



JAN ČERNÝ

Professor of Cell Biology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE

Department of Cell Biology

Viničná 7, 128 40 Praha 2

Czech Republic

Phone: (+420) 2 4106 1795

E-mail: jan.cerny@natur.cuni.cz

POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE Bc. Adély Fellnerové

Chimeric antigen receptors in the treatment of hematological malignancies

Předložená diplomová práce se zabývá vysoce aktuálním biomedicínálním tématem využívajícím pokrok ve znalostech imunologie pro „chytrou“ léčbu nádorových onemocnění pomocí sofistikovaných molekulárních nástrojů. Je třeba hned na začátek konstatovat, že se jedná o velice ambiciózní projekt, který konkuruje celým výzkumným ústavům na celém světě. Dokonce by se dalo říct, že se jedná o strategickou technologii, jejíž zavedení v českém klinickém prostředí je otázkou udržení konkurenceschopnosti místní protinádorové terapie. Je tedy skvělé, že se našla laboratoř ochotná jít do riskantního projektu a schopná blízce spolupracovat s lékařem – vizionářem, MUDr. Pavlem Otáhalem, který je zde zárukou klinické relevance projektu. Konkrétně se práce zabývá přípravou chimérických antigenních receptorů (CAR) zacílených na typické molekuly B-lymfocytů (CD19, CD20) a potenciálně optimální pro léčení příslušných odvozených malignit. Ultimátním cílem projektu je konstrukce tzv. superCARu, který by měl zajistit příslušným T-lymfocytům duální specifitu s možnými benefity pro použití v klinice.

Při čtení práce je evidentní, že téma práce bylo zvoleno vhodně, nutilo Adélu pečlivě formulovat hypotézy, ty ještě pečlivěji testovat a úplně nejpečlivěji interpretovat získaná data. Penum práce, které Adéla Fellnerová odvedla je impresivní, stejně jako její orientace v problému (což prokázala kvalitním literárním úvodem a diskusí). Z pohledu garanta oboru se jedná o optimální situaci, kdy na kvalitním pracovišti vedeném zkušeným školitelem student realizuje projekt, který jej donutí si průběžně osvěžovat recentní data na dané téma (vzhledem k enormní rychlosti vývoje a testování příslušné technologie), kde si sám s velkou samostatností vyzkouší reálný výzkumný projekt, kdy je třeba v labyrintech možností často vstupovat do slepých uliček, opakovaně vstupovat do nových, a hlavně se nenechat odradit neúspěchy. To, co bylo možné snadno objevit, již dávno objeveno bylo!

Práce je psána výbornou angličtinou, celkem cca 90 stranách, je členěna standardně a obsahuje požadované části. Po formální stránce je zpracována velice kvalitně, je třeba vynaložit mnoho práce identifikovat minuciózní formální nedostatky. Je tedy evidentní, že si s ní autorka dala hodně práce nejen po stránce obsahové, ale i formální. Jak literární rešerše, tak část výsledková i diskuse jsou promyšleně formulovány. Práce obsahuje cca 150 vhodně vybraných citací, opět citační standard předložené práce je vysoký. Kromě výše zmíněného práce obsahuje celou řadu obrázků, v experimentální části jasně ukazujících diskutované výsledky, v části přehledové se v řadě případů autorka nespokojila s přebráním, ale vytvořila autorskou obrazovou dokumentaci, což je třeba ocenit, stejně jako velice informativní appendix sumarizující klinické testy CARových technologií.

Literární přehled je velice zdařilý, kriticky se zabývá rolí imunitního systému jako dozoru kontrolujícího v těle vznikající malignity, stručně seznamuje se základními principy receptorové signalizace nezbytné pro pochopení logiky a významu práce. Autorka velice rychle přechází k tématu práce, aniž by rezignovala na ukotvení

v obecném a detailně a erudovaně představuje CAR technologii, s důrazem na příslušné molekulární mechanismy. Autorka dále nerezignuje na diskusi jejích metodických a terapeutických omezení, včetně velice zajímavé závěrečné subkapitoly věnované možnostem regulovat její bezpečnost a specifitu CAR technologie.

Adéla Fellnerová ve své práci naštěstí nemusela začínat od nuly, ale mohla využít již připravených, avšak neexprimovaných konstruktů připravených týmem dr. Pavla Otáhala. Jejím cílem bylo vyřešit, v čem se skrývá problém původní technologie, otestovat konstrukty s jednou specifitou *per partes* a následně je opět spojit a vytvořit funkční superCAR systém. Na začátku práce tedy bylo velké množství klonování, sekvenování, obecně přípravné molekulárně biologické práce, která byla jistě velice dobrou školou těchto technologií, která byla korunována úspěchem přípravou lentivirových expresních vektorů. Dále následovala příprava buněčných populací stabilně exprimujících příslušné proteinové konstrukty a jejich funkční a fenotypické testování. Zde se autorka naučila práci s buněčnými kulturami a v neposlední řadě na velice solidní úrovni průtokovou cytometrii. Autorce se podařilo připravit všechny plánované konstrukty, ověřit jejich expresi v buněčné linii HEK293T, připravit funkční lentivirové konstrukty, ověřit jejich funkčnost v HEK293T i modelové T-buněčné linii Jurkat. Funkčnost CAR konstruktů pro aktivaci T-lymfocytů byla ověřena kvantifikací aktivačního znaku, molekuly CD69 po kokultivaci s B-buněčnou linií Raji. Dále se s CAR konstrukty podařilo provést NFAT-GFP esej, opět s pozitivním výsledkem.

Na začátku práce bylo více cílů, než se podařilo v předložené diplomové práci splnit. Z řady důvodů se nepodařilo dokončit přípravu superCARu a jeho testování, stejně tak vše ověřit na primárních buňkách. Přesto je penzum a kvalita prezentovaného výzkumu zcela dostatečná pro úspěšné obhájení diplomové práce. Jak jsem již jednou napsal - to, co bylo možné snadno objevit, již dávno objeveno bylo! Předložená diplomová práce zcela jistě splnila svůj účel, poskytnout studentce zajímavé atraktivní téma, které by jí umožnilo proniknout do metodického a intelektuálního zázemí moderní imunologie, včetně jejího aplikačního potenciálu.

Otázky:

1. *Zajímá by mne původ označení superCAR – jedná se o vaše vlastní označení?*
2. *V klinickém testování je celá řada CAR konstruktů. Mohla byste stručně srovnat svůj design (a možné výhody) s již testovanými modely?*
3. *Klíčovým problémem CAR technologií (a vlastně protinádorové terapie využívající aktivaci imunitního systému) je v podstatě absence specifických nádorových znaků. CD19 a CD20 jsou poměrně výjimečné v tom, že absenci B-lymfocytů (jako bystander efekt terapie) je možné poměrně dobře kontrolovat. Kdybyste měla rozhodnout, který z dalších testovaných cílů CAR technologie má největší naději na úspěch, kterou molekulu byste při znalosti relevantní literatury zvolila.*
4. *Jako alternativní možnost pro léčení B-buněčných malignit se v klinické praxi používají bivalentní protilátky propojující T lymfocyt s cílovou buňkou m. j. zacílením na CD19, nebo CD20, což je situace symetrická tomu, o co se pokoušíte vy. Pokuste se diskutovat výhody a nevýhody těchto dvou možností imunoterapie nádorů (CAR vs. bivalentní protilátka).*
5. *Nezbytným předpokladem pro úspěch CAR terapie je vnesení příslušných konstruktů do primárních T-lymfocytů, přičemž je zřejmé, že těchto buněk je potřeba velké množství. Zajímalo by mne váš názor na to, zda sortování a expanse optimálního T-buněčného typu pro genetickou modifikaci a následné vrácení do cirkulace se v klinických textech děje ideálním způsobem. Jaký je podle vašeho názoru optimální T-buněčný subtyp pro tuto technologii?*

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce je zajímavým příspěvkem k důležitému biomedicínskému tématu. Práce je sepsána kvalitní angličtinou, formálně dokonale, intelektuálně na výši a co je důležité zopakovat, pomocí náročných netriviálních metodik moderní imunologie zahrnující kombinaci molekulárně biologických přístupů, pokročilé buněčné biologie i kombinaci optimálních modelů pro testování konkrétní hypotézy. Tuto práci doporučuji k obhajobě s výborným hodnocením. Autorce přeji hodně štěstí a úspěchů v dobře započaté vědecké kariéře, kdy si hned na začátek „osahala“ reálný vědecký problém, který je toho typu, že se nedá rozlousknout hned první ranou...

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

2