, I. M., Rondina, M., Bobisse, S., Figini, M., Cingarlini, S., Colombatti, M., Zanovello, P., & Rosato, A. (2014). PSMA-specific CAR-engineered T cells eradicate disseminated prostate cancer in preclinical models. *PLoS One*, *9*(10), e109427. doi:10.1371/journal.pone.0109427

9 Přílohy

9.1 Plazmidy piggyBac vektorů

Ilustrační mapy vybraných vektorů použitých v Diplomové práci.

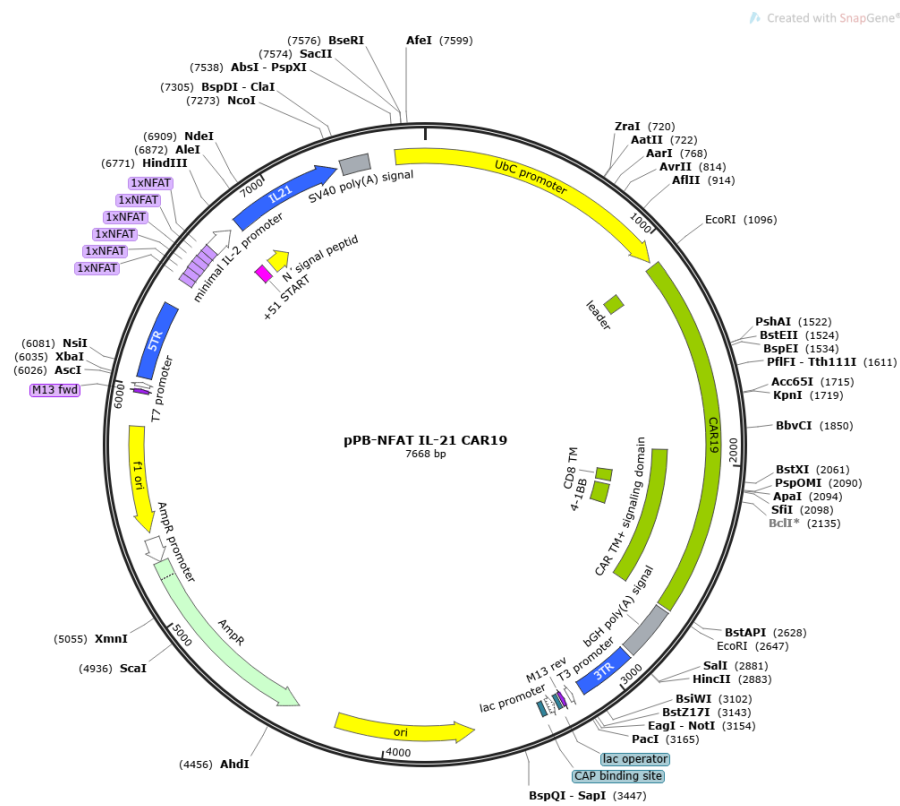
9.1.1 pBase



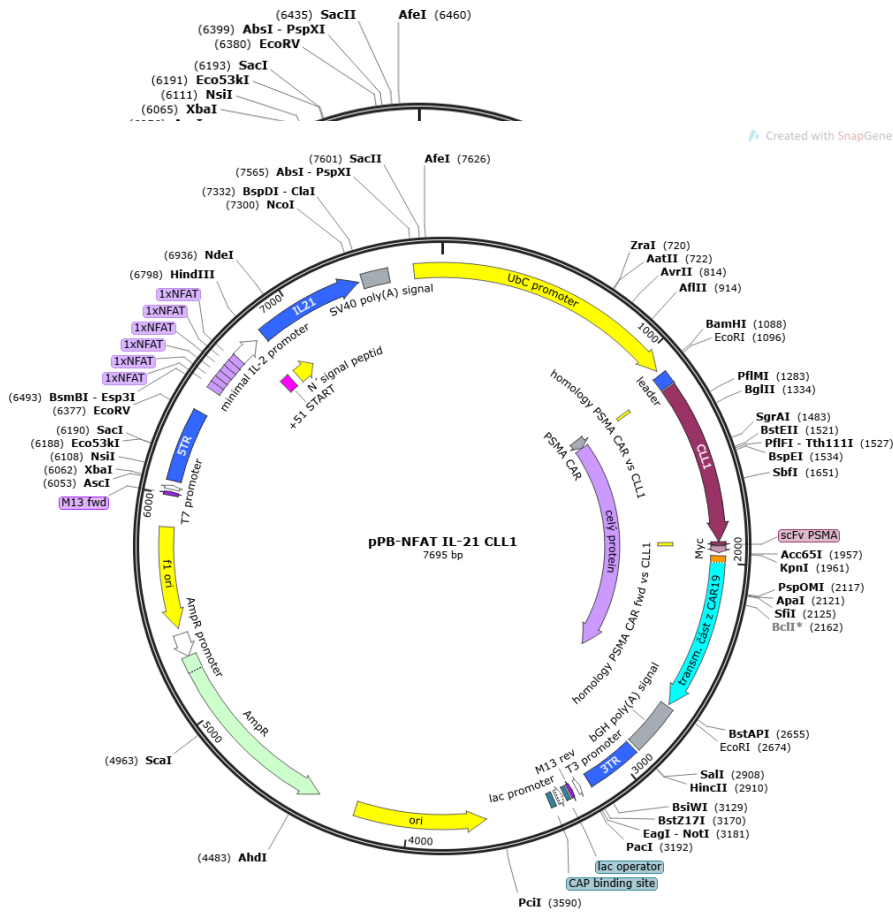
9.1.2 pPB-CAR19



9.1.3 pPB-NFAT IL-21 CAR19



9.1.4 pPB-CLL1



9.1.5 pPB-NFAT IL-21 CLL1

9.2 DNA sekvence transpozonu pPB-NFAT IL-21 CAR19

Tripletová DNA sekvence transpozonu pPB-NFAT IL-21 CAR19

5 ITR

CTAGATTAACCCTAGAAAGATAGTCTGCGTAAAAATTGACGCATGCATTCTTGAAATATTGCTCTCTCTTTCTAAATAGCGC
GAATCCGTCGCTGTGCATTTAGGACATCTCAGTCGCCGCTTGGAGCTCCCGTGAGGCGTGCTTGCAATGCCGTAAGTG
TCACTGATTTTGAACATAACGACCGCGTGAGTCAAATGACGCATGATTATCTTTACGTGACTTTTAAGATTTAACTC
ATACGATAATTATATTGTTATTTTCATGTTCTACTTACGTGATAACTTATTATATATATATTTTCTTGTATAGATATCAACTAGA
ATGCTAGCTGTCTCACAAAATAAAGTAAGCCCGACTGAGTGCAGAAAGGCGGGCTGGCGGGTCTGGTCTCCCCATG
CGGCCACCAGAGGCCCTGCAGCCTTCAGTCT

6X NFAT

CGAGACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATG
AAACAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGAAA

minimalní IL-2 promotor

CAGTTTTTCCTCCACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCCACATTTGACACCCCCATAATATTTTCCAGAATTA
CAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTCCCTATCACTCTCTTAAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCA
AGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGAGGTCAAGTCTGGCAAC

IL21

atggaacgcattgtgattgctgatggtgattttctgggcaccctggtgcataaaagcagcagccagggccaggatgccatattgctgatgcccagctgattgatattggtatcagctga
aaaactatgtgaacgatctggtgccgaatttctccggcgcgggaagatgtgaaaccaactcgaatggagcgcgttagctgcttcagaaagcgcagctgaaaagcgcgaacaccggca
acaacgaacgcattattaacgtgagcattaaaaactgaaacgaaaccgagcaccacgcgggcccggccagaaacatgcctgacctgcccagctgctgatagctatgaaaaaaa
ccggcgaagaatttctggaacgcttaaaagcctgctgcagaaaatgattcatcagcatctgagcagccgaccat

SV40 polyA

ggcagcgaagatagctaattgtacacgaatcgatAACTTGTATTATGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTCCAC
AAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGCCAAACTCATCAATGTATCTTACGCTTGAAGGGGTAATG
CGCTTCCACTCACAAACATGGCGGACAGAGCGTGTGAACGAGATGAACAGCCCC

UBC promotor

TCAAAAATATGGCCGCCGAGGCTGGACGGCTAGCCTCGAGGGCCTCCGCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCC
CCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGCGAGCGTCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCAG
GACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGG
TGACTCTAGGGCAGCTGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCCATTCTGCGGA
GGGATTCCTCCGTGGGCGGTGAACGCCGATATTATATAAGGACGCGCCGGGTGGCAGACTAGTCCGCTGCAGCC
GGGATTTGGTTCGAGTTCTTGTGTTGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTAGCGGGCTGTGGGCTGGCCGGG
CTTTCGTGGCCCGCGGCCGCTCGGTGGACGGAGCGTGTGGAGAGACCGCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGA
GCAAGTTGCCCTGAACGGGGTTGGGGGAGCGCAGCAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGC
TTGTGAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCAAGGCTTGGAGGCT
TCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTATTGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCCTGACGTTAAGTTTGTGAC
TGACTGGAGAACTCGTTTTGCTGCTGTTGCGGGGGCGGACGTTATGGCGGTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTT
TGGGAGCGCGCCCTCGTCTGCTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGT
AGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGACGACGAGGTTCCGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCC
GGACCTCTGTTGAGGGGAGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTCTGGTGGTTTTATGTACCTATCTTCTAAGTAGCTG
AAGCTCCGTTTTGAACTATGCGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCACCTTTTGAATGTAATC
ATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTAGACTAGTAAATTGTCGCTAAATTCTGGCCGTTTTTGGCTTTTTTGTAGA
CGGATCCATGAATTCGCCAGC

CAR19

ATGGCCCTGCCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCCACGCGTGAAGTGCAG
CTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCACTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATAACATTC
ACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGGAGTGGATTGGATATGTTAATCCTTACAATG
ATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGG
AGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGCCTTACTACTACGGTAGTAGCCCTT
TGACTACTGGGGCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCGGAGGTGGCGGTTCAAGCGGTGGCGGATCCGGCGGTGGCG
GATCCGGCGGTGGCGGATCGGATATCGTGATGACACAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTC
CATCTCTTGCAAGTCTAGTCAGAGCCTTGAACAACAGTAATGGAACAACCTATTTGAACTGGTACCTCCAGAAACCAGG
CCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGGGTTTCAAACCGATTTCTGGGGTCTAGACAGGTTCACTGGTAGTGGATCA

GGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTTCTGCCTCCAAGTTACACAT
GTCCCTCCCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGTA TAGTCCCACAACCACCCCTGCCCTAGACCT
CCAACACCCGCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTGTAGACCTGCTGCAGGGGGAGCC
GTGCACACCAGAGGACTGGATTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGCGGAGTGCTGCTG
CTGAGCCTCGTGATCACCTGTACTGCAACCACCGGAACCGGCGGAGAGTGAAGCGGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTA
CATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGGACGGCTGCTCCTGCAGATTCCCCGAGGA
AGAAGAAGGCGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAATT CAGCAGATCCGCCGACGCCCTGCCTACCAGCAGGGACAGAACC
AGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGGGACCCTGA
GATGGGCGGAAAGCCCCAGCGGAGAAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCC
GAGGCCTACAGCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGA
GCAC

bGH polyA

CGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCAAGATGATGAGAATTCGACTGTGCCTTCTA
GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAA
TAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC

3 ITR

TATGGGTCGACATACTAGTTAAAAGTTTTGTTACTTTATAGAAGAAATTTGAGTTTTTGTTTTTTTTAATAAATAAATAA
ACATAAATAAATTGTTTGAATTTATTATTAGTATGTAAGTGTAATATAATAAACTTAATATCTATTCAAATTAATAAA
TAAACCTCGATATACAGACCGATAAAACACATGCGTCAATTTTACGCATGATTATCTTTAACGTACGTCACAATATGATTA
TCTTTCTAGGGTTAATCTAGTATAC

9.3 Aminokyselinová sekvence CAR19

Leader (CD8)

Ig-kappa light chain

MALPVTALLLPLALLLHAARP TREVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYTFT
SYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPYNDGTTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAY
MELSSLTSEDSAVYYCARGPYYYGSSPFDYWGQGTTVTV

linker

Ig heavy chain

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS DIVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLE
NSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGLDRFSGSGSGT

CD8

DFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPPTFGAGTKLEIKRTSPTTTPAPRP

transmembrane domain

PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTC

4-1BB intracellular domain

GVLLLSLVITLYCNHRNRRRVKRGKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC

TCR zeta intracellular domain

SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH
DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*



ELSEVIER

FULL-LENGTH ARTICLE

Translational Research

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

Martin Stach^{1,3}, Pavlína Ptackova^{1,2}, Martin Mucha^{1,3}, Jan Musil¹, Pavel Klener², Pavel Otahal^{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. Ota hal).

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 ϵ 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 mL buffer T and mixed with 5 mg 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-mg 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 NFAT21 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 × 10⁶ Ramos B cells. After 12 days, when large macroscopic tumors had formed, the mice

received one intravenous dose of 5 × 10⁶ 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

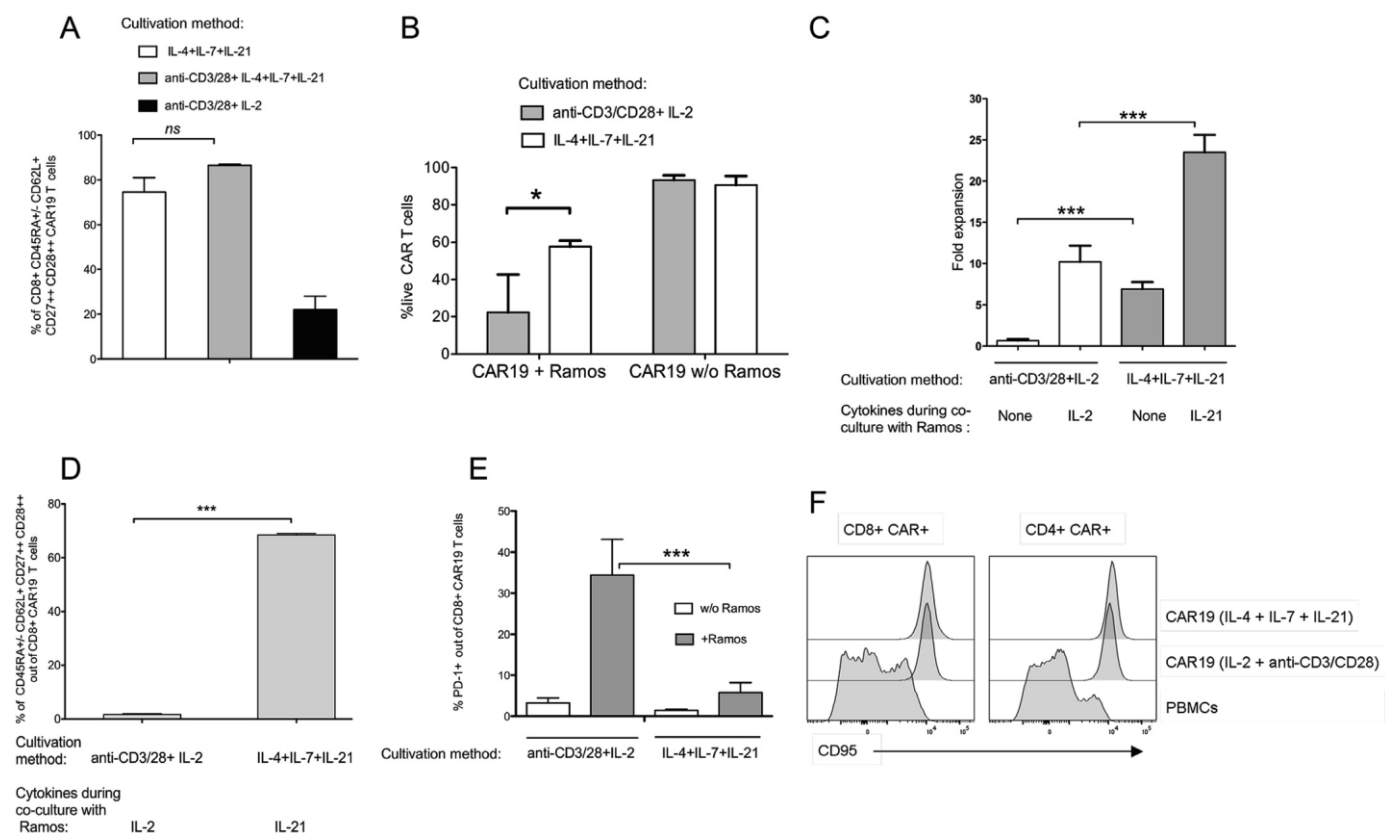


Figure 1. IL-21 promotes expansion of CAR19 T cells and maintenance of early memory phenotype after anti-genic restimulation. (A) Percentage of Tscm-like (CD45RA⁺ CD62L⁺ CD27⁺ CD28⁺) CAR19 T cells in the product obtained by cultivating in a mixture of IL-4, IL-7 and IL-21 or a mixture of IL-4, IL-7 and 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 0.05, *** P 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

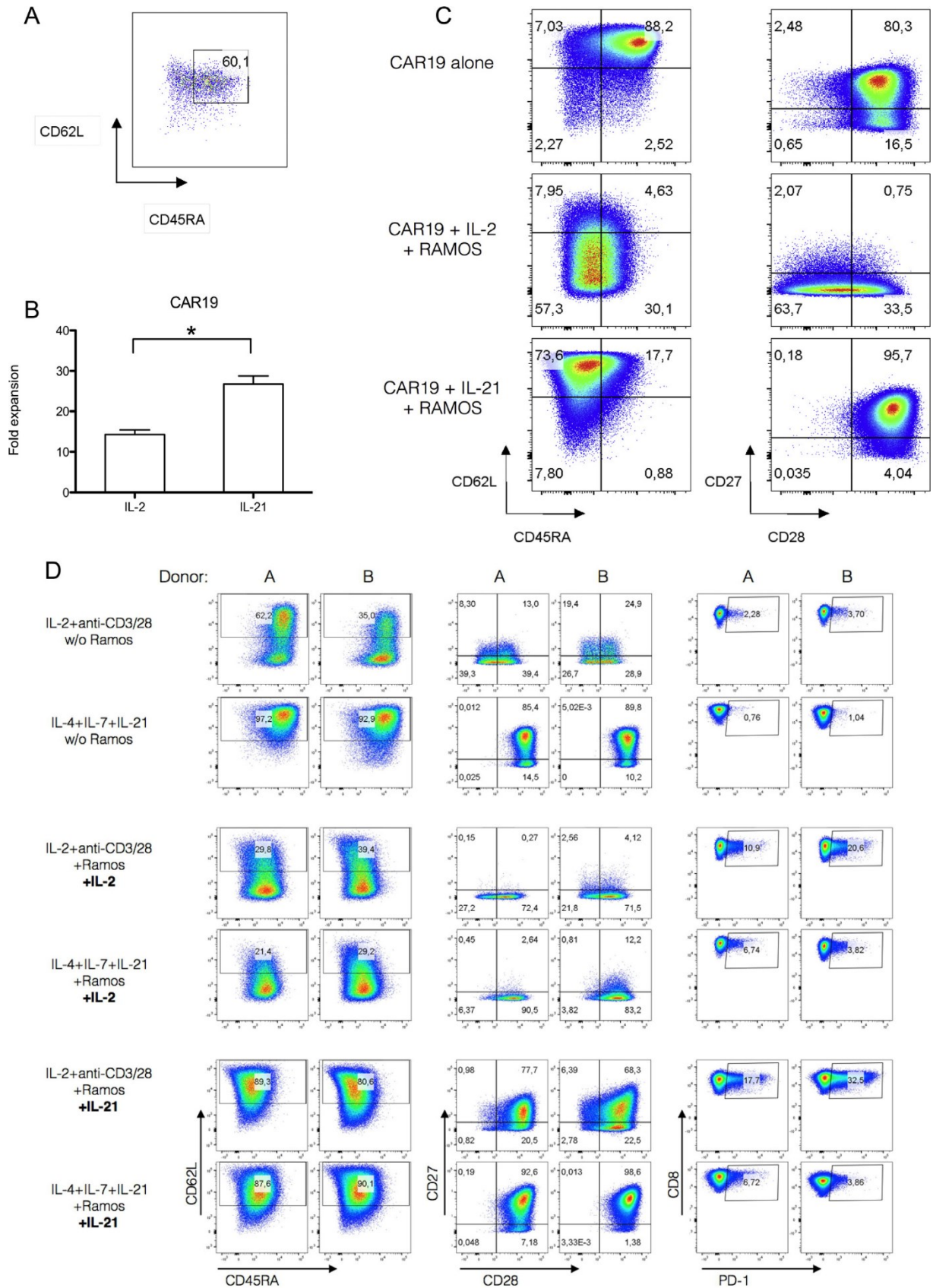


Figure 2. IL-2 supports proliferation of CAR19 T cells but does not promote maintenance of early memory phenotype. (A) CAR19 T cells cultivated in IL-4, IL-7 and IL-21 were sorted by FACS to isolate early memory T cells (CD62L+CD45RA+) and then restimulated with Ramos B cells in the presence of exogenous 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+ CART 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 Ca^{2+} -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).

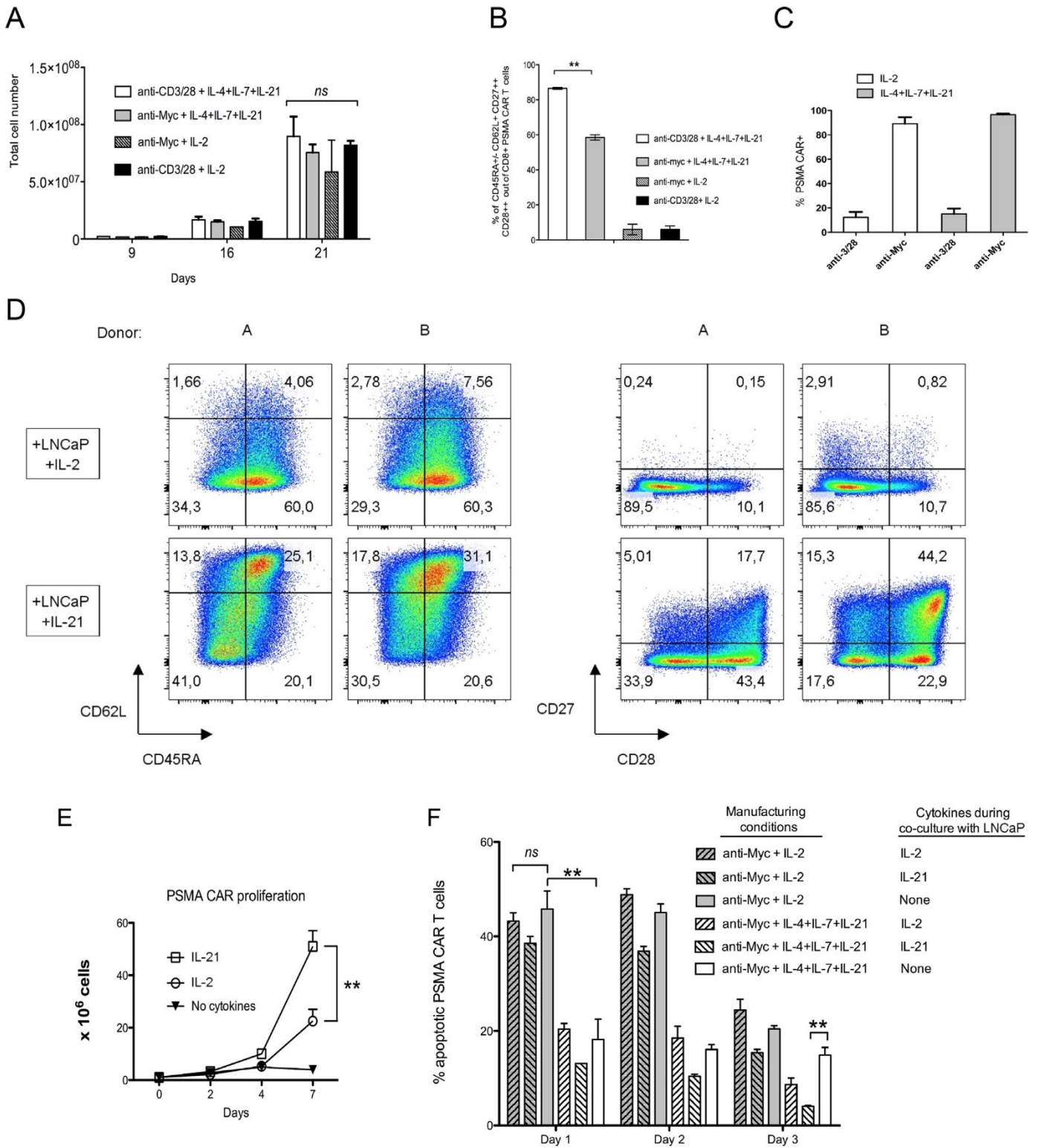


Figure 3. IL-21 enhances expansion of Tscm-like PSMA CART cells and reduces their apoptosis after anti-genic restimulation. (A–C) Characterization of manufactured PSMA CART cells. PBMCs were electroporated with DNA plasmids and activated with anti-CD3/CD28 antibodies or anti-Myc antibody, followed by expansion in the presence of IL-4, IL-7, IL-21 or IL-2. The expansion of all cells (A), percentage of CD8+ PSMA CART 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 CART 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 image shows the memory phenotype. (E) Expansion of PSMA CART cells in the presence of IL-2 or IL-21 compared with PSMA CART 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 CART 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 CART 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 0.05, **P 0.01; SEM, standard error of the mean. (Color version of figure is available online).

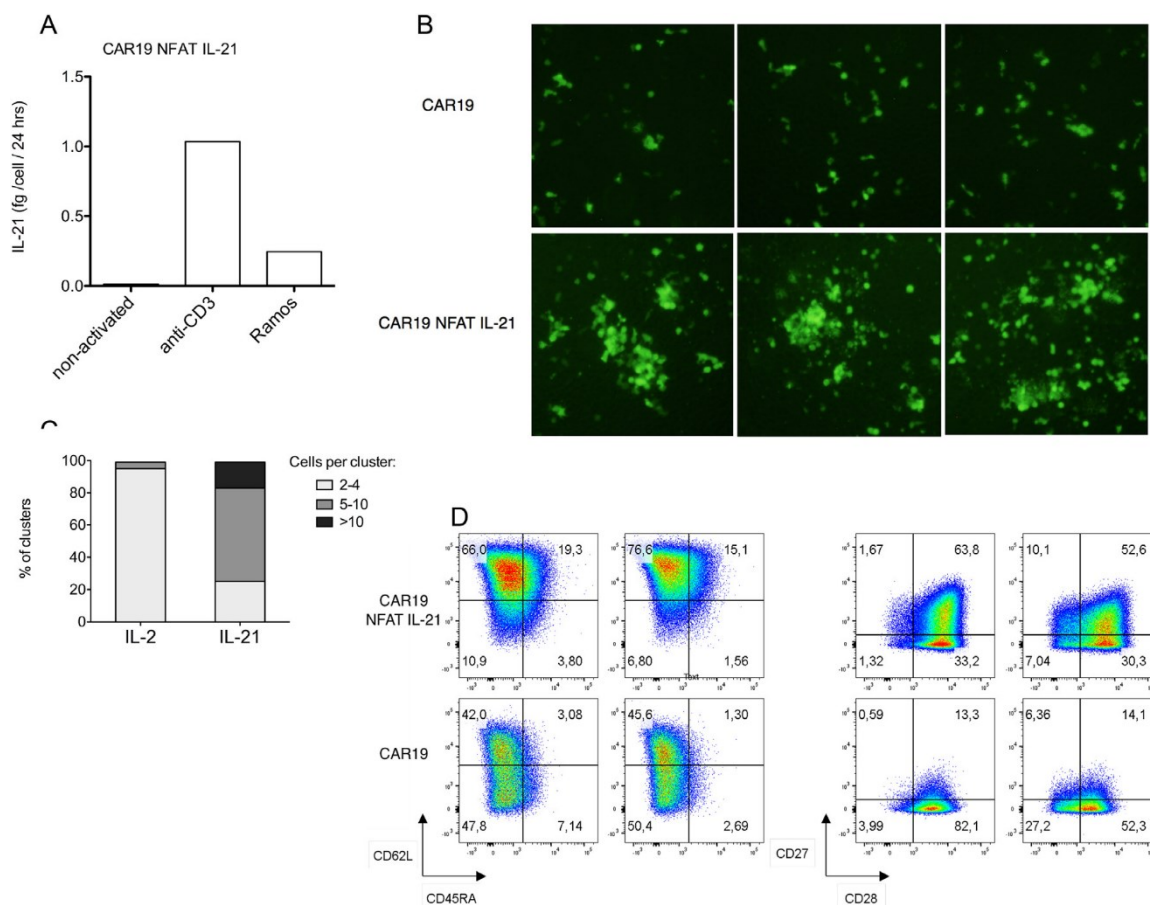


Figure 4. Inducible secretion of IL-21 stimulates the proliferation of CAR T cells after co-culture with tumor cells. (A) CAR19 T cells expressing IL-21 as a transgene under an artificial NFAT promoter produce IL-21 upon T-cell activation by anti-CD3 antibody or after co-cultivation with Ramos B cells. (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 CART 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 efficacy [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 CART cells in vitro, but the effects were much weaker than those seen in the current study because Singh

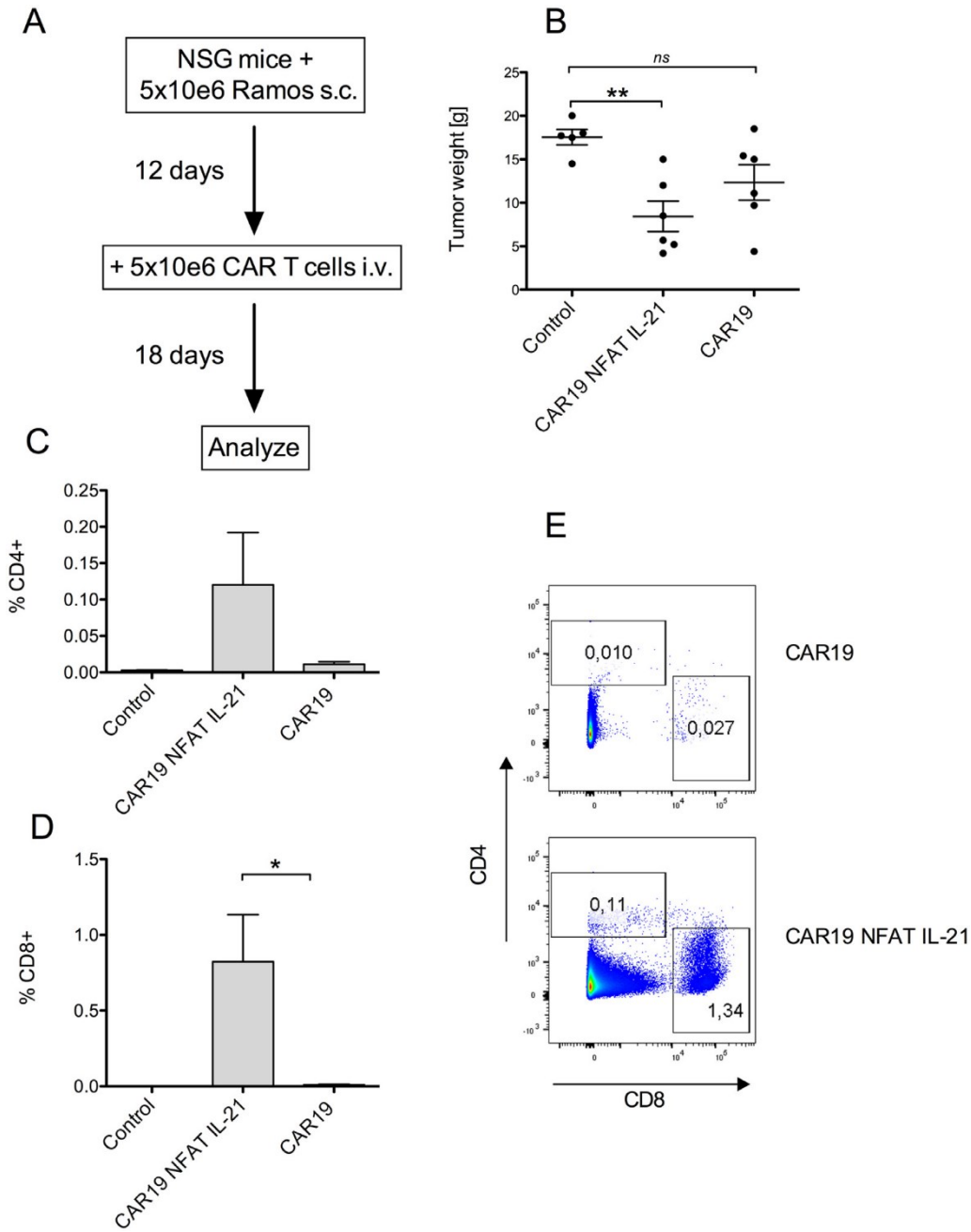


Figure 5. CAR19 T cells armed with IL-21 have enhanced anti-tumor efficacy in vivo. (A) Immunodeficient NSG mice were transplanted subcutaneously with 5 million Ramos cells. After 12 days, when macroscopic tumors had formed, mice received 5 million CAR T cells intravenously. (B) The treatment response 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

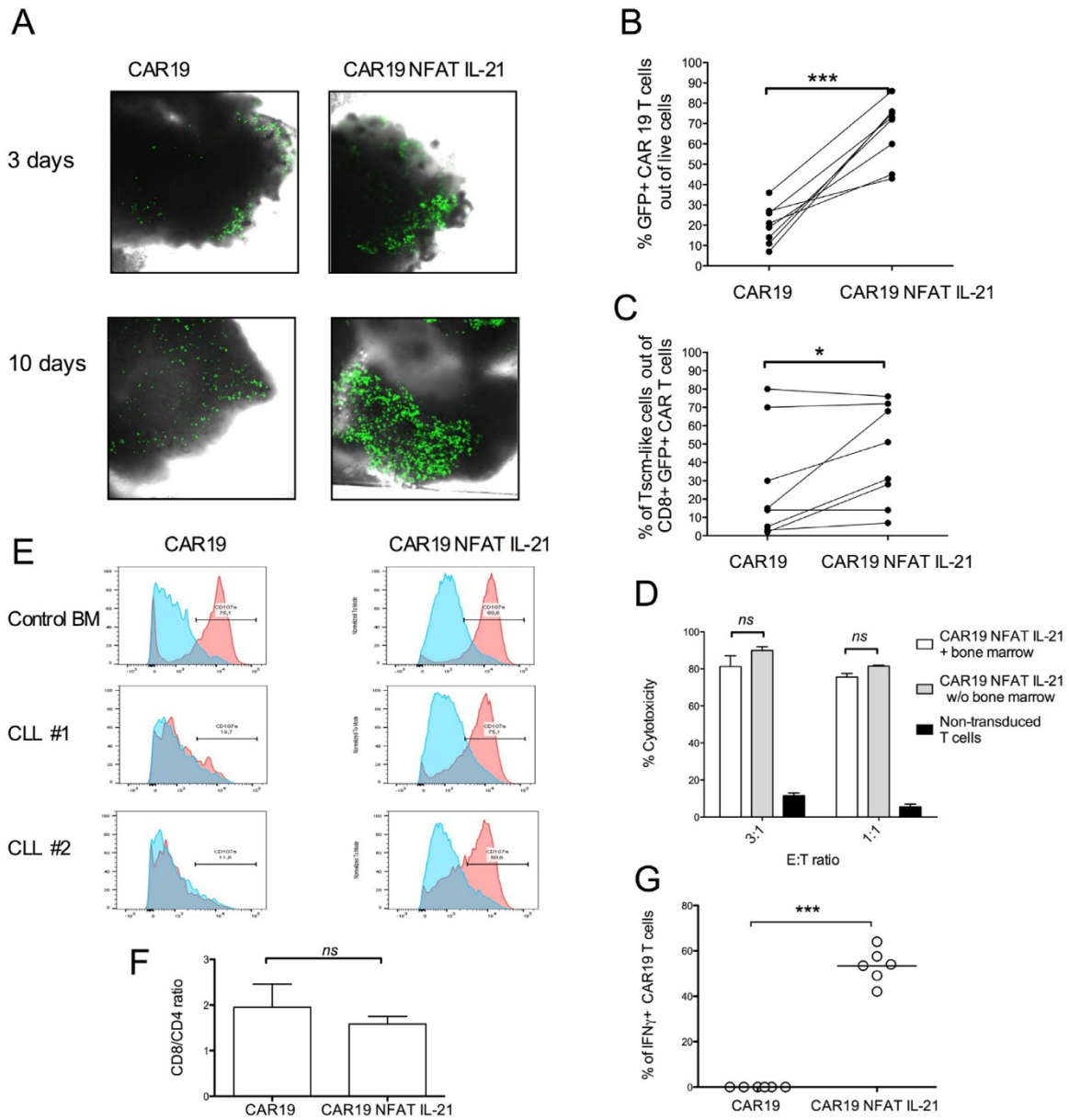


Figure 6. CAR19 T cells armed with IL-21 are resistant to immunosuppression induced by CLL cells. (A) GFP-expressing CAR19 T cells were co-cultivated with BM fragments obtained from CLL patients. The images show infiltration by GFP+ cells after 3 days and 10 days in one representative sample. The images 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) $P > 0.05$, * $P = 0.05$, *** $P = 0.001$. 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, OPVVV16_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] Ptackova P, Musil J, Stach M, Lesny P, Nemeckova S, Kral 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, Duret 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] Pule 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] Othahal P, Prukova D, Kral V, Fabry M, Vockova P, Lateckova R, 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, Bilmon 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.