## **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

# Kiméra antigén receptorral (CAR) átprogramozott T sejtek optimalizálása szolid tumorok kezelésére: a molekuláris kölcsönhatások és a differenciálódás szabályozásának lehetséges szerepe

Mezősi-Csaplár Marianna

Témavezetők: Dr. Vereb György, Dr. Szöőr Árpád



DEBRECENI EGYETEM GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA Debrecen, 2024

### Tárgyszavak

HER2-pozitív tumorok, kiméra antigén receptor (CAR), immunterápia, sejtterápia, immunológiai szinapszis, fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS), receptor mobilitás, receptor szerveződés, T sejt expanzió, T sejt perzisztencia, T sejt fenotípus

### Keywords

HER2-positive tumors, chimeric antigen receptor (CAR), immunotherapy, cell therapy, immunological synapse, fluorescence correlation spectroscopy (FCS), receptor mobility, receptor clustering, T cell expansion, T cell persistence, T cell phenotype

## TARTALOMJEGYZÉK

I.	Rövidítések jegyzéke	6
II.	Bevezetés	9
III.	Irodalmi áttekintés	10
Ι	. Bevezetés az immuno-onkológiába	10
	I.1.1. Monoklonális antitest terápiák	12
	I.1.2. Tumor infiltráló limfocita terápiák	17
Ι	2. CAR T sejt terápia	20
	I.2.1. A CAR felépítése és evolúciójának főbb állomásai	23
	I.2.2. CAR T sejtkészítmények előállítása kutatási célra	27
	I.2.3. CAR T sejtkészítmények előállítása terápiás felhasználásra	29
	I.2.4. A CAR T sejt terápiák a klinikumban – hematológiai megbetegedések	31
	I.2.5. CAR T sejt terápiák a klinikumban – szolid tumorok	33
	I.2.6. A CAR T sejt terápia biztonságossága és mellékhatásai	36
IV.	Célkitűzések	38
v	Anvegelt és médezenelt	20
۷. ۲	Anyagok es mouszerek	20 20
,	Allyagok, tolzsoluatok	
	1.1. Artalatos torzs-es tapolitatok, toborunketos reagensek	40 40
	1.2. CAR I Sejt civalitas	<del>4</del> 0 40
	1.5. Infindimuoreszencias jerores, mikroszkopia	<del>4</del> 0 //1
	1.4. SDS gelektroforezis es western-ofor	<del>+</del> 1 //2
	1.5. Oyarto anar osszeannoù puner es reagens keszletek	+2 12
V	A kísérletekhez használt seitvonalak	<u>+</u> 2 43
Ţ	CAR T seitek előállítása	+3 44
	3 1 PBMC izolálás	1 I 44
	3.2 Az alkalmazott CAR konstrukciók felépítése	44
	33 CAR kódoló retrovirális pszeudovírusok előállítása	45
	3.4 T seit stimulációs és tenvésztési protokollok. CAR transzdukció	15
V	Antitest preparáció, konjugálás fluoreszcens festékkel	47
V	Immunfluoreszcenciás jelölések, áramlási citometria	
V	Mikroszkópos módszerek	49
	7.6.1. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia	49
	7.6.2. Az Airyscan/Airyscan Fast mikroszkópia elméleti alapjai és kísérleti	
	alkalmazása	50
	.6.3. A CAR-ok alkotta immunológiai szinapszis analízise	53
	.6.4. CAR membránklaszterek jellemzése	53
_	C.6.5. CAR-TCR kolokalizáció vizsgálata	54
1	Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia	56
	7.1. A konfokális detektálási térfogat paramétereinek kalibrációja	59
-	./.2. CAR-ok diffúziós karakterisztikájának meghatározása	60
)	CAR oligomerizáció meghatározása Western blot módszerrel	62
1	CAR struktúra predikció	62
1	U. CAR I sejtek proliteraciojanak meghatározása "rechallenge" próbával	63
	1. CAR 1 sejtek citokin szekréciójának meghatározása	64

<ul> <li>V.12. Relatív foszfoprotein szintek vizsgálata</li></ul>	5 5
mérésen alapuló bioszenzorral	6 7 8
VI. Eredmények	9
VI.1. A kostimulációs domének meghatározzák a kiméra antigén receptorok sejtfelszíni	
szerveződését és a CAR T sejtek aktivációját6	9
VI.1.1. HER2-specifickus CAR T sejtek előállítása6	9
VI.1.2. A kostimulációs endodomének meghatározzák a kiméra antigén receptorok felszíni szerveződését a nyugvó CAR T sejt membránban	0
VI.1.3. A CAR-ok eltérő diffúziós dinamikát mutatnak a CD3z domén	
membránfelszíntől való távolságának függvényében7	4
<ul> <li>VI.1.4. A TCR komplex nem integrálódik a CAR specifikus immunszinapszisba7</li> <li>VI.1.5. A nagyméretű receptor klaszterek és a fokozott mobilitás is előnyt jelent a</li> </ul>	7
korai aktiváció során	0
VI.1.6. Az első generációs CAR-ok indukálják a leghatékonyabb tumor eliminációt a	~
Kokulturalas elso 25 orajaban	2
v1.2. A CAR I sejtkesztimenyek tenotípus elosztása meghatározza a tumorenenes	1
VI 2 1 A RetroNectin stimuláció és LymphoONE kulturálási médium lassítia a CAR	+
T seitek differenciációiát	4
VI.2.2. A fenotípus eloszlás hatása az aktivált HER2-CAR T sejtek citokin	•
kibocsájtására az alkalmazott kostimulációs doméntől függ	8
VI.2.3. Az effektor memória fenotípus többlet fokozza a CAR T sejtkészítmények in	
<i>vitro</i> citotoxicitását9	1
VI.2.4. Az előrehaladott differenciációs fokú CAR T sejtek nagyobb proliferatív	
kapacitást mutatnak sorozatos <i>in vitro</i> stimuláció során	2
VI.2.5. A kiegyensúlyozott CD4/CD8 arányú, EM domináns CAR T sejtekkel való	
kezelés teljes tumor eradikációhoz vezet <i>in vivo</i> xenograft modellben	4
VI.2.6. AZ EM dominans CAR I sejtek natekony tumor infiltraciót és expanziót	6
mutamak <i>in vivo</i> xenogran modenden	0
VII. Megbeszélés	8
VII.1. A kostimulációs domének meghatározzák a CAR-ok sejtfelszíni szerveződését és a	l
VII 2 A LIED2 CAD T seithástára árus le fonstárus profilis mechatározza a tumorallanas	8
vII.2. A HER2-CAR I sejtkeszítmenyek fenotípus profilja meghatarozza a tumorellenes aktivitás hatékonyságát10	1
VIII. Összefoglalás	5
IX. Summary10	6
X Irodalomiegyzék 10	7
X.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke	7
X.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények DEENK által hitelesített jegyzéke .12	1
XI.   Köszönetnyilvánítás	2
XII. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai12	3

## I. Rövidítések jegyzéke

A488	Alexa Fluor 488			
A647	Alexa Fluor 647			
ACT	Adoptív sejtterápia (Adoptive cell therapy)			
ADC	Antitest-gyógyszer konjugátum (Antibody-drug conjugate)			
ADCC	Ellenanyagfüggő sejtes citotoxicitás (Antibody dependent cellular cytotoxicity)			
ALL	Akut lymphoblastos leukémia (Acute lymphoblastic leukaemia)			
APC	Allofikocianin (allophycocyanin)			
BCMA	B sejt maturációs antigén (B-cell maturation antigen)			
CAR	Kiméra antigén receptor (Chimeric antigen receptor)			
<b>CD3</b> ζ Natív T sejt receptor komplex CD3ζ alegysége				
CD3z	Kiméra antigén receptor natív CD3ζ-ból származó alegysége			
CCR7	C-C kemokin receptor 7 (C-C chemokine receptor type 7)			
CDC	Komplement mediált citotoxicitás (Complement dependent cytotoxicity)			
CLL	Krónikus limfoid leukémia (Chronic lymphocytic leukaemia)			
СМ	Centrális memória (Central memory)			
CRES	CAR T sejt függő encephalopathia (CAR-T-cell-related encephalopathy syndrome)			
CRR	Teljes válaszarány (Complete response rate)			
CRS	Citokinfelszabadulási szindróma / "citokin vihar" (Cytokine release syndrome)			
CTLA-4	Citotoxikus T limfocita antigén 4 (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4)			
DAPI	4',6-Diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid			
DLBCL	Diffúz nagy B sejtes limfóma (Diffuse large B cell lymphoma)			
DMSO	Dimetil-szulfoxid (Dimethyl sulfoxide)			
DTT	Dithiothreitol			
ECD	Extracelluláris domén (Extracellular domain)			
ECIS	Elektromos Sejt-szubsztrát Impedancia szenzor (Electric Cell-substrate Impedance Sensor)			
ECM	Extracelluláris mátrix (Extracellular matrix)			
EM	Effektor memória (Effector memory)			
EMA	Európai Gyógyszerügynökség (European Medicines Agency)			
FBS	Magzati borjúszérum (Foetal Bovine Serum)			

FCS	Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (Fluorescence correlation spectroscopy)			
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (Food and Drug Administration)			
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát (Fluorescein isothiocyanate)			
FL	Follikuláris limfóma (Follicular lymphoma)			
FRAP	P Fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (Fluorescence recovery after photobleaching)			
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Green fluorescent protein)			
GMP Jó gyártási gyakorlat (Good manufacturing practice)				
GPC3	Glipikán-3 (Glypican-3)			
<b>GSK-3</b> Glikogén-szintáz kináz 3 ( <i>Glycogen synthase kinase 3</i> )				
HCC	Hepatocelluláris karcinóma (Hepatocellular carcinoma)			
HER2	Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa (Human epidermal growth factor receptor 2)			
HRP	Torma peroxidáz (Horseradish peroxidase)			
ICI Immunellenőrzőpont-gátló (Immune checkpoint inhibitor)				
ICOS	Indukálható T sejt kostimulátor (Inducible T-cell costimulator, CD278)			
IFNγ	Interferon gamma			
IL	Interleukin			
IS	Immunszinapszis (Immunological synapse)			
ITAM	Immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívum (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)			
JNK	c-jun N-terminális kináz (c-Jun N-terminal kinase)			
Lck	Limfocita specifikus protein tirozin kináz (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)			
LDDT	Local Distance Difference Test			
LSM	Lézer pásztázó mikroszkóp (Laser Scanning Microscope)			
mAb	monoklonális antitest (monoclonal antibody)			
MACS	Mágnesesen aktivált sejtválogatás (Magnetic activated cell separation)			
MCL	Köpenysejtes limfóma (Mantle Cell lymphoma)			
MHC	C Fő hisztokompatibilitási komplex (Major histocompatibility comple			
MRD	Minimális reziduális betegség (Minimal residual disease)			
MUC4	Mucin-4			
NaOV	Nátrium-ortovanadát			

NCI	CI Nemzeti Rákkutató Intézet (National Cancer Institute)				
NK sejt	Természetes ölősejt (Natural killer cell)				
NT sejt	Nem transzdukált T sejt (Non-transduced T cell)				
ORR	Objektív válaszarány (Objective response rate)				
ΟΤΟΤ	"on-target, off-tumour"				
PBMC	Perifériás vér mononukleáris sejt (Peripheral blood mononuclear cell)				
PCC Pearson féle korrelációs együttható (Pearson correlation coefficient					
Praaformaldehid ( <i>Paraformaldehyde</i> )					
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid (Phenylmethylsulfonyl fluoride)				
<b>PRAS40</b> 40kDa-os prolin gazdag Akt szubsztrát ( <i>Proline-rich Akt substrate</i>					
PSF	Pont-kiterjedési függvény (Point spread function)				
PVDF	Polivinilidén-fluorid				
R/R	Relapszált vagy refraktáló (relapsed or refractory)				
ROI	Region of interest				
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (tápoldat)				
scFv	Egyszálú variábilis fragment (Single-chain variable fragment)				
SCID	Súlyos kombinált immunhiány (Severe combined immunodeficiency)				
SH	"Short hinge"				
TAATumor asszociált antigén (Tumor-associated antigen)					
TBS	Tris-buffered saline				
TCR	T sejt receptor (T-cell receptor)				
TE	Terminális effektor (Terminal effector)				
TIL	Tumor infiltráló limfocita (Tumor infiltrating lymphocyte)				
TIM-3	T sejt Immunglobulin és Mucin domén-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3)				
TME	Tumor mikrokörnyezet (Tumor microenvironment)				
Tris	Trisz(hidroximetil)-aminometán				
TRUCK	T cells redirected for universal cytokine-mediated killing				
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular endothelial growth factor)				
VEGFR	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor (Vascular endothelial growth factor receptor)				
v/v%	Térfogatszázalék (volume/volume)				
w/v%	Vegyesszázalék (weight/volume)				

#### II. Bevezetés

Az elmúlt évtized egyik legígéretesebb stratégiája a tumorellenes immunterápia területén a betegek T limfocitáinak genetikai módosítása kiméra antigén receptorokkal (CAR). Az I. generációba tartozó CAR-ok két fő funkcionális eleme egy tumorantigénre specifikus, antitest természetű ektodomén, mely lehetővé teszi a daganatsejtek célzott felismerését és egy – többnyire a T sejt receptorkomplex (TCR) CD3ζ alegységből származtatott – effektor endodomén, mely a célsejt felismerését követően aktiválja annak CAR T sejt általi eliminációját. Az így átprogramozott sejtek aktivációjának és expanziójának javítására a CAR konstrukciók II. generációjába egy további kostimulátorral rendelkező CAR-ok mára forradalmasították a terápia-rezisztens leukémiák és limfómák kezelését, így sikeresen kaptak alkalmazási engedélyt az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivataltól (Food and Drug Administration, FDA). Ezzel szemben a szolid, azaz szervekre lokalizált daganatokat célzó CAR T sejtes terápiák eddigi klinikai tesztelése nem hozott áttörést, sőt egy ízben a CD28 és a 41BB kostimulációs domént kombináló III. generációs CAR T sejt készítmény kipróbálása a páciens halálához vezetett [1].

Mindezek fényében elengedhetetlen olyan paraméterek azonosítása, melyek optimalizálása hozzájárulhat ahhoz, hogy hatékonyabb és biztonságosabb készítmények kerüljenek a klinikai tesztelés fázisába. A CAR működését alapvetően meghatározza, hogy a funkcionális alkotóelemeihez kapcsolódó molekuláris mechanizmusok hogyan integrálódnak a T sejtek fiziológiás jelátviteli folyamataiba. A felhasznált domének befolyásolhatják a CAR-ok egymással, a natív T sejt receptor komplexszel, és az aktivációs szignálkaszkád elemeivel való kölcsönhatásait mind a nyugvó sejtfelszínen, mind az immunszinapszis összeszerelődése során. Ezen keresztül hatással lehetnek nemcsak az akut molekuláris történésekre, de rövid- és hosszútávú citotoxikus aktivitásra, expanzióra, túlélésre, illetve kimerülésre is. Utóbbi tényezőket a CAR T sejtkészítmény előállításának körülményei is jelentősen befolyásolhatják. Munkánk során ezért szolid tumorokat célzó I-III. generációs CAR-ok alkalmazásán keresztül tanulmányoztuk a klinikai szempontból leginkább releváns CD28 és 41BB kostimulációs domének hatását a CAR-ok sejtfelszíni szerveződésére és diffúziós kinetikájára. Megfigyeléseinket az immunszinapszis kialakulásának dinamikájával és a korai citolitikus jelátvitel hatékonyságával korreláltattuk. Végezetül feltártuk, hogy a T sejt differenciáció dinamikáját befolyásoló kostimulációs domének és tenyésztési protokollok hogyan hatnak az in vitro hatékonyságra, expanzióra és kimerülésre, valamint az in vivo tumorkontrollra.

#### III. Irodalmi áttekintés

#### III.1. Bevezetés az immuno-onkológiába

Az immuno-onkológia elmúlt évtizedének forradalmi eredménye, hogy a daganatos betegségek kezelésének klasszikus protokolljai – mint a sebészeti beavatkozás, kemoterápia és sugárkezelés – mellé új terápiás lehetőségként felsorakoztak a különböző biológiai és immunterápiák. Az immunrendszer aktiválásán alapuló kezelések fejlesztése és a meglévő terápiás protokollok optimalizálása világszerte intenzív kutatómunka tárgya. A cél olyan gyors, célzott és biztonságos eljárások kidolgozása, amelyek hatékonyan alkalmazhatóak a tumorok széles spektruma ellen.

Az immunrendszer változatos és hatékony mechanizmusok sokaságán keresztül képes a daganatok felismerésére és elpusztítására [2]. A karcinogenezist genetikai mutációk és epigenetikai változások felhalmozódása kíséri, ami tumorspecifikus neoantigének kifejeződéséhez, illetve tumor asszociált antigének (tumor-associated antigen, TAA) megnövekedett expressziójához vezethet. Az immunrendszer állandóan működő tumorellenes "őrjárata" ("immune surveillance") folyamatosan monitorozza a malignus átalakulást jelző antigének megjelenését és a veszélyt észlelve célzott támadást indít a daganatsejtek ellen. Ennek egyik eszköze a sejtfelszíni TAA-kat közvetlenül felismerő antitestek termelése, melyek a daganatsejthez kötődve indukálják azok gyors és hatékony eliminációját. Gyakrabban fordul elő, hogy a dedifferenciáció során intracellulárisan kialakult tumorspecifikus neoantigének a fő hisztokompatibilitási komplexhez (Major Histocompatibility Complex, MHC) kötött peptidek formájában prezentálódnak a daganatsejtek felszínén. Ezeket az immunrendszer leghatékonyabb effektor sejtjei, a T limfociták képesek T sejt receptoraik (T-cell receptor, TCR) által specifikusan felismerni és elpusztítani.

Az immunfelügyelet ugyanakkor kétélű kard: a könnyű célpontok gyors eliminációja kiszelektálja azokat tumorsejteket ("immunoediting"), amelyek inherens genetikai instabilitásuk révén további átalakulási lépésekben rezisztenssé válnak ("tumor escape") az immunrendszerrel szemben. Ez többek között megvalósulhat az MHC expresszió csökkenése vagy megszűnése, az antitestek célantigénhez való kötődésének akadályai, illetve immunszupresszív mikrokörnyezet kialakulása által [3]. Az immunrendszer működését befolyásoló terápiák elsődleges célja, hogy a természetes védelmi funkciók célzása és/vagy fokozása által ismét képessé tegyék az immunsejteket a hatékony tumorellenes válasz kialakítására.

10

A klinikai gyakorlatban számos módszert kidolgoztak az immunrendszer aktiválására (1. ábra). Míg a már több évtizede széles körben alkalmazott monoklonális antitestekkel (monoclonal antibody, mAb) az ellenanyagfüggő sejtes citotoxikus reakciót (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC) és a komplement mediálta citotoxicitást (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) lehet aktiválni [4], addig az úgynevezett adoptív immunsejt-terápiák – mint a tumor infiltráló limfocitákon (Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL) alapuló kezelések – a T sejt indukált tumorspecifikus immunválasz hatékonyságát fokozzák [5]. Fontos megemlékezni ugyanitt az immunellenőrzőpont-gátló (Immune Checkpoint Inhibitor, ICI) monoklonális antitestekről. A klinikai áttörést hozó ICI-k olyan receptorokat, illetve ligandumokat blokkolnak, amelyek aktiválódása a T sejtek korai kimerüléséhez és anergiájához vezet [6].



1. ábra Főbb immunterápiás modalitások bemutatása

A mAb terápia alapja a tumorsejteken expresszálódó TAA-k specifikus felismerése, és a tumort elimináló ADCC és CDC immunológiai effektusok aktiválása. A TIL és ICI kezelések a beteg szervezetében jelen lévő tumorreaktív T sejtek effektor funkcióit serkentik, előbbi a tumorszövetből izolált tumor infiltráló limfociták *ex vivo* aktivációján, utóbbi a T sejt gátló szignálok blokkolásán keresztül fejti ki hatását. A CAR T sejt terápiák a beteg autológ T limfocitáinak genetikai módosításával egyesíti a mAb-ok TAA specifikus felismerését és a T sejtek hatékony citolitikus aktivitását.

ADCC: ellenanyagfüggő sejtes citotoxicitás; CAR: kiméra antigén receptor; CDC: komplement mediálta citotoxicitás; ICI: immunellenőrzőpont-gátló; mAb: monoklonális antitest; pMHC: peptid-fő hisztokompatibilitási komplex; TA: tumor antigén; TCR: T sejt receptor; TIL: tumor infiltráló limfocita

Amellett, hogy az antitest, a TIL, és az immunellenőrzőpont-gátló kezelések önmagukban is jelentős eredményeket értek el a rosszindulatú daganatok kezelésében, előnyeik egy részét sikerült egy olyan precíziós gén- és sejtterápiás készítményben egyesíteni, amely klinikai potenciálját tekintve mindhárom stratégián túlmutat. Ez az úgynevezett kiméra antigén receptor (Chimeric Antigen Receptor, CAR) T sejt terápia, mely a monoklonális antitestekre jellemző célzott daganatfelismerést kombinálja a T sejtek robosztus tumorellenes hatékonyságával (1. ábra) [7]. A CAR T sejtek mára forradalmasították a terápia-rezisztens leukémiák és limfómák kezelését, ugyanakkor a szolid szervi daganatokat célzó klinikai vizsgálatokban az áttörés eddig elmaradt [8]. Az alapkutatás egyik jelentős feladata, hogy szisztematikus vizsgálatokkal feltárjon olyan lehetséges paramétereket, amelyek optimalizálásával a szolid tumorokat célzó CAR T sejt készítmények is a terápiás protokollok részeivé válhatnak.

#### III.1.1. Monoklonális antitest terápiák

Bár a daganatos megbetegedések kezelését célzó immunterápiák csak az elmúlt két évtizedben váltak az onkológiai rutin részévé, az immunrendszer természetes védelmi mechanizmusainak gyógyászati hasznosítása korántsem újkeletű koncepció. A célzott immunaktiváció legkorábbi módja a vakcinálás volt, mely a kórokozóra specifikus antigének bemutatásával képes előre felkészíteni az immunrendszert a védekezésre. Ma már tudjuk, hogy a vakcináció nyújtotta immunitást elsősorban a B sejtekből differenciálódó plazmasejtek által termelt antigénspecifikus ellenanyagok közvetítik, ahogy azt is, hogy ez a stratégia központi eleme az immunrendszer számtalan biológiai funkciójának. Az ellenanyagok gyógyászati alkalmazásában rejlő potenciált azonban sokáig nem tudta kiaknázni a klinikai gyakorlat a molekuláris biológia technológiai korlátjai miatt. Az áttörést Köhler és Milstein 1975-ös eredményei jelentették, melyekben limfociták és mielómasejtek fúziójával olyan hibrid sejtklónt állítottak elő, ami megőrizte mind a fehérvérsejtek antitest termelő sajátságát, mind a rákos sejtek korlátlan osztódási képességeit [9]. A hibridóma technika finomításával lehetővé vált szinte bármilyen antigén egyedi epitópjára specifikus monoklonális antitest nagy mennyiségű előállítása, melyek immár biztonságosan alkalmazhatóvá váltak a humán gyógyászatban [10].

A mAb-ok felismerő – és effektor funkcióikat speciális felépítésüknek köszönhetik [11]. A legtöbb terápiás antitest az immunglobulin szupercsalád G1 osztályába (IgG1) tartozik (2. ábra). Szerkezetüket tekintve két nehéz láncból (heavy chain, H) és két könnyű láncból (light chain, L) állnak, melyeket diszulfid hidak kapcsolnak össze Y alakú dimerré. Az antigénkötésben az Y szétváló ágait képviselő két Fab (fragment, antigen-binding) fragmentum vesz részt, melyek rugalmas elmozdulását a "hinge" régió biztosítja. Az Y szára az úgynevezett Fc (fragment, crystallizable) domén, feladata a daganatsejteket elpusztító immunválasz aktiválása. Az Fc fragmenthez az Fc-receptorokat expresszáló citotoxikus immunsejtek (monociták, makrofágok, NK sejtek és granulociták) illetve a komplement rendszer fehérjéi képesek hozzákapcsolódni. Előbbiek ADCC révén direkt, utóbbi a komplement kaszkád aktiválásával indirekt úton indukálja a tumorsejt lízisét.



2. ábra Az IgG1 antitest felépítése és funkciói

A daganatsejteket célzó mAb-okkal kapcsolatos legkorábbi eredmények a limfómás megbetegedések kezeléséhez kapcsolódnak: első sikeres klinikai tesztelésükre 1980-ban került sor [12], az első klinikai áttörést pedig a CD20 specifikus rituximab hozta el (4. ábra) a Non-Hodgkin-limfóma gyógyításában [13]. Hatásmechanizmusát tekintve a rituximab egyedül az immunrendszer aktiválására támaszkodott, azaz a target molekulához kötődve közvetlen szignalizációs hatást nem fejtett ki. A mAb-ok fejlesztésének következő szakasza a jóval ellenállóbb célpontot jelentő szolid tumorok kezelésére irányult, ahol indokolt volt további megfontolásokat is bevonni a terápiás stratégiába. Itt olyan target antigének tudatos megválasztása volt célravezető, melyek antitest által megkötése nemcsak ADCC-t indukált, de ezen túlmenően a célpont blokkolásán keresztül hátráltatta a tumorprogressziót is (3. ábra). Ideális célpontot kínált a proliferatív és antiapoptotikus szignálokat közvetítő humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es altípusa (human epidermal growth factor receptor 2, HER2), melynek fokozott mértékű expressziója számos daganattípus kialakulásában és növekedésében játszik jelentős szerepet [14].

A HER2 specifikus ellenanyagok, mint a trastuzumab (3. ábra) és a pertuzumab, rendkívül eredményesnek bizonyultak a daganatproliferáció és az áttétképződés gátlásában, első vonalbeli kezelést biztosítva a HER2 pozitív metasztatikus emlőrákkal szemben [15].



3. ábra Különböző monoklonális antitest terápiák hatásmechanizmusai

A mAb terápiák alapvető hatásmechanizmusa a TA-k felismerése és az ADCC, illetve CDC immuneffektor funkciók aktiválása. Bizonyos mAb-ok, mint a HER2 specifikus trastuzumab és pertuzumab, az ADCC és CDC aktiválásán túl a proliferáció gátlásán keresztül is hozzájárulnak a tumorsejt elpusztításához. A VEGF specifikus antitestek, mint a bevacizumab, képesek meggátolni a tumor angiogenezisét, de nem indukálják az ADCC és CDC immuneffektor funkciókat. Az ADC-k célzottan a tumorsejtekbe szállítják az antitesthez kapcsolt onkofarmakonokat. Az olyan ADC-k, mint a trastuzumab emtansine, többféle tumoreliminációs mechanizmust kombinálnak.

ADC: antitest -gyógyszer konjugátum; ADCC: ellenanyagfüggő sejtes citotoxicitás; CDC: komplement mediálta citotoxicitás; mAb: monoklonális antitest; TA: tumor antigén

Tovább gazdagították a szolid tumorok terápiás repertoárját a tumor vérellátását biztosító érújdonképződést (neo-angiogenezis) akadályozó vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular endothelial growth factor, VEGF) specifikus mAb-ok (3. ábra), klinikai áttörést hozva többek között az áttétes vastagbélrák, mellrák, valamint nem kissejtes tüdőrák gyógyításában [16]. Fontos megemlíteni ugyanakkor, hogy az eddig bemutatott antitesttípusok mindegyikét gyakran szükséges kemoterápiával kombinálni az optimális tumorválasz elérése érdekében, ami növelheti az átfedő toxicitások és nemkívánatos események kockázatát, valamint nehezítheti a mellékhatások monitorozását és kezelését [17].

Elegáns alternatívát nyújtanak az ellenanyagok és az onkofarmakonok kombinált terápiájára az antitest-gyógyszer konjugátumok (antibody-drug conjugate, ADC), melyekben a kemoterápiás ágenseket az antitesthez kötik, így azok célzottan a tumorsejtekbe juttathatóak (3. ábra). Az első ilyen, klinikai alkalmazásra engedélyezett készítmény a Hodgkin-limfóma Reed-Sternberg sejtjein expresszált CD30-ra specifikus brentuximab vedotin volt [18], melyet a

szolid tumorok terápiájában úttörő antitest, a trastuzumab követett emtansine konjugátum (4. ábra) formájában [19].

A klinikai felhasználásra elfogadott mAb-ok számának robbanásszerű növekedése (4. ábra) az elmúlt évtized folyamán látványosan szemlélteti a stratégia átütő sikerét: az EMA és az FDA napjainkig 43 rákterápiás kezelést hagyott jóvá (<u>www.antibodysociety.org/antibody-</u> <u>therapeutics-product-data</u>).



**4. ábra** Az FDA által klinikai használatra engedélyezett rákterápiás monoklonális antitestek száma 1997 és 2023 között, éves bontásban

A Non-Hodgkin limfóma CD20<sup>+</sup> daganatsejtjeit célzó rituximab 1997-ben, a HER2-re specifikus trastuzumab 1998-ban, a VEGF ligandum VEGFR receptorhoz való kötődését blokkoló bevacizumab 2004-ben került törzskönyvezésre. Az első ADC-ket, a CD30 specifikus brentuximab vedotin-t, illetve a trastuzumab emtansine-t 2011-ben, illetve 2013-ban engedélyezték. 2013 és 2023 között exponenciálisan növekedett a törzskönyvezett mAb terápiák száma.

A számításba vett antitest terápiák nem tartalmazzák az immunellenőrzőpont-gátlókat. A feltüntetett adatok az Antibody Society adatbázisából származnak (<u>www.antibodysociety.org/antibody-therapeutics-product-data</u>).

ADC: antitest-gyógyszer konjugátum; FDA: Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal; HER2: humán epidermális növekedési faktor receptor 2; VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor; VEGFR: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

Jelentős sikereik mellett ugyanakkor nem elhanyagolható szempont, hogy a monoklonális antitest terápiák során gyakran jelentkezik már meglévő vagy szerzett rezisztencia. Klinikai kísérletekben a Non-Hodgkin limfómás betegek 30-60%-ánál nem volt

megfigyelhető tumorválasz a rituximab terápiát követően [20], illetve a páciensek 72%-a egy éven belül relabált [21]. A trastuzumab monoterápia során 35%-ban lép fel primer rezisztencia, illetve az eleinte jól reagáló betegek 70%-ánál is egy éven belül szerzett rezisztencia alakul ki [22].

A tumorsejtek számos módon képesek védekezni a monoklonális antitesteken alapuló daganatterápiák ellen. Leggyakrabban a target antigén expresszióját csökkentik, emellett gátolhatják a tumorsejtek elpusztítására irányuló immunválaszt, valamint fokozhatják az apoptózist elkerülő és proliferációt serkentő jelátviteli útvonalak aktivitását [23]. Ezen kívül a szolid tumorok mAb terápiával szembeni rezisztenciájában fokozott jelentőséggel bír az antitestek kötődésének sztérikus akadályozása (epitóp maszkolás) mucin-4-et (MUC4), hialuronsavat és annak receptorát (CD44) tartalmazó extracelluláris mátrix (ECM) felépítésével [24]. A HER2 pozitív tumorok epitóp maszkoláson keresztül kialakuló rezisztenciáját jól modellezi a JIMT-1 sejtvonal, amelyet egy 62 éves emlőrákos beteg mellhártyametasztázisából izoláltak [25]. A páciens rezisztenticát mutatott a trastuzumab kezeléssel szemben, amit a sejtvonalat előállító kutatólaboratóriumban előrehaladott stádiumú JIMT-1 xenotranszplantátumokkal végzett állatkísérletes modelleken is igazoltak. Korai stádiumú, valamint keringő és disszeminált JIMT-1 tumorsejtek vizsgálata azonban bebizonyította, hogy a modell sejtvonal trastuzumab rezisztenciája csupán a tumorprogresszió késői szakaszában lép fel, és a hialuronán/MUC4 polimer komplexekből álló extracelluláris mátrix kialakulásához köthető. Az ECM felépülését megelőzően a trastuzumab képes volt hozzákötődni a tumorsejtekhez, és ADCC útján eliminálni azokat [26,27]. A mAb-ok hatékonyságát vizsgáló preklinikai kísérletek tehát arra mutatnak, hogy kulcsfontosságú a tumorelimináció sebességének fokozása a szerzett rezisztencia kialakulásának megelőzésében.

Mindezek mellett számos ráktípusban nem állnak rendelkezésre a mAb-ok számára ideális célpontot jelentő TAA-k. Amennyiben a tumorsejtek dedifferenciációja során kialakuló neoantigének pMHC formában prezentálódnak a membránban, a daganatképződés előrehaladottabb szakaszában is jelen lehetnek a strómában a tumorantigént felismerő, illetve arra reaktív T limfociták [2]. Ezek a tumorspecifikus T sejtek – bár elveszítették a daganat elleni aktív védekezés képességét – megfelelő eszközökkel újra aktiválhatóak, terápiás lehetőséget nyújtva a hagyományos mAb-ok hatáskörén kívül eső megbetegedések kezelésére. Ennek egyik útja a T limfociták felszabadítása a tumor által közvetített immunszupresszív mechanizmusok alól az ún. immunellenőrzőpont-gátló antitestek segítségével [6]. Az ICI-k a citotoxikus T limfocita antigén-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) és a programozott sejthalál fehérje-1 (programmed cell death protein 1, PD-1) receptorokhoz, illetve a PD-L1

ligandumhoz kapcsolódva blokkolják az aktivált tumorspecifikus T sejtek kimerüléséhez vezető jelátviteli útvonalakat. Indikációjuk rendkívül széles körű: a PD-1 blokkoló pembrolizumab volt az első olyan immunterápiás hatóanyag, amelynek törzskönyvi engedélye a tumor szöveti eredete helyett annak molekuláris profilján alapult. A készítmény alkalmazható többek között inoperábilis vagy áttétes melanoma, nem kissejtes tüdőrák, fej-nyak karcinóma, uroteliális karcinóma és Hodgkin limfóma ellen [6].

Az immunellenőrzőpont-gátlók olyan reményt adnak előrehaladott, metasztatizáló, hagyományos modalitásokkal szemben rezisztens daganatos megbetegedések gyógyítására, ami megjelenésük előtt elképzelhetetlen lett volna. A sikeres kezelés tartós túlélést biztosít – a terápiára várhatóan jól reagáló páciensek előzetes szűrése nélkül azonban a betegpopuláció alig 20%-ánál figyelhető meg érdemi tumorválasz nem kissejtes tüdőrák [28], 30-40%-ánál metasztatikus melanóma esetén [29]. Ennek háttere, hogy az immunellenőrzőpont-gátlók hatékonyságát a szervezet természetes immunológiai védekezése során kialakult tumorreaktív T sejt készlet mennyisége és minősége szabja meg. Ezért az ICI kezelések egyik fő fejlesztési iránya az olyan kombinált terápiák irányába mutat, amelyek a strómát beszűrő limfociták izolálásával, *ex vivo* aktiválásával és adoptív transzferével biztosítják a szükséges tumorreaktív T sejt populációt [30].

#### III.1.2. Tumor infiltráló limfocita terápiák

Napjainkban a T limfocitákon alapuló adoptív sejtterápiák (adoptive cell therapy, ACT) állnak a transzlációs kutatás fókuszában, amelyek különböző mechanizmusok útján fokozzák a sejtes immunitás hatékonyságát. Az ACT terápiák úttörője Steven Rosenberg amerikai onkológus és immunológus (NIH-NCI, Bethesda, MD, USA), aki részben szembe menve a kor uralkodó tudományos álláspontjával már a 70-es években a T limfociták daganatellenes immunválaszban betöltött szerepe mellett foglalt állást.

Rosenberg kutatásait hátráltatta a limfociták laboratóriumi tenyésztésének nehézsége, amit a T sejtek által termelt proliferációt támogató faktor, az interleukin-2 (IL-2) citokin 1976os azonosítása oldott meg [31]. Rosenberg és kutatócsoportja az IL-2-őt nagydózisú intravénás infúzió formájában alkalmazta melanómában (a bőr rosszindulatú daganata) szenvedő betegek kezelésére azt remélve, hogy a T sejtekre specifikus stimulus reaktiválja a daganatspecifikus sejtes immunválaszt. Hipotézise beigazolódott, a betegek mintegy felében volt megfigyelhető tumor regresszió, és egyikük teljesen felépült [32]. További klinikai kísérletei nyomán az FDA 1992-ben, illetve 1998-ban engedélyezte a megadózisú IL-2 terápiát az elsőként az áttétes veserák majd a melanóma kezelésére [33]. Bár az IL-2 önmagában a veserákos páciensek csupán 7%-ánál biztosított teljes, 15%-ánál részleges tumor regressziót, és a vizsgált daganatok széles spektruma nem reagált a kezelésre; a részsikerek rámutattak arra, hogy a T sejtek önmagukban is alkalmasak lehetnek előrehaladott, távoli áttétet adó daganatok komplett eradikálására [33].

Az előző felismerés vezetett az adoptív immunsejtes terápiáknak a daganatszövetből izolált magas tumorspecificitású T sejteken – az úgynevezett tumor infiltráló limfocitákon – alapuló formájának kifejlesztéséhez. A TIL terápiák evolúciójának korai szakaszában már ismert volt a stratégiát megalapozó T sejt sajátosságok egy része. 1975-ben állatkísérletes rendszerben bizonyították, hogy a T sejtek hatékony tumorellenes immunválaszát citotoxikus és "helper" altípusaik szoros együttműködése biztosítja [34]. Később fény derült arra is, hogy a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T limfociták képesek a tumorszövetben fennmaradva több tumorsejt szekvenciális megtámadására, amit a CD4<sup>+</sup> helper T sejtek a citolitikus aktivitást és perzisztenciát serkentő citokinek, például IL-2 kibocsájtásával támogatnak. Ennek hiányában a tumor infiltráló CD8<sup>+</sup> T sejtek idővel válaszképtelenné, anergiássá válnak [35].

Rosenberg kutatócsoportja sikeresen izolálta ezeket a diszfunkcionális TIL-eket, és IL-2 tartalmú tenyésztőközegben való *ex vivo* szaporításuk útján újraaktiválta tumorspecifikus citolitikus aktivitásukat. Az expandált TIL-ekből álló készítmények terápiás hatékonyságát 1987-ben hét különböző szolid daganatot modellező *in vivo* preklinikai vizsgálatban monitorozták. 15 nappal az adoptív transzfert követően a TIL sejtek hétből öt daganattípus esetén sikeresen eliminálták a mikrometasztázisokat [36]. A forradalmi eredményekre alapozva humán klinikai vizsgálatok indultak el, melyekben az autológ tumorokkal szemben mutatott aktivitás vizsgálatát követően a megfelelő specificitással és citolitikus hatékonysággal rendelkező T sejt izolátumokat *in vitro* expandálták, majd limfoablatív (limfocitákat elimináló) előkészítő kezelést követően IL-2 bevonása mellett intravénás úton adták vissza a betegnek (5. ábra) [37].

A TIL terápia I/II-es klinikai vizsgálati szinten a metasztatikus melanómában szenvedő páciensek megközelítőleg 40-72%-ánál indukált részleges, 40%-ánál teljes tumor regressziót, ami valódi áttörést hozott az előrehaladott bőrrákban szenvedő betegek kezelésében [38]. Bár a TIL-ek hatékonysága jelentősen felülmúlja a megadózisú IL-2 kezelését, az első klinikai felhasználásra szánt TIL készítmény, a lifileucel törzskönyvi engedélyeztetése jelenleg is az FDA elbírálása alatt áll [39]. Ennek oka elsősorban a TIL terápiás stratégia korlátjaira vezethető vissza.



5. ábra TIL sejtkészítmények előállítása és adminisztrációja autológ transzferrel Rosenberg kutatócsoportjának melanomát célzó klinikai kísérleteiben

A melanomás tumorszövetből vett biopsziás mintát megtisztították, feldarabolták, és 6000 IU/ml IL-2 jelenlétében kulturálták 1-2 héten keresztül. A tenyésztés során monitorozták a TIL populáció növekedését és szükséges esetben további IL-2-őt adagoltak. A felnövő TIL sejtpopulációkat izolálták, és autológ tumorsejtekkel fedett tenyésztőedényekben tesztelték tumorspecifikus aktivitásukat. A pácienseknek limfoablatív kemoterápiás kezelését követően egy dózisban kapták meg a megfelelő reaktivitású autológ TIL sejtkészítményt, infúzió útján, megadózisú IL-2-vel kombinálva [37].

A TIL-eken alapuló terápia rutin klinikai gyakorlatba való beépülését több tényező is hátráltatja. A hatékony terápiás sejtkészítmény előállításának feltétele megfelelő számú, lehetőleg többféle tumor neoantigénre specifikus T sejt jelenléte a tumorszövetben, ami magas mutációs rátájú daganatokra korlátozza a TIL-ek alkalmazási körét [5]. Számos kutatócsoport foglalkozik olyan diagnosztikai markerek keresésével, amelyekkel megbecsülhető a TIL stratégia várható sikere, ugyanakkor a terápiás sejttermék előállításának esélye még kedvező tumortípusok esetében is csak 75-85% közé esik [40]. Ezáltal minden páciens esetén fennáll a kockázat, hogy a kezelés nem megvalósítható. Emellett a TIL alkalmazásához elengedhetetlen IL-2 adagolása olyan súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet, mint például az érrendszerben kialakuló folyadékvesztéssel járó kapillárisszivárgás-szindróma, ami többek között oliguria (a kiürített vizelet mennyiségének csökkenése), ischaemiás szívbetegség, illetve nehézlégzés kialakulásához vezethet [41]. További hátrány, hogy a TIL terápiák útjába is jelentős akadályt gördít a daganatok fokozott képessége a rezisztencia kialakítására. Mivel a TIL-ek hatásmechanizmusa az MHC-n prezentált tumor antigének felismerésén alapul, a daganatsejtek progresszív dedifferenciációja során megváltozó vagy megszűnő az MHC expresszió [3] korlátozhatja a terápia hatékonyságát. A szervezetben ugyanakkor bőségesen rendelkezésre állnak aktív – de nem tumorreaktív – T limfociták. Ezek átprogramozása a daganatok célzott megtámadására olyan megoldást kínál, ami potenciálisan meghaladhatja az összes eddig látott immunterápia sikerét.

#### III.2. CAR T sejt terápia

Az elmúlt évtizedek kiemelkedő klinikai előrelépése volt a CAR T sejt terápiák megjelenése. Ez egy olyan tökéletesen személyre és daganattípusra szabható, ultraszelektív és specifikus stratégia, amely kombinálja az eddig bemutatott terápiás rendszerek előnyeit, ugyanakkor kiküszöböli azok hátrányait. Alapja a betegek T sejtjeinek genetikai módosítása egy szintetikus receptorral, amely a tumorspecifikus antigének célzott felismerését követően képes aktiválni a T sejtek effektor funkcióit [7]. A terápiás eljárás fő lépései a páciens T sejtjeinek izolálását, azok aktiválását, illetve a kiméra antigén receptort kódoló terápiás transzgén genomba integrálását és a CAR-t kifejező T sejtek autológ transzferét foglalják magukba (6. ábra). A betegek a CAR T készítmény beadását megelőzően limfoablatív kemoterápiában részesülnek, amely elősegíti a CAR T sejtek proliferációját a szervezetben [7].

Kezelés	Generikus név	Célantigén	ORR [%]	CRR [%]	Hivatkozás
mAb	Rituximab	CD20	57	14	[42]
	Obinutuzumab	CD20	79	16	[43]
CAR T	Axicabtagene ciloleucel	CD19	91	60	[44]
Criix I	Tisagenlecleucel	CD19	86	69	[45]

 táblázat mAb és CAR T sejt terápiák válaszaránya relapszált vagy refrakter felnőttkori follikuláris limfóma kezelésében

CAR: kiméra antigén receptor; CRR: teljes válaszarány (complete response rate); FL: follikuláris limfóma; mAb: monoklonális antitest; ORR: objektív válaszarány (objective response rate)

A CAR-ok antitest eredetű felismerő régója a mAb-okkal megegyező célzott specificitást kölcsönöz a T sejteknek, tumorválaszuk azonban felülmúlja az antitestek közvetítette ADCC hatékonyságát. Ezt támasztják alá azok a metaanalízisek, melyek a CAR T sejtekkel, illetve monoklonális antitestekkel kezelt relapszált vagy refraktáló felnőttkori follikuláris limfómában (Follicular lymphoma, FL) szenvedő betegek terápiás válaszait hasonlítják össze. A tanulmányok egyértelműen igazolták, hogy a CAR T sejtes terápia objektív és teljes válaszaránya jóval meghaladja a mAb kezeléssel elérhető tumorcsökkenést (1.

táblázat).

Preklinikai modellek eredményei alapján a CAR T sejtek kis számú sejtfelszíni tumorantigén mellett is képesek felismerni és eliminálni a daganatot, így a mAb-oknál kevésbé érzékenyek lehetnek az antigén expressziójának csökkenése útján kialakuló rezisztenciára [46]. A szolid daganatok indikációjában előnyt jelenthet a két terápiás hatóanyag eltérő biodisztribúciója: az antitesteknek csak igen kis része detektálható a tumorszövetben a beadott dózishoz viszonyítva [47], mivel az erek endotél sejtjeinek szoros kapcsolata fizikailag korlátozza perfúziójukat a daganat környezetébe. Ezzel szemben a CAR T sejtek megőrzik a limfociták extravazációs (erekből az extravaszkuláris térbe történő migrálás) képességét, és *in vivo* szolid tumor modellekben igazoltan képesek behatolni a daganatos szövetbe [27].



6. ábra CAR T sejt terápiás eljárás fő lépései

A CAR T sejtek a TIL és ICI kezelésekkel összevetve is több szempontból kínálnak kedvezőbb terápiás stratégát (7. ábra). CAR tumorspecifikus és tumorasszociált antigének széles spektrumának MHC független felismerését teszi lehetővé, működését tehát nem befolyásolja a TIL és ICI modalitásokat korlátozó MHC restrikció. Emellett a CAR T sejtek forrása a páciens perifériás limfocitakészlete, ezáltal nem támaszkodik a TIL és ICI kezelések

hatékonyságát alapjaiban meghatározó tumorreaktív T sejtek jelenlétére. Végezetül a korszerű molekuláris biológiai és sejttenyésztési módszereknek köszönhetően a terápiás CAR T sejtkészítmény előállításának sikere a TIL-el szemben 99%-os [48].



7. ábra CAR T sejt terápia főbb előnyei a mAb, TIL és ICI kezelésekkel szemben

CAR: kiméra antigén receptor; ICI: immunellenőrzőpont-gátló; mAb: monoklonális antitest; TIL: tumor infiltráló limfocita

A CAR T sejtekben rejlő potenciál már a klinikai tesztelés korai fázisában kivívta a tudományos társadalom elismerését: rangos *Science* folyóirat 2013-ban az immunellenőrzőpont-gátlók mellett a CAR T terápiákat nevezte meg az év áttöréseként [49]. Az azóta eltelt évtizedben a génmódosított immunsejteken alapuló kezelések a hematológiai megbetegedések tekintetében túlszárnyalták a várakozásokat, és immár hatféle CAR T terápia lépett be a mindennapok onkológiai gyakorlatába. A CAR T sejtek transzlációs kutatása napjainkban a szolid tumorok kezelésére fókuszál, mely területen az ígéretes preklinikai eredmények ellenére nem történt klinikai áttörés.

#### III.2.1. A CAR felépítése és evolúciójának főbb állomásai

A CAR T sejteken alapuló immunterápia fejlesztése során a mesterséges receptor felépítése többlépcsős evolúción ment keresztül [7]. Az első generációba tartozó CAR-ok működése a receptor két legelemibb funkcionális alegységére – a daganatsejtek membrán asszociált tumorantigénjeit felismerő antitest tulajdonságú ektodoménre, valamint a T sejtek citotoxikus sejtválaszát kiváltó, TCR eredetű effektor endodoménre – támaszkodott (8. ábra). Ez a konstrukció biztosította a T sejt aktivációhoz nélkülözhetetlen antigénfüggő első szignált (szignál I); amely azonban nem bizonyult elegendőnek a hatékony terápiás válaszhoz: bár in vivo egérmodellekben ezek az első generációs CAR-ok képesek voltak tumorkontrollt eredményező antigén-specifikus citotoxicitást és citokin felszabadulást indukálni [50], korlátozott perzisztenciájuk révén I. fázisú klinikai kísérletekben nem váltottak ki érdemi tumorcsökkenést [51]. Ennek oka, hogy a natív T limfocitákhoz hasonlóan CAR T sejteknek is szükségük van a kostimulációs receptorok biztosította II. szignálra citolitikus és proliferatív képességeik teljes körű aktiválásához. A második generációs kiméra receptorok endodoménjébe ezért a T sejtek valamely kostimulációs receptorának jelátvivő doménje került beépítésre, mely addig nem látott, robosztus tumoreliminációt és hosszú távú túlélést kölcsönzött a CAR T sejteknek [7]. A stratégia klinikai áttöréshez vezetett a hematológiai megbetegedések különböző típusainak kezelésében – a szolid tumorok indikációjában azonban nem hozott jelentős előrelépést.

A különböző típusú kostimulátorok által biztosított eltérő előnyök kombinálásának reményében született meg a CAR-ok két kostimulációs doménnel rendelkező harmadik generációja. Preklinikai tesztelésük során megnövekedett perzisztenciát és tumorellenes aktivitást mutattak [52], a kostimulációs domének szinergikus működéséből fakadó fokozott aktiváció azonban hátrányosnak bizonyult: a kiújuló (relapszáló) vagy egyéb kezelésre nem reagáló (refrakter) B sejtes leukémiák indikációjában hatékonyságuk nem múlta felül a második generációs CAR T sejtekét, ellenben alkalmazásuk gyakrabban vezetett súlyos mellékhatások kialakulásához [53]. A CAR T sejtek legfiatalabb, negyedik generációja (T cells Redirected for antigen-Unrestricted Cytokine-initiated Killing, TRUCK) a receptor expressziója mellett valamely, a tumor mikrokörnyezetét (tumor microenvironment, TME) és a T sejtek működését moduláló citokin kibocsájtását is fokozzák, ezzel biztosítva egy harmadik – úgynevezett citokin – szignált (szignál III) a tumorellenes immunválaszhoz (8. ábra) [54].

A kiméra antigén receptorok felépítése az egyes generációkon belül is igen változatos, és az alapvető funkcionális alegységek mellett a strukturális megfontolásból beépített régiók is jelentősen befolyásolják a működésüket. A leggyakrabban alkalmazott extracelluláris antigénfelismerő rész egy monoklonális antitest könnyű (VL) és nehéz (VH) láncát tartalmazó egyláncú variábilis fragmens (single chain variable fragment, scFv). A CAR scFv számos azonos specificitással, de eltérő antigénkötési erősséggel (affinitás) rendelkező antitestből származhat. A magas affinitású scFv növeli a kontaktfelszínre gyülekező CAR-ok által felépített immunológiai szinapszis (IS) stabilitását a daganat megtámadása folyamán, ezek a CAR T sejtek azonban a célzott tumor asszociált antigént kis mértékben expresszáló egészséges szöveteket is károsíthatják, ami az ún. "on target off tumor" mellékhatás kialakulásához vezethet [55]. Az scFv-ken túlmutatóan egyéb felismerő domének sikeres preklinikai tesztelésére is sor került, mint a glioblasztóma specifikus klorotoxin [56] és az UniCAR, melynek streptavidin eredetű extracelluláris doménje egy biotinilált linker molekulán keresztül képes a specifikus tumor célponthoz kötődni [57].



8. ábra A kiméra antigén receptorok alapvető szerkezete és generációi

CAR: kiméra antigén receptor; Kostim.: kostimulációs domén; mAb: monoklonális antitest; scFv: egyláncú variábilis fragmens; TCR: T sejt receptor; TM domén: transzmembrán domén

A CAR molekula szerkezetének rövid, de funkcionálisan igen jelentős építőelemei az extracelluláris antigénfelismerő és intracelluláris effektor domének között elhelyezkedő hinge (más néven spacer vagy linker) és transzmembrán (TM) alegységek (9. ábra). Előbbi az antigénfelismerő egység rugalmasságáért, utóbbi a receptor stabil membránbeli expressziójának biztosításáért felelős. A legelterjedtebben alkalmazott hinge-ek IgG1, IgG4,

CD8 vagy CD28 eredetűek, míg a TM domén jellemzően a CD8, CD4 vagy CD28 receptorokból származik [55]. Funkcionális hatásaik tekintetében a hinge hosszának és rugalmasságának növelése segíti a CAR hozzáférését a nehezen elérhető tumor epitópokhoz, fontos ugyanakkor, hogy a CAR T limfocita és a daganatsejt közötti fizikai kapcsolat kellően szoros maradjon ahhoz, hogy az aktivációs jelátvitelt gátló T sejt szabályozók kiszoruljanak az immunológiai szinapszisból [55]. A TM régió fő funkcióján túlmutatóan a kiméra receptor spontán vagy stimuláció hatására bekövetkező dimerizációját indukálhatja, ami kedvezően hat az IS felépítésének hatékonyságára és a korai aktiváció jelátvitelére [55]. Az IS összeszerelődésének dinamikája és stabilitása kulcsfontosságú a citolitikus T sejt válasz lefolyásában, és egyes korrelatív elemzések szerint megjósolhatja a CAR T sejtek terápiás hatékonyságát [58].



9. ábra A CAR építőegységeinek főbb összefüggései a CAR T sejt funkcionális működésével

Az illusztratív mikroszkópiás felvétel zöld fluoreszcens fehérjevel (Green fluorescent protein, GFP) fúzionált kiméra antigén receptorokat kifejező (zöld jel) Alexa Fluor 647 konjugált anti-humán TCRα/β antitesttel jelölt (vörös jel) CAR T sejteket ábrázol a specifikus antigént hordozó tumorsejt megtámadása közben. A kép előállítása során optikai szeletelést és 3D rekonstrukciót alkalmaztunk, a kép Airyscan szuperrezolúciós felvételi üzemmódban készült.

CAR: kiméra antigén receptor; CM: centrális memória; EM: effektor memória; scFv: egyláncú variábilis fragmens; TAA: tumor asszociált antigén

Az scFv antigén felismerését és az IS kialakulását követően a CAR-ok intracelluláris effektor doménje közvetíti a T sejt aktivációhoz nélkülözhetetlen első szignált. Az effektor alegység a CAR többi építőeleménél kevésbé változatos, leggyakrabban a TCR komplex CD3ζ

láncából származik [55]. A legtöbb CAR CD3z alegysége három, úgynevezett immunoreceptor tirozin-alapú aktivációs motívumot (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) tartalmaz, amelyeket – a natív TCR-el megegyezően – az aktiváció során a limfocita specifikus protein tirozin kináz (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Lck) foszforilál. A szignalizációs kaszkád további lépései nagy hatékonysággal indítják el a transzkripcióhoz, proliferációhoz és citotoxikus T sejtválaszhoz vezető foszfatidilinozitol és tirozinkináz jelátviteli útvonalakat [55]. A fent már leírtaknak megfelelően a második és harmadik generációból származó CAR-ok egy, illetve két kostimulátor endodoménje a transzmembrán-és a CD3z szignáldomén között helyezkedik el. Ezek jellemzően az ICOS, CD28, 41BB vagy OX40 molekulákból származhatnak, klinikai indikációja ugyanakkor egyedül a CD28 és 41BB CAR-oknak van [55]. Mindkét kostimulációs domén erőteljes proliferációs, túlélési, és aktivációs szignált biztosít a CAR T sejtek számára, azonban eltérő módon modulálják az effektorválasz kimenetelét (9. ábra).

A CD28 jelátvitele elnyomja a mitokondriális biogenezist így a sejt energiaforrásának nagy részét glikolízissel állítja elő, míg a 41BB CAR T sejtekben a mitokondriumokban zajló oxidatív foszforiláció dominál [59]. Ennek funkcionális következménye a CD28 eredetű kostimuláció robusztus, nagy hatékonyságú citotoxikus válasza, amelyben a CAR T sejtek gyorsan kimerülnek, és rövidebb ideig perzisztáló effektor memória sejtekké differenciálódnak [59]. Ezzel szemben a 41BB kostimulátor endodomén által közvetített citolízis kevésbé intenzív; ugyanakkor a 41BB CAR T sejtek hosszabb ideig maradnak fenn központi (vagy más néven centrális) memória alcsoportként [60].

Az extracelluláris domén, illetve a transzmembrán alegység hatása tehát jól ismert a daganatellenes CAR T sejtes immunválasz korai eseményeit befolyásoló molekuláris interakciókra, míg az intracelluláris effektor domének eltérő szerepe a CAR T sejtek hosszú távú aktivitásának tekintetében került mélyreható feltárásra (9. ábra). Kevés információ áll ugyanakkor rendelkezésre a leggyakrabban alkalmazott CD28 és 41BB kostimulátorok lehetséges hatásáról az immunológiai szinapszis felépülésére. Egy tanulmány szignifikáns összefüggést tárt fel a második generációs CD28 és 41BB CAR-ok alkotta IS minősége és a tumorválasz hatékonysága között a hematológiai megbetegedéseket célzó CAR T sejt terápiák kontextusában [61], indikálva, hogy a kostimulációs domének a hosszú távú effektorválasz modulálását megelőzően már a CAR T sejtek korai aktivációjára is eltérő hatást gyakorolhatnak.

#### III.2.2. CAR T sejtkészítmények előállítása kutatási célra

A kísérleti célra felhasznált CAR T sejtek előállításának első lépése a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) izolálása egészséges donorok véréből, melyet a T sejtek osztódásának indukálása követ (10. ábra). Ehhez a T sejteknek három szignált kell kapnia. Az antigén specifikus első szignált jellemzően a TCR/CD3 komplex epszilon alegységének stimulálásával hozzák létre. A második, kostimulációs szignált a CD28 membránfehérje aktiválásával biztosítják. A T sejtek teljes aktivációjához elengedhetetlen harmadik citokin szignált az IL-2, IL7 és IL15 citokin szupplementáció szolgáltatja [62]. Az aktivált és expandált T sejtek genomjába legelterjedtebben gamma-retrovirális és lentivirális génbeviteli módszerek segítségével integrálják a CAR-t kódoló transzgént. Mindkét módszer nagy hatékonyan alkalmazható a T sejtek permanens génmódosításra. A kizárólag osztódó sejteket megfertőző retrovírusokkal szemben a lentivírusok képesek a nyugvó sejtek genetikai módosítására is, és a klinikai kísérletek egy részében kedvezőbb terápiás választ biztosítottak a retrovirális transzdukciós rendszereknél [63].



10. ábra Kísérleti célra felhasznált CAR T sejttermék előállításának sémája

A funkcionális virális vektorok előállításához egy ún. csomagoló sejtvonal szükséges, melyre a humán embrionális vese (Human embryonic kidney, HEK) 293T sejtvonalat alkalmazzák. A teljes virális vektor felépítéséhez a kiméra antigén receptort, illetve a vírusok működéséhez nélkülözhetetlen polimeráz enzimeket és virális burkot kódoló plazmidok egyidejű transzfektálása szükséges. A csomagolósejtekben ezt követően felépülnek a funkcionális pszeudovírus vektorok, melyek immár felhasználhatóak a limfociták génmódosítására [64]. A géntranszfer serkenthető a humán fibronektin eredetű RetroNectin reagenssel, ami a T limfociták és a víruspartikulumok egyidejű megkötésével jelentősen fokozza a transzdukció hatékonyságát [65]. A pszeudovírus a T sejtek megfertőzése során átadja a CAR-t kódoló genetikai információt, mely a genomba beépülve biztosítja a kiméra antigén receptor stabil expresszióját a sejtmembránban. A nem-virális génbeviteli módszerek közül többek között a *Sleeping Beauty* [66] és a *PiggyBac* [67] transzpozon rendszert tesztelték CAR T sejtkészítmények előállítására. A CAR T sejteket a transzdukciós lépést követően citokinek jelenlétében a megfelelő sejtszám eléréséig expandálják, majd a transzdukció hatásfokának ellenőrzését követően felhasználásra kerülnek.

A CAR T sejtek előállításának bizonyos lépései jelentősen befolyásolják a heterogén sejttermék differenciáltságának fokát, melynek fő stádiumait a naiv ( $T_N$ ), centrális memória ( $T_{CM}$ ), effektor memória ( $T_{EM}$ ) és terminális effektor ( $T_{TE}$ ) T sejtek képviselik. A CAR T sejtek előállítása megköveteli az izolált T limfociták expandálását, amely egyben a sejtek differenciációját is indukálja [62]. A T sejtek citolitikus hatékonysága fokozatosan növekszik, proliferatív kapacitásuk fokozatosan csökken a naivtól a terminális effektor felé mutató átalakulásuk során (11. ábra). A  $T_{TE}$  fenotípusú sejtek, bár robosztus citotoxikus aktivitással bírnak, további expanzióra már nem képesek, így idővel apoptózis útján elpusztulnak, vagy működésképtelen "kimerült" fenotípust vesznek fel [68]. A T sejtek *ex vivo* szaporítása során alkalmazott stimulációs- és tenyésztési körülmények eltérően befolyásolják a differenciáció





 $T_N$ : naiv-;  $T_{CM}$ : centrális memória-;  $T_{EM}$ : effektor memória-;  $T_{TE}$ : terminális effektor T sejt

A CAR T sejtek összetételének további fontos szempontja a CD4<sup>+</sup> segítő ("helper") és CD8<sup>+</sup> citotoxikus limfociták aránya, mely összefüggést mutatott a CAR T sejtek tumorválaszával. Szinergikus aktivitásuk során az erőteljes citolitikus képességekkel rendelkező CD8<sup>+</sup> CAR T sejtek proliferációját, túlélését és effektor funkcióját a CD4<sup>+</sup> CAR T sejtek citokinek kibocsátásával támogatják [62]. A T sejtek *ex vivo* tenyésztésének körülményei a CD4<sup>+</sup>/ CD8<sup>+</sup> eloszlást is befolyásolhatják [62].

A T sejt differenciáció sebessége csökkenthető az intenzív CD3, illetve CD28 stimulációhoz képest, alternatív jelátviteli útvonalak aktiválásával. A humán fibronektinből származó RetroNectin elsősorban a virális géntranszfer hatékonyságának fokozására használatos, azonban a VLA-4/5 integrin receptorokhoz való kapcsolódásán keresztül a T sejtek aktiválására is alkalmas. GD2 és CD19 specifikus CAR T sejtek előállítása során az anti-CD3 és RetroNectin általi kombinált stimuláció a T<sub>N</sub> és T<sub>CM</sub> fenotípus dúsulását eredményezte a sejtkészítményben, valamint a CD8<sup>+</sup> T sejtek apoptózisának gátlásán keresztül a növelte citotoxikus alpopuláció arányát az *in vitro* expanzió ideje alatt [69], és az adoptív transzfert követően [70]. Az expanziót indukáló aktivációs jel mellett a növekedést serkentő citokinek megválasztása is hatással lehet a CAR T sejtermék differenciációs karakterisztikájára. Klinikai kísérleti rendszerekben leggyakrabban az IL-2 használatos, amely azonban felgyorsítja a T sejt differenciációt és csökkenti a CAR T sejtek perzisztenciáját. Ezzel szemben az IL-7/IL-15 alapú expanziós protokoll az IL-2-nél magasabb fokú aktivációt és proliferációt nyújt, és a T sejtek differenciációjának lassítása révén kedvez a naiv fenotípus fennmaradásának [71].

A CAR T limfociták átalakulása a beadást és a célzott tumorsejtek felismerését követően tovább folytatódik, melyre ekkor már a kostimulációs domének szignalizációja is hatást gyakorol (lásd CD28, 41BB jelátvitel hatása a hosszú távú effektorválaszra, 9. ábra). A B sejtes leukémiák különböző típusainak indikációjában mind preklinikai, mind klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a kevésbé differenciálódott, T<sub>N</sub> és T<sub>CM</sub> sejteket nagyobb arányban tartalmazó CAR T sejttermékek rendelkeznek a legkedvezőbb tumorellenes hatékonysággal [62].

#### III.2.3. CAR T sejtkészítmények előállítása terápiás felhasználásra

A klinikumban alkalmazott CAR T termékek előállítása a páciens perifériás mononukleáris sejtjeinek aferezisével és a gyártási folyamat helyszínére való szállításával kezdődik. Ezekben a korszerű sejtterápiás centrumokban elterjedt az olyan automata bioreaktorok használata, mint a *Sefia*<sup>TM</sup> *Cell Processing System*, illetve a *CliniMACS Prodigy*<sup>®</sup>, ezek segítségével a T sejt izolálástól a végső formulálásig minden lépés egy készülékben, zárt rendszerben, a "jó gyártási gyakorlat" (Good manufacturing practice, GMP) szabványainak

megfelelő körülmények között végezhető el. A T sejt stimuláció és a génbeviteli eljárások tekintetében többféle protokoll ismert. Az anti-CD3 és anti-CD28 stimulációt alkalmazó gyártástechnológiák közül a Kymriah<sup>®</sup> (Tisagenlecleucel) és Breyanzi<sup>®</sup> (Lisocabtagene maraleucel) sejtkészítményekbe lentivirális [72,73]; a Tecartus<sup>®</sup> (Brexucabtagene autoleucel) termékbe retrovirális vektorokkal integrálják a CAR-t kódoló transzgént [74]. A kész termék szigorú minőségellenőrzést követően a sejtek életképességét megőrző krioprezervatív oldatban lefagyasztásra kerül, majd elszállítják a beteg kezelését végző gyógyászati központba. A teljes folyamat az aferezis pillanatától a CAR T sejtek beadásáig jellemzően 21-35 napot vesz igénybe [7].

A CAR T sejttermékek ideális összetételére vonatkozó alapkutatási eredmények nyomán klinikai oldalon is jelentős erőfeszítés irányul a kevésbé differenciált T limfocita populációt eredményező expanziós eljárások implementálására. Újkeletű stratégia a foszfoinozitid 3-kináz inhibitorok adagolása a sejttenyésztési folyamat során, ami jelentős naiv és memória fenotípusú T sejt többletet biztosít a készítményben [75]. A Tecartus<sup>®</sup> gyártástechnológiája speciális limfocita dúsító eljárást alkalmaz a PBMC izolátumot szennyező keringő tumorsejtek eltávolítására, megakadályozva a T sejtek nem kívánt aktivációját, differenciációját és kimerülését az *ex vivo* szaporítás során [74]. A CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> T sejtek klinikai léptékű szelekciója a jól ismert és széles körben alkalmazott ún. mágnesesen aktivált sejtválogatáson (Magnetic-activated cell sorting, MACS) alapul. A Breyanzi<sup>®</sup> gyártására alkalmazott *CliniMACS Prodigy<sup>®</sup>* rendszerben antitestekkel borított mágneses gyöngyök segítségével kiválogatják a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> sejteket, és 1:1-re állítják be arányukat a CAR T termékben [76]. Az Abecma<sup>®</sup> protokollja a CD4<sup>+</sup> altípus dúsítására irányul, így a késztermék átlagosan 85% CD4<sup>+</sup> illetve 13% CD8<sup>+</sup> CAR T sejtet tartalmaz [77].

A CAR T sejtterápiák klinikai fejlesztésének további prominens ágát képviselik a gamma/delta ( $\gamma/\delta$ ) T sejteken alapuló sejtkészítmények. Esetükben a hagyományosan alkalmazott  $\alpha/\beta$  T sejtekhez képest csökken a Graft-versus-Host betegség (GvHD) kockázata, emellett a különböző daganatokban gyakori stressz-indukált molekulák széles skáláját felismerik, ami potenciálisan szélesebb körű alkalmazhatóságot kínál a különböző ráktípusok kezelésében. Ugyanakkor a  $\gamma/\delta$  T-sejtek izolálása és expanziója nagyobb kihívást jelenthet az  $\alpha/\beta$  T sejtekhez képest, ami hátráltatja az elterjedésüket [78].

#### III.2.4. A CAR T sejt terápiák a klinikumban – hematológiai megbetegedések

A natív, ugyanakkor malignus B sejteteken is expresszálódó CD19-re specifikus második generációs CAR T sejtek az elmúlt évtizedben lezajlott második fázisú klinikai tesztekben a B sejtes akut limfoid leukémiában (B-cell Acute lymphoblastic leukaemia, B-ALL) 81%-os [72], a diffúz nagy B sejtes limfómában (Diffuse large B cell lymphoma, DLBCL) 54%-os [48], a köpenysejtes limfómában (Mantle Cell lymphoma, MCL) 67%-os [79], a follikuláris limfómában (Follicular lymphoma, FL) szenvedő pácienseknél 69%-os [45] teljes válaszarányt értek el. Ezek a forradalmi eredmények paradigmaváltást hoztak a hagyományos terápiákkal szemben rezisztens, relabáló/refraktáló (relapsed or refractory, R/R) hematológiai megbetegedések kezelésében. A klinikai kísérletek sikerei nyomán az amerikai gyógyszerbiztonsági hatóság mára négyféle CD19 specifikus CAR T terápia számára adta meg a törzskönyvi engedélyt (2. táblázat). Ezek közül kettő CD28, kettő 41BB kostimulációt vesz igénybe. Mind a négy terméket másodvonalban alkalmazzák sikertelen első vonalbeli terápiát követően.

A B sejtes leukémiákat és limfómákat célzó CAR T kezelések hosszú távú hatékonyságának és biztonságosságának tekintetében mára elérhetőek olyan metaanalízisek, melyek több vizsgálat adatainak összegzésével vonnak le statisztikailag megalapozott következtetéseket. 38 klinikai kísérlet összesen 2134 páciensének adatait feldolgozó szisztematikus metaanalízis az R/R B-ALL indikációjában 70, 56 és 44%-os 1, 2 és 5 éves medián összesített túlélési arányt, valamint 53, 42, illetve 35%-os medián eseménymentes túlélési arányt mutatott ki. Az összesített objektív válaszarány 76% volt, a terápiára válaszoló betegek közül 98% érte el a teljes felépülést jelentő minimális reziduális betegség (minimal residual disease, MRD) negatív remissziót [80]. Az analízis jelentős eltérésre hívta fel a figyelmet a CD28 és 41BB kostimuláció hatásában: a CD28 CAR T sejtek átlagosan 58%-os összesített objektív válaszarányt és 90%-os MRD-negatív remissziót eredményeztek, míg a 41BB CAR T termékek esetén ezek az értékek 78, illetve 99%-nak adódtak.

Generikus név	Gyári név	Célantigén	Intracelluláris jelátvivő domének	Indikáció (FDA engedélyezés éve)
Tisagenlecleucel	Kymriah®	CD19	41BB-CD3ζ	B-ALL (2017), DLBCL (2018), FL (2022)
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta®	CD19	CD28-CD3ζ	DLBCL (2017), FL (2021)
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus®	CD19	CD28-CD3ζ	MCL (2020), B-ALL (2021)
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi®	CD19	41BB-CD3ζ	DLBCL (2021)
Idecabtagene vicleucel	Abecma®	BCMA	41BB-CD3ζ	MM (2021)
Ciltacabtagene autoleucel	Carvykti®	BCMA	41BB-CD3ζ	MM (2022)

2. táblázat: Az FDA törzskönyvi engedélyével rendelkező CAR T sejt terápiák.

BCMA: B sejt maturációs antigén; B-ALL: B sejtes akut limfoid leukémia; DLBCL: Diffúz nagy B sejtes limfóma; FL: Follikuláris limfóma; MCL: Köpenysejtes limfóma; MM: Mielóma multiplex

A legújabb eredmények alapján a második generációs, 41BB kostimulációt alkalmazó CAR T sejt terápiák a mielóma multiplex (MM) kezelésében is klinikai áttörést hoztak. Ezek a kiméra receptorok a csontvelőben felszaporodó rosszindulatú plazmasejtek B sejt maturációs antigénjét (B-cell maturation antigen, BCMA) ismerik fel. Az FDA törzskönyvi engedélyével rendelkező Abecma® illetve Carvykti® készítményeket (2. táblázat) olyan relabált/refrakter mielóma multiplexben szenvedő felnőttek kezelésére alkalmazzák, akik korábban legalább négyféle terápiában részesültek, és a betegségük súlyosbodott az utolsó kezelés óta. Az Abecma® hatékonyságát felmérő eddigi legnagyobb szabású klinikai kísérlet (KarMMa) 13,3 hónapos medián utánkövetési idő mellett a 128 vizsgált beteg 73%-ánál mutatott ki részleges, 33%-ánál teljes terápiás választ. A medián progressziómentes túlélés a teljes betegcsoportban 8,8 hónap, a teljes választ adó betegeknél 20,2 hónap volt [81]. A 419 Carvykti<sup>®</sup>-vel kezelt pácienst magába foglaló CARTITUDE-4 kohortban 15,9 hónap elteltével a betegek 84%-a reagált kedvezően a kezelésre, és mintegy 73%-uknál teljesen eltűntek a daganatos betegség jelei [82]. Egy szintén jelentős klinikai kísérletben a páciensek aferezis termékének összetételét az Abecma® kezelést követő hosszú távú remisszióval korreláltatták. Szignifikánsan több naiv és korai memória CD4<sup>+</sup> illetve kevesebb szenescens (inaktív, kimerült) CD8<sup>+</sup> T sejtet tartalmazott azon betegek kiindulási PBMC izolátuma, akik 18 hónapnál tartósabb remisszióba kerültek. A kiindulási sejtpopuláció kedvező összetétele funkcionálisan aktívabb CAR T sejttermékeket eredményezett a beadás előtti *in vitro* tesztek tanúsága szerint, ami szintén korrelált a tartós remisszióval [83].

A CAR T sejt terápiák sikere ugyanakkor nem egyöntetű: a hematológiai megbetegedések közül a krónikus limfoid leukémia (CLL) és a T sejtes akut limfoid leukémia (T-ALL) indikációjában egyelőre csak részsikerek láthatóak. A krónikus limfoid leukémia CD19 specifikus CAR T sejtekkel való kezelését először 2010-ben tesztelték az amerikai Pennsylvaniai Egyetemen, ígéretes eredményekkel: a terápia két relabált/refrakter CLL-ben szenvedő páciensnél immár több mint tíz éve tartó teljes remissziót ért el [84]. A CAR T limfociták citotoxikus képességekkel rendelkező CD4<sup>+</sup> sejtek formájában még 2022-ben is kimutathatóak voltak a betegek vérében. A klinikai tesztelésbe bevont páciensek számának növekedése folyamán azonban ritkán volt megfigyelhető hasonló mértékű siker. Napjainkig több mint 100 CLL beteget kezeltek anti-CD19 CAR T sejtekkel, de az objektív válaszarányok nagy spektrumon, 0-67% között szórnak, így a terápiás eljárás további optimalizációra szorul [85].

A jellemzően rendkívül agresszív T-ALL megbetegedéssel szemben jelenleg egyedül a jelentős kockázatokkal járó allogén őssejt-transzplantáció képvisel kuratív alternatívát. A T sejtes akut limfoblasztos leukémiát hatékonyan elimináló CAR T kezelésre tehát nagy szükség lenne, azonban a malignitás T limfocita eredete számos akadályt állít a stratégia útjába. Amennyiben a CAR specifikus célantigén nem csak a rákos T sejtek, hanem az aferezissel szelektált T sejtek és a normál keringő T sejtek felszínén is kifejeződik, a CAR T sejtek egymást ("fratricide") illetve a fiziológiás T limfocitákat is megtámadhatják, ami a T sejtek eltűnéséhez vezet ("T cell aplasia"). Továbbá a PBMC izolátumban fennmaradhatnak malignus T limfociták, melyek transzdukciójával a késztermékben "CAR tumor T sejt" szennyezés jelenik meg. Ezek beadása a betegnek beláthatatlan, súlyos mellékhatások kialakulásával járhat. A transzlációs kutatásban intenzív erőfeszítés irányul e hátrányos mechanizmusok leküzdésére, illetve megfelelő célpontot nyújtó antigének azonosítására [86].

#### III.2.5. CAR T sejt terápiák a klinikumban – szolid tumorok

A CAR T sejtek forradalmi sikerei a szolid daganatokkal szemben történő alkalmazás felé is utat nyitottak, ezek azonban jóval összetettebb célpontot jelentenek a hematológiai megbetegedéseknél. A terápiás stratégia implementálását számos akadály nehezíti. Ezek közé tartozik, hogy a szervekre lokalizált daganatokban ritkán áll rendelkezésre olyan tumor

asszociált antigén, ami kellően specifikus célpontot jelent a CAR T sejtek számára. Ez könnyen a már korábban említett "on target, off tumor" mellékhatás kialakulásához vezet. Tumor oldalon a T sejt effektor funkciót gátolhatják különböző immunellenőrző pontok [87]. Továbbá gyakori, hogy a génmódosított T sejtek expanziója és perzisztenciája a tumorszövetben nem elégséges a hatékony tumorlízis kiváltásához [88]. Ezen akadályok ellenére világszerte megközelítőleg 200 CAR T sejtes klinikai vizsgálat zajlik a legkülönbözőbb szervekre lokalizált (agy, hasnyálmirigy, tüdő, nyelőcső, gyomor, emlő, vastagbél, és petefészek) szolid tumorokkal szemben. A több mint 50 féle vizsgált antigén közül kiemelkedik a glipikán-3 (Glypican-3, GPC3), GD2 illetve HER2 sejtfelszíni TAA-kat célzó CAR T terápiák jelentősége.

A GPC3 a májrák egy fajtájában, a hepatocelluláris karcinómában (Hepatocellular carcinoma, HCC) fokozott expressziót mutató sejtfelszíni glikoprotein. Az egészséges szövetek közül csak a gyomor mirigyek, vesetubulusok és here csírasejtek esetén volt megfigyelhető kis mértékű kifejeződése [89], így megfelelő célpontot nyújt a CAR T sejtek számára. A GPC3-CAR T sejt terápia biztonságosságát és hatékonyságát elsőként felmérő klinikai kísérletbe 13 GPC3-pozitív HCC-ben szenvedő beteget vontak be [90]. A terápiát mind a 13 beteg jól tolerálta, de csak 1 páciensnél jelentkezett tumorellenes immunválasz. Ezt követően az expanzió és perzisztencia fokozásának céljából IL-7 és CCL19 citokineket termelő harmadik/negyedik generációs GPC3-CAR T (két kostimulációs doménnel rendelkező TRUCK) sejtek tesztelésére került sor előrehaladott HCC-ban szenvedő betegek első fázisú klinikai vizsgálatában. A stratégia rendkívül hatékonynak bizonyult, 30 nappal az intratumorális injekciót követően a GPC3-TRUCK T sejtek teljes mértékben eradikálták a tumort [91].

A diszialogangliozid (GD2) glikolipid a neuroblasztóma, melanóma és oszteoszarkóma sejtek felszínén fokozottan kifejeződő tumor asszociált antigén [92]. Az amerikai *Baylor College of Medicine* klinikai vizsgálatában 19 neuroblasztómás beteg kapott GD2 specifikus CAR T sejteket, és a terápiát követően három esetben komplett remissziót tapasztaltak [93]. A klinikai teszt ezen kívül összefüggést mutatott ki a CAR T sejtek kedvező hosszú távú *in vivo* perzisztenciája és az az infundált termék nagyobb arányú CD4<sup>+</sup> valamint T<sub>CM</sub> tartalma között. A GD2 specifikus CAR T terápiákhoz kapcsolódik az eddigi legeredményesebb klinikai kísérlet a szolid tumorok indikációjában. Az olaszországi Bambino Gesù Gyermekkórházban CD28 és 41BB kostimulációt alkalmazó harmadik generációs GD2-CAR T sejtkészítménnyel kezeltek összesen 27 neuroblasztómás gyermeket [94]. A CAR konstrukció tartalmazott egy ún. "biztonsági kapcsolót" ("safety switch"). Ennek segítségével azonnal indukálható a CAR T sejt apoptózisa a kezelésből fakadó toxicitás fellépése esetén, így kivédhetővé vált a harmadik

generációs CAR T sejtek fokozott aktivitásával járó kockázat. A biztonsági kapcsolót a vizsgálat során egyetlen esetben aktiválták, ami a terápiás sejtek gyors eliminációját eredményezte. A GD2-CAR T limfociták jól mérhető *in vivo* expanziót mutattak: 27 betegből 26 perifériás vérében kimutathatók voltak az infúziót követő 30 hónapban. A terápia rendkívül hatékony tumorválaszt eredményezett. 17 gyermek jól reagált a kezelésre, közülük 9-nél teljes, 8-nál részleges válasz alakult ki. Az ajánlott terápiás dózisban részesülő betegek 3 éves teljes túlélése 60%, eseménymentes túlélése 36% volt.

A legkorábbi és a mai napig leggyakrabban vizsgált terápiás célpont a HER2, mely fokozottan expresszálódik többek között emlő, tüdő, gyomor, vastagbél, glia és hasnyálmirigy tumorsejtek felszínén [14]. Az ígéretes preklinikai eredmények nyomán a HER2-CAR T terápiát elsőként egy metasztatikus vastagbél karcinómát célzó klinikai vizsgálatban tesztelték [1]. A kezelés során magas dózisú harmadik generációs CAR T sejteket alkalmaztak. A terápiás sejtek infúzióját követő 15 percen belül kezelhetetlen "citokin vihar" lépett fel egy 39 esztendős betegben, azonnali halálához vezetve. Ez a sajnálatos esemény több éven keresztül hátráltatta a HER2-CAR T sejtek klinikai vizsgálatát, újabb teszteléseik során pedig immár alacsonyabb dózis, és biztonságosabb második generációs CAR konstrukció volt használatos.

Egy I. fázisú klinikai vizsgálatban 11 előrehaladott hasnyálmirigy, illetve epeúti rákban szenvedő beteget kezeltek 41BB kostimulációt alkalmazó, második generációs HER2-CAR T limfocitákkal [95]. A CAR T készítményekben jelentős  $T_{CM}$  többletet és igen kis számú  $T_{EM}$ sejtet mutattak ki, míg a CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> limfociták eloszlása kiegyensúlyozottnak bizonyult. A páciensek a CAR T sejtek infúzióját megelőzően limfoablatív előkészítő kezelést kaptak. Kedvező eredménynek számít, hogy csak egy esetben lépett fel súlyos mellékhatás, azonban részleges tumorválasz is csupán egy betegnél volt megfigyelhető.

Szintén I. fázisú, 17 előrehaladott HER2-pozitív glioblasztómában szenvedő beteg bevonásával végzett klinikai vizsgálatban CD28 kostimulált második generációs HER2-CAR T limfociták infúziója jól tolerálható volt a kezeléssel összefüggő súlyos toxicitások fellépése nélkül [96]. A 16 értékelhető beteg közül 1 esetben a részleges válasz több mint kilenc hónapig tartott, 7-nél a tumorprogresszió nyolc hét és 29 hónap között stabilizálódott, 8 beteg daganata azonban terápiát követően tovább növekedett. A CAR T sejtek száma a vérben folyamatosan csökkent, 18 hónap múlva pedig teljesen eltűntek. Ebből arra lehetett következtetni, hogy beadást követően a terápiás limfociták nem expandáltak, hanem közel egy évig túléltek. Ehhez feltételezhetően hozzájárult, hogy a sejtterápiás készítmény kizárólag CD8<sup>+</sup> sejteket tartalmazott.

A HER2 specifikus CAR T sejt terápiával a publikált adatok alapján ezidáig egy páciens teljes felépülését sikerült elérni. Egy refrakter, csontáttéteket adó lágyrészszarkómában szenvedő gyermek három ciklusban részesült CD28 kostimulációt alkalmazó HER2-CAR T sejtes kezelésben az amerikai Baylor College of Medicine kutatóközpontjában [97]. Az utolsó infúziót követő 10. héten a daganat már nem volt detektálható, és további 4 kezelési ciklust végeztével 20 hónappal később sem volt kimutatható a betegség. A klinikai kísérlet részeként a beadott CAR T sejttermékek összetételét is monitorozták: az első három ciklusban felhasznált készítmény 70% CD8<sup>+</sup>, 30% CD4<sup>+</sup> T sejtet, a második négy ciklusban alkalmazott készítmény 50-50% CD8<sup>+</sup> és CD4<sup>+</sup> T sejtet tartalmazott. A fenotípus profil tekintetében mindkét termék jelentős T<sub>EM</sub> többletet, és alacsony T<sub>CM</sub> arányt mutatott.

A legintenzívebben kutatott szolid tumorokat célzó modalitások közül tehát a HER2-CAR T terápiák klinikai tesztjei mutatták a legszélsőségesebb eredményeket. A kis mértékű, de a betegek egy részénél konzisztensen jelentkező tumorválasz arra hívja fel a figyelmet, hogy a HER2-CAR T sejtek képesek megtámadni a daganatot, de a terápiás stratégia optimalizációra szorul a citolitikus aktivitás és a hosszú távú expanzió fokozásának érdekében.

Bár a rendkívül kis számú és eltérő indikációjú klinikai adat nem ad lehetőséget a kedvezőbb kostimulációra vagy a késztermék ideális összetételére vonatkozó definitív állásfoglalásra, az eredmények arra utalnak, hogy ezen paraméterek fontos szerepet játszhatnak a terápia kimenetelében.

#### III.2.6. A CAR T sejt terápia biztonságossága és mellékhatásai

Mivel a CAR T sejt terápia az hagyományos onkológiai eljárásokkal szemben nem a gyorsan osztódó sejteket támadja, a kezelések során fellépő mellékhatások profilja is eltér kemoterápia és sugárterápia esetén megszokottaktól. A klinikai tapasztalatok alapján a CAR T sejt terápiához kapcsolódó mellékhatások három fő csoportba sorolhatóak:

1. "On target, off tumor" (OTOT) toxicitás:

Az "on target, off tumor" toxicitás akkor lép fel, ha a CAR T limfocita felismeri és megtámadja a célzott tumorasszociált antigént kis mértékben expresszáló normális sejteket, ami a szövetek súlyos, visszafordíthatatlan roncsolását eredményezheti. A mellékhatás kialakulása a CD19 specifikus CAR T sejtek alkalmazásának következményes velejárója, mivel a target antigén az egészséges B sejtek felszínén is megtalálható. A B sejtek számának csökkenésével járó hipo- vagy agammaglobulinaemia ugyanakkor hatékonyan kezelhető humán immunglobulin intravénás adagolásával [98]. A szolid tumorokon célzott antigének szintén

gyakran fejeződnek ki az egészséges szöveteken. A terápia során fellépő "on target off tumor" toxicitást legelterjedtebben kortikoszteroidokkal beadásával mitigálják, ez azonban a CAR T sejtek tumorellenes effektivitását és perzisztenciáját is negatívan befolyásolja. Számos kutatás vizsgál olyan lehetőségeket, ami a CAR konstrukció felépítésének optimalizálásával kerüli ki az egészséges szövetek felismerését [99].

2. "Citokin vihar":

Az ún. "citokin vihar" vagy citokinfelszabadulási szindróma (cytokine release syndrome, CRS) az infundált CAR T sejtek által felszabadított citokinek (IFNγ, GM-CSF, TNF-α, IL-6 és IL-10) okozta szisztémás gyulladásos választ foglalja magába. Hosszan tartó magas lázat, alacsony vérnyomást, szisztémás hipoxiát és ritka esetben sokszervi elégtelenséget okozhat. A CRS a CAR T sejt terápiához kapcsolódó toxikus effektusok leggyakoribb típusa. A korábban halálos kimenetelű mellékhatás napjainkban már kiválóan kezelhető az IL-6 receptort blokkoló monoklonális antitest, a tocilizumab alkalmazásával. Fontos azonban, hogy a CRS a CAR T sejt terápia hatékony effektorválaszának szükséges velejárója, ezért nem cél annak teljes elfojtása [100]. Az irodalomban leírt legsúlyosabb CRS esemény a korábban említett HER2 pozitív metasztatikus vastagbélrákot célzó klinikai vizsgálatban lépett fel, melynek következtében a páciens életét vesztette [1].

#### 3. CAR T sejt függő encephalopathia (CAR T-Cell Related Encephalopathy, CRES):

Az anti-CD19 CAR T sejtekkel járó neurológiai toxicitások sokfélék lehetnek, és nem lokalizálódnak az idegrendszer adott területére. Előfordulási gyakorisága meglehetősen változó, irodalmi adatok szerint 0% és 50% között mozog. A neurológiai eltérések rövid és hosszú távon egyaránt megjelentek, jellemzően fejfájás, zavartság, delírium, hallucinációk, diszfázia, ataxia, apraxia, arcidegbénulás, remegés, diszmetria és görcsrohamok, illetve az intelligenciahányados csökkenésének formájában. A neurológiai események a CRS-től eltérő időpontban vagy a CRS-toxicitások hiányában is előfordulhatnak, ami arra utal, hogy a két mellékhatásnak legalább részben eltérő a mechanizmusa [101].
## IV. Célkitűzések

A B sejtes leukémiák és limfómák kezelésében alkalmazott CAR T terápiák sikerét a konstrukció felépítésétől a sejtkészítmény fenotípus profiljáig a rendszer összetett optimalizálása alapozta meg. A szolid daganatokat célzó CAR T sejtekkel kapcsolatos klinikai tapasztalatok azonban egyelőre elmaradnak a várakozástól. A HER2-t célzó CAR T sejteken alapuló klinikai vizsgálatokban a betegek egy részénél konzisztensen jelentkező, ugyanakkor visszafogott tumorellenes immunválasz arra hívja fel a figyelmet, hogy a terápiás stratégia optimalizációra szorul a citolitikus aktivitás és a hosszú távú expanzió fokozásának érdekében. Munkánk során olyan beavatkozási pontok azonosítását tűztük ki célul, amelyek által a HER2<sup>+</sup> szolid tumorok kezelésére alkalmas CAR T sejtek hatékonysága potenciálisan növelhető.

Kísérleti rendszerünkben az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolja a CAR T sejtek rövid távú tumorellenes hatékonyságát a kiméra receptor molekuláris szerkezete, sejtfelszíni szerveződése, és membrándiffúziós dinamikája?
- Milyen T sejt fenotípus profil biztosítja a leghatékonyabb hosszú távú expanziót és effektor választ a HER2<sup>+</sup> szolid tumorokat célzó CAR T sejtek számára?

## V. Anyagok és módszerek

## V.1. Anyagok, törzsoldatok

A megjelölt kivételektől eltekintve az összes anyag a Sigma Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) terméke.

#### V.1.1. Általános törzs-és tápoldatok, többfunkciós reagensek

- 1× PBS puffer: 10× PBS-ből (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 3 mM KCl) hígítva.
- 2. TBS puffer: 20 mM trisz(hidroximetil)-aminometán (Tris), 150 mM NaCl desztillált vízben oldva, 4°C-on tárolva.
- 3. DMEM tápoldat (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4°C-on tárolva.
- 4. Ham-féle F12 tápoldat, 4°C-on tárolva.
- 5. FBS (magzati borjúszérum, Foetal Bovine Serum; Biosera, BioTech Hungary Kft., Budapest, Magyarország), -20°C-on tárolva.
- 6. GlutaMAX (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 4°C-on tárolva.
- 7. Inzulin, 4°C-on tárolva.
- 8. Antibiotikumok: Penicillin-Streptomycin, 4°C-on tárolva.
- 9. RPMI-1640 tápoldat (Roswell Park Memorial Institute), 4°C-on tárolva.
- 10. Komplett RPMI: 2mmol/l GlutaMAX-al, 10% FBS-el és antibiotikumokkal kiegészített RPMI-1640 médium, 4°C-on tárolva.
- 11. LymphoONE tápoldat (Takara Bio, Kusatsu, Japán), 4°C-on tárolva.
- 12. Komplett LymphoONE: 2mmol/l GlutaMAX-al, 10% FBS-el és antibiotikumokkal kiegészített LymphoONE tápoldat, 4°C-on tárolva.
- 13. Formaldehid (Formaldehid Solutio, MOLAR Chemicals Kft., forgalmazó: Hungaropharma Gyógyszerkereskedelmi Zrt., Budapest, Magyarország) 35%-os törzsoldata szobahőmérsékleten tárolva.
- 14. Triton X-100 (Thermo Fisher Scientific Kft., Budapest, Magyarország), 4°C-on tárolva.
- 15. Tween20 (Thermo Fisher Scientific Kft., Budapest, Magyarország), szobahőmérsékleten tárolva.
- HER2-Fc fúziós fehérje: Humán IgG1 Fc régióval fúzionált (hFc tag) humán HER2 rekombináns fehérje extracelluláris domén (extracellular domain, ECD) (Katalógusszám: 10004-H02H; Sino Biological, Eschborn, Németország) liofilizátum formájában –20°C-on tárolva.
- 17. D-luciferin (Katalógusszám: 122799; Revvity/Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), –20°C-on tárolva.

#### V.1.2. CAR T sejt előállítás

- 18. Histopaque-1077 oldat, 4°C-on tárolva.
- 19. JetPRIME transzfekciós reagens (Polyplus, Ill-kirch, Franciaország), 4°C-on tárolva.
- 20. Anti-humán CD3e (OKT3 klón; katalógusszám: 14-0037-82; ThermoFischer, Waltham, MA, USA) monoklonális antitest, 4°C-on tárolva.
- Anti-humán CD28 (Katalógusszám: mAb342-100; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) monoklonális antitest 4°C-on tárolva.
- 22. Interleukin-7 (IL-7) liofilizátum (Katalógusszám: 130-095-367; Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Németország), steril desztillált vízben feloldva, –20°C-on tárolva.
- 23. Interleukin-15 (IL-15) liofilizátum (Katalógusszám: 130-095-760; Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Németország) steril desztillált vízben feloldva, –20°C-on tárolva.
- 24. RetroNectin (Katalógusszám: T100B; Takara Bio, Kusatsu, Japán), -20°C-on tárolva.
- 25. Dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide, DMSO), szobahőn tárolva.

#### V.1.3. Immunfluoreszcenciás jelölés, mikroszkópia

- 26. Alexa Fluor 488 szukcinimidil észter (Katalógusszám: A20000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) –20°C-on tárolva.
- 27. Alexa Fluor 647 szukcinimidil észter (Katalógusszám: A20006; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) –20°C-on tárolva.
- A647 monomer HER2: humán HER2 rekombináns teljes fehérje (Katalógusszám: 10004-HCCH; Sino Biological, Eschborn, Németország) : Alexa Fluor 647-el konjugálva, 4°C-on tárolva.
- 29. A488 anti-IgG: Alexa Fluor 488 konjugált anti-humán IgG (Katalógusszám: A-11013; Invitrogen /Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) 4°C-on tárolva.
- 30. FITC anti-CD4: Fluoreszcein-izotiocianát konjugált anti-humán CD4 (Katalógusszám: 561842; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) monoklonális antitest 4°C-on tárolva.
- 31. A647 anti-CD8: anti-humán CD8 (YTC 182.20 klón [102]) monoklonális antitest, hibridóma preparátum Alexa Fluor 647-el konjugálva, 4°C-on tárolva.
- FITC anti-CD197: Fluoreszcein-izotiocianát konjugált anti-humán CD197 (CCR7; 150503-as klón; katalógusszám: 561271; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) monoklonális antitest 4°C-on tárolva.
- APC anti-CD45RA: Allofikocianin konjugált anti-humán CD45RA (HI100-es klón; katalógusszám: 550875; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) monoklonális antitest 4°C-on tárolva.
- A647 anti-TCR: Alexa Fluor 647 konjugált anti-humán TCRα/β monoklonális antitest (Katalógusszám: 306714; BioLegend, Amszterdam, Hollandia) 4°C-on tárolva.

- 35. A647 anti-IgG: Alexa Fluor 647 konjugált anti-humán IgG F(ab')2 (Katalógusszám: 2042-31; SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 4°C-on tárolva.
- A647 anti-TfR: Alexa Fluor 647 konjugált anti-humán transzferrin receptor (TfR) monoklonális antitest (Katalógusszám: MA5-18151; Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 4°C-on tárolva.
- 37. A488 anti-HER2: Anti-humán HER2 (ErbB2-76.5 klón) monoklonális antitest, hibridóma preparátum Alexa Fluor 488-al konjugálva, 4°C-on tárolva.
- A647 anti-pCD3ζ: Alexa Fluor 647 konjugált anti-humán pCD3ζ monoklonális antitest (Katalógusszám: sc-9975; Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) 4°C-on tárolva.
- 39. PE anti-pLck: fikoeritrin konjugált anti-humán pLck monoklonális antitest (Katalógusszám: 558552; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 4°C-on tárolva.
- 40. Paraformaldehid (Paraformaldehyde, PFA) por 4°C-on tárolva.
- 41. Mowiol 4-88 (Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Németország) 10 w/v% 0,1 M Tris-HCl-ben oldva (pH 8,5), 25 w/v% glicerinnel, -20°C-on tárolva.
- 42. DAPI (4',6-Diamidin-2'-fenilindol dihidroklorid) 1µg/ml törzsoldata metanolban.

#### V.1.4. SDS gélelektroforézis és Western-blot

- 43. Fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) -20°C-on tárolva.
- 44. Nátrium-ortovanadát (NaoV) 100 mM-os törzsoldatban -20°C-on tárolva.
- 45. cOmplete<sup>™</sup> Mini proteáz inhibitor koktél (Roche, Basel, Svájc) tablettaként 4°C-on tárolva, használat előtt 1,5 ml steril vízben feloldva.
- 46. Dithiothreitol (DTT) por 4°C-on tárolva.
- 47. Lízis puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5 mM EDTA desztillált vízben oldva, 4°C-on tárolva.
- 48. Lízis oldat: 2 mM PMSF, 1 mM NaoV, cOmplete<sup>™</sup> Mini proteáz inhibitor koktél a gyártó előírása szerint.
- 49. Natív mintapuffer (5x): 300 mM Tris, 12 w/v% SDS, 50 v/v% glicerol, 0,05 w/v% brómfenolkék, desztillált vízzel hígítva, -20°C-on tárolva.
- 50. Redukáló mintapuffer (6x): 300 mM Tris, 12 w/v% SDS, 30 v/v% glicerol, 0,02 w/v% brómfenolkék, 0,1 mM DTT desztillált vízzel hígítva, -20°C-on tárolva.
- 51. 30% Akrilamid (Acrilamide/bis-Acrilamide) 4°C-on tárolva.
- 52. Elektroforézis puffer (10x): 30 g Tris, 144 g glicin; 100 ml 10%-os SDS desztillált vízzel 1000 ml végső térfogatra hígítva (pH = 8,3), szobahőmérsékleten tárolva.
- 53. Zsírmentes tejpor (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) szobahőmérsékleten tárolva.
- 54. Anti-humán CD3ζ: Egér anti-humán CD3ζ elsődleges antitest (Katalógusszám: 556366; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 4°C-on tárolva.

- 55. Egér anti-IgG HRP: Torma peroxidáz (horseradish peroxidase, HRP) konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos antitest (Katalógusszám: A4416; Sigma-Aldrich/Merck) 4°C-on tárolva.
- 56. WesternBright ECL HRP szubsztrát (Advansta, San Jose, CA, USA) 4°C-on tárolva.

#### V.1.5. Gyártó által összeállított puffer és reagens készletek

- 57. IL-2 ELISA készlet (Katalógusszám: D2050; Human IL-2 Quantikine ELISA Kit; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 4°C-on tárolva.
- 58. IFNγ ELISA készlet (Katalógusszám: DIF50; Human IFN-gamma Quantikine ELISA Kit; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 4°C-on tárolva.
- 59. Proteome Profiler Human XL Cytokine Array kit (Katalógusszám: ARY022B; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 4°C-on tárolva.
- 60. Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array kit (Katalógusszám: ARY003B; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 4°C-on tárolva.

#### V.1.6. In vivo xenograft kísérletek

- 61. Matrigel (Katalógusszám: 356234; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), -20°C-on tárolva.
- 62. Izoflurán (Katalógusszám: 1001936040; Baxter, Deerfield, IL, United States), szobahőmérsékleten tárolva.

## V.2. A kísérletekhez használt sejtvonalak

A humán T sejtek ex vivo génmódosítása során alkalmazott HER2 specifikus CAR-okat kódoló retrovirális vektorok előállítására a HEK293T (ATCC, Manassas, VA, USA) vírus csomagoló sejtvonalat használtuk.

A CAR T sejtek *in vitro* tumorellenes aktivitását három különböző HER2<sup>+</sup> sejtvonalon vizsgáltuk. Ezek az eredendően ösztrogén, progeszteron és HER2 receptorokat nem expresszáló (tripla-negatív) MDA-MB-468 (MDA; ATCC, Manassas, VA, USA) sejtvonalból retrovirális transzdukcióval előállított, a HER2-t így transzgén formájában stabilan kifejező MDA-HER2 [103], az N87 humán gyomor karcinóma (ATCC, Manassas, VA, USA) és a JIMT-1 [25] sejtvonalak voltak. Utóbbi sejtvonalat egy 62 éves, trastuzumab rezisztens emlőrákos beteg mellhártya-metasztázisából izolálták a finnországi Tampere Egyetem Orvosi Technológiai rezisztencia Intézetében [25]. Kiváló modell, hiszen sejtvonalból előállított а xenotranszplantátumok a tumorprogresszió során hialuronán/MUC4 polimer komplexekből álló extracelluláris mátrixot építenek fel, amely sztérikus gátat szab a terápiás antitestek kötődésének [27]. Kísérleteinkben kontrollként a tripla-negatív MDA-MB-468 sejtvonalat alkalmaztuk (MDA).

A HEK293T, MDA, MDA-HER2, valamint N87 sejtvonalakat 2 mmol/l GlutaMAX-al, 10% magzati borjúszérummal (foetal bovine serum, FBS) és antibiotikumokkal kiegészített Dulbecco Modified Eagle médiumban (DMEM), a JIMT-1 sejtvonalat 1:1 arányban kevert Ham-féle F12 és DMEM médiumban tenyésztettük 20% FBS, 300 U/l inzulin, 2 mmol/l GlutaMAX és antibiotikumok hozzáadásával.

A CAR T sejtek *in vitro* citolitikus aktivitását zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein, GFP) és luciferáz expresszáló MDA.ffLuc, MDA-HER2.ffLuc, N87.ffLuc és JIMT-1.ffLuc sejtvonalak segítségével teszteltük, melyeket a natív sejtvonalakkal azonos körülmények között tenyésztettünk. A CAR T sejtek *in vivo* tumorellenes hatékonyságát a JIMT-1, illetve JIMT-1.ffLuc sejtvonalakból előállított tumor xenograft alkalmazásával vizsgáltuk. Minden sejtvonalat 5% szén-dioxidot tartalmazó párásított atmoszférában tenyésztettünk 37°C-on.<sup>1</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> A sejtvonalak rutinszerű tenyésztését Vágóné Toldi Hajnalka és Szilágyi Anikó végezték.

#### V.3. CAR T sejtek előállítása

Az primer humán sejtekkel végzett munkát a Regionális Kutatásetikai és Intézményi Bizottság hagyta jóvá (RKEB.5378/2019).

#### V.3.1. PBMC izolálás

A CAR T sejtek előállítására használt PBMC izolátumot egészséges donorok perifériás teljes véréből nyertük ki 1200 rpm-en, 10 percig, szobahőmérsékleten történő gradiens centrifugálással, melyre a limfociták szedimentációs alapú elválasztására alkalmas Histopaque-1077 oldatot használtuk. A T sejt izolátumokat folyékony nitrogénben tároltuk, 10% dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide, DMSO), 10% RPMI-1640, és 80% FBS tartalmú krioprezerváló oldatban,  $5 \times 10^6$  sejt/ml koncentrációjú alikvotokban.

#### V.3.2. Az alkalmazott CAR konstrukciók felépítése

Kutatómunkánk során összesen öt különböző HER2 specifikus CAR konstrukciót alkalmaztunk (12. ábra). Az eltérő kostimulációs doménnel rendelkező CAR-ok korai aktivációjának összefüggését a receptorok membránfelszíni szerveződésével és diffúziós dinamikájával az első, második és harmadik generációba tartozó CAR T sejtek felhasználásával vizsgáltuk.



12. ábra Az alkalmazott CAR konstrukciók sematikus felépítése

Az első generációs CAR molekuláris szerkezetét a HER2 specifikus FRP5 eredetű scFv, az IgG1 "short hinge" (SH), a humán CD28 eredetű transzmembrán régió (TM), valamint a humán TCR-ből származó CD3z effektor domén alkotta (HER2.z CAR). A második generációs CAR-ok intracelluláris régiójába ezen kívül a CD28 vagy a 41BB (HER2.CD28.z, HER2.41BB.z CAR) kostimulációs domén került beépítésre. A harmadik generációs CAR mind a CD28 mind a 41BB (HER2.CD28.41BB.z CAR) kostimulációs domént tartalmazta.

A CAR T sejtkészítmények fenotípus profiljának összefüggését a tumorellenes aktivitás hatékonyságával a második generációs HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR-ok bevonásával vizsgáltuk. A T sejt receptorok és a kiméra antigén receptorok kolokalizációjának vizsgálata során alkalmazott első generációs kiméra antigén receptor a 4D5 scFv, IgG1 Fc "spacer", CD28 TM és CD3z effektor doménekből, valamint egy ehhez kapcsolódó GFP fluoreszcens jelölőmolekulából épült fel (HER2.z.GFP CAR). A különböző kutatásokban alkalmazott HER2 specifikus CAR-ok egyláncú variábilis doménjeinek eltérő (FRP5, illetve 4D5) kódjai az eltérő HER2 specifikus monoklonális antitestből származó eredetre utalnak. Míg az FRP5 a HER2 11-169-es aminosavszakasza között található diszkontinuus epitópot ismeri fel, addig a trastuzumab antitest variábilis régióját tartalmazó 4D5 a HER2 juxta-membrán régiójához kötődik. Klinikai kísérletek eredményei szerint az FRP5-alapú CAR-ok biztonságosabbak lehetnek a 4D5 scFv-vel rendelkező konstrukcióknál, mivel kevésbé aktiválódnak a normál hámszövetekben mérsékelt szinten expresszálódó HER2 hatására [104].

A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z, valamint HER2.CD28.41BB.z CAR konstrukciókat Dr. Stephen Gottschalk (Department of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA), a HER2.z.GFP CAR-t Dr. Hinrich Abken (Leibniz Institute for Immunotherapy, Division of Genetic Immunotherapy, University Regensburg, Regensburg, Németország) bocsátotta rendelkezésünkre.

#### V.3.3. CAR kódoló retrovirális pszeudovírusok előállítása

A T sejtek *ex vivo* transzdukciója során használt retrovirális partikulákat HEK293T csomagolósejtek alkalmazásával állítottuk elő. Ennek során az adott CAR konstrukciót hordozó pSFG retrovirális vektort [103,105], a virionok strukturális fehérjéit és a virális replikációhoz szükséges enzimkészletet kódoló gag-pol szekvenciát tartalmazó MoMLV Peg-Pam-e plazmidot, valamint a vírusfertőzést lehetővé tévő RD114 burokfehérjét kódoló pMax.RD114 plazmidot tartalmazó mixet JetPRIME transzfekciós reagens segítségével juttattuk be a HEK293T sejtekbe, a gyártó utasításait követve. Három napig tartó inkubációt követően a HEK293T sejtek által termelt retrovírust tartalmazó felülúszót 0,22 μm pórusátmérőjű steril fecskendőszűrővel tisztítottuk, és felhasználásukig –40°C-on tároltuk. A vírusfelülúszókat legfeljebb két fagyasztási-olvasztási ciklusnak tettük ki.

#### V.3.4. T sejt stimulációs és tenyésztési protokollok, CAR transzdukció

A kutatócsoportunk által hagyományosan alkalmazott stimulációs és kulturálási protokoll [27] 1. napján  $2 \times 10^6$  T sejt osztódását indukáltuk 1 µg/ml OKT3 és 1 µg/ml anti-CD28 antitesttel fedett 24 kamrás sejttenyésztő edényben egy éjszakán keresztül tartó inkubálással, 2 mmol/l GlutaMAX-al, 10% FBS-el és antibiotikumokkal kiegészített RPMI-1640 médiumban (komplett RPMI) 2 ml össztérfogatban. A 2. napon a T sejtek további expanzióját 10 ng/ml humán interleukin-7 (IL-7) és 5 ng/ml humán interleukin-15 (IL-15) hozzáadásával váltottuk ki. A 3. napon került sor a T sejtek transzdukciójára, melynek első lépéseként 20 µg/ml RetroNectinnel bevont, felületkezelés nélküli 24 kamrás tenyésztőedényre spinokuláltuk a CAR konstrukciót hordozó retrovirális vektorokat 4000 rpm-en, 2 órán keresztül történő centrifugálással. Ezt követően 5×10<sup>5</sup> T sejtet transzdukáltuk három napon keresztül a retrovírussal bevont tenyésztőedényben, 10 ng/ml IL-7 és 5 ng/ml IL-15 jelenlétében, 2 ml komplett RPMI médiumban. Az így előállított CAR T sejteket 2 ml friss 10 ng/ml IL-7 és 5 ng/ml IL-15 tartalmú komplett RPMI médiumban 24 kamrás, sejttenyésztésre alkalmas bevonattal ellátott tenyésztőedénybe helyeztük át. A CAR T sejteket a felhasználásukig 10 ng/ml IL-7 és 5 ng/ml IL-15 jelenlétében, 2 ml komplett RPMI médiumban tenyésztettük (OKT3-antiCD28/RPMI protokoll, 13. ábra).<sup>2</sup>



13. ábra Különböző CAR T sejt előállítási protokollok sémája

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> A kísérleti munka során összesen 21 alkalommal állítottunk elő CAR T sejtkészítményeket az OKT3antiCD28/RPMI protokoll segítségével. Ezek közül 2 készítményt Dr. Szöőr Árpád, 3-at Tóth Csaba Tamás, 1-et Szilágyi Ádám állított elő.

A hagyományos protokoll sejttermékeinek fenotípus profiljától eltérő CAR T sejtkészítmények előállításának céljából a RetroNectin stimuláció és a LymphoONE médium T sejt differenciációra gyakorolt hatását külön-külön és együttesen alkalmazva is teszteltük (13. ábra). Az OKT3-antiCD28/LymphoONE protokoll esetén 1 µg/ml OKT3 és 1 µg/ml anti-CD28 stimulációt végeztünk 2 mmol/l GlutaMAX-al, 10% FBS-el és antibiotikumokkal kiegészített LymphoONE médiumban (komplett LymphoONE), az OKT3-RetroNectin/RPMI protokoll alkalmazása során 1 µg/ml OKT3 antitest és 20 µg/ml RetroNectin reagens segítségével indukáltuk а Т sejtek osztódását komplett RPMI médiumban, az *OKT3-*RetroNectin/LymphoONE protokoll esetén 1 µg/ml OKT3 antitesttel és 20 µg/ml RetroNectinnel való stimulációt végeztünk komplett LymphoONE médiumban (13. ábra).

A T sejt transzdukció minden további körülménye megegyezett az *OKT3antiCD28/RPMI* protokoll esetén leírtakkal. A CAR T sejtek további expanziója, valamint kísérleti felhasználása során az adott protokollnak megfelelő tenyésztőközeget alkalmaztuk.<sup>3</sup>

## V.4. Antitest preparáció, konjugálás fluoreszcens festékkel

Az anti-humán HER2 (ErbB2-76.5 klón) illetve az anti-humán CD8 monoklonális antitestet (YTC 182.20 klón) hibridóma felülúszóból állítottuk elő, és affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az anti-humán HER2-t termelő hibridóma sejtvonalat Yosef Yarden (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Izrael) bocsátotta rendelkezésünkre.

Az anti-HER2 monoklonális antitestet az aminreaktív Alexa Fluor 488 (A488) szukcinimidil észter, az anti-CD8 monoklonális antitestet, illetve a humán HER2 monomer rekombináns fehérjét Alexa Fluor 647 (A647) szukcinimidil észter festékekkel konjugáltuk a gyártó utasításai szerint. Az antitest preparátumok koncentrációját, illetve az egy antitesthez vagy monomer HER2 rekombináns fehérjéhez kapcsolódó fluorofórok átlagos számát (fluorochrome molecules conjugated per primary antibody; f/p) abszorbancia alapú mérési módszerrel, NanoDrop ND 1000-es készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg.<sup>4</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> A kísérleti munka során összesen 11 alkalommal állítottunk elő CAR T sejtkészítményeket az OKT3-RetroNectin/LymphoONE protokoll segítségével. Ezek közül 2 készítményt Dr. Szöőr Árpád, 3-at Tóth Csaba Tamás, 1-et Szilágyi Ádám állított elő.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> A hibridóma sejtvonalakkal termeltetett antitestek izolálását, tisztítását, az antitestek illetve a rekombináns HER2 fehérje fluorofórokkal való konjugálását, valamint az előállított konjugátumok koncentrációjának és f/p arányának meghatározását Vágóné Toldi Hajnalka végezte.

#### V.5. Immunfluoreszcenciás jelölések, áramlási citometria

A HER2 specifikus CAR-ok expresszióját HER2-Fc fúziós proteinnel és A488 konjugált anti-humán IgG-vel való indirekt jelöléssel igazoltuk. A különböző stimulációs és sejttenyésztési protokollok segítségével előállított CAR T sejtek fenotípus profiljának meghatározása során a helper és citotoxikus limfociták arányát a CD4 és CD8 expresszió alapján határoztuk meg, fluoreszcein-izotiocianát (fluorescein isothiocyanate, FITC) konjugált anti-humán CD4 illetve A647 konjugált anti-humán CD8 kettős jelölés segítségével. A CD4<sup>+</sup> populáció a CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup> kvadráns, a CD8<sup>+</sup> populáció pedig a CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> kvadráns adatait tartalmazza, a CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> dupla pozitív, illetve CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> dupla negatív kvadránsbeli sejteket kizártuk az elemzésből.



**14. ábra** Kapuzási stratégia a különböző stimulációs és sejttenyésztési protokollok segítségével előállított CAR T sejtkészítmények fenotípus profiljának meghatározására

A: CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> populációk elkülönítésére szolgáló kapuk beállítása jelöletlen kontroll, valamint FITC anti-CD4 és A647 anti-CD8 egyszeres jelölés segítségével.

**B:** Naiv, centrális memória, effektor memória, terminális effektor populációk elkülönítésére szolgáló kapuk beállítása jelöletlen kontroll, valamint FITC anti-CD197 (CCR7) és APC anti-CD45RA egyszeres jelölés segítségével.

A memória fenotípusok eloszlásának vizsgálata során a CCR7 és a CD45RA receptorok expresszióját FITC konjugált anti-humán CD197 (CCR7) és allofikocianin (allophycocyanin, APC) konjugált anti-humán CD45RA monoklonális antitestekkel való kettős direkt jelöléssel határoztuk meg. A naiv sejteket CCR7 és CD45RA dupla pozitív; a centrális memória (central

memory, CM) CCR7 pozitív, CD45RA negatív; az effektor memória (effector memory, EM) CCR7 és CD45RA dupla negatív; a terminális effektor (terminal effector, TE) T sejteket CCR7 negatív, CD45RA pozitív populációként azonosítottuk.

A populációk elválasztására szolgáló kapukat az egyszeres jelölés alapján állítottuk be (14. ábra). Az áramlási citometriás analízis során az antitestekkel, illetve a HER2-Fc rekombináns fehérjével való jelölést 10  $\mu$ g/ml végső koncentrációban, 10 percig, jégen végeztük. A mérések során minden esetben minimum 10<sup>4</sup> sejtet vizsgáltunk, NovoCyte áramlási citométer és a NovoExpress szoftver (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) segítségével.<sup>5</sup>

#### V.6. Mikroszkópos módszerek

A mikroszkópos méréseket AiryScan/AiryScan Fast képalkotó egységgel felszerelt LSM 880 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) végeztük. Kísérleteink során vízimmerziós objektívet (C-Apochromat, 1,2 NA; 40×) alkalmaztunk. Az immunfluoreszcensen jelölt sejtek felvételeinek készítésekor a diamino-fenilindol (4',6diamidino-2-phenylindole, DAPI) festéket 405 nm hullámhosszúságú lézerdiódával; az A488 és a GFP fluorokrómokat, illetve a fikoeritrin (phycoerythrin, PE) festéket argon ion lézer 488 nm-es illetve 543 nm-es vonalával, az A647 festéket 633 nm hullámhosszúságú HeNe lézerrel gerjesztettük.

#### V.6.1. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

A konfokális lézer pásztázó üzemmódbeli felvétel során a fluoreszcens festékek emisszióját 32 elemű gallium-arzenid-foszfid (Gallium arsenide phosphide, GaAsP) fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk, melyek tartományait az alkalmazott festékek (DAPI, A488, PE és A647) emissziós maximumaihoz állítottuk be. A detektálási hullámhosszak átfedéséből fakadó "crosstalk" effektust váltott csatornás felvételi mód ("frame switch") alkalmazásával küszöböltük ki, minden specifikus gerjesztő lézer hullámhossz esetén csak a gerjeszteni kívánt festék emisszióját mértük. A felvételeket egyirányú vonalmenti pásztázással ("unidirectional line scan") készítettük. Az aktuális nagyítási faktornál elérhető legjobb felbontást a felvételek készítése során alkalmazott ZEN Black 2.3 szoftverbe beépített Nyquist optimalizációs algoritmus segítségével állítottuk be.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> A CAR T sejtek áramlási citometriás fenotipizálását összesen 14 független kísérletben végeztük el. Ezek közül 1 mérés Dr. Szöőr Árpád, 2 Tóth Csaba Tamás, 1 Szilágyi Ádám munkája.

## V.6.2. Az Airyscan/Airyscan Fast mikroszkópia elméleti alapjai és kísérleti alkalmazása

A Zeiss által kifejlesztett Airyscan mikroszkópiai technológia olyan speciális képalkotó eljárást és digitális képfeldolgozási technikát foglal magába, amely összességében kétszereses faktorral javítja az Abbe limit által megszabott maximális felbontóképességet, s így szuperrezolúciós módszernek minősül [106]. Az Airyscan mikroszkópiai technológia magasabb felbontást és kedvezőbb jel-zaj arányt biztosít a hagyományos konfokális mikroszkópiához képest [106]. A konvencionális konfokális mikroszkóp esetén alkalmazott kicsiny apertúra ("pinhole") kirekeszti a fókuszsík alatti és feletti síkokból érkező fotonok nagy részét (15. ábra A), ami jelentős mértékben javítja az axiális feloldást a széles látóterű ("widefield") fluoreszcens képalkotáshoz viszonyítva. A detektált térfogatelem hosszát a z tengelyen az apertúra mérete szabja meg, melyet az apertúra minta síkjában vett kör alakú vetületének sugara és a Rayleigh kritérium szerint feloldható legkisebb távolság arányát kifejező Airy egységben (Airy unit, AU) szokás megadni. 1 AU apertúraméret az általánosan alkalmazott beállítás amennyiben a detektálható fluoreszcens jel kellően nagy, a gyenge intenzitású minták esetén jelentkező kedvezőtlen a jel-zaj arány azonban csak kompromisszumok árán javítható. Az apertúra méretének növelése az axiális felbontás csökkenésével jár, míg a gerjesztő lézer erősségének növelése a fluorofór fotoelhalványítás általi kiégetéséhez vezethet [107].

Az Airyscan képalkotási elve úgy küszöböli ki ezt a problémát, hogy nem az apertúrán áthaladó integrált intenzitást méri, hanem a megvilágított térfogatból származó teljes, apertúrával nem limitált diffrakciós képet megfelelő optikával felnagyítva egy 32 elemű GaAsP fotoelektron-sokszorozó mátrixra vetíti (15. ábra A). Mind a 32 hexagonális detektor elem egy 0,2 AU méretű apertúrának tekinthető, melyek együttesen 1,25 AU virtuális apertúrát tesznek ki (15. ábra B, bal oldali kép). Míg a konfokális mikroszkópia kirekeszti a diffrakciós minta szélső részeit a képalkotásból, és ezáltal növeli a feloldást, az Airyscan esetén minden detektor elem – eltérő szögek alatt – egyidejűleg méri a teljes diffrakciós mintázat rá eső részét. A középső, optikai tengelyre eső detektor az Airy korong középső (nulladrendű) maximumának közepét érzékeli, a szomszédjai a közepétől különböző irányokban eltolt szegmensét, míg a legszélső részben már az elsőrendű minimumot mintavételezik. Ha az egyes detektor elemek jelét a pozíciójuk figyelembevételével összegezzük, a nulladrendű maximum 1/e<sup>2</sup> szélessége csökken és így a felbontás javul. Az Airyscan Fast üzemmódja esetén a fényforrás nem egyetlen pontot világít meg, hanem az y tengely mentén egyszerre négyet. Ebben az üzemmódban 16 darab 0,3 AU méretű detektor elem vesz részt a képalkotásban, melyek összesítve az x

tengelyen 0,9 AU, az y tengelyen 1,6 AU nagyságú virtuális apertúrának felelnek meg (15. ábra B, jobb oldali kép). Ennek a megközelítésnek köszönhetően négyszer gyorsabb felvételi sebesség érhető el a hagyományos Airyscan módhoz viszonyítva a felbontás és a jel-zaj arány minimális csökkenése mellett.



15. ábra: Konfokális lézer pásztázó, Airyscan és AiryScan Fast mikroszkópia összehasonlítása

A: Konfokális és Airyscan detektálás sémája [108].

B: Az Airyscan és Airyscan Fast detektormátrixok elrendezésének sémája [106].

**C:** Konfokális felvételi mód (1 AU; bal szélső kép), Airyscan felvétel a 32 csatorna jelintenzitásainak "pixel reassignment" segítségével való helyes pozícióhoz rendelését és összesítését (középső kép) valamint a dekonvolúciót követően (jobb szélső kép). A felvételek A647 konjugált anti-humán TCR $\alpha/\beta$  teljes antitesttel (piros) jelölt HER2.z.GFP (zöld) CAR T sejtekről készültek. A skála mérete 2 µm.

Az Airyscan detektormátrix 1,25 AU-nak megfelelő apertúraméretének köszönhetően megközelítőleg 56%-kal növeli a fotonbegyűjtés hatásfokát az 1 AU nagyságú apertúra beállítást alkalmazó konfokális mikroszkópiás felvételi módhoz (15. ábra C, bal szélső kép) viszonyítva. Amennyiben az AiryScan-nel azonos feloldást eredményező 0,2 AU méretű konfokális apertúrát tekintünk referenciának, az AiryScan 1,25<sup>2</sup>/0,2<sup>2</sup> = 39-szer több fényt enged át, így ~6-os faktorral javítja a jel-zaj arányt a konfokális mikroszkópiához képest. Ugyanezen elv mentén az Airyscan Fast üzemmódjában a jel-zaj arány ~4-es faktorral javul.

A kísérleti munka során minden felvétel az adott körülményeknek leginkább megfelelő üzemmódban készült. Az Airyscan detektálási módok használatával együtt jár, hogy a megfelelő mintavételezéshez minimum 1,7-es nagyítási faktor alkalmazása szükséges, ami 40× objektív mellett 75×75 µm-es képméretnek felel meg. Ezért amennyiben a kvantitatív képelemzés nagyobb látótér használatát indokolta és megfelelő detektálható fluoreszcencia intenzitás állt rendelkezésre, a konfokális üzemmódot alkalmaztuk. Az Airyscan képalkotás szuper-rezolúciós felbontását egyedi sejtek szubmikronos doménjeinek vizsgálatára használtuk 2D felvételek esetén, míg az élő sejtekről optikai szeleteléssel készült 3D képeket Fast üzemmódban vettük fel.

A CAR T sejtek vizsgálata során a GFP emisszió detektálására 495-560 nm-es sávszűrőt, az A647 emisszió detektálására 660 nm-es felüláteresztő szűrőt alkalmaztunk; melynek a detektor által megszabott felső korlátja 735 nm. Az Airyscan és Airyscan Fast felvételeket a ZEN Blue 2.3 szoftverrel dolgoztuk fel. Ennek első lépése a "pixel reassignment": mivel az AiryScan képalkotás során a pont-kiterjedési függvény (point spread function, PSF) eltolódása az egyes detektor elemeken ismert, a detektált jel pixelenként visszarendelhető abba a pozícióba, ahová valójában tartozik (15. ábra C, középső kép). Az immár helyes pozícióhoz rendelt jelek összegzésével (ún. Sheppard féle összeg) a konfokálishoz képest 1,4-szer nagyobb felbontású kép nyerhető. Az Airyscan felvétel digitális feldolgozásának következő lépése a Wiener-filterrel regularizált lineáris inverzión alapuló dekonvolúció, mely az objektumok rekonstruálása során mind a 32 - illetve AiryScan Fast esetén 16 - detektorelem jelét önállóan és súlyozva dekonvolválja. Ennek köszönhetően az AiryScan felvétel esetén összességében 2szeres (15. ábra C, jobb szélső kép); AiryScan Fast felvétel esetén 1,5-szeres faktorral javul a felbontás a konvencionális konfokális mikroszkópiához képest [106,107]. A 3D felvételek esetében alkalmazott speciális képfeldolgozási eljárás során a szoftver algoritmusa mindemellett a rendelkezésre álló axiális információkat is figyelembe veszi. A feldolgozott AiryScan és Airyscan Fast felvételeket Zeiss czi fájlformátumban tároltuk.

#### V.6.3. A CAR-ok alkotta immunológiai szinapszis analízise

A CAR T sejtek tumorsejtekhez való kötődése során felépülő immunológiai szinapszisok tanulmányozásának céljából 3×10<sup>4</sup> N87 tumor sejtet tapasztottunk nyolc kamrás, sejttenyésztésre alkalmas bevonattal ellátott lemezekre (Ibidi, Gräfelfing, Németország) egy éjszakán keresztül. 2×10<sup>5</sup> HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z, illetve HER2.CD28.41BB.z CAR T sejttel való, 15 percen keresztül tartó inkubációt követően a sejteket 1% PFA-ban fixáltuk 10 percig 37°C-on, majd A488 konjugált anti-HER2-vel (ErbB2-76.5) valamint A647 konjugált anti-humán p-CD3z-val vagy PE konjugált anti-humán p-Lck-val jelöltünk 0,05 v/v% Triton-X tartalmú PBS-ben 30 percen keresztül, jégen. A jelölés során minden esetben 10 µg/ml antitest koncentrációt alkalmaztunk. Ezután a sejteket először PBS-ben, majd 10 µg/ml DAPI tartalmú PBS-ben, végül ismét PBS-ben mostuk. A sejteket mowiolba ágyaztuk annak érdekében, hogy megakadályozzuk a fluorofórok fény-indukált irreverzibilis fotoelhalványodását. A felvételeket konfokális lézer pásztázó üzemmódban készítettük<sup>6</sup>, és az ImageJ/Fiji [109] szoftver segítségével analizáltuk.

#### V.6.4. CAR membránklaszterek jellemzése

A CAR-ok membránfelszíni szerveződését nyugvó CAR T sejtekben vizsgáltuk. A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és a HER2.CD28.41BB.z CAR T sejteket 37°C-on egy órán keresztül szérummentes RPMI-ben inkubáltuk, majd 4°C-os PBS-el mostuk. A sejteket 5 µg/ml A647 konjugált monomer HER2-vel jelöltük 10 percen keresztül jégen, 4°C-os PBS-el mostuk, majd 10 mM glükóz-PBS-ben szuszpendáltuk. Az A647-monomer HER2 jelölő molekulát úgy választottuk meg, hogy elkerüljük a CAR-ok keresztkötését. 10<sup>5</sup> CAR T sejtet helyeztünk nyolc kamrás lemezre (Ibidi, Gräfelfing, Németország), és 600 nm vastag optikai szeleteket vettünk fel a sejtek apikális membránfelszínéről AiryScan üzemmódban. A sejteket a mérés során 37°C-on inkubáltuk. A felvételeket az ImageJ/Fiji [109] szoftver segítségével értékeltük ki. Az átlagos képintenzitások kumulatív sűrűségfüggvénye lognormális eloszlást követett (lásd V.16-es fejezet), az elemzés során az ebből kiugró értékeket nem vettük figyelembe. A klasztereket "watershed" szegmentációval [110] különítettük el.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> A CAR-ok által felépített immunológiai szinapszisokat összesen 5 független kísérletben vizsgáltuk. Ezek közül 2-t Tóth Csaba Tamás végzett el.

A molekulaklaszterek elválasztása során alkalmazott küszöbértéket a teljes intenzitástartomány felső kvartilisának határán definiáltuk minden egyedi kép esetén. Digitális képanalízissel meghatároztuk a szubmikronos domének összesített terület- és receptorarányát, valamint az egyedi receptorklaszterek átlagos méretének, integrált intenzitásának, és 10  $\mu$ m<sup>2</sup> apikális membránfelszínre vetített mennyiségének eloszlását.

#### V.6.5. CAR-TCR kolokalizáció vizsgálata

A CAR és a TCR kolokalizációját az effektorsejtek és a tumorsejtek között felépülő immunológiai szinapszisban, az extraszinaptikus régióban, és a nyugvó sejtmembránban AiryScan Fast mikroszkópia, optikai szeletelés, és digitális képanalízis segítségével vizsgáltuk élő CAR T sejtekben. A kísérlet során az első generációs HER2.z.GFP CAR T sejteket A647 konjugált anti-humán TCRα/β (TCR-A647) teljes antitesttel jelöltük. Pozitív kontrollként a HER2.z.GFP CAR IgG1 Fc "hinge" doménjéhez kapcsolódó A647 konjugált anti-humán IgG F(ab')2 antitesttel (CAR-A647) való jelölést alkalmaztuk, negatív kontrollként az A647 konjugált anti-humán transzferrin receptor (transferrin receptor, TfR) monoklonális antitest (TfR-A647) jelölés szolgált. A jelölésre minden esetben 5 µg/ml antitest koncentrációt alkalmaztunk. Ezt követően 2×10<sup>5</sup> jelölt CAR T sejtet helyeztünk 3×10<sup>5</sup> N87 tumorsejttel fedett, sejttenyésztésre alkalmas bevonattal ellátott nyolc kamrás lemezre (ibidi, Gräfelfing, Németország) 10 mM glükóz-PBS-ben. A kamrát a felvételek ideje alatt 37°C-on inkubáltuk. A CAR T sejtekről Airyscan Fast üzemmódban 3D felvételeket készítettünk optikai szeleteléssel, 0,23 µm axiális lépésköz alkalmazásával. Minden analizált sejtről a transzmissziós detektorral konfokális képet is készítettünk a mintában való könnyebb tájékozódás érdekében (16. ábra A). Az illusztratív céllal készült 3D rekonstrukciós képeket (16. ábra E) ZEN Blue 2.3 szoftver segítségével állítottuk elő.

A CAR-GFP valamint a CAR-A647, TCR-A647, illetve a TfR-A647 eloszlását a szinaptikus régióban (16. ábra B), az extraszinaptikus membránban (16. ábra C), a kettő egyesítésével előállított teljes membránban (16. ábra D), valamint a nyugvó sejtek teljes sejtmembránjában a távoli vörös és a zöld csatornák intenzitásértékei alapján elemeztük 3D ROI (region of interest) tartományokban, melyeket az ImageJ/Fiji szoftver [109] 3DSuite pluginjával [111] állítottunk elő (16. ábra A-C). Ennek során 3D átlag szűrést végeztünk 3×3×3 pixel méretű voxel cellákon (0,30×0,30×0,68 μm), majd intenzitásalapon szegmentáltuk a felvételeket.



**16. ábra** CAR-TCR kolokalizáció vizsgálata N87 tumorsejttel kontaktusba lépő CAR T sejtek AiryScan Fast felvételeinek digitális képanalízisével

A: Konfokális lézer pásztázó üzemmódban, orientációs céllal készült felvételek.

**B**: Szinaptikus régió kijelölése a HER2.z.GFP CAR csatornában az Airyscan Fast felvételek digitális képanalízisének segítségével.

C: Extraszinaptikus régió szegmentálása aTCR-A647 (felső kép), a CAR-A647 (középső kép), és aTfR-A647 (alsó kép) csatornájában az Airyscan Fast felvételek digitális képanalízise során. Az elemzés alatt a szinaptikus területek kizárásra kerültek.

**D**: A szinaptikus és extraszinaptikus régiók egyesítésével előállított teljes membrán ROI-k. Azok a területek, amelyekről nem volt egyértelműen meghatározható a szinaptikus/extraszinaptikus lokalizáció, nem kerültek elemzésre.

E: Az Airyscan Fast üzemmódban készült optikai szeletek 3D rekonstrukciója ZEN Blue 2.3 szoftverrel.

F: Az ImageJ/Fiji 3DSuite pluginjának segítségével előállított 3D szinaptikus (zöld) és extraszinaptikus (piros) ROI-k.

A skála mérete 5 µm.

A szinaptikus régió 3D ROI-kat a CAR-GFP jel, az extraszinaptikus régió 3D ROI-kat a CAR-A647, a TCR-A647, illetve a TfR-A647 jel alapján állítottuk elő a szinaptikus terület kizárása mellett (16. ábra B-D, F). Minden szinaptikus és extraszinaptikus 3D ROI-t manuálisan ellenőriztünk a konfokális képek alapján behatárolt kontaktrégió segítségével, hogy kizárjuk azon területeket, amelyek nem érintkeztek a tumorsejt felszínével. A teljes sejtet lefedő 3D ROI-kat a szinaptikus és extraszinaptikus ROI-k egyesítésével állítottuk elő.

Az átlagos intenzitást a szinaptikus és extraszinaptikus régióban, valamint a teljes sejtmembrán területén határoztuk meg mind a távoli vörös, mind a zöld csatornában. A relatív intenzitásértékeket a szinaptikus és extraszinaptikus területek átlagintenzitásainak a teljes sejtmembrán átlagos intenzitásával való osztásával számítottuk ki.

A pixelenkénti korrelációt a CAR-GFP zöld csatornája és a CAR-A647, TCR-A647, vagy TfR-A647 vörös csatornája között mértük a szinaptikus kontaktrégió és az extraszinaptikus membránterületek 3D ROI objektumaiban, melyben csak azok a pixelek szerepeltek, amelyek legalább egy csatornában egy meghatározott intenzitáshatár felett voltak. Ezen intenzitáshatárt a sejteket tartalmazó és a sejtmentes területek intenzitáseloszlásainak metszete alapján határoztuk meg. A Pearson féle korrelációs együtthatót (Pearson correlation coefficient, PCC) külön mértük a 3D felvételek minden szeletén, a kutatócsoport saját fejlesztésű ImageJ/Fiji pluginjának alkalmazásával. Az egyedi sejtek optikai szeleteinek PCC értékeit a teljes sejtre átlagoltuk, majd az egyedi sejtek átlagértékeit ismét átlagoltuk. Minden esetben legalább 3 független mérést végeztünk.

#### V.7. Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) molekuláris folyamatok dinamikájának tanulmányozására szolgáló módszer. Alapja fluoreszcensen jelölt, oldott részecskék helyzetében és számszerű sűrűségében jelentkező sztochasztikus ingadozások mérése egy fókuszált lézernyaláb által gerjesztett térfogatelemben.

Az FCS módszert, mint a fluktuációs spektroszkópia egyik új ágát, a 70-es években kezdték alkalmazni. Kémiai reakciók egyensúlyának és kinetikájának vizsgálata mellett [112] felhasználását sejtalkotók molekuláris diffúziójának és szervezettségének jellemzésében is tesztelték [113,114]. Azonban komplex enzimreakciók [115] és biológiai rendszerek – különösképpen élő sejtek [116] – tanulmányozására csak a 90-es években vált alkalmassá a modern mikroszkópia olyan vívmányainak köszönhetően, mint a mérési térfogat femtoliteres nagyságrend alá csökkenése, valamint a nagy kvantumhatásfokú lavina fotodiódák és gyors korrelátor elektronikák elérhetővé válása.

Az élő sejteken történő FCS vizsgálatok között a sejtfelszíni receptorok mobilitási viszonyainak meghatározása különösen kiemelkedő jelentőségű, mivel a korábban csak az ún. fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) módszerrel mérhető, nagy-távolságú is kis időfelbontású laterális mobilitást kiegészíti a gyors lokális diffúzió és abszolút molekula-koncentráció kvantitatív elemezhetőségével [117].

A módszer a fókuszált lézernyaláb sejtmembrán általi metszetében jelentkező intenzitásfluktuáció detektálásán alapul. A vizsgált receptor lokális koncentrációjának és diffúziójának meghatározásához a mért fluktuáció matematikai átalakítása szükséges, mely során a fluoreszcencia ingadozás pillanatnyi eltérését az átlagos fluoreszcencia intenzitástól ugyanezen paraméter  $\tau$  időkülönbséggel adódó értékével korreláltatjuk az (1)-es egyenlet szerint. Az így kapott időbeli G( $\tau$ ) autokorrelációs függvény értéke  $\tau$  késleltetési időnél arányos annak valószínűségével, hogy az adott fluoreszcens részecske  $\tau$  időpillanatban is a fókusztérfogatban található, ha  $\tau = 0$  pillanatban ott tartózkodott.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \times \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2}$$
(1)

ahol  $\delta F(t)$  a fluoreszcencia ingadozás pillanatnyi értékének eltérése az átlagos fluoreszcencia intenzitástól,  $\tau(\tau \in t)$  a késleltetési idő,  $\langle F \rangle$  az átlagos fluoreszcencia intenzitás a megfigyelés teljes időtartama alatt.

A gyakorlatban az autokorrelációs görbék kiszámítása az úgynevezett multiple- $\tau$ algoritmussal történik, logaritmikusan ekvidisztáns késleltetési időpontok alkalmazásával [118]. A vizsgált molekula vagy fehérje tartózkodási ideje a mérési térfogatban a G( $\tau$ ) autokorrelációs görbe megfelelő próbafüggvénnyel való nemlineáris illesztése által becsülhető. Az illesztés során szükséges figyelembe venni a fluorofórok fotofizikai tulajdonságait az egyensúlyi triplet hányad és a triplet korrelációs idő paramétereinek bevezetésével. Ennek hiányában a foton kibocsájtással nem járó triplet átmenet egy további diffúziós komponensként jelenne meg az autokorrelációs görbe mikroszekundumos korrelációs tartományában. Egykomponensű, szabad 3D diffúziót végző részecskék triplet korrekciót tartalmazó modellfüggvénye a (2)-es egyenlettel írható le a (3)-as és (4)-es egyenletek behelyettesítésével.

$$G(\tau) = 1 + G_{triplet} G_{diff} (z_i)$$
<sup>(2)</sup>

$$G_{triplet}(\tau) = 1 + \frac{T_t e^{-\tau/\tau_t}}{1 - T_t}$$
 (3)

$$G_{diff\acute{u}zi\acute{0}}(\tau) = \frac{f}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right) \left(1 + \frac{1}{S^2 \tau_d}\right)^{0.5}}$$
(4)

ahol T<sub>t</sub> az egyensúlyi triplet hányad,  $\tau_t$  a triplet állapot korrelációs ideje, f a szabad 3D diffúziót végző részecske frakciója,  $\tau_d$  a részecskék fókusztérfogatban átlagosan eltöltött ideje (karakterisztikus diffúziós vagy tartózkodási idő), S a forgási ellipszoid alakú fókusztérfogat axiális és laterális sugarának a hányadosa (alakfaktor vagy strukturális paraméter). A forgási ellipszoid felületét azon pontok határozzák meg, ahol a detektálási hatékonyság a középponthoz képest e<sup>-2</sup>-ed részére csökken.

Megfelelő modellegyenlet alkalmazásával a módszer lehetőséget ad egyszerre több, eltérő diffúziós karakterisztikával rendelkező komponens paramétereinek vizsgálatára. Két komponensű rendszer esetén, ahol az első komponens szabad 3D diffúziót, a második komponens szabad 2D (pl. membrán-síkbeli) diffúziót végez, a próbafüggvény diffúziót leíró eleme az (5)-ös egyenletnek megfelelően alakul át.

$$G_{diff\acute{u}zi\acute{0}}(\tau) = \frac{f_1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{d,1}}\right) \left(1 + \frac{1}{S^2 \tau_{d,1}}\right)^{0,5}} + \frac{f_2}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{d,2}}\right)}$$
(5)

ahol  $f_1$  és  $f_2$  az 1. és 2. komponens relatív frakciója,  $\tau_{d,1}$  és  $\tau_{d,2}$  az 1. és 2. komponens karakterisztikus diffúziós ideje, S a strukturális paraméter.

Az autokorrelációs görbék illesztése a bemutatott próbafüggvényekkel tehát az egyensúlyi triplet hányad, a triplet állapot korrelációs ideje, egy vagy több komponens relatív frakciója, illetve tartózkodási ideje, valamint a strukturális paraméter meghatározására ad lehetőséget.

$$D = \frac{\omega_{xy}^2}{4\tau_d} \tag{6}$$

ahol D a diffúziós koefficiens,  $\omega_{xy}$  a detektálási térfogat laterális sugara.

Ezen kívül az ellipszoid alakú fókusztérfogat laterális sugarának és a  $\tau_d$  karakterisztikus diffúziós időnek ismeretében kiszámítható a részecske abszolút diffúziós koefficiense a (6)-os egyenlet szerint.

#### V.7.1. A konfokális detektálási térfogat paramétereinek kalibrációja

Az FCS paraméterbecslése során alkalmazott nemlineáris illesztési eljárás megbízhatóbb eredményt ad, amennyiben a szabad paraméterek száma alacsony. Ezért elsőként kalibrációs kísérleti rendszerben meghatároztuk az S alakfaktort, mely az ellipszoid alakú detektálási térfogat axiális és laterális sugarának a hányadosa. Mivel az S műszeres paraméter, adott fluoreszcens festékkel kalibrált értéke rögzíthető minden további mérés autokorrelációs görbéinek megfelelő próbafüggvénnyel való illesztése során, ahol a gerjesztő lézer hullámhossza azonos.

A kalibrációs mérésekben az A647 festéket alkalmaztuk. A 10 mM koncentrációjú A647 tesztoldat fluoreszcencia fluktuációját desztillált vízben, 25°C-on, 10 másodpercig követtük ZEISS LSM 880 konfokális mikroszkóp segítségével. A mérések során 40× vízimmerziós objektívet (NA = 1,2) alkalmaztunk. Az A647-et a HeNe lézer 633 nm-es vonalával gerjesztettük. A gerjesztő fény és emittált fluoreszcencia elválasztására az MBS 488/543/633 sugárosztót használtunk. Az emittált fotonokat GaAsP fotoelektron sokszorozóval detektáltuk. Az autokorrelációs görbéket 10 s-os időközökre vonatkoztatva számítottuk ki a ZEN Black 2.3 szoftver multiple- $\tau$  algoritmusának segítségével. A korrelátor által tárolt legkisebb  $\tau$  késleltetési időegység 0,2 µs; a maximális korrelációs idő 10 s volt. A kalibráció során 20 ismételt mérést végeztünk négy független kísérletben. Az ismételt mérések autokorrelációs görbéinek együttesére egy komponens szabad 3D diffúzióját és triplet korrekciót tartalmazó modellt illesztettük, melyet a (2)-es egyenlet ír le a (3)-as és (4)-es egyenletek behelyettesítésével. Az illesztés eredményeként kapott S értékeket a független mérések között átlagoltuk, és minden további kísérletben konstans paraméterként vettük figyelembe.

Ugyanezen kísérletben meghatároztuk a detektálási térfogat laterális sugarát is, melyet arra használtunk fel, hogy az elkövetkezendő mérések során kapott karakterisztikus diffúziós időket átszámítsuk diffúziós együtthatóvá a (6)-os egyenlet szerint. A szabad A647 festék karakterisztikus diffúziós idejét az S paraméterrel azonos módon határoztuk meg.

$$\omega_{xy} = \sqrt{4\tau_{A647} D_{A647}} \tag{7}$$

A detektálási térfogat laterális sugarát ( $\omega_{xy}$ ) az A647 festék becsült karakterisztikus diffúziós ideje ( $\tau_{A647}$ ) és az azonos körülmények között meghatározott, ismert D<sub>A647</sub> diffúziós együttható [119] ismeretében a (7)-es egyenlet segítségével számítottuk ki.

#### V.7.2. CAR-ok diffúziós karakterisztikájának meghatározása

A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és HER2.CD28.41BB.z CAR-ok diffúziós viszonyait közvetlenül az apikális membránfelszín szuperrezolúciós Airyscan felvételeinek elkészítését követően (lásd V.6.4-es fejezet) fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával vizsgáltuk. Az A647 konjugált monomer HER2-vel jelölt CAR T sejteket a kísérlet ideje alatt 10 mM glükóz-PBS-ben, 37°-on inkubáltuk. A mérésekhez 40× vízimmerziós (NA = 1,2) objektívet használtunk. Az A647 festéket a kalibrációs kísérletekkel megegyezően a HeNe lézer 633 nm vonalával gerjesztettük. A konfokális képeken sejtenként egy mérési pontot jelöltünk ki a CAR T sejtek apikális membránfelszínén, melyet a legmagasabb jelintenzitású z pozícióra fókuszáltunk, feltételezve, hogy a forgási ellipszoid alakú mérési térfogat fókuszsíkja itt metszi a legnagyobb membránfelületet. A mérések hossza sejtenként összesen 100 s volt, az autokorrelációs görbéket 10 másodperces részintervallumokra bontva számoltuk ki. Minden vizsgált CAR konstrukció esetén legalább 3 független mérést végeztünk.<sup>7</sup> A kísérlet sémáját a 17. ábra mutatja be.

A CAR T sejtek apikális membránfelszínének mintegy harmadát lefedő, elszórtan elhelyezkedő immobilis CAR aggregátumok jelenléte a mérés kezdeti szakaszában gyors ütemű fotoelhalványulás formájában jelentkezett. Az adatok feldolgozása során ezért a teljes mérési időintervallumból csak azokat a 10 s-os szakaszokat vettük figyelembe, amelyekben az átlagos fluoreszcencia intenzitás a megfigyelés teljes időtartama alatt stabilnak bizonyult, minimalizálva a fotoelhalványulásból származó műtermékeket.

Az autokorrelációs görbék egy komponens térbeli és egy komponens síkbeli szabad diffúzióját leíró modellfüggvénnyel bizonyultak a legjobban illeszthetőnek, melyet a (2)-es egyenlet ír le a (3)-as és (5)-ös egyenletek behelyettesítésével. A 3D diffúziót mutató komponenst a jelölés során alkalmazott, disszociált monomer A647-HER2-ként, a 2D membrándiffúziós karakterisztikájú komponenst a mobilis CAR frakcióként azonosítottuk.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> A CAR-ok membránbeli mobilitását összesen 5 független kísérletben vizsgáltuk FCS módszerrel. Ezek közül 1 alkalommal a mérést Tóth Csaba Tamás végezte.



17. ábra CAR mobilitás FCS-el való meghatározásának sémája

Annak érdekében, hogy tovább csökkentsük az ismeretlen paraméterek számát a próbafüggvény illesztése során, a szabad A647-HER2 karakterisztikus diffúziós idejét külön kalibrációs kísérletben határoztuk meg. Ennek során 0,5 nM koncentrációjú A647-HER2 oldat diffúzióját 37°C-on, 10 mM glükóz-PBS-ben, az "éles" kísérletekkel azonos körülmények között mértük négy független kísérlet 20×10 másodperces szakaszaiban. Az autokorrelációs görbék együttesére egy komponens szabad 3D diffúzióját és triplet korrekciót tartalmazó modellt illesztettük ((2)-es egyenlet a (3)-as és (4)-es egyenletek behelyettesítésével) ahol az S szerkezeti paramétert az A647 tesztoldat segítségével kalibrált értéknek megfelelően rögzítettük.

A mobilis CAR molekulák diffúziós állandójának meghatározása során ezután mind a szabad monomer A647-HER2 karakterisztikus diffúziós idejét, mind az S alakfaktort rögzített paraméterként vettük figyelembe a modellillesztésben. A diffúziós időket a (6)-os egyenlet segítségével, az A647 festék tesztoldatának kalibrációs méréséből származtatott  $\omega_{xy}$  sugár felhasználásával alakítottuk át diffúziós koefficienssé.

#### V.8. CAR oligomerizáció meghatározása Western blot módszerrel

A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z, és HER2.CD28.41BB.z CAR-ok oligomerizációját Western blot segítségével vizsgáltuk. A CAR T sejteket 4°C-os PBS-el mostuk, majd lizáltuk 2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 1 mM nátrium-ortovanadát (NaOV), illetve a gyártó előírásai szerint előkészített proteáz inhibitor koktél tartalmú lízis pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5 mM EDTA). A dimer és oligomer CAR-okat natív körülmények között, a monomer receptorokat 0,1 mM ditiotreitol (DTT) tartalmú redukáló minta pufferben választottuk el 10%-os SDS-PAGE poliakrilamid gélen. A futtatás végeztével a fehérjesávokat félszáraz blottolóval polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra (Millipore, USA) vittük át. A membránt szobahőmérsékleten egy órán keresztül 0,1% Tween20-at és 5% zsírmentes tejport tartalmazó TBS pufferben blokkoltuk, majd 1 µg/ml egér anti-humán CD3ζ antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül 4°C-on, billegő keverés mellett. A membránt 0,1% Tween20 tartalmú TBS oldatban (TBS-Tween20) mostuk fél órán keresztül többszöri oldatcserét alkalmazva. Ezt követően a membránokat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten torma peroxidáz konjugált anti-egér IgG másodlagos antitesttel jelöltük, TBS-Tween20 oldattal mostuk egy órán keresztül, majd HRP szubsztrátot tartalmazó előhívó oldatban inkubáltuk 3 percig. A felvételeket a FluorChem Q képalkotó és analizáló rendszerrel (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) készítettük. A sávok intenzitását az ImageJ/Fiji szoftverrel [109] elemeztük.<sup>8</sup>

## V.9. CAR struktúra predikció

A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z, és HER2.CD28.41BB.z CAR-ok harmadlagos szerkezetének vizsgálatára a RoseTTAFold gépi mélytanuláson alapuló fehérjeszerkezet modellező algoritmust [120] alkalmaztuk. A HER2-specifikus, FRP5 eredetű scFv, az IgG1 SH és a CD28 transzmembránrégió, valamint az intracelluláris kostimulációs domének és a CD3z effektor domének szerkezetét egyedileg jósoltuk meg. Az algoritmus a fehérjeszerkezet modell megbízhatóságát 0-1 között értékeli, a DeepAccNet mélytanulási keretrendszerrel [121] végzett Local Distance Difference Test (LDDT) alapján, mely a modellben szereplő összes atom helyi távolságkülönbségének szuperpozíciómentes értékelése [122].

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> A CAR oligomerizációt összesen 2 független kísérletben vizsgáltuk. Ebből 1 kísérlet technikai végrehajtását és elemzését Dr. Szöőr Árpád végezte.



**18. ábra** A natív TCR CD3ζ domén és az intracelluláris CAR domének másodlagos szerkezete A TCR CD3ζ és CAR konstrukciók CD3z doménjeit az aminosavszekvenciák piros, a CD28 domént zöld, a 41BB domént kék színe jelöli.

Az intracelluláris CAR domének esetében a natív TCR CD3ζ doménjének krioelektronmikroszkópiával meghatározott struktúrájával [123] legnagyobb homológiát mutató (18. ábra), az scFv és az IgG1 SH-CD28 TM alegységek esetében a legmagasabb megbízhatósági pontszámmal rendelkező predikciós modelleket választottuk elemzésre. Az illusztrációs célú ábrák elkészítéséhez az iCn3D Structure Viewer [124] szoftvert használtuk.

# V.10. CAR T sejtek proliferációjának meghatározása "rechallenge" próbával

Az OKT3-antiCD28/RPMI és az OKT3-RetroNectin/LymphoONE protokollokkal (lásd V.3.4-es fejezet) előállított HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek proliferációs potenciálját ún. "rechallenge" próba segítségével vizsgáltuk. Ezen kísérleti rendszer leegyszerűsített in vitro körülmények között modellezi a CAR T sejteket érő folytonos antigénstimuláció hatását a tumorszövetben. A próba annak vizsgálatára alkalmas, hogy a CAR T sejtek mennyi időn keresztül, és milyen mértékben képesek expandálni a hosszú időn keresztül fenntartott stimuláló jel hatására. Emellett a sejtszám csökkenése alapján kimerülésük mértéke és sebessége is nyomon követhető. A kísérlet során  $2 \times 10^5$  CAR T sejtet helyeztünk 1 μg/ml HER2-Fc molekulával fedett 96 lyukú tenyésztőedénybe, 200 μl komplett RPMI vagy LymphoONE médiumban a kiindulási protokollnak megfelelően. A CAR T sejtek számát 3,5 naponta határoztuk meg áramlási citometriával. A proliferációs rátát az adott napon mért sejtszám kiindulási sejtszámmal való osztásával számoltuk ki. Ezt követően a kiindulási számmal azonos sejtet újra stimuláltunk friss 1 µg/ml HER2-Fc fedett tenyésztőedényben. Amennyiben a proliferációs ráta 1 alá esett, az összes rendelkezésre álló CAR T sejtet stimuláltuk újra.<sup>9</sup> A sorozatos stimuláció 0., 3,5. és 10,5. napján áramlási citometriával és immunfluoreszcens jelöléssel meghatároztuk a CAR T sejtkészítmények CD8/CD4 és memória

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> A "rechallenge" próbát összesen 5 független kísérletben végeztük el. Ebből 1 Tóth Csaba Tamás, 1 Szilágyi Ádám munkája.

fenotípus eloszlását a 0-es fejezetben ismertetett módon. Kontrollként nem transzdukált (nontransduced, NT) T sejteket alkalmaztunk. Minden esetben két párhuzamos mintát vizsgáltunk.

#### V.11. CAR T sejtek citokin szekréciójának meghatározása

Az OKT3-antiCD28/RPMI és az OKT3-RetroNectin/LymphoONE protokollok segítségével előállított HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek antigén specifikus aktivációját az IL-2 és IFNy citokinek valamint a szolubilis T sejt immunglobulin és mucin domén-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3, TIM-3) kimerülési marker kibocsájtásával jellemeztük. Ennek során  $2 \times 10^5$  CAR T sejtet helyeztünk 1 µg/ml HER2-Fc-vel fedett 96 kamrás sejttenyésztő edénybe, melyeket a kiindulási protokollnak megfelelően komplett RPMI vagy LymphoONE médiumban inkubáltunk 24 óráig. Ezt követően a felülúszó IL-2 és IFNy koncentrációját a gyártó által előre összeállított puffer- és reagens készletek (Quantikine ELISA; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével ELISA módszerrel, a szolubilis TIM-3 relatív szintjét Western-blot (Proteome Profiler Human XL Cytokine Array KIT; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint, Synergy HT ELISA olvasó (BioTec, Winooski, VE, USA) illetve a FluorChem Q képalkotó és analizáló rendszer (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) alkalmazásával. A Western-blot kísérlet immunreaktív foltjainak pixelintenzitását az ImageJ/Fiji [109] szoftverrel határoztuk meg. Kontrollként sejtmentes médiumot, valamint NT T sejteket használtuk.

Az IFN $\gamma$  kibocsájtást ezen kívül HER2<sup>+</sup> tumor sejteken való inkubációt követően is meghatároztuk. Ennek során 2×10<sup>5</sup> CAR T sejtet helyeztünk 2×10<sup>5</sup> MDA-HER2, N87, vagy JIMT-1 tumorsejttel fedett 96 kamrás sejttenyésztő edénybe, melyeket a kiindulási protokollnak megfelelően komplett RPMI vagy LymphoONE médiumban inkubáltunk 24 órán keresztül. A felülúszó IFN $\gamma$  koncentrációját ELISA módszerrel (Quantikine ELISA; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) mértük a gyártó utasításait követve. Kontrollként sejtmentes médiumot, NT T sejteket, CAR T effektor sejtekkel nem kezelt HER2<sup>+</sup> tumorsejteket, valamint a HER2<sup>-</sup> MDA sejtvonalat használtuk. A méréseket három párhuzamos mintán végeztük, két független kísérletben.<sup>10</sup>

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> A 2 független kísérlet közül 1 Szilágyi Ádám munkája.

## V.12. Relatív foszfoprotein szintek vizsgálata

A különböző fenotípuseloszlású HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek antigénspecifikus stimulációját követő jelátviteli útvonalak szempontjából releváns protein kinázok és szubsztrátok relatív foszforilációs szintjének párhuzamos vizsgálatára a Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array kitet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) használtuk. A mérés során 3,33×10<sup>6</sup> CAR T sejtet inkubáltunk 1 µg/ml HER2-Fc-vel bevont 24 kamrás tenyésztőedényben 0,5; 2,5; vagy 7 percig, 2 ml komplett RPMI illetve LymphoONE médiumban, 37°C-on. A kapott mintákat egyesítettük, és 4°C-os PBS-sel mostuk. Számolás után a mintákból 106 sejtet 1200 rpm-en 5 percig 4°C-on centrifugáltunk, majd a gyártó utasításai szerint lizáltuk. A sejtlizátumokat 43 különböző foszforilált fehérjére specifikus befogó antitestekkel duplikátumokban pontozott nitrocellulóz membránokon inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, lengőplatformos rázógépen. A gyártó által biztosított mosópufferben való háromszoros mosást követően a membránokat biotinilált detektáló antitestkoktélban inkubáltuk 2 órán át szobahőmérsékleten, háromszor mostuk, majd 30 percig szobahőmérsékleten sztreptavidin-HRP-vel inkubáltuk. A membránokat a gyártó utasításai szerint mostuk, majd 1 percig inkubáltuk a mellékelt kemilumineszcens detektáló oldatban. A felvételeteleket FluorChem Q képalkotó rendszer (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) segítségével készítettük el. Az immunreaktív foltok pixelintenzitását az ImageJ/Fiji [109] szoftverrel határoztuk meg.

A különböző fenotípus eloszlású HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek antigénspecifikus stimulációja utáni relatív foszfokináz szinteken felügyelet nélküli kétirányú hierarchikus klaszterezést végeztünk az R-alapú ClustVis segítségével [125]. Nem elemeztük azokat a foszfoproteineket, amelyek mind a négy mintában a negatív kontroll alatti jelet adtak. A sorok és oszlopok klasztereit az ún. átlagos láncmódszerrel csoportosítottuk, melyben két klaszter távolságát az összes megfigyelési egység páronkénti távolságának átlaga definiálja. Az eredményeket hőtérképen jelenítettük meg.

#### V.13. CAR T sejtek in vitro citotoxicitásának meghatározása

A különböző fenotípuseloszlású HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek *in vitro* citotoxicitását a HER2<sup>+</sup>, luciferáz expresszáló MDA-HER2, N87 és JIMT-1 tumor sejtvonalak alkalmazásával vizsgáltuk a D-luciferin bomlását követő lumineszcens jel detektálásán alapuló módszer segítségével. 10<sup>5</sup> MDA-HER2.ffLuc, N87.ffLuc és JIMT-1.ffLuc sejtet tenyésztettünk 96 lyukú lapos aljú tenyésztőedényben 200 μl komplett RPMI vagy LymphoONE médiumban, melyeket 10<sup>5</sup> *OKT3-antiCD28/RPMI*, illetve *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal

előállított CD28.z és 41BB.z CAR T sejt jelenlétében inkubáltunk 24 óráig. A CAR T sejteket lemostuk a kezelést túlélő adherens tumorsejtekről, melyek relatív számát D-luciferin reagens segítségével határoztuk meg a gyártó iránymutatása szerint Synergy HT luminométer (BioTek, Winooski, VE, USA) használatával. Kontrollként kezeletlen tumorsejteket, NT T sejteket, valamint a HER2<sup>-</sup> MDA.ffLuc sejtvonalat használtuk. A CAR T kezelést túlélő adherens tumorsejtek relatív arányának meghatározása során a kezelt csoportokban mért lumineszcencia intenzitást elsőként a kezeletlen mintapárjaikban, majd az NT T sejtekkel kezelt mintapárjaikban meghatározott lumineszcencia intenzitás értékekkel normalizáltuk. A méréseket két párhuzamos mintán végeztük, három független kísérletben.<sup>11</sup>

# V.14. CAR T sejt közvetített citolízis kinetikájának vizsgálata elektromos impedancia mérésen alapuló bioszenzorral

A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és a HER2.CD28.41BB.z CAR T sejtek mediálta korai citotoxikus hatást az elektromos impedancia mérésen alapuló Elektromos Sejtszubsztrát Impedancia szenzor (ECIS; Applied BioPhysics, Inc., New York, NY, USA) segítségével jellemeztük. A 8 kamrás 8W10E PET lemez (Applied BioPhysics, New York, NY, USA) alját borító arany elektródákra HER2 expresszáló JIMT-1 tumorsejteket tapasztottunk ki. A letapadó tumorsejtek komplex impedancia spektrumát 1-től 10<sup>5</sup> Hz-ig terjedő tartományban mértük. A tumorsejteket 25 órán keresztül inkubáltuk a kamrákban. Ebben a pontban a mért impedancia elérte a kamrák alját teljesen lefedő sejttenyészetre utaló platót, ami elengedhetetlen a különböző kezelések megfelelő összehasonlításához. Az adherens tumorsejtek pusztulása a mért impedancia csökkenését eredményezi, lehetővé téve a CAR T sejtek citotoxikus hatásának vizsgálatát valós időben. Az effektor/target sejt arányt 1:1-re állítottuk be. A CAR T sejteket két, párhuzamosan készült technikai replikátumban hasonlítottuk össze.<sup>12</sup> Az impedanciát 25 órán keresztül követtük. Az átlagolt impedancia értékeket először a kiindulási impedanciával, majd a NT T sejt kontrollban mért impedanciával normalizáltuk.

<sup>&</sup>lt;sup>11</sup> A CAR T sejtek in vitro citotoxicitását vizsgáló 3 független kísérletből 1 Szilágyi Ádám munkája.
<sup>12</sup> A 2 technikai ismétlés közül 1 Dr. Szöőr Árpád munkája.

## V.15. Xenograft tumorok CAR T sejt kezelése

A CAR T sejt kezelés JIMT-1 sejtekből álló xenograft daganatra gyakorolt hatását NSG (NOD scid gamma) egerekben vizsgáltuk. Az általunk alkalmazott NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>*/SzJ egértörzs súlyos kombinált immunhiányos állapothoz (Severe combined immunodeficiency, SCID) vezető és az IL-2 receptor gamma láncának kifejeződését meggátoló mutációkat hordoz. Az egyedek nem rendelkeznek érett T, B, és funkcionális NK-sejtekkel, valamint citokin jelátvitelük is hiányos, így szervezetük nem képes fellépni az idegen sejtekkel és anyagokkal szemben, ezért jól alkalmazhatóak transzplantációs kísérletekben. A The Jackson Laboratory-tól (Bar Harbor, Manié, USA) vásárolt egereket a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Kísérleti Állatházának (nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015) SPF minősítésű területén tenyésztették, a kezeléseket és a tumorméret monitorozását az "MD" részlegen végeztük.

A xenograft oltást a nőstény egerek 7 hetes korában adtuk be, 100  $\mu$ l PBS-ben szuszpendált 3×10<sup>6</sup> JIMT-1.ffLuc vagy 3×10<sup>6</sup> JIMT-1 sejt és ezzel megegyező térfogatú Matrigel keverékének szubkután (s.c.) injekciójával. A Matrigel folyékony állapotának megőrzése érdekében a sejtszuszpenziós keveréket és injekciós szereléket az oltásig jégen tartottuk. Egerenként 2 oltást végeztünk a 2 hátsó végtag dorzális oldalán.

Az egereket egyszeri dózisban kezeltük  $2,5 \times 10^6$  HER2-CAR vagy  $2,5 \times 10^6$  HER2-CAR.ffLuc T sejt intravénás (iv.) injekciójával a xenograft beoltását követő 14. napon. Kontrollként  $2,5 \times 10^6$  NT vagy NT.ffLuc T sejtet alkalmaztunk. A JIMT-1.ffLuc daganat növekedését, illetve a HER2-CAR.ffLuc T sejtek lokalizációját és proliferációját IVIS Spectrum CT készülékkel (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) követtük 7 naponta. A mérés előtt az izofluránnal érzéstelenített állatokat intraperitoneálisan D-luciferinnel (150 mg/kg) injektáltuk, majd 10 perc elteltével biolumineszcens képeket vettünk fel. A felvételeket a Living Image szoftver 4.0 verziójával (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA) elemeztük. Az elemzés során minden tumorrégión azonos méretű területet jelöltünk ki, ahol foton/másodperc/négyzetcentiméter/szteradián (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) értékben határoztuk meg a biolumineszcens jel intenzitását.

Az állatkísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával (# 5-1/2017/DEMÁB), a szükséges engedélyek birtokában végeztük. Minden állatkísérletet megfelelő FELASA képesítéssel rendelkező szakember felügyelete mellett, a DIN EN ISO 9001 szabályozásnak megfelelően hajtottunk végre.

67

## V.16. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis során a GraphPad Prism 5 szoftvert (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA) használtuk. Az alacsony elemszámú minták eloszlásának statisztikai normalitását a Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Az adatokat átlag ± SEM vagy SD formájában adtuk meg. Két csoport összehasonlítására kétoldali t-próbát alkalmaztunk. Három vagy több csoport összehasonlításához egyirányú ANOVA-t és Tukey vagy Bonferroni-féle post hoc tesztet használtunk. A Tukey post hoc tesztet azonos mintaelemszámú csoportok, a Bonferroni-féle post hoc tesztet eltérő mintaelemszámú csoportok összehasonlítására alkalmaztuk. Az eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha p<0,05 volt.

## **VI. Eredmények**

## VI.1. A kostimulációs domének meghatározzák a kiméra antigén receptorok sejtfelszíni szerveződését és a CAR T sejtek aktivációját

A CAR T sejtek rövid távú effektorválaszát jelentős mértékben befolyásolja a kiméra receptorok azon képessége, hogy a tumorsejt felismerését követően a kontaktfelszínen akkumulálódva stabil immunológiai szinapszist építsenek fel. A CAR-ok extracelluláris doménjei az antigénkötés erősségén, a CAR T és tumorsejt közötti fizikai távolságon és a CAR-ok dimerizációján keresztül ismert hatást gyakorolnak erre a folyamatra, ugyanakkor a legelterjedtebben alkalmazott kostimulációs endodomének szerepe mindeddig nem került feltárásra. Projektünk első részében ezért a kostimulációs endodomének szerepét jellemeztük az első, második és harmadik generációs CAR-ok molekuláris szerkezetében, sejtfelszíni szerveződésében és membrándiffúziós dinamikájában a nyugvó sejtmembránban. Következő lépésben megvizsgáltuk ezen alapvető receptortulajdonságok hatását az immunszinapszis felépülésére, a korai citolitikus jelátvitelre, illetve tumor elimináció rövid távú kinetikájára.

#### VI.1.1. HER2-specifickus CAR T sejtek előállítása

A kostimulációs domént nem expresszáló első generációs HER2.z, a CD28 vagy 41BB kostimulációs endodomént kifejező második generációs HER.CD28.z és HER2.41BB.z, illetve a mindkét endodomént tartalmazó, harmadik generációs HER2.CD28.41BB.z CAR T sejteket retrovirális transzdukciós rendszerben állítottuk elő az *OKT3-antiCD28/RPMI* sejttenyésztési és T sejt stimulációs protokollal (lásd V.3.4-es fejezet). A kiméra antigén receptor expresszióját a HER2-felismerő doménre specifikus fluoreszcens jelöléssel, majd ezt követő áramlási citometriás vizsgálattal igazoltuk a transzdukciót követő negyedik napon. Kontrollként NT T sejteket alkalmaztunk. A kapuzás során először morfológiai jellemzőik szerint különítettük el a limfocita populációt, majd meghatároztuk a CAR pozitív T sejtek százalékos arányát a kontroll NT sejtekhez viszonyítva (19. ábra A, B).

Minden CAR stabil expressziót mutatott a T sejtek felszínén (HER2.z:  $89\pm5\%$ , HER2.CD28.z:  $76\pm8\%$ , HER2.41BB.z:  $85\pm4\%$ , HER2.CD28.41BB.z:  $95\pm5\%$ ), illetve az egyes konstrukciókra jellemző transzdukciós hatékonyságok között nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eltérést (19. ábra B).





A: A HER2-CAR expressziót HER2-Fc fúziós proteinnel és A488 konjugált anti-humán IgG-vel való indirekt jelöléssel és áramlási citometriával igazoltuk. A kapuzás során morfológiai jellemzőik szerint elkülönítettük a limfocita populációt, majd meghatároztuk a CAR pozitív T sejtek százalékos arányát a kontroll NT sejtekhez viszonyítva.

**B:** A reprezentatív hisztogramok a HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és HER2.CD28.41BB.z konstrukciókat expresszáló CAR és NT T sejt populációk eloszlását mutatják.

C: Az oszlopdiagram a CAR T sejtkészítmények transzdukciós hatékonyságának átlagát (± SD) ábrázolják (n = 3). A statisztikai összehasonlításokat egyirányú ANOVA és Tukey post hoc teszttel végeztük el.

## VI.1.2. A kostimulációs endodomének meghatározzák a kiméra antigén receptorok felszíni szerveződését a nyugvó CAR T sejt membránban

A specifikusan célzott tumor antigén CAR T sejt általi felismerét a cél-és effektor sejtet összekötő immunológiai szinapszis felépülése követi, mely során a kontaktfelszínen akkumulálódó kiméra antigén receptorok aktiválják a tumorsejt eliminációjához vezető citolitikus jelátviteli útvonalakat. Korábbi kutatási eredmények alapján az immunszinapszis kialakulásának sebessége, mérete és stabilitása fontos indikátora lehet a CAR T sejtek tumorellenes hatékonyságának [126]. Mivel a kiméra receptorok molekuláris szerkezete és az előre összeszerelődött receptorstruktúrák membránbeli jelenléte potenciálisan befolyásolhatja a szinapszis felépülésének dinamikáját, ezért első lépésként a kostimulációs endodomének szerepét vizsgáltuk meg a receptor oligomerizáció és a sejtfelszíni szerveződés tekintetében.

A kiméra receptorok oligomerizációját Western-blot segítségével jellemeztük. A nyugvó CAR T sejtekből előállított teljes sejtlizátumokat SDS-PAGE gélen futtattuk. A dimer és oligomer CAR-ok detektálása céljából natív mintapuffert alkalmaztunk, a monomer receptorokat a diszulfid hidakat felbontó DTT-t tartalmazó redukáló pufferben választottuk el. A PVDF membránra blottolt fehérjesávokat anti-humán CD3ζ monoklonális antitesttel tettük láthatóvá. Kontrollként az NT T sejtek szolgáltak. Az alkalmazott antitest a CAR-ok CD3z alegysége mellett a TCR receptorkomplex részeként natívan kifejeződő CD3ζ láncot is felismeri, amely 20 kDa magasságában jelenik meg az előhívott membránon mind a natív, mind a redukáló körülmények között futtatott mintákban (20. ábra A).



**20. ábra** A különböző kostimulációs doménnel rendelkező kiméra antigén receptorok oligomerizációs szintjének meghatározása a nyugvó CAR T sejt membránban

**A:** A dimer és oligomer CAR-okat natív körülmények között, a monomer receptorokat 0,1 mM DTT tartalmú redukáló pufferben választottuk el SDS-PAGE poliakrilamid gélen. A fehérjesávokat PVDF membránra blottoltuk és 1 μg/ml anti-humán CD3ζ monoklonális antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül 4°C-on.

**B:** Az oszlopdiagramok 2 különböző donortól származó, natív körülmények között elválasztott HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és HER2.CD28.41BB.z CAR T sejtkészítmény Western-blot vizsgálatának eredményeit ábrázolják.

Az anti-CD3ζ-val jelölt CAR dimerek a 150-180 kDa közötti, az oligomerek a 250 kDa feletti régióban jelentek meg a natív pufferben futtatott mintában (20. ábra A, bal oldali felvétel), míg a redukáló körülmények között elválasztott monomerek a CAR-ok molekulaméretének megfelelően 60-75 kDa-os mérettartományban voltak detektálhatóak (20. ábra A, jobb oldali felvétel). Az immunreaktív sávok intenzitásának elemzésével kimutattuk, hogy a kostimulációs domént nem tartalmazó HER2.z és a CD28 alegységgel rendelkező

HER2.CD28.z CAR-ok megközelítőleg 90%-a dimereket alkot. A 41BB domén jelenléte azonban nagy mértékben fokozza a receptor oligomerizációt: a HER2.41BB.z és a HER2.CD28.41BB.z CAR-ok mintegy 38% illetve 60%-a magasabb rendű oligomerekké szerveződött (20. ábra B).

A CAR-ok antigénstimulustól független szerveződését ezt követően a sejtfelszíni membránstruktúrák szintjén vizsgáltuk Airyscan mikroszkópia és digitális képelemző algoritmusok segítségével. A CAR T sejtek transzdukciós hatékonyságának meghatározása kapcsán rutinszerűen alkalmazott HER2-Fc ECD jelölés ebben a kísérleti rendszerben nem volt alkalmazható, mivel a fehérje dimer jellege a receptorok keresztkötéséhez és következményes aggregációjához vezetett volna. A fluoreszcens jelöléshez ezért A647 konjugált monomer HER2-t állítottunk elő (lásd V.4-es fejezet). A 37°C-on, 10 mM glükóz-PBS-ben inkubált jelölt CAR T sejtek apikális membránfelszínéről megközelítőleg 600 nm vastag optikai szeleteket vettünk fel, melyek intenzitásalapú szegmentálásával (21. ábra A) meghatároztuk a szubmikronos domének összesített terület- és receptorarányát, valamint az egyedi receptorklaszterek átlagos méretének, integrált intenzitásának és mennyiségének eloszlásait. Az átlagos képintenzitások kumulatív sűrűségfüggvénye lognormális eloszlást követett, a kiugró értékeket nem vettük figyelembe az elemzés során. Ezáltal kiküszöböltük a CAR expressziós szintjének szélsőséges inkonzisztenciáiból fakadó zavaró hatásokat (21. ábra B).

Eredményeink alapján mind a négy vizsgált CAR inhomogén sejtfelszíni eloszlást mutatott: a kiméra receptorok mintegy 75%-a a felvétel idejének léptékében (2-5 s) immobilisnak mutatkozó, nagy receptorsűrűségű klaszterekben lokalizálódott, a teljes apikális membránfelszín területének harmadát lefedve (21. ábra C). Az egyedi klaszterek kiterjedésében és receptorsűrűségében azonban szignifikáns eltérés jelentkezett az egyes kostimulációs domének jelenléte, illetve hiánya esetén. Megfigyeléseink szerint az elsősorban dimereket alkotó HER2.z és HER2.CD28.z CAR-ok kisebb számú, ugyanakkor nagyobb méretű és denzitású szubmikronos doménekben lokalizálódtak, ezzel szemben a magasabb rendű oligomereket alkotó HER2.41BB.z és HER2.CD28.41BB.z konstrukciók kisebb méretű és alacsonyabb integrált intenzitást mutató membránklaszterbe szerveződtek (21. ábra D,E).

72



21. ábra A kiméra antigén receptorok sejtfelszíni szerveződésének meghatározása nyugvó CAR T sejtekben

**A:** A reprezentatív AiryScan felvételek a HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és a HER2.CD28.41BB.z CAR T sejtek apikális membránfelszínét (Elemzett kép, felső sor) valamint a klaszterszegmentáció eredményét (Szegmentált kép, alsó sor) mutatják. Az CAR-okat A647 konjugált monomer HER2-vel jelöltük. A klasztereket a fluoreszcens jelintenzitás tartomány alsó 75%-ának levágását követően a ImageJ/Fiji szoftver "watershed" funkciójának segítségével szegmentáltuk. A skála mérete 2 μm.

B: Az ábra az elemzett CAR T sejtek apikális membránfelszínének összesített intenzitását mutatja.

C: CAR klaszterek összesített területének (bal oldali diagram) és jelintenzitásának (jobb oldali diagram) aránya a teljes apikális membránfelszínhez viszonyítva.

D: Kiméra antigén receptor klaszterek átlagos száma 10 µm<sup>2</sup> apikális membránfelszín területén.

E: Az egyedi CAR klaszterek méretének és integrált intenzitásának eloszlása.

A B-E oszlopdiagramokon az átlag (± SEM) van feltüntetve (nHER2.z = 54, 4 donor; nHER2.CD28.z = 44, 3 donor; nHER2.41BB.z = 47, 4 donor; nHER2.CD28.41BB.z = 54, 4 donor). A statisztikai összehasonlításokat egyirányú ANOVA és Bonferroni post hoc teszttel végeztük el (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).
Ezen eredmények tehát arra mutattak, hogy a különböző kostimulációs doménekkel rendelkező kiméra receptorok eltérő sejtfelszíni struktúrákat alkotnak. Ugyanakkor az összes vizsgált konstrukció esetén konzisztensen megfigyelhető volt, hogy a CAR-ok mintegy negyede a klasztereken kívül helyezkedik el. Mivel a CAR-ok immunológiai szinapszisban való akkumulációja során az előre összeszerelődött receptor aggregátumok mellett a mobilis receptorstruktúrák diffúziós sebessége is fontos szerepet játszhat, a következő lépésben megvizsgáltuk a különböző kostimulációs doménekkel rendelkező CAR-ok membrándiffúziós kinetikáját.

#### VI.1.3. A CAR-ok eltérő diffúziós dinamikát mutatnak a CD3z domén membránfelszíntől való távolságának függvényében

Az eltérő kostimulációs doménnel rendelkező CAR-ok membrándiffúziós kinetikáját fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia segítségével jellemeztük. Ennek során a 37°C-on inkubált, nyugvó CAR T sejtek apikális membránfelszínét átszelő konfokális detektálási térfogatban vizsgáltuk az A647 konjugált monomer HER2-vel jelölt CAR-ok fluoreszcenciájának 2D membrándiffúzióból fakadó időbeni ingadozását (22. ábra A).

A fluoreszcencia fluktuációkat autokorrelációs függvénnyé alakítottuk, majd a paraméterbecslést nemlineáris modellillesztés segítségével végeztük el. A CAR autokorrelációs görbék egy komponens térbeli és egy komponens síkbeli szabad diffúzióját leíró próbafüggvénnyel bizonyultak a legjobban illeszthetőnek (22. ábra B). A 3D diffúziót mutató komponenst a jelölés során alkalmazott, disszociált monomer A647-HER2-ként, a 2D membrándiffúziós karakterisztikájú komponenst a mobilis CAR frakcióként azonosítottuk.

	τ <sub>d</sub> [μs]	S
10 mM A647 tesztoldat (Desztillált víz, 25°C)	44,18 ± 5,02	$6,8\pm0,5$
0,5 nM A647-HER2 tesztoldat (10 mM glükóz-PBS, 37°C)	$383,30 \pm 4,79$	6,8

3. táblázat Tesztoldatok autokorrelációs függvényeinek illesztett paraméterei

Mivel az autokorrelációs görbék illesztése az adott próbafüggvénnyel megbízhatóbb eredményeket ad amennyiben a szabad paraméterek száma alacsony, a modellegyenlet egyes paramétereit kalibrációs kísérletekben határoztuk meg. Elsőként az A647 festék tartózkodási idejét és az S műszeres paramétert mértük 10 mM koncentrációjú tesztoldatban, desztillált vízben, 25°C-on (lásd V.7.1-es fejezet). A kalibrációs kísérletek eredményeit a 3. táblázat

A korrelációs függvényekre egy komponens szabad 3D diffúzióját és triplet korrekciót tartalmazó modellt illesztettünk. A táblázatban négy független kísérletből származó paraméterek átlagértéke ( $\pm$  SD) van feltüntetve. T<sub>t</sub>: az egyensúlyi tripethányad,  $\tau_t$ : a triplet állapot korrelációs ideje, S: a fókusztérfogat axiális és laterális sugarának hányadosa,  $\tau_d$ : a komponens diffúziós ideje.

foglalja össze. Az S alakfaktort minden további illesztés során a kalibrált 6,8-as értéken rögzítettük. A szabad A647 festék karakterisztikus diffúziós idejének ( $\tau_{A647} = 44,18 \ \mu s$ ) és diffúziós együtthatójának ( $3,3 \times 10^{-4} \ \mu m^2/\mu s$  [119]) ismeretében a (7)-es egyenlet szerint kiszámítottuk a  $\omega_{xy}$  laterális fókuszsugarat, amely az alkalmazott gerjesztési hullámhossz mellett 0,242 µm-nek adódott. A  $\omega_{xy}$  paramétert a későbbiekben az azonos festékkel jelölt mobilis CAR komponens diffúziós koefficiensének számítására használtuk fel a (6)-os egyenlet szerint. Ezt követően az A647-HER2 jelölőmolekula szabad 3D diffúzióját határoztuk meg, 10 mM glükóz-PBS oldatban, 37°C-on (lásd V.7.2-es fejezet). A kapott karakterisztikus diffúziós időt ( $\tau_{A647-HER2} = 383,30 \ \mu s$ ) a CAR T sejtes minták autokorrelációs görbéinek illesztése során a szabad 3D diffúziót végző komponens karakterisztikus diffúziós idejeként rögzítettük.

A CAR T sejtes minták autokorrelációs görbéinek illesztése által nyert paramétereket a 4. táblázat foglalja össze. Az egyensúlyi triplet hányad és a triplet állapot korrelációs ideje statisztikailag szignifikáns eltéréseket mutatott a különböző konstrukciók között, ami a CARok aggregációs állapotának különbségeiből fakadó eltérő molekuláris környezettel magyarázható. A diffundáló komponensek frakcionális eloszlásának elemzése azt mutatta, hogy a CD28 kostimulációs endodoméneket tartalmazó konstrukciók esetén magasabb a disszociált festékmolekulák aránya, ami arra utal, hogy a CD28 endodomén beépítése csökkentheti a CAR kötési affinitását.

	Tt [%]	τ <sub>t</sub> [μs]	f <sub>A647HER</sub> [%]	f <sub>CAR</sub> [%]	$\tau_{CAR}$ [ms]	$D_{CAR} \left[\mu m^2 s^{-1}\right]$
HER2.z CAR	$34,6\pm0,9$	17,6 ± 1,4	$20,4 \pm 1,3$	79,6 ± 1,3	$47,0 \pm 1,4$	0,31 ± 0,01
HER2.CD28.z CAR	$35,6 \pm 0,8$	12,4 ± 0,8	$36,6 \pm 0,6$	63,4 ± 0,6	33,5 ± 0,9	$0,\!44\pm0,\!01$
HER2.41BB.z CAR	$37,0\pm0,9$	14,5 ± 1,0	$25,5\pm0,8$	$74,5\pm0,8$	33,6 ± 0,9	$0,\!44\pm0,\!01$
HER2.CD28.41BB.z CAR	36,1 ± 0,9	13,9 ± 1,0	$35,0 \pm 0,6$	$65,0\pm0,6$	$27,8\pm0,8$	$0{,}53\pm0{,}02$

4. táblázat A mobilis CAR-ok autokorrelációs függvényeinek illesztéséből nyert paraméterek

Az autokorrelációs görbékre egy komponens szabad 3D diffúzióját, egy komponens szabad 2D diffúzióját, és triplet korrekciót tartalmazó modellt illesztettünk. A táblázatban négy (nHER2.z = 300, nHER2.41BB.z = 276, nHER2.CD28.41BB.z = 289) illetve három (HER2.CD28.z = 260) független mérésben kapott átlagértéke ( $\pm$  SD) van feltüntetve.

T<sub>t</sub>: egyensúlyi tripethányad,  $\tau_t$ : a triplet állapot korrelációs ideje, f: a komponens frakciója,  $\tau_{A647HER2}$ : a szabad A647-HER2 tartózkodási ideje,  $\tau_{A647-HER2}$ : a mobilis CAR frakció tartózkodási ideje, S: a fókusztérfogat axiális és laterális sugarának hányadosa

Fő megfigyelésünk, hogy a kostimulációs alegységgel nem rendelkező HER2.z CAR bizonyult a legkevésbé, a HER2.CD28.41BB.z CAR a leginkább mobilisnak, míg a HER2.CD28.z, és a HER2.41BB.z CAR-ok diffúziós sebessége az az első-és harmadik generációs CAR-ok közé esett (22. ábra C).



22. ábra Különböző kostimulációs doménnel rendelkező CAR-ok membrándiffúziója és szerkezetmodellezése

A: A HER2.z, HER2.CD28.z, HER2.41BB.z és a HER2.CD28.41BB.z CAR T sejtek apikális membránfelszínét átszelő konfokális térfogatban detektált reprezentatív fluoreszcencia fluktuáció.

**B:** Az ábra az egyedi autokorrelációs görbék összesítésének modellillesztését mutatja a triplet állapot ( $\tau_{Triplet}$ ), a CAR-okról disszociálódó A647 monomer HER2 ( $\tau_{A647-HER2}$ ) és a különböző mobilis CAR receptorok ( $\tau_{.z}$ ;  $\tau_{CD28.z}$ ;  $\tau_{41BB.z}$ ;  $\tau_{CD28.41BB.z}$ ) korrelációs idejének feltüntetésével (nHER2.z = 300, 4 donor; nHER2.CD28.z = 260, 3 donor; nHER2.41BB.z = 276, 4 donor; nHER2.CD28.41BB.z = 289, 4 donor). A diagramon az átlag (± SD) van feltüntetve. A statisztikai összehasonlításokat párosítatlan t-teszttel végeztük el (\*\*\*p<0,001).

C: CAR-ok diffúziós korrelációs idejét a detektálási térfogat kalibrációs kísérletekben meghatározott laterális sugarának alapján váltottuk át diffúziós koefficienssé.

**D:** A natív TCR CD3ζ [123], valamint a RoseTTAFold gépi mélytanuláson alapuló algoritmussal modellezett CAR struktúrák sematikus diagramja. Az ábrán az algoritmus által becsült megbízhatósági pontszámok és a diszulfid hidak kerültek feltüntetésre.

A mobilitásra vonatkozó megfigyeléseink összefüggésben állhatnak a kiméra antigén receptorok molekuláris fehérjeszerkezetével. A CAR-ok másod- és harmadlagos struktúráját a RoseTTAFold algoritmussal [121] modelleztük (22. ábra D). A HER2-specifikus, FRP5 eredetű scFv, az IgG1 SH és a CD28 transzmembránrégió, valamint az intracelluláris rész szerkezetét külön jósoltuk meg. Az intracelluláris CAR domének esetében a natív TCR CD3ζ doménjével legnagyobb homológiát mutató (18. ábra), az scFv és az IgG1 SH-CD28 TM alegységek esetében a legmagasabb megbízhatósági pontszámot kapó predikciós modelleket választottuk elemzésre.

A legmagasabb konfidenciapontszámmal rendelkező modellek megközelítőleg lineáris harmadlagos szerkezetet mutattak (22. ábra D). Ennek eredményeképp a kostimulációs endodomének beépítésével a CD3z domén feltételezhetően egyre távolabb kerül a plazmamembrán síkjától és ezáltal a TCR/CD3ζ-lánc pozíciójától. Natív T sejtekben kimutatták, hogy a CD3ζ alegység citoplazmatikus doménje szelektíven komplexet képez több foszfoinozitid lipiddel a plazmamembránban [127]. Amennyiben a kölcsönhatásban részt vevő lipidek szelektív defoszforilációjával felbontották a CD3ζ-foszfoinozitid komplexeket, a TCR laterális diffúziós sebességének szignifikáns növekedése volt megfigyelhető a receptor ligandkötését megelőzően [128]. Eredményeink tehát arra utaltak, hogy a CAR diffúziós dinamikáját befolyásolhatja a CD3z effektor doménnek azon képessége, hogy a kölcsönhatásba lépjen foszfoinozitid lipidekkel plazmamembrán belső felületén, a CAR mobilitás fokozatos növekedését előidézve natív TCR/CD3ζ pozíciójától arányosan távolodva.

#### VI.1.4. A TCR komplex nem integrálódik a CAR specifikus immunszinapszisba

A CAR T sejtekben a kiméra receptor a natív TCR/CD3 komplexszel egyidejűen expresszálódik, egyazon jelátviteli útvonalon aktiválva a T limfocitákat. A foszfoinozitid lipidekkel való komplexképzés mellett a natív TCR-hez kapcsolódó CD3ζ lánc is hatással lehet a kiméra antigén receptorok immunszinapszisban való akkumulációjára. Mivel a CD28 és a 41BB kostimulációs receptorok nem lépnek közvetlen interakcióba a TCR komplexszel annak specifikus lingandasszociációja során, a TCR integrációját a CAR antigén specifikus szinapszisban első generációs kiméra receptorok alkalmazásával vizsgáltuk.



23. ábra A TCR komplex integrációjának vizsgálata a CAR specifikus immunszinapszisban

A: A HER2.z.GFP CAR és a TCR kolokalizációját nyugvó (bal oldali képek) és N87 tumorasszociát (jobb oldali képek) CAR T sejtek szinaptikus, extraszinaptikus, és teljes sejtet lefedő membránrégióiban vizsgáltuk konfokális és Airyscan Fast mikroszkópia segítségével. A HER2.z.GFP CAR T sejteket A647 konjugált anti-humán TCR $\alpha/\beta$  teljes antitesttel, A647 konjugált anti-humán IgG F(ab')2 antitesttel, vagy A647 konjugált anti-humán transzferrin receptor (TfR) monoklonális antitesttel jelöltük. Az Airyscan Fast mikroszkópiával készített 3D felvételek megközelítőleg 50-80 optikai szeletet tartalmaztak. A skála mérete 5 µm.

**B**: Az N87 tumorsejthez kapcsolódó HER2.z.GFP CAR T sejtek szinaptikus, extraszinaptikus, és egyesített régióiban meghatároztuk a CAR-GFP, TCR-A647, CAR-A647 és TfR-A647 intenzitást. A relatív intenzitásértékeket a szinaptikus és extraszinaptikus területek átlagintenzitásainak a teljes sejtmembrán átlagos intenzitásával való osztásával állítottuk elő.

C: A pixelenkénti korrelációt a CAR-GFP zöld csatornája és a CAR-A647, TCR-A647, vagy TfR-A647 vörös csatornája között mértük a szinaptikus kontaktrégió és az extraszinaptikus membránterületek 3D ROI objektumaiban. Kontrollként a nyugvó HER2.z.GFP CAR T sejteket alkalmaztuk.

Az oszlopdiagramokon az átlag (± SD) van feltüntetve (nCAR-GFP = 11, nTCR-A647 = 11, nCAR-A647 = 10, nTfR-A647 = 6; 3 donor). A statisztikai összehasonlításokat párosítatlan t-teszttel végeztük el (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

A CAR és a TCR eloszlását a HER2.z.GFP CAR T sejt és a HER2<sup>+</sup> tumorsejt közötti kontaktrégióban, az extraszinaptikus régióban, és a nyugvó sejtmembránban vizsgáltuk (23. ábra A). A HER2.z.GFP CAR T sejteket A647 konjugált anti-humán TCRα/β teljes antitesttel jelöltük (TCR-A647). Pozitív kontrollként az A647 konjugált anti-humán IgG F(ab')2 (CAR-A647), negatív kontrollként az A647 konjugált anti-humán transzferrin receptor (TfR) monoklonális antitest jelölés (TfR-A647) szolgált. A CAR T sejteket N87 tumorsejttel fedett, sejttenyésztésre alkalmas bevonattal ellátott nyolc kamrás lemezre helyeztük 10 mM glükóz-PBS-ben. A tumorasszociált effektor sejtekről Airyscan Fast üzemmódban optikai szeleteléssel 3D felvételeket készítettünk. A kamrát a felvételek ideje alatt 37°C-on inkubáltuk. Minden analizált sejtről konfokális képet is készítettünk a PMT csatorna orientációs alkalmazása céljából (23. ábra A).

A CAR-GFP és a CAR-A647, TCR-A647, illetve a TfR-A647 eloszlását a szinaptikus régióban, az extraszinaptikus membránban és ezek egyesítésében, illetve a nyugvó teljes sejtmembránban a távoli vörös és a zöld csatornák intenzitásértékei alapján elemeztük 3D ROI tartományokban, melyeket az ImageJ/Fiji szoftver [109] 3DSuite pluginjával [111] szegmentáltunk. A relatív intenzitásértékeket a szinaptikus és extraszinaptikus területek átlagintenzitásainak a teljes sejtmembrán átlagos intenzitásával való osztásával állítottuk elő (23. ábra B). A pixelenkénti korrelációt a CAR-GFP zöld csatornája és a CAR-A647, TCR-A647, vagy TfR-A647 vörös csatornája között mértük a szinaptikus kontaktrégió és az extraszinaptikus membránterületek 3D ROI objektumaiban, melyben csak azok a pixelek szerepeltek, amelyek legalább egy csatornában a meghatározott intenzitáshatár felett voltak (lásd V.6.5-ös fejezet). A PCC-t külön mértük a 3D felvételek minden szeletén, a kutatócsoport saját fejlesztésű ImageJ/Fiji pluginjának alkalmazásával. Az egyazon sejten belüli optikai szeletek PCC értékeit átlagoltuk, majd az egyedi sejtek értékeit ismét átlagoltuk.

Az intenzitáseloszlás analízisének eredményei a HER2 specifikus CAR-ok esetén igazolták, míg a TCR-ek esetén cáfolták a molekulák akkumulációját a szinaptikus régióban a HER2.z.GFP CAR T sejtek HER2<sup>+</sup> N87 tumorsejtekkel való asszociációja során (23. ábra B). A TCR szignifikánsan alacsonyabb átlagintenzitást mutatott a szinapszisban, mint az extraszinaptikus régióban a teljes membrán intenzitásával való normalizálást követően. A HER2<sup>+</sup> tumorsejtekkel kontaktusba lépő anti-HER2 CAR T sejtek a szinaptikus régiójában a CAR és a TCR közötti PCC nem különbözött a TfR negatív kontrollétól (PCC<sub>CAR\_TCR</sub> = 0,149; PCC<sub>CAR\_TFR</sub> = 0,040), míg a GFP-CAR jel erős korrelációt mutatott az anti-CAR antitest pozitív kontrollal (PCC<sub>CAR\_CAR</sub> = 0,628; 23. ábra C).

A szinaptikus régió, az extra-szinaptikus régió és a nem stimulált CAR T sejtmembránok összehasonlításakor nem fordult elő a CAR és a TCR, illetve TfR negatív kontroll együttes eloszlása (23. ábra C). Összességében az adataink azt mutatják, hogy a TCR nem integrálódik CAR specifikus antigén felismerése során kialakuló szinaptikus kontaktrégióba és nem alakít ki molekuláris interakciót a kiméra antigén receptorral a CAR T sejtek tumorsejtekkel való asszociációja során.

#### VI.1.5. A nagyméretű receptor klaszterek és a fokozott mobilitás is előnyt jelent a korai aktiváció során

A natív CD8<sup>+</sup> T limfocitákhoz hasonlóan a CAR T sejtek is csak akkor képesek citolitikus sejtfunkciójuk ellátására, ha a specifikus molekuláris felismerést (TCR-pMHC, CAR-TAA) követően stabil szinaptikus kapcsolat épül fel az érintkező sejtek plazmamembránjai között. A natív immunszinapszis egy nagyfokú rendezettséget mutató membránstruktúra, amelynek centrumában az MHC-peptid komplexhez kapcsolódó TCR-ek aktiválják a transzkripcióhoz, proliferációhoz és citotoxikus T sejt válaszhoz vezető foszfatidilinozitol és tirozinkináz jelátviteli útvonalakat. A struktúrát a citoszkeletális hálózat átrendeződése és a kontaktfelszín szélén kialakuló adhéziós molekulagyűrű stabilizálja. A CAR immunszinapszis ezzel szemben nem csak az aktivációs jelátvitel, hanem a stabil adhézió szempontjából is a kiméra receptorokra támaszkodik. Mindkét tekintetben előnyösnek bizonyulhatnak a CAR klaszterek, melyek nagy receptorsűrűségüknél és nanométeres léptékű átmérőjüknél fogva mintegy előre összeszerelt aktivációs és adhéziós centrumként kínálkoznak. Eredményeink szerink ugyanakkor a CAR T sejt membránfelszínének csupán harmadát fedik klaszterek. A fennmaradó területen is találhatók mobilis receptorkomponensek, melyek szintén fontos szerepet játszhatnak a CAR szinapszis felépítésében és az aktivációs jel közvetítésében.

Következő lépésben tehát megvizsgáltuk az eltérő kostimulációs doménekkel rendelkező CAR-ok sejtfelszíni szerveződésének és membránbeli mobilitásának viszonyát az immunszinapszisok területéről kiinduló szignáltranszdukció hatékonyságához. A kísérlet során HER2 expresszáló N87 target sejtekkel fedett kamrákban inkubáltuk a CAR T effektor sejteket 15 percig, majd a sejtek fixálását követően a CAR-okat A488 konjugált anti-HER2-vel, a foszforilált CD3z-t A647 konjugált anti-pCD3z antitesttel, a foszforilált Lck-et fikoeritrin konjugált anti-pLck antitesttel jelöltük. A szinapszisok kiterjedését, valamint a foszforilált CD3 és Lck jelintenzitását konfokális mikroszkópia és digitális képanalízis segítségével határoztuk meg (24. ábra A).



24. ábra A korai aktiváció jelátviteli eseményeinek vizsgálata az immunológiai szinapszisban

A: Reprezentatív mikroszkópos felvételek a CAR T effektor és tumorsejtek 15 perces kokulturálását követően.

**B:** A CD3z (Felső sor, nHER2.z = 45, nHER2.CD28.z = 38, nHER2.41BB.z = 34, nHER2.CD28.41BB.z = 42) és az Lck (Alsó sor, nHER2.z = 37, nHER2.CD28.z = 32, nHER2.41BB.z = 27, nHER2.CD28.41BB.z = 34) foszforilációs szintjének meghatározása kvantitatív digitális képanalízissel.

A diagramokon az átlag (± SEM) van feltüntetve. A statisztikai összehasonlításokat egyirányú ANOVA és Bonferroni post hoc teszttel végeztük el (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Eredményeink szerint mind a HER2.CD28.41BB.z rendkívül mobilis, kisméretű mikrodoménjei, mind a lassan diffundáló HER2.z CAR-ok és előre összeszerelődött nagyméretű klaszterei hatékonyabban indukáltak CD3z foszforilációt mint a közepesen mobilis HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR-ok. Ugyanígy az Lck foszforiláció tekintetében is előnyösnek bizonyultak mind a nagyméretű HER2.z klaszterek, mind a nagyobb diffúziós sebességű HER2.CD28.41BB.z mikrodomének: előbbi a nagyobb kiterjedésű szinapszisok kialakulásának kedvezett, utóbbi fokozott Lck foszforilációval járt együtt (24. ábra B).

#### VI.1.6. Az első generációs CAR-ok indukálják a leghatékonyabb tumor eliminációt a kokulturálás első 25 órájában

A citotoxikus hatást elektromos impedancia mérésen alapuló ECIS bioszenzor segítségével jellemeztük, amely a kamra alján található arany elektródákra tapadt sejtekkel fedett terület impedanciáját méri. Az HER2-CAR T sejtek JIMT-1 target sejtekkel alkotott kokultúrájában az adherens tumorsejtek pusztulása a mért impedancia csökkenését eredményezi, lehetővé téve az effektor sejtek citotoxikus hatásának valós idejű vizsgálatát. A kísérlet során kontrollként NT T sejteket alkalmaztunk.





**25. ábra** A különböző kostimulációs doménnel rendelkező CAR T sejtek *in vitro* citotoxicitásának kinetikai analízise az elektromos impedancia mérésen alapuló ECIS bioszenzorral.

A 8 kamrás 8W10E PET lemezek aljára JIMT-1 tumorsejteket tapasztottunk ki. Az effektor/target sejt arányt 1:1re állítottuk be. Az impedanciát 25 órán keresztül követtük. A CAR T sejteket kotemporálisan, két technikai ismétlésben hasonlítottuk össze. Az átlagolt impedancia értékeket először a kiindulási impedanciával, majd a NT T sejt kontrollban mért impedanciával normalizáltuk. Az ábrán az átlagérték (± SD) van feltüntetve (n = 2). Érdekes módon, bár az első célsejttel való találkozást követő aktivációs jelátvitel a kostimulációs doménnek nem rendelkező HER2.z és a harmadik generációba tartozó HER2.CD28.41BB.z CAR T sejteknél mutatkozott a leghatékonyabbnak, a hosszabb távú citotoxikus hatékonyság nem követte ezt a tendenciát. Az ECIS-szel mért impedanciaváltozás alapján a HER2.z és a HER2.CD28.z CAR T sejtek citolitikus aktivitása már a tumorsejtekkel való kontaktusba lépés első órájában megmutatkozott, míg a HER2.41BB.z és a HER2.CD28.41BB.z CAR T sejtek mintegy két órával később kezdték meg a daganatsejtek eliminációját.

Összességében a kisméretű klaszterekkel és mobilis receptorokkal rendelkező HER2.CD28.41BB.z, és a szintén fragmentált klasztereket képző, közepes diffúziós sebességű HER2.41BB.z CAR indukálta a legkisebb mértékű tumoreliminációt, míg a HER2.z CAR-ok által képzett nagyméretű receptor aggregátumok jelenléte eredményezte a leghatékonyabb citolitikus aktivitást a tumorsejtekkel való kokultárálás első 25 órájában.

# VI.2. A CAR T sejtkészítmények fenotípus eloszlása meghatározza a tumorellenes aktivitás hatékonyságát

## VI.2.1. A RetroNectin stimuláció és LymphoONE kulturálási médium lassítja a CAR T sejtek differenciációját

A leukémiás megbetegedéseket célzó CAR T terápiák nagy fokú sikerét az alkalmazott CAR konstrukció felépítése, az *in vitro* kultiválás metodikája, és a limfociták ideális fenotípus összetételének komplex, együttes optimalizálása alapozta meg [129]. A leukémiákat és limfómákat célzó CAR T terápiák esetén mind preklinikai, mind klinikai vizsgálatok eredményei bizonyították, hogy a kevésbé differenciálódott, naiv és CM fenotípusú sejteket nagyobb arányban tartalmazó készítmények rendelkeznek a legkedvezőbb tumorellenes hatékonysággal [62,130]. Szolid tumorokat célzó terápiás modellek esetén azonban mindeddig nem született eredmény arról, hogy a CAR T limfociták differenciációjának foka és CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> fenotípusok eloszlása hogyan befolyásolja a citolitikus hatékonyságot, valamint, hogy a legelterjedtebben alkalmazott kostimulációs domének, a CD28 citotoxicitást fokozó hatása, illetve a 41BB perzisztenciát növelő effektusa hogyan befolyásolja a CAR T sejtkészítmény fenotípus profilját.

Irodalmi adatok alapján a T sejtek expanziójára optimalizált LymphoONE tápfolyadék [131], valamint a RetroNectin rekombináns fibronectin fragmenssel történő előstimuláció [69] lassítja a T sejt differenciációt, befolyásolva a sejtkészítmény proliferációs potenciálját és a naiv, centrális memória, effektor memória, illetve terminális effektor fenotípusok eloszlását. RetroNectin stimuláció emellett a citotoxikus T sejtek apoptózisának gátlásán keresztül CD8<sup>+</sup> fenotípusban domináns sejtkészítmények előállítását teszi lehetővé [69].

Kutatásaink során a RetroNectin stimuláció és a LymphoONE médium T sejt differenciációra gyakorolt hatását külön-külön és kombinálva is teszteltük. A HER2.CD28.z és a HER2.41BB.z CAR T sejteket retrovirális transzdukciós rendszerben állítottuk elő az *OKT3-antiCD28/RPMI (1)*, *OKT3-antiCD28/LymphoONE (2)*, *OKT3-RetroNectin/RPMI (3)* és *OKT3-RetroNectin/LymphoONE (4)* protokollok alkalmazásával (lásd V.3.4-es fejezet). A retrovirális transzdukció hatékonyságának és a CAR-ok expressziós szintjének ellenőrzését követően szisztematikus fenotípusvizsgálattal meghatároztuk a különböző módon létrehozott készítmények fenotípus összetételét és a helper/citotoxikus sejtek arányát. Kontrollként az NT T sejteket alkalmaztuk.



**26. ábra** Négy különböző stimulációs és kulturálási protokollal előállított HER2-CAR T sejtkészítmény kiméra receptor expressziójának meghatározása

A CAR transzdukció hatékonyságát (bal oldali diagram) és expressziós szintjét (jobb oldali diagram) HER2-Fc fúziós fehérjével és A647 konjugált anti-humán IgG másodlagos jelöléssel vizsgáltuk a transzdukciót követő 4. napon. Kontrollként NT T sejteket alkalmaztunk. Az oszlopdiagramokon az átlag (± SEM) van feltüntetve (n = 11). A statisztikai összehasonlításokat egyirányú ANOVA és Tukey post hoc teszttel végeztük el (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

A CAR<sup>+</sup> T sejtek százalékos megoszlását kifejező transzdukciós hatásfokot, és a CARok relatív expressziós szintjével arányos átlagos fluoreszcencia intenzitást receptorspecifikus fluoreszcens jelölést követően áramlási citometriával vizsgáltuk. Mind a HER2.CD28.z (Protokoll (1): 62,6±3,8%; (2): 59,9±5,6%; (3): 58,0±4,6%; (4): 50,8±5,3%; n = 11) mind a HER2.41BB.z (Protokoll (1): 69,9±5,6%; (2): 69,6±3,1%; (3): 66,3±4,8%; (4): 58,9±3,9%; n = 11) CAR stabilan expresszálódott a transzdukált T sejtek membránfelszínén. A LymphoONE médium, és a RetroNectin stimuláció alkalmazása külön-külön és együttesen is az összes kísérlet átlagában csökkentette a transzdukció hatásfokát és a kifejeződő CAR-ok relatív szintjét, a különbségek azonban nem bizonyultak statisztikailag szignifikánsnak (26. ábra).

A négyféle stimulációs és sejttenyésztési protokoll hatását CAR T készítmények összetételére a transzdukciót követő negyedik napon a HER2-felismerő doménre specifikus immunfluoreszcens jelöléssel, majd ezt követő áramlási citometriás vizsgálattal határoztuk meg. Kontrollként NT T sejteket alkalmaztunk. A helper és citotoxikus T sejtek eloszlását FITC konjugált anti-CD4 és A647 konjugált anti-CD8 antitestekkel való egyidejű jelöléssel teszteltük (27. ábra).

Az áramlási citometriás analízis nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltérést a helper/citotoxikus T sejtek arányában a különböző protokollal előállított CAR T sejtkészítmények között, ugyanakkor a LymphoONE médium és a RetroNectin stimuláció egyedi és kombinált alkalmazása is tendenciózusan növelte a CD8<sup>+</sup> limfociták arányát mind a HER2.CD28.z (Protokoll (1):  $35,8\pm2,7\%$ ; (2):  $42,4\pm4,1\%$ ; (3):  $43,3\pm4,3\%$ ; (4):  $45,1\pm4,8\%$ ; n = 8) mind a HER2.41BB.z (Protokoll (1):  $35,4\pm3,3\%$ ; (2):  $42,0\pm4,8\%$ ; (3):  $44,7\pm5,9\%$ ; (4):  $45,4\pm5,4\%$ ; n = 8) CAR T sejtek esetén (26. ábra B), alátámasztva a RetroNectin reagens és a T sejtek expanziójára optimalizált LymphoONE médium citotoxikus T limfocitákra gyakorolt antiapoptotikus hatását.



**27. ábra:** Négy különböző stimulációs és kulturálási protokollal előállított HER2-CAR T sejtkészítmény CD4<sup>+</sup> és CD8<sup>+</sup> összetételének meghatározása.



A CAR T sejtek progresszív differenciációja során a naiv sejtekből kialakuló centrális memória (CM), effektor memória (EM) és terminális effektor (TE) fenotípusok eloszlását FITC konjugált anti-humán CCR7 és APC konjugált anti-humán CD45RA jelölés segítségével különítettük el és áramlási citometriával vizsgáltuk. A naiv fenotípust CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, a CM fenotípust CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>, a TE fenotípust CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup> T sejtekként definiáltuk.

Eredményeink szerint a RetroNectin stimuláció és LymphoONE médium önmagában és kombinálva is növelte a naiv, és csökkentette a TE sejtpopuláció arányát (28. ábra; bal felső, jobb alsó hisztogramok), az eltérés azonban a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el. A RetroNectin stimuláció és a LymphoONE kulturálási médium kombinált hatása a T sejt differenciációra a CM és EM fenotípusok eloszlásában eredményezett szignifikáns különbségeket. Az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított HER2.CD28.z és

HER2.41BB.z CAR T sejtkészítmények nagyobb arányban tartalmaztak CM sejteket (28. ábra; jobb felső hisztogram; HER2.CD28.z: (1) vs. (4):  $32,8\pm2,0\%$  vs.  $47,3\pm5,8\%$ ; HER2.41BB.z: (1) vs. (4):  $34,5\pm5,2\%$  vs.  $54,5\pm4,8\%$ ), míg az *OKT3-antiCD28/RPMI* protokoll esetén az EM fenotípus szignifikáns dúsulása volt megfigyelhető (28. ábra; bal alsó hisztogram; HER2.CD28.z: (1) vs. (4):  $27,8\pm2,2\%$  vs.  $16,4\pm3,5\%$ ; HER2.41BB.z: (1) vs. (4):  $37,3\pm7,2\%$  vs.  $16,6\pm4,3\%$  n = 7).



fenotípus összetételének meghatározása.

A naiv (CCR7, CD45RA dupla pozitív; bal felső diagram), centrális memória (CCR7 pozitív, CD45RA negatív; jobb felső diagram), effektor memória (CCR7, CD45RA dupla negatív; bal alsó diagram), és terminális effektor (CCR7 negatív, CD45RA pozitív; jobb alsó diagram) fenotípusok eloszlását FITC konjugált anti-humán CCR7 és APC konjugált anti-humán CD45RA jelöléssel határoztuk meg 4 nappal a transzdukciót követően. Kontrollként NT T sejteket alkalmaztunk.

Az oszlopdiagramokon az átlag ( $\pm$  SEM) van feltüntetve (n = 7). A statisztikai összehasonlításokat egyirányú ANOVA és Tukey post hoc teszttel végeztük (\*p<0,05).

A szisztematikus fenotípusvizsgálat eredményei tehát azt mutatták, hogy a RetroNectin stimuláció és a LymphoONE médium kombinált alkalmazása jelentős mértékben lassítja a differenciációt mind a HER2.CD28.z mind a HER2.41BB.z CAR T sejtek esetén, eltérő CM és EM fenotípus eloszlást eredményezve. Mivel a legjelentősebb különbség az *OKT3-antiCD28/RPMI* és *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* sejtkészítmények között jelentkezett, a továbbiak során ezen két protokollokkal előállított CAR T sejtek *in vitro* és *in vivo* tumorellenes hatékonyságát és perzisztenciáját vizsgáltuk.

### VI.2.2. A fenotípus eloszlás hatása az aktivált HER2-CAR T sejtek citokin kibocsájtására az alkalmazott kostimulációs doméntől függ

A CM- vagy EM irányú differenciáció hatását az antigénspecifikus stimulációt követő jelátviteli útvonalak aktivitására foszfo-proteom profilalkotással vizsgáltuk. Ennek során a CAR T sejteket 1 µg/ml HER2-Fc-vel bevont platefelszínen inkubáltuk 0,5; 2,5; vagy 7 percig, majd a mintákat egyesítettük, lizáltuk, és 43 különböző foszforilált fehérjére specifikus befogó antitesttel pontozott nitrocellulóz membránokra vittük fel. Az immunreaktív pontokat a kemilumineszcens jel detektálásával hívtuk elő, majd elemeztük a relatív foszfokináz szinteket. Mindkét protokollal előállított HER2.CD28.z CAR T sejtkészítményben növekedést mutatott a c-jun N-terminális kinázok (c-Jun N-terminal kinase, JNK) és a 40 kDa-os prolin gazdag Akt szubsztrát (Proline-rich Akt substrate of 40 kDa, PRAS40) foszforilációja a HER2.41BB.z CAR limfocitákhoz képest (29. ábra A), ami koherens a CD28 által közvetített kostimuláció jelátviteli útvonalával [132,133]. Emellett a T sejt differenciáció szabályozásában szerepet játszó glikogén-szintáz kináz 3 (Glycogen synthase kinase 3, GSK-3) fokozott foszforilációt mutatott a CM-ben dúsított CAR T sejtek esetén az EM-ben dúsított sejtkészítményekhez képest, ami magyarázza az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokoll differenciációt késleltető hatását [134].

A CM domináns *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* és az EM domináns *OKT3antiCD28/RPMI* CAR T sejtek effektor funkcióit első lépésben a specifikus antigén indukált citokin termeléssel jellemeztük tisztán molekuláris körülmények között. Az effektor sejteket 24 órán keresztül 1µg/ml HER2-Fc molekulával fedett tenyésztőedényben inkubáltuk, majd ELISA módszer segítségével meghatároztuk a felülúszó IFNγ és IL-2 koncentrációját. Kontrollként sejtmentes médiumot, NT T sejteket, és antigén nélküli CAR T sejt inkubációt alkalmaztunk.

Az immobilizált HER2-Fc általi aktiváció hatására az *OKT3-antiCD28/RPMI* protokollal előállított, EM fenotípusú limfocita többlettel rendelkező CAR T sejtek jelentősen több IFNγ és IL-2 citokint termeltek, mely különbség a HER2.41BB.z CAR T sejtek esetén szignifikánsnak bizonyult (29. ábra B; bal szélső és középső hisztogram). A kontroll NT T sejtek felülúszójában nem volt megfigyelhető citokin felszabadulás, alátámasztva, hogy a T sejt aktiváció kizárólag az antigén-specifikus CAR expressziójától és a célmolekula jelenlététől függ.



**29. ábra**: Az eltérő fenotípus profillal rendelkező aktivált HER2-CAR T sejtek citokin termelésének, kimerülésének, és foszfo-proteom profiljának jellemzése

A: A CD28.z és 41BB.z CAR T sejtek antigénspecifikus stimulációját követő jelátviteli útvonalak szempontjából releváns protein kinázok és szubsztrátok relatív foszforilációs szintjét a Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array kitettel vizsgáltuk. A relatív foszfokináz szinteken felügyelet nélküli kétirányú hierarchikus klaszterezést végeztünk az R-alapú ClustVis segítségével. A sorok és oszlopok klasztereit átlagos láncmódszerrel csoportosítottuk, és hőtérképen jelenítettük meg. A hőtérképen az átlagos pixelintenzitás értékeket (~1-től 4000-ig terjedő tartomány) –1,5-től 1,5-ig terjedő skálára transzformáltuk a szemléletesebb ábrázolás érdekében. **B**: *OKT3-antiCD28/RPMI* és OKT3-RetroNectin/LymphoONE protokollal előállított CD28.z és 41BB.z HER2-CAR T sejtet inkubáltunk 24 órán keresztül 1  $\mu$ g/ml HER2-Fc fedett tenyésztőedényben. A felülúszók IFN $\gamma$  és IL-2 koncentrációját ELISA módszer, a TIM-3 T sejt kimerülési marker relatív szintjét a Proteome Profiler Human XL Cytokine Array kit segítségével határoztuk meg. Kontrollként sejtmentes médiumot, NT T sejteket, és antigén nélküli CAR T sejt inkubációt alkalmaztunk. Az ábrákon az átlag (± SEM) van feltüntetve (n = 6). A statisztikai összehasonlításokat párosítatlan t-teszttel végeztük (\*p<0,05, \*\*p<0,01).

Ezt követően megvizsgáltuk a differenciációs szint hatását a CAR T sejtkészítmények kimerültségére. A TIM-3 különféle effektor sejteken expresszálódó transzmembrán fehérje, melynek mátrix metalloproteinázok által lehasított oldható formája a T sejtek kimerülésének markere [135].

Az immobilizált HER2-Fc-vel fedett tenyésztőedényben végzett 24 órás inkubáció alatt a CM fenotípus domináns HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségű szolibilis TIM-3-at termeltek, mint az EM fenotípus többlettel rendelkező CAR limfociták (29. ábra B, bal szélső hisztogram), amely az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított CM domináns CAR T sejtkészítmények fokozott kimerülésére utalt.

Következő lépésben az IFNγ termelést különböző HER2 expresszáló tumor sejteken (MDA-HER2, N87, JIMT1) történő inkubációt követően vizsgáltuk. Az effektor és tumor sejteket 1:1 arányban tenyésztettük 24 órán keresztül, majd ELISA módszerrel meghatároztuk a mintafelülúszók IFNγ koncentrációját.

OKT3-antiCD28 / RPMI

OKT3-RetroNectin / LymphoONE



**30. ábra**: A különböző stimulációs és sejttenyésztési protokollokkal előállított CAR T sejtek IFNγ termelése target specifikus aktiváció hatására

*OKT3-CD28/RPMI* és *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtet inkubáltunk MDA-HER2, N87, valamint JIMT-1 tumor sejtekkel borított tenyésztőedényben az effektor és target sejtek 1:1-es aránya mellett. 24 órán keresztül tartó kulturálást követően ELISA módszer segítségével határoztuk meg a felülúszók IFN $\gamma$  koncentrációját. Kontrollként sejtmentes médiumot, NT T sejteket, tumorsejtek nélküli CAR T sejt inkubációt, valamint a HER2 negatív MDA sejtvonalat alkalmaztuk. A diagramokon a minták átlagértéke (± SEM) van feltüntetve (n = 6). A statisztikai elemzés során párosítatlan t-tesztet alkalmaztuk (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

Azt tapasztaltuk, hogy a molekuláris HER2 antigénnel való stimuláció során megfigyelt eredményekkel szemben a HER2<sup>+</sup> tumorsejtekkel (MDA-HER2, N87, JIMT1) kokulturált effektorsejtek inkoherens citokin szekréciót mutattak. A kétféle HER2.CD28.z CAR T sejtkészítmény közül az EM-irányított (*OKT3-CD28/RPMI* protokoll) mutatott szignifikánsan magasabb IFNγ termelést, míg a HER2.41BB.z CAR limfociták esetén a CM domináns (*OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokoll) effektor szekretáltak több citokint (30. ábra). A kontrollként alkalmazott NT T sejtek és a HER2<sup>-</sup> MDA target sejtek kokultúráiban nem volt detektálható IFNγ kibocsájtás, megerősítve, hogy az effektor sejtek hatása csak a target antigén jelenlétében alakul ki.

#### VI.2.3. Az effektor memória fenotípus többlet fokozza a CAR T sejtkészítmények *in vitro* citotoxicitását

A következőkben az eltérő fenotípus profillal rendelkező CAR T sejtek *in vitro* citotoxicitását a kezelést túlélő tumorsejtek luciferáz aktivitása alapján vetettük össze. Ennek során 1:1 arányú kokultúrát képeztünk CAR T effektor sejtekkel és luciferáz expresszáló tumorsejtekkel (MDA-HER2.ffLuc, JIMT1.ffLuc, N87.ffLuc). 24 órás inkubációt követően a CAR T sejteket eltávolítottuk a tenyésztőedény aljához tapadó tumorsejtekről, majd D-luciferin reagenst adtunk a mintákhoz. A luciferáz enzim ATP jelenlétében a luciferin oxidációját katalizálja, melyet fotonkibocsájtás kísér. A lumineszcencia detektálásával az élő tumorsejtek mennyiségéről kapunk információt, melyek relatív arányát a kezelés nélküli, illetve az NT T sejtekkel kezelt kontroll mintákban mért fényintenzitás viszonylatában határoztuk meg. A CAR T sejtek citolitikus aktivitásának antigén-specificitását HER2<sup>-</sup> MDA sejtvonal alkalmazásával vizsgáltuk.

A target specifikus aktivációt követő citokin felszabadulás esetén megfigyelt eredményeinkkel összhangban mind az *OKT3-CD28/RPMI*, mind az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek képesek voltak a HER2<sup>+</sup> tumorsejtek felismerésére és elpusztítására (31. ábra). A HER2<sup>-</sup> MDA sejtekkel inkubált NT T sejtek esetén nem volt megfigyelhető citolitikus aktivitás, megerősítve, hogy a HER2-CAR T sejtek hatása antigén specifikus.

Eredményeink azt mutatták, hogy az EM-dúsított *OKT3-CD28/RPMI* HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejtek robusztusabb tumorellenes hatékonysággal rendelkeznek a CM fenotípus domináns *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* CAR T sejtekhez képest (31. ábra).



31. ábra Különböző protokollokkal előállított CAR T sejtek vitro citotoxicitásának vizsgálata

A CAR T sejtek *in vitro* citotoxicitását a tumorsejtek luciferáz aktivitását kísérő lumineszcens fénykibocsájtás alapján határoztuk meg. MDA-HER2.ffLuc, N87.ffLuc, illetve JIMT-1.ffLuc tumor sejteket *OKT3-CD28/RPMI*, illetve *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR T sejttel kokulturáltuk 1:1 arányban 24 órán keresztül. A luciferáz aktivitást D-luciferin reagens hozzáadásával, az enzimreakciót kísérő fénykibocsájtást luminométerrel mértük. Kontrollként CAR T sejt mentes médiumot, NT T sejteket, valamint a HER2<sup>–</sup> MDA sejtvonalat használtuk. Az oszlopdiagramokon a minták átlagértéke (± SEM) van feltüntetve (n = 6). A statisztikai elemzés során párosítatlan t tesztet alkalmaztunk (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Az alkalmazott HER2<sup>+</sup> tumor sejtvonalak közül az MDA-HER2 "könnyű" célpontnak bizonyult, melyet mind az *OKT3-CD28/RPMI*, mind az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* CAR T sejtek hatékonyan elpusztítottak, míg a JIMT-1 sejtek jelentős része túlélte a kezeléseket. Ezért annak érdekében, hogy a CAR T sejtkészítmények fenotípusprofiljának szerepét hatékonyan vizsgálni tudjuk, későbbi *in vivo* kísérleteinkben a JIMT-1 sejtvonalat alkalmaztuk.

### VI.2.4. Az előrehaladott differenciációs fokú CAR T sejtek nagyobb proliferatív kapacitást mutatnak sorozatos *in vitro* stimuláció során

A különböző tenyésztési körülményekben előállított CAR T sejtek expanziós képességét és fenotípus profiljuk hosszú távú változását ún. "rechallenge" kísérletben vizsgáltuk. Ennek során a CAR T sejteket 3,5 napig 1 µg/ml immobilizált HER2-Fc molekulán inkubáltuk, majd áramlási citometria segítségével meghatároztuk a sejtszámot. Ezt követően a kiindulási sejtszámmal azonos mennyiségű CAR T sejtet újra aktiváltunk a HER2-Fc molekulával frissen bevont tenyésztőedényben.



32. ábra Antigén-stimulált CAR T sejtkészítmények perzisztenciája és fenotípus eloszlása.

A: Az ún. "rechallenge" kísérletben *OKT3-CD28/RPMI*, illetve *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított HER2.CD28.z vagy HER2.41BB.z CAR T sejtet helyeztünk 1 μg/ml HER2-Fc molekulával borított 96 lyukú lapos aljú tenyésztőedényre, duplikátumokban. A kísérlet minden 3,5. napján meghatároztuk a sejtszámot áramlási citometriával. Amennyiben rendelkezésre állt, a kiindulási sejtszámmal azonos mennyiségű sejtet a kiindulási körülményekkel azonos módon újra aktiváltunk. Az expanziós rátát az adott mérési nap sejtszámát a kiindulási sejtszámmal elosztva számítottuk ki (n = 10).

**B**: A CD4 és CD8 pozitivitást FITC konjugált anti-CD4 és A647 konjugált anti-CD8 jelöléssel határoztuk meg a kísérlet 3,5. és 10,5. napján, áramlási citometriás analízissel (n = 3).

C: A centrális és effektor memória fenotípusok eloszlását FITC konjugált anti-humán CCR7 és APC konjugált anti-humán CD45RA jelöléssel határoztuk meg a kísérlet 3,5. és 10,5. napján, áramlási citometriás analízissel (n = 3).

A diagramokon az átlag (± SEM) van feltüntetve. A statisztikai összehasonlításokat párosítatlan t teszttel végeztük (n = 7, \*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

A proliferációs rátát az adott napon mért sejtszám kiindulási sejtszámmal való osztásával számoltuk ki. Amennyiben a proliferációs ráta 1 alá esett, az összes rendelkezésre álló CAR T sejtet újrastimuláltuk. Az expandált CAR T sejtek centrális és effektor memória, illetve CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> fenotípusainak eloszlását áramlási citometriával jellemeztük a kísérlet 3,5 és 10,5. napján. Kontrollként NT T sejteket alkalmaztunk.

Eredményeink korábbi megfigyeléseinkkel összhangban azt mutatták, hogy az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított, CM fenotípus domináns CD28.z és 41BB.z HER2-CAR T sejtek gyorsabban merültek ki a sorozatos antigén stimuláció hatására, mint az EM fenotípusban dúsulást mutató *OKT3-antiCD28/RPMI* sejtkészítmények (32. ábra A, CD28.z és 41BB.z folytonos vonalak vs. CD28.z és 41BB.z szaggatott vonalak). A *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított CD28.z CAR limfociták expanziója a kísérlet 10,5. napjától fokozatos csökkenést mutatott, ugyanezen 41BB.z CAR T sejtek proliferációs rátája már a 7. napot követően 1 alá esett.

A CAR T sejtek CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> eloszlását a kísérlet 3,5. és 10,5. napján vizsgálva megállapítottuk, hogy az *OKT3-Retronectin/LymphoONE* CAR T sejtek esetén a sorozatos CAR-specifikus antigénstimuláció jelentősen csökkentette a CD4<sup>+</sup> T sejtek gyakoriságát (32. ábra B; CD28.z és 41BB.z, *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* oszlopok). A hosszú távon fenntartott stimuláció során egyedül az *OKT3-antiCD28/RPMI* protokollal előállított HER2.CD28.z CAR limfociták őrizték meg a kiindulási arányokkal (lásd 27. ábra) azonos, kiegyensúlyozott CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> eloszlást. Az *OKT3-Retronectin/LymphoONE* protokoll differenciációt lassító hatása a sorozatos stimuláció során szignifikáns mennyiségű CM CAR T sejt EM-irányú differenciációját akadályozta meg (32. ábra D; CD28.z és 41BB.z, *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* oszlopok).

## VI.2.5. A kiegyensúlyozott CD4/CD8 arányú, EM domináns CAR T sejtekkel való kezelés teljes tumor eradikációhoz vezet *in vivo* xenograft modellben

Az utolsó, preklinikai kísérletsorozatunkban az EM és CM domináns CAR T sejtkészítmények *in vivo* tumorellenes aktivitását és tumorinfiltrációs/expanziós potenciálját hasonlítottuk össze HER2<sup>+</sup> JIMT-1 xenograft modellben. A xenograftokat a nőstény NSG egerek 7 hetes korában inokuláltuk,  $3 \times 10^6$  JIMT-1.ffLuc szubkután injekciójával. Egyedenként 2 oltást végeztünk a 2 hátsó végtag dorzális oldalán. Az egereket egyszeri dózisban kezeltük 2,5×10<sup>6</sup> HER2-CAR T sejt intravénás injekciójával a xenograft beoltását követő 14. napon. Kontrollként 2,5×10<sup>6</sup> NT T sejtet alkalmaztunk.



33. ábra Az EM fenotípus domináns, kiegyensúlyozott CD4/CD8 arányú HER2.CD28.z CAR T sejt kezelés a HER2<sup>+</sup> tumor xenograftok teljes eradikációjához vezet *in vivo* 

A: A kezelés sémája. Az egereket  $3 \times 10^6$  JIMT-1.ffLuc sejttel oltottuk, melyeket a xenograft beoltását követő 14. napon egyszeri dózisban kezeltük  $2,5 \times 10^6$  HER2-CAR T sejt intravénás injekciójával. Kontrollként  $2,5 \times 10^6$  NT T sejtet alkalmaztunk. A tumorméretet biolumineszcens detektálás segítségével követtük.

**B**: A JIMT-1.ffLuc xenograft transzplantot hordozó egyedekről készült reprezentatív biolumineszcens felvételek. **C, bal oldali panel**: A JIMT-1.ffLuc xenograft tumorok biolumineszcens felvételeinek kvantitatív elemzése. Az ábrán az átlag ( $\pm$  SEM) van feltüntetve (Átlagos totál radiancia = foton/s/cm<sup>2</sup>/sr; *OKT3-antiCD28/RPMI* vs. *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* HER2-CAR T sejt kezelés: \*\*p<0,01; n = 5).

**C, jobb oldali panel**: Az egyedek túlélésének analízise Kaplan-Meier módszerrel (*OKT3-antiCD28/RPMI* vs. *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* HER2-CAR T sejt kezelés: \*\*\*p<0,001; *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* NT vs. *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* HER2-CAR T sejt kezelés: \*\*\*p<0,001; n = 5).

A kísérlet sémáját a 33. ábra A panelje szemlélteti. A JIMT-1.ffLuc daganat növekedését D-luciferin intraperitoneális injektálását követően IVIS Spectrum CT készülékkel monitoroztuk 7 naponta (33. ábra B). A biolumineszcens jel intenzitását foton/másodperc/ négyzetcentiméter/szteradián (p/s/cm<sup>2</sup>/sr) értékben határoztuk meg. *In vitro* eredményeinkkel összhangban az *OKT3-antiCD28/RPMI* protokollal előállított, EM domináns CAR T sejtek robosztus tumorellenes aktivitással rendelkeztek, aminek köszönhetően a vizsgált egyedek 100%-os túlélést mutattak (33. ábra C,D; CD28.z és 41BB.z folytonos vonalak). Ezzel szemben a differenciációt korlátozó *OKT3-Retronectin/LymphoONE* stimulációs és kulturálási metódus sejtkészítményeivel való kezelés csak kis mértékben lassította a xenograft tumorok növekedését, melynek következtében a kísérlet 100. napjára az egyedek mintegy 80%-a elpusztult, vagy terminálni kellett a tumor túlnövekedése miatt (33. ábra C,D; CD28.z és 41BB.z szaggatott vonalak).

Az EM-differenciáció felé irányított CAR T sejtek közül azonban egyedül az *in vitro* eredményeink során kimutatott, kiegyensúlyozott CD4/CD8 eloszlással rendelkező CD28.z CAR limfocita kezelés eredményezett teljes tumor eradikációt (33. ábra C; CD28.z vs. 41BB.z folytonos vonalak). Az NT T sejtek esetén nem jelentkezett tumorellenes aktivitás, megerősítve a CAR T sejtek specificitását (33. ábra C; NT folytonos és szaggatott vonalak).

## VI.2.6. Az EM domináns CAR T sejtek hatékony tumor infiltrációt és expanziót mutatnak *in vivo* xenograft modellben

Miután megállapítottuk, hogy az EM domináns *OKT3-antiCD28/RPMI* HER2-CAR T sejtkészítmények hatékonyabb *in vivo* tumorellenes aktivitással rendelkeznek, mint a CM domináns *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* protokollal előállított párjaik, meghatároztuk, hogy ezen jelenség összefüggésben áll-e a nagyobb expanzióval és/vagy perzisztenciával az infúziót követően. Az *in vivo* kísérleteket az előzőek során bemutatott körülményekkel azonos módon hajtottuk végre, azzal a különbséggel, hogy ezúttal a CAR T sejtek expresszálták a biolumineszcens detektálást lehetővé tevő ffLuc-ot (NT.ffLuc, CD28.z.ffLuc, 41BB.z.ffLuc), és nem a JIMT-1 tumorsejtek (34. ábra A).

Eredményeink szerint az EM fenotípus domináns CD28.z CAR T sejtkészítmények gyorsabban és hosszabb ideig expandáltak a tumor xenograft területén, mint a CM dúsított HER2-CAR T sejttermékek (34. ábra C; *OKT3-anti-CD28/RPMI* CD28.z.ffLuc vs. *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* CD28.z.ffLuc, \*\*p<0,01). Ezzel összhangban az EM fenotípusban dúsított 41BB.z CAR T sejtek expanziója is felülmúlta kevésbé differenciált párjukét (34. ábra C; *OKT3-anti-CD28/RPMI* 41BB.z.ffLuc vs. *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* 41BB.z.ffLuc).



**34. ábra**: A EM-domináns *OKT3-antiCD28/RPMI* CD28.z CAR.ffLuc T sejtek robusztus infiltrációt és expanziót mutatnak az *in vivo* tumor xenograftban

A: A kezelés sémája. Az egereket  $3 \times 10^6$  JIMT-1 sejttel oltottuk, melyeket a xenograft beoltását követő 14. napon egyszeri dózisban kezeltük  $2,5 \times 10^6$  HER2-CAR.ffLuc T sejt intravénás injekciójával. Kontrollként  $2,5 \times 10^6$  NT.ffLuc T sejtet alkalmaztunk. A HER2-CAR.ffLuc és NT.ffLuc T sejtek tumor infiltrációját és expanzióját biolumineszcens detektálás segítségével követtük.

B: A JIMT-1 xenograft injektált egyedekről készült reprezentatív biolumineszcens felvételek.

C: A JIMT-1 xenograft tumorokat infiltráló HER2-CAR.ffLuc T sejtek biolumineszcens felvételeinek kvantitatív elemzése. Az ábrán az átlag (± SEM) van feltüntetve (Átlagos totál radiancia = foton/s/cm<sup>2</sup>/sr; CD28.z.ffLuc *OKT3-antiCD28/RPMI* vs. CD28.ffLuc *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* HER2-CAR: \*\*\*p<0,001).

A 41BB.z CAR T sejtek az injekciót követően lassú, de folyamatosan növekvő proliferációt mutattak a kísérlet teljes időtartama alatt, míg a CD28.z CAR T limfociták kezdeti gyors szaporodása a kísérlet 28. napjától lelassult. Az NT.ffLuc T sejtek nem expandáltak, összhangban tumorellenes aktivitás hiányával (34. ábra C).

### VII. Megbeszélés

Az autológ immunsejtek mint terápiás hatóanyagok komplexitásuknál fogva összetett kihívást jelentenek a klinikai alkalmazásuk optimalizálására irányuló törekvésekben. A CAR-ok közvetítette tumorspecifikus citotoxikus hatás, a terápiás limfociták hosszú távú perzisztenciája, és a fellépő mellékhatások súlyossága ezer szálon kapcsolódik a mesterségesen beépített receptor és a T sejt fiziológiás működésének szinergiájához. A CAR, akárcsak bármely más természetes membránreceptor, komplex sejtfelszíni struktúrákat alakíthat ki, kiméra természeténél fogva számos ponton léphet kölcsönhatásba az alkalmazott domének natív partnereivel, és a stimulációját követő aktivációs szignál összefonódik a limfociták endogén jelátviteli folyamataival. A B sejtes leukémiák és limfómák kezelésében alkalmazott CAR T terápiák sikerét a konstrukció felépítésétől a heterogén sejtkészítmény fenotípus profiljáig a rendszer összetett optimalizálása alapozta meg. A szolid szervi daganatokat célzó CAR T sejtek klinikai tapasztalatai azonban egyelőre elmaradnak a várakozástól [8], szükségessé téve olyan beavatkozási pontok azonosítását, amelyek által hatékonyságuk növelhető.

### VII.1. A kostimulációs domének meghatározzák a CAR-ok sejtfelszíni szerveződését és a CAR T sejtek aktivációját

A kiméra receptor konstrukció kostimulációs endodoménjei alapjaiban határozzák meg a CAR T sejtek hosszú távú terápiás potenciálját. A második generációs kiméra receptorok tekintetében a CD28 kostimulációs doménnel rendelkező HER2-specifikus CAR-ok ígéretes tumorellenes hatékonyságot mutattak preklinikai állatkísérletekben [103], de nem váltottak ki terápiás választ klinikai vizsgálatokban [46,97]. A 41BB.z HER2-CAR T sejtek kutatócsoportunk eredményei szerint korlátozott daganatellenes aktivitással rendelkeznek HER2-pozitív xenograft modellben [136]. A harmadik generációs CAR-okat abban a reményben fejlesztették ki, hogy a CD28 és 41BB kostimulációs domének kombinálásával összeadódhatnak az általuk biztosított előnyös tulajdonságok is. Az előzetes várakozásokkal szemben azonban a harmadik generációs CAR T sejtek nem növelték a citotoxikus hatékonyságot és az élettartamot, ellenben halálos kimenetelű mellékhatás kialakulását okozták egy HER2-pozitív metasztatikus vastagbélrákot célzó klinikai vizsgálatban [1]. Ez a sajnálatos eset rámutat, hogy szükséges a CAR-ok molekuláris működésének lehető legszélesebb körű feltárása a terápia klinikai fázisba lépését megelőzően. A kostimulációs alegységek az antigén specifikus stimulációt követő szignál transzdukciós útvonalakra gyakorolt hatásuk mellett befolyásolhatják a kiméra receptorok alapvető molekuláris tulajdonságait, ide értve a fehérjeszerkezetet, illetve a membránbeli szerveződést és mobilitást.

Ezen effektus vizsgálatára szisztematikusan összehasonlítottuk az első, második és harmadik generációba tartozó, eltérő kostimulációs doménekkel rendelkező HER2-specifikus CAR-ok molekuláris struktúráját, sejtfelszíni szerveződését és mobilitását; majd ezen paraméterek jelentőségét a korai citolitikus aktivitás kinetikájával összefüggésben vizsgáltuk.



**35. ábra** CAR molekuláris szerkezet, sejtfelszíni szerveződés és mobilitás összefüggése a proximális jelátvitel hatékonyságával és a korai citolitikus aktivitással

Elsőként azt demonstráltuk, hogy az I. generációs .z és a II. generációs CD28.z CARok főként dimereket alkotnak, és kevesebb, de nagyobb kiterjedésű sejtfelszíni klaszterbe szerveződnek a nyugvó sejtmembránban. Ezzel szemben a 41BB.z és a CD28.41BB.z CAR-ok jelentős része oligomer állapotban van, amelyek szignifikánsan kisebb méretű, de nagyobb számú membrán klaszterekbe tömörülnek. Ez a megfigyelés részben magyarázható a CAR konstrukciók szerkezet predikciós modelljeivel, amelyek azt sugallják, hogy a 41BB kostimulációs endodomének beépítése egyedi tercier struktúrát eredményez a 41BB.z és CD28.41BB.z CAR-ok esetében, elősegítve a CAR-ok antigén független oligomerizációját. Azonban ezen eredmények nem zárják ki egyéb molekuláris mechanizmusok, mint például az scFv közvetített keresztkötés szerepét az antigénfüggetlen aggregáció során, amelyről korábban kimutatták, hogy indukálhatja receptorklaszterek képződését [137]. Ezt követően a különböző kostimulációs doménnel rendelkező CAR-ok sejtfelszíni mobilitását fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával vizsgáltuk. Az egyéni fluktuációs ingadozások elemzése azt mutatta, hogy a .z konstrukció, amely gyakran rendeződött nagyobb méretű membránklaszterekbe, lényegesen lassabban, a CD28.41BB.z CAR jelentősen gyorsabban mozog a CAR T sejt membránban, mint a második generációs CD28.z vagy 41BB.z CAR-ok. Fő megfigyelésünk szerint a kiméra receptorok oldalirányú diffúziója arányosan gyorsul, ahogy azok CD3z effektor endodoménje egyre távolabb kerül a membránfelszíntől. Ezen megfigyelés feltételezhetően arra vezethető vissza, hogy a CD3z effektor domén natív kölcsönhatása a plazmamembránban található foszfoinozitidekkel [127] csökkenti a laterális diffúziós sebességet, mivel irodalmi adatok alapján a TCR/CD3 komplex sejtfelszíni mobilitása jelentős mértékben növekszik az ezen lipidekkel való asszociáció gátlása esetén [128].

Mivel a CAR T sejtekben a kiméra receptor a fiziológiás TCR/CD3 komplexszel egyidejűen expresszálódik, megvizsgáltuk a natív TCR-hez kapcsolódó CD3ζ lánc akkumulációját a CAR T sejtek és tumorsejtek kontaktusa során felépülő immunszinapszisban. A CD28 és a 41BB kostimulációs endodomént expresszáló receptorok nem lépnek közvetlen interakcióba a TCR komplexszel annak specifikus lingandasszociációja során, ezért a TCR integrációját a CAR közvetített antigén specifikus szinapszisban első generációs HER2.z.GFP kiméra receptorok alkalmazásával vizsgáltuk. Adataink cáfolták a TCR/CD3 komplex integrálódását a CAR specifikus szinaptikus kontaktrégióba, és molekuláris interakcióját a CAR T immunszinapszis elemeivel.

Balagopalan és munkatársai kimutatták, hogy a TCR nanoklaszterek jelenléte a nyugvó T sejt membránban javítja stimulációt követő jelátvitelt [138]. Ezen eredményekre alapozva feltételeztük, hogy az előre összeszerelődött receptor klaszterek, valamint a klasztereken kívül elhelyezkedő receptorok mozgékonysága hatással lehet az immunológiai szinapszis kialakulására és a stimulációt követő jelátviteli útvonalak aktivációjának kinetikájára az effektor sejtek tumorsejtekkel való kontaktusba lépését követően. A CAR-ok akkumulációját és a korai aktiváció szignáltranszdukcióját konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk, foszfo-CD3z és foszfo-Lck specifikus jelölést alkalmazva. A felvételek kvantitatív elemzése szerint a HER2.z és a HER2.CD28.41BB.z konstrukciók erősebb rövid távú CD3z és Lck foszforilációt váltottak ki, mint a HER2.CD28.z és a HER2.41BB.z CAR-ok, arra utalva, hogy a klaszterképződés és a magas receptor mobilitás is előnyös lehet a korai aktiváció során. A CAR-ok citotoxikus hatásának tekintetében ugyanakkor a fragmentált klaszter struktúrákat alkotó, magas mobilitású CD28.41BB.z és 41BB.z HER2-CAR-ok bizonyultak a legkevésbé hatékonynak a tumorsejtekkel való kokulturálás első 25 órájában.

# VII.2. A HER2-CAR T sejtkészítmények fenotípus profilja meghatározza a tumorellenes aktivitás hatékonyságát

A hematológiai megbetegedéseket célzó CAR T sejtek nagyfokú sikeréhez hozzájárult a T sejtek érési és differenciálódási folyamatainak eredményeként heterogén sejtpopulációkkal rendelkező terápiás sejtkészítmények fenotípus összetételének optimalizálása. Preklinikai és klinikai vizsgálatok eredményei bizonyították, hogy kevésbé differenciálódott, naiv és centrális memória sejteket nagyobb arányban tartalmazó citotoxikus CAR T sejtek rendelkeznek a legkedvezőbb tumorellenes hatékonysággal B sejtes leukémiákkal és limfómákkal szemben [62,130]. Szolid tumorokat célzó terápiás modellek esetén azonban mindeddig nem született eredmény arról, hogy a CAR T limfociták fenotípus profilja hogyan befolyásolja a citolitikus hatékonyságot, valamint, hogy a legelterjedtebben alkalmazott CD28 és 41BB kostimulációs endodomének citotoxicitást fokozó hatása, illetve perzisztenciát növelő effektusa hogyan hat kölcsön a CAR T limfociták fenotípus kompozíciójának alakulásával.

Kutatómunkánk során eltérő fenotípus profilú CD28.z és 41BB.z HER2-CAR T sejteket állítottunk elő hagyományos (*OKT3-anti-CD28/RPMI*) és T sejt differenciációt korlátozó (*OKT3-RetroNectin/LymphoONE*) protokollok segítségével. Szisztematikus fenotípus vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* stimulációs és kulturálási metodika alkalmazásának hatására a CAR T sejtek szignifikánsan nagyobb arányban tartalmazták a centrális memória fenotípust, továbbá tendenciózus emelkedés jelentkezett a CD8<sup>+</sup> citotoxikus sejtek számában. Ezzel szemben az *OKT3-anti-CD28/RPMI* protokollal előállított sejttermékekben az effektor memória fenotípus arányának növekedése volt megfigyelhető.

Az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* sejtkészítmények megemelkedett CD8<sup>+</sup> szintjére mechanisztikus magyarázatául szolgálhat a GSK-3 21-es szerinjének fokozott foszforilációja ebben a csoportban. A GSK-3 S21-es foszforilációja inaktiválja a molekulát, ami a T-bet transzkripciós faktor közvetítésével a PD-1 T sejt kimerülési marker expressziójának csökkenéséhez vezet CD8<sup>+</sup> T sejtekben [139]. Megfigyeléseink továbbá összhangban vannak Gargett és Stock eredményeivel [69,140], amelyek szerint a RetroNectin alapú stimuláció alkalmazása jelentősen növeli a CD45RA<sup>+</sup> naiv és centrális memória, valamint CD8<sup>+</sup> citotoxikus CAR T sejtek arányát a sejttermékben.



**36. ábra** A HER2-CAR T sejtkészítmények fenotípus profiljának szerepe az *in vivo* tumorellenes hatékonyságban

Funkcionális *in vitro* vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az effektor memória T sejtekben dúsított CAR T termékek jelentősen magasabb szintű IFNγ és IL-2 citokint szekretálnak immobilizált célantigének jelenlétében, és erősebb CAR-specifikus antitumor hatást váltanak ki. Emellett megfigyelhető volt az EM-domináns CAR T sejtek szignifikánsan alacsonyabb TIM-3 termelése, arra utalva, hogy kimerültségi szintjük alacsonyabb [135], mint az *OKT3-RetroNectin/LymphoONE* sejttermékeké. Az előrehaladott differenciációs szintű EM-domináns CAR T sejtek továbbá kedvezőbb hosszú távú proliferációs kapacitást mutattak immobilizált célantigénekkel való sorozatos stimuláció folyamán. Ugyanakkor hosszú távon fenntartott stimuláció alatt egyedül az *OKT3-antiCD28/RPMI* protokollal előállított CD28.z CAR limfociták őrizték meg a kiindulási arányokkal azonos, kiegyensúlyozott CD4/CD8 eloszlást. Megfigyeltük továbbá, hogy a kevésbé differenciált, CM-domináns 41BB.z CAR T sejtek nagyobb mennyiségű IFNγ citokint termeltek tumorsejt felszínen prezentált HER2<sup>+</sup> stimuláció hatására. Ennek az eredménynek a magyarázata részben a tumorsejtek T sejt altípusok citokin szekréciójára gyakorolt szerteágazó moduláló hatásában rejtőzhet [141], így e téren további kutatások szükségesek. Utolsó, preklinikai kísérletsorozatunkban megvizsgáltuk az eltérő fenotípus profillal rendelkező CAR T sejttermékek *in vivo* tumorellenes aktivitását, valamint tumorinfiltrációs és expanziós potenciálját HER2 pozitív JIMT-1 xenograft modellben. *In vitro* megfigyeléseinkkel összhangban az EM fenotípusban dúsulást mutató CAR T sejtkészítmények hatékonyan infiltrálják a tumor xenograftot, és gyorsabban expandálnak a lassabban differenciálódó, CM-ben gazdag sejttermékeknél. Ezen eredményeink látszólag ellentmondásban állnak a CD19 specifikus CAR T sejtek ideális fenotípus kompozíciójának feltárására irányuló tanulmányok konklúzióival. Preklinikai és klinikai kutatásokban demonstrálták, hogy a naiv és centrális memória T sejt altípusok magas aránya hozzájárul a CD19-CAR T terápiás sejttermékek kedvező tumorspecifikus citolitikus aktivitásához és akár éveken keresztül fenntartott perzisztenciájához [71,130]. Ez számos tényezőből fakadhat, ideértve az eltérő fenotípusú T limfociták szöveti elhelyezkedését: míg az effektor memóriasejtek jellemzően a perifériás szövetekben telepednek le, a centrális memóriasejtek nem lépnek ki a vérkeringésből [142]. Ezáltal az effektor memória fenotípus fokozott aránya a CAR T sejttermékben javíthatja a szolid tumorok infiltrációjának hatékonyságát.

Emellett nem elhanyagolható a szolid szervi daganatok és a leukémiás sejtek sejtfelszíni molekuláinak eltérő összetétele [143], valamint a leukémiás sejtek könnyű hozzáférhetősége a véráramban keringő CAR T sejtek számára, ami erősen eltér a szolid tumorok komplex mikrokörnyezetétől. Ebben a tekintetben akadályt jelenthet a daganatot borító sűrű extracelluláris mátrix [26,27] melybe olyan immunszupresszor sejtek rekrutálódnak, mint a tumorstrómában rezidens fibroblasztok (cancer-associated fibroblast, CAF)[144], tumor infiltráló makrofágok [145] valamint szabályozó T és B sejtek, amelyek gátolhatják a CAR T sejtek citolitikus aktivitását [146]. Ezek alapján feltételezhető, hogy a centrális memória sejtek alacsonyabb inherens citotoxikus potenciálja, de kedvezőbb hosszú távú túlélése optimális tumorellenes hatékonyságot biztosít a CD19-CAR T sejtek számára a könnyű célpontot jelentő limfoblasztok ellen, de nem elégséges a szervi daganatok immunszuppresszív TME-jének leküzdéséhez, amely erősebb T sejt aktivációt igényel. Erre megoldásként kínálkozik a CD28 alapú kostimuláció alkalmazása a 41BB helyett, mivel előbbi bizonyítottan hatékonyabb T sejt aktivációt eredményez a szolid tumorokat célzó CAR T sejtek esetén [147].

Emellett számos lehetőség kínálkozik a 41BB kostimulációval járó alacsonyabb citolitikus potenciál növelésére. Ezek közé tartozik a CAR indukált szignáltranszdukciót fokozó egyéb stimulátor domének integrálása a konstrukcióba [54], a citotoxikus T sejt

működést gátló citokin jelátvitelének blokkolását célzó ún. "kapcsoló" receptorok kotranszdukciója [148], illetve olyan genetikai módosítások, melyek fokozzák serkentő citokinek jelátvitelét [149] vagy negatív regulátorokat törölnek [150]. Mivel ezek alkalmazása tovább fokozza a natív T sejtek molekuláris szabályozásával való szinergikus együttműködés komplexitását, korábbi eredményeink alapján azt gondoltuk, hogy célszerű ezen rendszerek esetén is megvizsgálni a terápiás sejtek fenotípus hátterét.

Ahogy in vitro eredményeink mutatták, a négyféle tesztelt sejtkészítmény közül egyedül az OKT3-antiCD28/RPMI protokollal előállított HER2.CD28.z CAR csoportban maradt fenn a frissen transzdukált sejtekben megfigyelhető kiegyensúlyozott, 60/40%-os CD4/CD8 arány sorozatos HER2 stimuláció 10,5. napjára. Az OKT3-RetroNectin által aktivált CD28.z CAR T sejtek CD4<sup>+</sup> mennyisége a folyamatos HER2 stimuláció ugyanezen időszakában ~50%-ról 10% alá csökkent. A 41BB kostimuláció alkalmazásakor az eredeti CD4<sup>+</sup> populáció mindkét csoportban 20-30%-ra esett. A fiziológiás immunológiai tumorfelügyelet rendszerében a CD8<sup>+</sup> T sejtek a daganatsejtek közvetlen eliminálásáért felelnek, míg a CD4<sup>+</sup> T helper limfociták többek között a CD8<sup>+</sup> T sejtek aktiválását és expanzióját segítik elő. Ezzel szemben a CD4<sup>+</sup> CAR T sejtek, akárcsak CD8<sup>+</sup> párjaik, direkt antitumor aktivitással rendelkeznek [151,152]. Kimutatták, hogy 1:1 arányban a CD4<sup>+</sup> helper és a CD8<sup>+</sup> citotoxikus T sejtek szinergikus daganatellenes hatást fejtenek ki, ami pozitívan befolyásolta a tumoreliminációt [153], és magas remissziós arányt eredményezett B-ALL betegségben szenvedő páciensek CD19 CAR T sejtekkel való kezelése során [154]. Összességében tehát mind az általunk, mind a más kutatók által végzett preklinikai vizsgálatok eredményei alátámasztják azt a koncepciót, hogy szolid tumorokkal szemben előnyös lehet kiegyensúlyozott CD4/CD8 arányú CAR T terápiás sejtkészítmények alkalmazása.

### VIII. Összefoglalás

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy míg a HER2.z és a HER2.CD28.z CAR dimerek nagy méretű és denzitású szubmikronos doméneket alkottak, a 41BB-t tartalmazó CAR oligomerek kisméretű, de nagyobb számú membrán klaszterré álltak össze. Ezzel párhuzamosan az I., II. és III. generációba tartozó CAR-ok a CD3z domén membrán síkjától mért távolságával arányosan gyorsuló laterális diffúziót mutattak. Immunfluoreszcenciával vizsgálva az első tumorsejttel való találkozáskor mind a HER2.CD28.41BB.z rendkívül mobilis oligomerjei és azok kisméretű klaszterei, mind a HER2.cD28.41BB.z rendkívül mobilis oligomerjei és azok kisméretű klaszterei, mind a HER2.CD28.z és HER2.41BB.z CAR-ok. Ugyanakkor tumorsejtkultúrák ECIS-szel mért impedanciaváltozása alapján hosszabb, egy napos távon a CD28.41BB.z CAR eredményezte a legkisebb ölést és a HER2.z CAR T sejtek bizonyultak a leghatékonyabbank. Mindezek alapján a molekuláris szerkezet, a membránbeli szerveződés és a mobilitás olyan fontos paraméterei a CAR-ok tervezésének, amelyek következtetni engednek az immunszinapszis kialakulásának és a célsejt elpusztításának hatékonyságára.

Egy másik lehetséges beavatkozási pont a szolid tumorokat célzó CAR T terápia optimalizálásában a kostimulációs domének közvetítette aktivációs jelátvitel és a natív T sejt funkciók összefonódásának vizsgálata. Kutatásunk során demonstráltuk, hogy a CAR T készítmények előállításának metodikája befolyásolja az elkészült heterogén sejttermékek fenotipikus összetételét, és igazoltuk ezen jellemzők jelentős hatását a CAR T sejtek működésére. Eredményeink szerint a jobban differenciált, effektor memória domináns CAR T sejttermékek erősebb in vitro citotoxicitással rendelkeznek és kevésbé merülnek ki hosszan tartó antigénstimuláció alatt, mint azok a sejtcsoportok, amelyek differenciációját az előállítási szakaszban korlátoztuk. Megfigyeltük továbbá, hogy a 41BB kostimuláció hatására, valamint a transzdukciót megelőző T sejt expanzió során alkalmazott RetroNectin stimuláció mellékhatásaként a CD8<sup>+</sup> citotoxikus CAR T sejtek aránya jelentős növekedést mutatott. Preklinikai modellünkben demonstráltuk, hogy az effektor memória irányú differenciáció, és a kiegyensúlyozott CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> arány kölcsönzi a legerőteljesebb expanziós és citolitikus hatékonyságot a HER2<sup>+</sup> szolid tumorokat célzó CAR T sejteknek. Ez a felismerés azt a világos üzenetet közvetíti a klinikumnak, hogy CAR T sejtkészítmények előállításnak optimalizálása és az ideális fenotípusprofil meghatározása a kezelt tumor típusának és antigénprofiljának függvényében elengedhetetlen feltétele a sikeres klinikai kipróbálásnak.

### IX. Summary

Our collective findings, derived from molecular and functional imaging data, propose that CARs incorporating 41BB undergo homooligomerization, resulting in smaller and more numerous membrane clusters in resting T cells. Moreover, the lateral diffusion of chimera receptors diminishes proportionally with the distance of the CD3z effector domain from the membrane plane, indicating reduced interaction with phosphoinositides, native partners of the TCR/CD3 complex. Despite this, both the slowest HER2.z CARs, forming large receptor clusters, and the fastest HER2.CD28.41BB.z CARs induce a more rapid and potent CD3z phosphorylation than HER2.CD28.z and HER241BB.z CARs. This implies that both higher mobility and preassembled receptor structures may enhance efficient immune synapse formation. Notably, while short-term activation during the initial target cell contact is evident for T cells redirected by non-costimulated HER2.z and third-generation HER2.CD28.41BB.z CARs, their long-term cytotoxic efficacy significantly differs. Real-time monitoring reveals that first-generation HER2.z CARs provide the most stable target cell killing over a 25h period, whereas CARs with 41BB costimulation perform poorly. Considering these findings, membrane organization and mobility may serve as crucial parameters in CAR design, shedding light on immune synapse formation efficiency and target cell killing.

Another potential intervention point in optimizing CAR T therapy for solid tumors is exploring the interconnection between activation signal transduction mediated by costimulatory domains and native T cell functions. Our research demonstrates that the methodology of CAR T production influences the phenotypic composition of resulting heterogeneous cell products, with significant impacts on CAR T cell function. Our results indicate that CAR T cell products with a more differentiated effector memory phenotype exhibit stronger *in vitro* cytotoxicity and lower exhaustion under prolonged antigen stimulation. Furthermore, during T cell expansion, we observed a significant increase in the proportion of CD8<sup>+</sup> CAR T cells due to 41BB costimulation and RetroNectin stimulation. Consistent with this, our preclinical model shows that effector memory differentiation and a balanced CD4/CD8 ratio yield the strongest expansion and cytolytic efficiency in CAR T cells targeting HER<sup>+</sup> solid tumors. This underscores the message to the clinic that optimizing CAR T cell production and determining the ideal phenotypic profile based on the targeted tumor type and antigen profile are essential prerequisites for successful clinical trials.

### X. Irodalomjegyzék

### X.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

- 1. Morgan, R.A.; Yang, J.C.; Kitano, M.; Dudley, M.E.; Laurencot, C.M.; Rosenberg, S.A. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* **2010**, *18*, 843-851, doi:10.1038/mt.2010.24.
- 2. Ochsenbein, A.F. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther* **2002**, *9*, 1043-1055, doi:10.1038/sj.cgt.7700540.
- 3. Stewart, T.J.; Abrams, S.I. How tumours escape mass destruction. *Oncogene* **2008**, *27*, 5894-5903, doi:10.1038/onc.2008.268.
- 4. Tsao, L.C.; Force, J.; Hartman, Z.C. Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. *Cancer Res* **2021**, *81*, 4641-4651, doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-1109.
- 5. Coukos, G. TIL Therapy Entering the Mainstream. *N Engl J Med* **2022**, *387*, 2185-2186, doi:10.1056/NEJMe2214655.
- 6. Bagchi, S.; Yuan, R.; Engleman, E.G. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol* **2021**, *16*, 223-249, doi:10.1146/annurev-pathol-042020-042741.
- 7. Mitra, A.; Barua, A.; Huang, L.; Ganguly, S.; Feng, Q.; He, B. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1188049, doi:10.3389/fimmu.2023.1188049.
- 8. Daei Sorkhabi, A.; Mohamed Khosroshahi, L.; Sarkesh, A.; Mardi, A.; Aghebati-Maleki, A.; Aghebati-Maleki, L.; Baradaran, B. The current landscape of CAR T-cell therapy for solid tumors: Mechanisms, research progress, challenges, and counterstrategies. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1113882, doi:10.3389/fimmu.2023.1113882.
- 9. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495-497, doi:10.1038/256495a0.
- 10. Liu, J.K. The history of monoclonal antibody development Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)* **2014**, *3*, 113-116, doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001.
- 11. Schroeder, H.W.; Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **2010**, *125*, S41-52, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- 12. Nadler, L.M.; Stashenko, P.; Hardy, R.; Kaplan, W.D.; Button, L.N.; Kufe, D.W.; Antman, K.H.; Schlossman, S.F. Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res* **1980**, *40*, 3147-3154.

- 13. Azim, H.A.; Pruneri, G.; Cocorocchio, E.; Cinieri, S.; Raviele, P.R.; Bassi, S.; Preda, L.; Martinelli, G.; Peccatori, F.A. Rituximab in lymphocyte-predominant Hodgkin disease. *Oncology* **2009**, *76*, 26-29, doi:10.1159/000177953.
- 14. Wang, S.C.; Hung, M.C. HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin Oncol* **2001**, *28*, 115-124, doi:10.1016/s0093-7754(01)90289-1.
- 15. Fabi, A.; Malaguti, P.; Vari, S.; Cognetti, F. First-line therapy in HER2 positive metastatic breast cancer: is the mosaic fully completed or are we missing additional pieces? *J Exp Clin Cancer Res* **2016**, *35*, 104, doi:10.1186/s13046-016-0380-5.
- Garcia, J.; Hurwitz, H.I.; Sandler, A.B.; Miles, D.; Coleman, R.L.; Deurloo, R.; Chinot, O.L. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev* 2020, *86*, 102017, doi:10.1016/j.ctrv.2020.102017.
- 17. Mould, D.R.; Green, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies: concepts and lessons for drug development. *BioDrugs* **2010**, *24*, 23-39, doi:10.2165/11530560-00000000-00000.
- 18. Younes, A.; Bartlett, N.L.; Leonard, J.P.; Kennedy, D.A.; Lynch, C.M.; Sievers, E.L.; Forero-Torres, A. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 1812-1821, doi:10.1056/NEJMoa1002965.
- 19. Mathew, J.; Perez, E.A. Trastuzumab emtansine in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: a review. *Curr Opin Oncol* **2011**, *23*, 594-600, doi:10.1097/CCO.0b013e32834b895c.
- 20. Rezvani, A.R.; Maloney, D.G. Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* **2011**, *24*, 203-216, doi:10.1016/j.beha.2011.02.009.
- 21. Kennedy, G.A.; Tey, S.K.; Cobcroft, R.; Marlton, P.; Cull, G.; Grimmett, K.; Thomson, D.; Gill, D. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br J Haematol* **2002**, *119*, 412-416, doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03843.x.
- 22. Vu, T.; Claret, F.X. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* **2012**, *2*, 62, doi:10.3389/fonc.2012.00062.
- 23. Parakh, S.; King, D.; Gan, H.K.; Scott, A.M. Current Development of Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Recent Results Cancer Res* **2020**, *214*, 1-70, doi:10.1007/978-3-030-23765-3\_1.
- 24. Derakhshani, A.; Rezaei, Z.; Safarpour, H.; Sabri, M.; Mir, A.; Sanati, M.A.; Vahidian, F.; Gholamiyan Moghadam, A.; Aghadoukht, A.; Hajiasgharzadeh, K.; et al. Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *J Cell Physiol* **2020**, *235*, 3142-3156, doi:10.1002/jcp.29216.
- 25. Tanner, M.; Kapanen, A.I.; Junttila, T.; Raheem, O.; Grenman, S.; Elo, J.; Elenius, K.; Isola, J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* **2004**, *3*, 1585-1592.

- 26. Barok, M.; Isola, J.; Pályi-Krekk, Z.; Nagy, P.; Juhász, I.; Vereb, G.; Kauraniemi, P.; Kapanen, A.; Tanner, M.; Szöllösi, J. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2007, *6*, 2065-2072, doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0766.
- 27. Szöőr, Á.; Tóth, G.; Zsebik, B.; Szabó, V.; Eshhar, Z.; Abken, H.; Vereb, G. Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies. *Cancer Lett* **2020**, *484*, 1-8, doi:10.1016/j.canlet.2020.04.008.
- Mazieres, J.; Drilon, A.; Lusque, A.; Mhanna, L.; Cortot, A.B.; Mezquita, L.; Thai, A.A.; Mascaux, C.; Couraud, S.; Veillon, R.; et al. Immune checkpoint inhibitors for patients with advanced lung cancer and oncogenic driver alterations: results from the IMMUNOTARGET registry. *Ann Oncol* 2019, *30*, 1321-1328, doi:10.1093/annonc/mdz167.
- 29. Hamid, O.; Robert, C.; Daud, A.; Hodi, F.S.; Hwu, W.J.; Kefford, R.; Wolchok, J.D.; Hersey, P.; Joseph, R.; Weber, J.S.; et al. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *Ann Oncol* **2019**, *30*, 582-588, doi:10.1093/annonc/mdz011.
- 30. Mullinax, J.E.; Hall, M.; Prabhakaran, S.; Weber, J.; Khushalani, N.; Eroglu, Z.; Brohl, A.S.; Markowitz, J.; Royster, E.; Richards, A.; et al. Combination of Ipilimumab and Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Metastatic Melanoma. *Front Oncol* 2018, *8*, 44, doi:10.3389/fonc.2018.00044.
- 31. Morgan, D.A.; Ruscetti, F.W.; Gallo, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* **1976**, *193*, 1007-1008, doi:10.1126/science.181845.
- 32. Rosenberg, S.A.; Lotze, M.T.; Muul, L.M.; Leitman, S.; Chang, A.E.; Ettinghausen, S.E.; Matory, Y.L.; Skibber, J.M.; Shiloni, E.; Vetto, J.T. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* **1985**, *313*, 1485-1492, doi:10.1056/NEJM198512053132327.
- 33. Jiang, T.; Zhou, C.; Ren, S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1163462, doi:10.1080/2162402X.2016.1163462.
- 34. Cantor, H.; Boyse, E.A. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly+ cells in the generation of killer activity. *J Exp Med* **1975**, *141*, 1390-1399, doi:10.1084/jem.141.6.1390.
- 35. Bos, R.; Sherman, L.A. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* **2010**, *70*, 8368-8377, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1322.
- 36. Spiess, P.J.; Yang, J.C.; Rosenberg, S.A. In vivo antitumor activity of tumorinfiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst* **1987**, *79*, 1067-1075.
- 37. Dudley, M.E.; Wunderlich, J.R.; Shelton, T.E.; Even, J.; Rosenberg, S.A. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother* **2003**, *26*, 332-342, doi:10.1097/00002371-200307000-00005.
- 38. Phan, G.Q.; Rosenberg, S.A. Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* **2013**, *20*, 289-297, doi:10.1177/107327481302000406.
- 39. Lee, H.; Kim, K.; Chung, J.; Hossain, M.; Lee, H.J. Tumor-infiltrating lymphocyte therapy: Clinical aspects and future developments in this breakthrough cancer treatment. *Bioessays* **2023**, *45*, e2200204, doi:10.1002/bies.202200204.
- 40. Rosenberg, S.A.; Yang, J.C.; Sherry, R.M.; Kammula, U.S.; Hughes, M.S.; Phan, G.Q.; Citrin, D.E.; Restifo, N.P.; Robbins, P.F.; Wunderlich, J.R.; et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 4550-4557, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0116.
- 41. Marabondo, S.; Kaufman, H.L. High-dose interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma: safety considerations and future directions. *Expert Opin Drug Saf* **2017**, *16*, 1347-1357, doi:10.1080/14740338.2017.1382472.
- 42. Piro, L.D.; White, C.A.; Grillo-López, A.J.; Janakiraman, N.; Saven, A.; Beck, T.M.; Varns, C.; Shuey, S.; Czuczman, M.; Lynch, J.W.; et al. Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* **1999**, *10*, 655-661, doi:10.1023/a:1008389119525.
- 43. Radford, J.; Davies, A.; Cartron, G.; Morschhauser, F.; Salles, G.; Marcus, R.; Wenger, M.; Lei, G.; Wassner-Fritsch, E.; Vitolo, U. Obinutuzumab (GA101) plus CHOP or FC in relapsed/refractory follicular lymphoma: results of the GAUDI study (BO21000). *Blood* **2013**, *122*, 1137-1143, doi:10.1182/blood-2013-01-481341.
- 44. Jacobson, C.A.; Chavez, J.C.; Sehgal, A.R.; William, B.M.; Munoz, J.; Salles, G.; Munshi, P.N.; Casulo, C.; Maloney, D.G.; de Vos, S.; et al. Axicabtagene ciloleucel in relapsed or refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (ZUMA-5): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **2022**, *23*, 91-103, doi:10.1016/S1470-2045(21)00591-X.
- 45. Fowler, N.H.; Dickinson, M.; Dreyling, M.; Martinez-Lopez, J.; Kolstad, A.; Butler, J.; Ghosh, M.; Popplewell, L.; Chavez, J.C.; Bachy, E.; et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory follicular lymphoma: the phase 2 ELARA trial. *Nat Med* **2022**, 28, 325-332, doi:10.1038/s41591-021-01622-0.
- Ahmed, N.; Ratnayake, M.; Savoldo, B.; Perlaky, L.; Dotti, G.; Wels, W.S.;
  Bhattacharjee, M.B.; Gilbertson, R.J.; Shine, H.D.; Weiss, H.L.; et al. Regression of experimental medulloblastoma following transfer of HER2-specific T cells. *Cancer Res* 2007, 67, 5957-5964, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4309.
- 47. Goldenberg, D.M. Targeting of cancer with radiolabeled antibodies. Prospects for imaging and therapy. *Arch Pathol Lab Med* **1988**, *112*, 580-587.

- 48. Neelapu, S.S.; Locke, F.L.; Bartlett, N.L.; Lekakis, L.J.; Miklos, D.B.; Jacobson, C.A.; Braunschweig, I.; Oluwole, O.O.; Siddiqi, T.; Lin, Y.; et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **2017**, *377*, 2531-2544, doi:10.1056/NEJMoa1707447.
- 49. Couzin-Frankel, J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* **2013**, *342*, 1432-1433, doi:10.1126/science.342.6165.1432.
- 50. Eshhar, Z.; Waks, T.; Gross, G.; Schindler, D.G. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 720-724, doi:10.1073/pnas.90.2.720.
- 51. Kershaw, M.H.; Westwood, J.A.; Parker, L.L.; Wang, G.; Eshhar, Z.; Mavroukakis, S.A.; White, D.E.; Wunderlich, J.R.; Canevari, S.; Rogers-Freezer, L.; et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 6106-6115, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
- 52. Carpenito, C.; Milone, M.C.; Hassan, R.; Simonet, J.C.; Lakhal, M.; Suhoski, M.M.; Varela-Rohena, A.; Haines, K.M.; Heitjan, D.F.; Albelda, S.M.; et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 3360-3365, doi:10.1073/pnas.0813101106.
- 53. Huang, R.; Li, X.; He, Y.; Zhu, W.; Gao, L.; Liu, Y.; Wen, Q.; Zhong, J.F.; Zhang, C.; Zhang, X. Recent advances in CAR-T cell engineering. *J Hematol Oncol* **2020**, *13*, 86, doi:10.1186/s13045-020-00910-5.
- 54. Chmielewski, M.; Abken, H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther* **2015**, *15*, 1145-1154, doi:10.1517/14712598.2015.1046430.
- 55. Jayaraman, J.; Mellody, M.P.; Hou, A.J.; Desai, R.P.; Fung, A.W.; Pham, A.H.T.; Chen, Y.Y.; Zhao, W. CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine* **2020**, *58*, 102931, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102931.
- 56. Wang, D.; Starr, R.; Chang, W.C.; Aguilar, B.; Alizadeh, D.; Wright, S.L.; Yang, X.; Brito, A.; Sarkissian, A.; Ostberg, J.R.; et al. Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma. *Sci Transl Med* **2020**, *12*, doi:10.1126/scitranslmed.aaw2672.
- 57. Albert, S.; Arndt, C.; Koristka, S.; Berndt, N.; Bergmann, R.; Feldmann, A.; Schmitz, M.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Bachmann, M. From mono- to bivalent: improving theranostic properties of target modules for redirection of UniCAR T cells against EGFR-expressing tumor cells. *Oncotarget* 2018, *9*, 25597-25616, doi:10.18632/oncotarget.25390.
- 58. Naghizadeh, A.; Tsao, W.C.; Hyun Cho, J.; Xu, H.; Mohamed, M.; Li, D.; Xiong, W.; Metaxas, D.; Ramos, C.A.; Liu, D. In vitro machine learning-based CAR T immunological synapse quality measurements correlate with patient clinical outcomes. *PLoS Comput Biol* 2022, 18, e1009883, doi:10.1371/journal.pcbi.1009883.

- Kawalekar, O.U.; O' Connor, R.S.; Fraietta, J.A.; Guo, L.; McGettigan, S.E.; Posey, A.D.; Patel, P.R.; Guedan, S.; Scholler, J.; Keith, B.; et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity* 2016, 44, 712, doi:10.1016/j.immuni.2016.02.023.
- 60. Long, A.H.; Haso, W.M.; Shern, J.F.; Wanhainen, K.M.; Murgai, M.; Ingaramo, M.; Smith, J.P.; Walker, A.J.; Kohler, M.E.; Venkateshwara, V.R.; et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* **2015**, *21*, 581-590, doi:10.1038/nm.3838.
- 61. Xiong, W.; Chen, Y.; Kang, X.; Chen, Z.; Zheng, P.; Hsu, Y.-H.; Jang, J.H.; Qin, L.; Liu, H.; Dotti, G.; et al. Immunological Synapse Predicts Effectiveness of Chimeric Antigen Receptor Cells. *Molecular Therapy* **2018**, *26*, 963-975, doi:<u>https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.01.020</u>.
- 62. Liu, Y.; Sperling, A.S.; Smith, E.L.; Mooney, D.J. Optimizing the manufacturing and antitumour response of CAR T therapy. *Nature Reviews Bioengineering* **2023**, *1*, 271-285, doi:10.1038/s44222-023-00031-x.
- 63. Roex, G.; Timmers, M.; Wouters, K.; Campillo-Davo, D.; Flumens, D.; Schroyens, W.; Chu, Y.; Berneman, Z.N.; Lion, E.; Luo, F.; et al. Safety and clinical efficacy of BCMA CAR-T-cell therapy in multiple myeloma. *J Hematol Oncol* **2020**, *13*, 164, doi:10.1186/s13045-020-01001-1.
- 64. Levine, B.L.; Miskin, J.; Wonnacott, K.; Keir, C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* **2017**, *4*, 92-101, doi:10.1016/j.omtm.2016.12.006.
- 65. Gouvarchin Ghaleh, H.E.; Bolandian, M.; Dorostkar, R.; Jafari, A.; Pour, M.F. Concise review on optimized methods in production and transduction of lentiviral vectors in order to facilitate immunotherapy and gene therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2020**, *128*, 110276, doi:https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110276.
- 66. Magnani, C.F.; Mezzanotte, C.; Cappuzzello, C.; Bardini, M.; Tettamanti, S.; Fazio, G.; Cooper, L.J.N.; Dastoli, G.; Cazzaniga, G.; Biondi, A.; et al. Preclinical Efficacy and Safety of CD19CAR Cytokine-Induced Killer Cells Transfected with Sleeping Beauty Transposon for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hum Gene Ther* 2018, 29, 602-613, doi:10.1089/hum.2017.207.
- 67. Suematsu, M.; Yagyu, S.; Nagao, N.; Kubota, S.; Shimizu, Y.; Tanaka, M.; Nakazawa, Y.; Imamura, T. Transposon-Mediated CD19 Chimeric Antigen Receptor-T Cells Derived From CD45RA-Positive Peripheral Blood Mononuclear Cells Possess Potent and Sustained Antileukemic Function. *Front Immunol* **2022**, *13*, 770132, doi:10.3389/fimmu.2022.770132.
- 68. Zhang, J.; Lei, F.; Tan, H. The development of CD8 T-cell exhaustion heterogeneity and the therapeutic potentials in cancer. *Front Immunol* **2023**, *14*, 1166128, doi:10.3389/fimmu.2023.1166128.

- 69. Gargett, T.; Brown, M.P. Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 487-495, doi:10.1016/j.jcyt.2014.12.002.
- Hosoi, H.; Ikeda, H.; Imai, N.; Amaike, C.; Wang, L.; Orito, Y.; Yamane, M.; Ueno, H.; Ideno, M.; Nukaya, I.; et al. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 2014, 44, 1747-1758, doi:10.1002/eji.201343969.
- 71. Xu, Y.; Zhang, M.; Ramos, C.A.; Durett, A.; Liu, E.; Dakhova, O.; Liu, H.; Creighton, C.J.; Gee, A.P.; Heslop, H.E.; 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*, 3750-3759, doi:10.1182/blood-2014-01-552174.
- 72. Maude, S.L.; Laetsch, T.W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M.R.; Stefanski, H.E.; Myers, G.D.; et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* **2018**, *378*, 439-448, doi:10.1056/NEJMoa1709866.
- 73. Abramson, J.S.; Palomba, M.L.; Gordon, L.I.; Lunning, M.A.; Wang, M.; Arnason, J.; Mehta, A.; Purev, E.; Maloney, D.G.; Andreadis, C.; et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 2020, *396*, 839-852, doi:10.1016/S0140-6736(20)31366-0.
- 74. Mian, A.; Hill, B.T. Brexucabtagene autoleucel for the treatment of relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Expert Opin Biol Ther* **2021**, *21*, 435-441, doi:10.1080/14712598.2021.1889510.
- 75. Funk, C.R.; Wang, S.; Chen, K.Z.; Waller, A.; Sharma, A.; Edgar, C.L.; Gupta, V.A.; Chandrakasan, S.; Zoine, J.T.; Fedanov, A.; et al. PI3Kδ/γ inhibition promotes human CART cell epigenetic and metabolic reprogramming to enhance antitumor cytotoxicity. *Blood* **2022**, *139*, 523-537, doi:10.1182/blood.2021011597.
- 76. Teoh, J.; Brown, L.F. Developing lisocabtagene maraleucel chimeric antigen receptor T-cell manufacturing for improved process, product quality and consistency across CD19. *Cytotherapy* **2022**, *24*, 962-973, doi:10.1016/j.jcyt.2022.03.013.
- 77. Raje, N.; Berdeja, J.; Lin, Y.; Siegel, D.; Jagannath, S.; Madduri, D.; Liedtke, M.; Rosenblatt, J.; Maus, M.V.; Turka, A.; et al. Anti-BCMA CAR T-Cell Therapy bb2121 in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **2019**, *380*, 1726-1737, doi:10.1056/NEJMoa1817226.
- 78. Saura-Esteller, J.; de Jong, M.; King, L.A.; Ensing, E.; Winograd, B.; de Gruijl, T.D.; Parren, P.W.H.I.; van der Vliet, H.J. Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front Immunol* 2022, *13*, 915837, doi:10.3389/fimmu.2022.915837.

- 79. Wang, M.; Munoz, J.; Goy, A.; Locke, F.L.; Jacobson, C.A.; Hill, B.T.; Timmerman, J.M.; Holmes, H.; Jaglowski, S.; Flinn, I.W.; et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* **2020**, *382*, 1331-1342, doi:10.1056/NEJMoa1914347.
- 80. Elsallab, M.; Ellithi, M.; Hempel, S.; Abdel-Azim, H.; Abou-El-Enein, M. Long-term response to autologous anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in relapsed or refractory B cell acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Gene Ther* **2023**, *30*, 845-854, doi:10.1038/s41417-023-00593-3.
- Munshi, N.C.; Anderson, L.D.; Shah, N.; Madduri, D.; Berdeja, J.; Lonial, S.; Raje, N.; Lin, Y.; Siegel, D.; Oriol, A.; et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2021, *384*, 705-716, doi:10.1056/NEJMoa2024850.
- 82. San-Miguel, J.; Dhakal, B.; Yong, K.; Spencer, A.; Anguille, S.; Mateos, M.V.; Fernández de Larrea, C.; Martínez-López, J.; Moreau, P.; Touzeau, C.; et al. Cilta-cel or Standard Care in Lenalidomide-Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **2023**, *389*, 335-347, doi:10.1056/NEJMoa2303379.
- 83. Lin, Y.; Raje, N.S.; Berdeja, J.G.; Siegel, D.S.; Jagannath, S.; Madduri, D.; Liedtke, M.; Rosenblatt, J.; Maus, M.V.; Massaro, M.; et al. Idecabtagene vicleucel for relapsed and refractory multiple myeloma: post hoc 18-month follow-up of a phase 1 trial. *Nat Med* 2023, *29*, 2286-2294, doi:10.1038/s41591-023-02496-0.
- Melenhorst, J.J.; Chen, G.M.; Wang, M.; Porter, D.L.; Chen, C.; Collins, M.A.; Gao, P.; Bandyopadhyay, S.; Sun, H.; Zhao, Z.; et al. Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4. *Nature* 2022, *602*, 503-509, doi:10.1038/s41586-021-04390-6.
- Todorovic, Z.; Todorovic, D.; Markovic, V.; Ladjevac, N.; Zdravkovic, N.; Djurdjevic, P.; Arsenijevic, N.; Milovanovic, M.; Arsenijevic, A.; Milovanovic, J. CAR T Cell Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia: Successes and Shortcomings. *Curr Oncol* 2022, 29, 3647-3657, doi:10.3390/curroncol29050293.
- 86. Ren, A.; Tong, X.; Xu, N.; Zhang, T.; Zhou, F.; Zhu, H. CAR T-Cell Immunotherapy Treating T-ALL: Challenges and Opportunities. *Vaccines (Basel)* **2023**, *11*, doi:10.3390/vaccines11010165.
- 87. Hendry, S.A.; Farnsworth, R.H.; Solomon, B.; Achen, M.G.; Stacker, S.A.; Fox, S.B. The Role of the Tumor Vasculature in the Host Immune Response: Implications for Therapeutic Strategies Targeting the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* **2016**, 7, 621, doi:10.3389/fimmu.2016.00621.
- 88. Beatty, G.L.; O'Hara, M. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of solid tumors: Defining the challenges and next steps. *Pharmacol Ther* **2016**, *166*, 30-39, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.06.010.
- Baumhoer, D.; Tornillo, L.; Stadlmann, S.; Roncalli, M.; Diamantis, E.K.; Terracciano, L.M. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2008, *129*, 899-906, doi:10.1309/HCQWPWD50XHD2DW6.

- 90. Zhai, B.; Shi, D.; Gao, H.; Qi, X.; Jiang, H.; Zhang, Y.; Chi, J.; Ruan, H.; Wang, H.; Ru, Q.C.; et al. A phase I study of anti-GPC3 chimeric antigen receptor modified T cells (GPC3 CAR-T) in Chinese patients with refractory or relapsed GPC3+ hepatocellular carcinoma (r/r GPC3+ HCC). *Journal of Clinical Oncology* 2017, *35*, 3049-3049, doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.3049.
- 91. Pang, N.; Shi, J.; Qin, L.; Chen, A.; Tang, Y.; Yang, H.; Huang, Y.; Wu, Q.; Li, X.; He, B.; et al. IL-7 and CCL19-secreting CAR-T cell therapy for tumors with positive glypican-3 or mesothelin. *J Hematol Oncol* 2021, *14*, 118, doi:10.1186/s13045-021-01128-9.
- 92. Nazha, B.; Inal, C.; Owonikoko, T.K. Disialoganglioside GD2 Expression in Solid Tumors and Role as a Target for Cancer Therapy. *Front Oncol* **2020**, *10*, 1000, doi:10.3389/fonc.2020.01000.
- Louis, C.U.; Savoldo, B.; Dotti, G.; Pule, M.; Yvon, E.; Myers, G.D.; Rossig, C.; Russell, H.V.; Diouf, O.; Liu, E.; et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 2011, *118*, 6050-6056, doi:10.1182/blood-2011-05-354449.
- 94. Del Bufalo, F.; De Angelis, B.; Caruana, I.; Del Baldo, G.; De Ioris, M.A.; Serra, A.; Mastronuzzi, A.; Cefalo, M.G.; Pagliara, D.; Amicucci, M.; et al. GD2-CART01 for Relapsed or Refractory High-Risk Neuroblastoma. *N Engl J Med* 2023, 388, 1284-1295, doi:10.1056/NEJMoa2210859.
- 95. Feng, K.; Liu, Y.; Guo, Y.; Qiu, J.; Wu, Z.; Dai, H.; Yang, Q.; Wang, Y.; Han, W. Phase I study of chimeric antigen receptor modified T cells in treating HER2-positive advanced biliary tract cancers and pancreatic cancers. *Protein Cell* **2018**, *9*, 838-847, doi:10.1007/s13238-017-0440-4.
- 96. Ahmed, N.; Salsman, V.S.; Kew, Y.; Shaffer, D.; Powell, S.; Zhang, Y.J.; Grossman, R.G.; Heslop, H.E.; Gottschalk, S. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin Cancer Res* 2010, 16, 474-485, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1322.
- 97. Hegde, M.; Joseph, S.K.; Pashankar, F.; DeRenzo, C.; Sanber, K.; Navai, S.; Byrd, T.T.; Hicks, J.; Xu, M.L.; Gerken, C.; et al. Tumor response and endogenous immune reactivity after administration of HER2 CAR T cells in a child with metastatic rhabdomyosarcoma. *Nat Commun* **2020**, *11*, 3549, doi:10.1038/s41467-020-17175-8.
- 98. Doan, A.; Pulsipher, M.A. Hypogammaglobulinemia due to CAR T-cell therapy. *Pediatr Blood Cancer* **2018**, *65*, doi:10.1002/pbc.26914.
- 99. Flugel, C.L.; Majzner, R.G.; Krenciute, G.; Dotti, G.; Riddell, S.R.; Wagner, D.L.; Abou-El-Enein, M. Overcoming on-target, off-tumour toxicity of CAR T cell therapy for solid tumours. *Nat Rev Clin Oncol* **2023**, *20*, 49-62, doi:10.1038/s41571-022-00704-3.
- 100. Grupp, S.A.; Kalos, M.; Barrett, D.; Aplenc, R.; Porter, D.L.; Rheingold, S.R.; Teachey, D.T.; Chew, A.; Hauck, B.; Wright, J.F.; et al. Chimeric antigen receptormodified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 1509-1518, doi:10.1056/NEJMoa1215134.

- 101. Maude, S.L.; Frey, N.; Shaw, P.A.; Aplenc, R.; Barrett, D.M.; Bunin, N.J.; Chew, A.; Gonzalez, V.E.; Zheng, Z.; Lacey, S.F.; et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* **2014**, *371*, 1507-1517, doi:10.1056/NEJMoa1407222.
- 102. Cobbold, S.P.; Jayasuriya, A.; Nash, A.; Prospero, T.D.; Waldmann, H. Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* **1984**, *312*, 548-551, doi:10.1038/312548a0.
- 103. Mata, M.; Gerken, C.; Nguyen, P.; Krenciute, G.; Spencer, D.M.; Gottschalk, S. Inducible Activation of MyD88 and CD40 in CAR T Cells Results in Controllable and Potent Antitumor Activity in Preclinical Solid Tumor Models. *Cancer Discov* 2017, 7, 1306-1319, doi:10.1158/2159-8290.CD-17-0263.
- 104. Ahmed, N.; Brawley, V.S.; Hegde, M.; Robertson, C.; Ghazi, A.; Gerken, C.; Liu, E.; Dakhova, O.; Ashoori, A.; Corder, A.; et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) -Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 2015, *33*, 1688-1696, doi:10.1200/JCO.2014.58.0225.
- 105. Ahmed, N.; Salsman, V.S.; Yvon, E.; Louis, C.U.; Perlaky, L.; Wels, W.S.; Dishop, M.K.; Kleinerman, E.E.; Pule, M.; Rooney, C.M.; et al. Immunotherapy for osteosarcoma: genetic modification of T cells overcomes low levels of tumor antigen expression. *Mol Ther* 2009, *17*, 1779-1787, doi:10.1038/mt.2009.133.
- 106. Wu, X.; Hammer, J.A. ZEISS Airyscan: Optimizing Usage for Fast, Gentle, Super-Resolution Imaging. *Methods Mol Biol* 2021, 2304, 111-130, doi:10.1007/978-1-0716-1402-0\_5.
- 107. Huff, J. The Fast mode for ZEISS LSM 880 with Airyscan: high-speed confocal imaging with super-resolution and improved signal-to-noise ratio. **2016**, *13*, doi:10.1038/nmeth.f.398.
- 108. Korobchevskaya, K.; Lagerholm, B.C.; Colin-York, H.; Fritzsche, M. Exploring the Potential of Airyscan Microscopy for Live Cell Imaging. **2017**, *4*(*3*), doi:10.3390/photonics4030041.
- 109. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **2012**, *9*, 676-682, doi:10.1038/nmeth.2019.
- 110. Soille, P.; Vincent, L. Determining watersheds in digital pictures via flooding simulations. *SPIE* **1990**, *Visual Communications and Image Processing '90: Fifth in a Series* . doi:10.1117/12.24211.
- Ollion, J.; Cochennec, J.; Loll, F.; Escudé, C.; Boudier, T. TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 2013, 29, 1840-1841, doi:10.1093/bioinformatics/btt276.

- 112. Magde, D.; Elson, E.; Webb, W.W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System---Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters* **1972**, *29*, 705-708, doi:10.1103/PhysRevLett.29.705.
- 113. Koppel, D.E.; Axelrod, D.; Schlessinger, J.; Elson, E.L.; Webb, W.W. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys J* **1976**, *16*, 1315-1329, doi:10.1016/S0006-3495(76)85776-1.
- 114. Sorscher, S.M.; Bartholomew, J.C.; Klein, M.P. The use of fluorescence correlations spectroscopy to probe chromatin in the cell nucleus. *Biochim Biophys Acta* **1980**, *610*, 28-46, doi:10.1016/0005-2787(80)90053-2.
- 115. Kettling, U.; Koltermann, A.; Schwille, P.; Eigen, M. Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 1416-1420, doi:10.1073/pnas.95.4.1416.
- 116. Brock, R.; Vàmosi, G.; Vereb, G.; Jovin, T.M. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 10123-10128, doi:10.1073/pnas.96.18.10123.
- 117. Elson, E.L.; Schlessinger, J.; Koppel, D.E.; Axelrod, D.; Webb, W.W. Measurement of lateral transport on cell surfaces. *Prog Clin Biol Res* **1976**, *9*, 137-147.
- 118. Schätzel, K.; Drewel, M.; Stimac, S. Photon Correlation Measurements at Large Lag Times: Improving Statistical Accuracy. *Journal of Modern Optics* **1988**, *35*, 711-718.
- 119. Loman, A.M.C.B.; Koberling, F.; Richtering, W.; Enderlein, J. Absolute and precise measurements of the diffusion of small fluorescent dye molecules across the visible spectrum. **2008**.
- 120. Baek, M.; DiMaio, F.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Ovchinnikov, S.; Lee, G.R.; Wang, J.; Cong, Q.; Kinch, L.N.; Schaeffer, R.D.; et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* 2021, *373*, 871-876, doi:10.1126/science.abj8754.
- 121. Hiranuma, N.; Park, H.; Baek, M.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Baker, D. Improved protein structure refinement guided by deep learning based accuracy estimation. *Nat Commun* **2021**, *12*, 1340, doi:10.1038/s41467-021-21511-x.
- 122. Mariani, V.; Biasini, M.; Barbato, A.; Schwede, T. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 2722-2728, doi:10.1093/bioinformatics/btt473.
- 123. Dong, D.; Zheng, L.; Lin, J.; Zhang, B.; Zhu, Y.; Li, N.; Xie, S.; Wang, Y.; Gao, N.; Huang, Z. Structural basis of assembly of the human T cell receptor-CD3 complex. *Nature* **2019**, *573*, 546-552, doi:10.1038/s41586-019-1537-0.
- 124. Wang, J.; Youkharibache, P.; Zhang, D.; Lanczycki, C.J.; Geer, R.C.; Madej, T.; Phan, L.; Ward, M.; Lu, S.; Marchler, G.H.; et al. iCn3D, a web-based 3D viewer for sharing 1D/2D/3D representations of biomolecular structures. *Bioinformatics* 2020, *36*, 131-135, doi:10.1093/bioinformatics/btz502.

- 125. Metsalu, T.; Vilo, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* **2015**, *43*, W566-570, doi:10.1093/nar/gkv468.
- 126. Liu, D.; Badeti, S.; Dotti, G.; Jiang, J.G.; Wang, H.; Dermody, J.; Soteropoulos, P.; Streck, D.; Birge, R.B.; Liu, C. The Role of Immunological Synapse in Predicting the Efficacy of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Immunotherapy. *Cell Commun Signal* 2020, 18, 134, doi:10.1186/s12964-020-00617-7.
- 127. DeFord-Watts, L.M.; Dougall, D.S.; Belkaya, S.; Johnson, B.A.; Eitson, J.L.; Roybal, K.T.; Barylko, B.; Albanesi, J.P.; Wülfing, C.; van Oers, N.S. The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse. *J Immunol* **2011**, *186*, 6839-6847, doi:10.4049/jimmunol.1002721.
- 128. Chouaki Benmansour, N.; Ruminski, K.; Sartre, A.M.; Phelipot, M.C.; Salles, A.; Bergot, E.; Wu, A.; Chicanne, G.; Fallet, M.; Brustlein, S.; et al. Phosphoinositides regulate the TCR/CD3 complex membrane dynamics and activation. *Sci Rep* **2018**, *8*, 4966, doi:10.1038/s41598-018-23109-8.
- 129. Zhang, H.; Zhao, P.; Huang, H. Engineering better chimeric antigen receptor T cells. *Exp Hematol Oncol* **2020**, *9*, 34, doi:10.1186/s40164-020-00190-2.
- Sabatino, M.; Hu, J.; Sommariva, M.; Gautam, S.; Fellowes, V.; Hocker, J.D.; Dougherty, S.; Qin, H.; Klebanoff, C.A.; Fry, T.J.; et al. Generation of clinical-grade CD19-specific CAR-modified CD8+ memory stem cells for the treatment of human Bcell malignancies. *Blood* 2016, *128*, 519-528, doi:10.1182/blood-2015-11-683847.
- 131. Janetzki, S.; Price, L.; Britten, C.M.; van der Burg, S.H.; Caterini, J.; Currier, J.R.; Ferrari, G.; Gouttefangeas, C.; Hayes, P.; Kaempgen, E.; et al. Performance of serumsupplemented and serum-free media in IFNgamma Elispot Assays for human T cells. *Cancer Immunol Immunother* **2010**, *59*, 609-618, doi:10.1007/s00262-009-0788-2.
- 132. Su, B.; Jacinto, E.; Hibi, M.; Kallunki, T.; Karin, M.; Ben-Neriah, Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **1994**, *77*, 727-736, doi:10.1016/0092-8674(94)90056-6.
- 133. Skånland, S.S.; Moltu, K.; Berge, T.; Aandahl, E.M.; Taskén, K. T-cell co-stimulation through the CD2 and CD28 co-receptors induces distinct signalling responses. *Biochem J* **2014**, *460*, 399-410, doi:10.1042/BJ20140040.
- 134. Gattinoni, L.; Zhong, X.S.; Palmer, D.C.; Ji, Y.; Hinrichs, C.S.; Yu, Z.; Wrzesinski, C.; Boni, A.; Cassard, L.; Garvin, L.M.; et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat Med* 2009, *15*, 808-813, doi:10.1038/nm.1982.
- 135. Hoel, H.; Ueland, T.; Hove-Skovsgaard, M.; Hartling, H.J.; Gelpi, M.; Benfield, T.; Ullum, H.; Michelsen, A.E.; Aukrust, P.; Nielsen, S.D.; et al. Soluble T-Cell Immunoglobulin Mucin Domain-3 Is Associated With Hepatitis C Virus Coinfection and Low-Grade Inflammation During Chronic Human Immunodeficiency Virus Infection. *Open Forum Infect Dis* **2020**, *7*, ofaa033, doi:10.1093/ofid/ofaa033.

- 136. Csaplár, M.; Szöllősi, J.; Gottschalk, S.; Vereb, G.; Szöőr, Á. Cytolytic Activity of CAR T Cells and Maintenance of Their CD4+ Subset Is Critical for Optimal Antitumor Activity in Preclinical Solid Tumor Models. *Cancers (Basel)* 2021, *13*, doi:10.3390/cancers13174301.
- 137. Nieba, L.; Honegger, A.; Krebber, C.; Plückthun, A. Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Eng* **1997**, *10*, 435-444, doi:10.1093/protein/10.4.435.
- 138. Balagopalan, L.; Raychaudhuri, K.; Samelson, L.E. Microclusters as T Cell Signaling Hubs: Structure, Kinetics, and Regulation. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 608530, doi:10.3389/fcell.2020.608530.
- 139. Taylor, A.; Harker, J.A.; Chanthong, K.; Stevenson, P.G.; Zuniga, E.I.; Rudd, C.E. Glycogen Synthase Kinase 3 Inactivation Drives T-bet-Mediated Downregulation of Co-receptor PD-1 to Enhance CD8(+) Cytolytic T Cell Responses. *Immunity* 2016, 44, 274-286, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.018.
- Stock, S.; Hoffmann, J.M.; Schubert, M.L.; Wang, L.; Wang, S.; Gong, W.; Neuber, B.; Gern, U.; Schmitt, A.; Müller-Tidow, C.; et al. Influence of Retronectin-Mediated T-Cell Activation on Expansion and Phenotype of CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Hum Gene Ther* 2018, 29, 1167-1182, doi:10.1089/hum.2017.237.
- 141. Zhang, Y.; Guan, X.Y.; Jiang, P. Cytokine and Chemokine Signals of T-Cell Exclusion in Tumors. *Front Immunol* **2020**, *11*, 594609, doi:10.3389/fimmu.2020.594609.
- 142. Masopust, D.; Vezys, V.; Marzo, A.L.; Lefrançois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **2001**, *291*, 2413-2417, doi:10.1126/science.1058867.
- 143. Junghans, R.P. The challenges of solid tumor for designer CAR-T therapies: a 25-year perspective. *Cancer Gene Ther* **2017**, *24*, 89-99, doi:10.1038/cgt.2016.82.
- Ping, Q.; Yan, R.; Cheng, X.; Wang, W.; Zhong, Y.; Hou, Z.; Shi, Y.; Wang, C.; Li, R. Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther* 2021, 28, 984-999, doi:10.1038/s41417-021-00318-4.
- 145. Mitchem, J.B.; Brennan, D.J.; Knolhoff, B.L.; Belt, B.A.; Zhu, Y.; Sanford, D.E.; Belaygorod, L.; Carpenter, D.; Collins, L.; Piwnica-Worms, D.; et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res* 2013, 73, 1128-1141, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2731.
- 146. Nishikawa, H.; Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **2014**, 27, 1-7, doi:10.1016/j.coi.2013.12.005.
- 147. Textor, A.; Grunewald, L.; Anders, K.; Klaus, A.; Schwiebert, S.; Winkler, A.; Stecklum, M.; Rolff, J.; Henssen, A.G.; Höpken, U.E.; et al. CD28 Co-Stimulus Achieves Superior CAR T Cell Effector Function against Solid Tumors Than 4-1BB Co-Stimulus. *Cancers (Basel)* 2021, *13*, doi:10.3390/cancers13051050.

- 148. Noh, K.E.; Lee, J.H.; Choi, S.Y.; Jung, N.C.; Nam, J.H.; Oh, J.S.; Song, J.Y.; Seo, H.G.; Wang, Y.; Lee, H.S.; et al. TGF-β/IL-7 Chimeric Switch Receptor-Expressing CAR-T Cells Inhibit Recurrence of CD19-Positive B Cell Lymphoma. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22168706.
- 149. Bell, M.; Gottschalk, S. Engineered Cytokine Signaling to Improve CAR T Cell Effector Function. *Front Immunol* **2021**, *12*, 684642, doi:10.3389/fimmu.2021.684642.
- 150. Dimitri, A.; Herbst, F.; Fraietta, J.A. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing. *Mol Cancer* **2022**, *21*, 78, doi:10.1186/s12943-022-01559-z.
- 151. Yang, Y.; Kohler, M.E.; Chien, C.D.; Sauter, C.T.; Jacoby, E.; Yan, C.; Hu, Y.; Wanhainen, K.; Qin, H.; Fry, T.J. TCR engagement negatively affects CD8 but not CD4 CAR T cell expansion and leukemic clearance. *Sci Transl Med* 2017, *9*, doi:10.1126/scitranslmed.aag1209.
- 152. Wang, D.; Aguilar, B.; Starr, R.; Alizadeh, D.; Brito, A.; Sarkissian, A.; Ostberg, J.R.; Forman, S.J.; Brown, C.E. Glioblastoma-targeted CD4+ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI Insight* **2018**, *3*, doi:10.1172/jci.insight.99048.
- 153. Sommermeyer, D.; Hudecek, M.; Kosasih, P.L.; Gogishvili, T.; Maloney, D.G.; Turtle, C.J.; Riddell, S.R. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia* 2016, *30*, 492-500, doi:10.1038/leu.2015.247.
- 154. Turtle, C.J.; Hanafi, L.A.; Berger, C.; Gooley, T.A.; Cherian, S.; Hudecek, M.; Sommermeyer, D.; Melville, K.; Pender, B.; Budiarto, T.M.; et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest* **2016**, *126*, 2123-2138, doi:10.1172/JCI85309.

## X.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények DEENK által hitelesített jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400 Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: Tárgy: DEENK/289/2023.PL PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mezősi-Csaplár Marianna Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

 Barden, M., Holzinger, A., Velas, L., Mezősi-Csaplár, M., Szöőr, Á., Vereb, G., Schütz, G., Hombach, A. A., Abken, H.: CAR and TCR form individual signaling synapses and do not cross-activate, however, can co-operate in T cell activation. *Front. Immunol.* 14, 1-13, 2023.
 DOI: http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2023.1110482
 IF: 8.786 (2021)

 Mezősi-Csaplár, M., Szöőr, Á., Vereb, G.: CD28 and 41BB Costimulatory Domains Alone or in Combination Differentially Influence Cell Surface Dynamics and Organization of Chimeric Antigen Receptors and Early Activation of CAR T Cells. *Cancers (Basel).* 15 (12), 3081-3097, 2023. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cancers15123081 IF: 6.575 (2021)

 Mezősi-Csaplár, M., Szöllősi, J., Gottschalk, S., Vereb, G., Szöőr, Á.: Cytolytic Activity of CAR T Cells and Maintenance of Their CD4+ Subset Is Critical for Optimal Antitumor Activity in Preclinical Solid Tumor Models. *Cancers (Basel). 13* (17), 1-19, 2021. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/cancers13174301 IF: 6.575

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,936 A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekte 21,936



A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetria Vernzeti K ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.06.26.

## XI. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném hálámat kifejezni Prof. Dr. Vereb György, illetve Dr. Szöőr Árpád témavezetőimnek, akik igazi "jó zsaru – rossz zsaru" páros módjára szükség szerint hol jószívű bíztatással, hol kellő szigorral terelték megfelelő mederbe a munkámat az emúlt évek folyamán. Mindig szeretettel fogok visszagondolni Gyuri klasszikus vicceire és popkulturális referenciáira. Köszönöm, hogy empatikusan fordult felém a legküzdelmesebb pillanatokban. Köszönöm Árpinak a tartalmas beszélgetéseket, tanulságos sztorikat és a töretlen támogatást. Mindig hálás szeretettel fogok emlékezni fogok a bátorítására, barátságára és arra, ahogyan kiállt mellettem a nehéz helyzetekben. Mindkettőjüknek hálásan köszönöm mind az iránymutatást, türelmet és mentorálást, amivel alapjában határozták meg mind szakmai, mind személyes fejlődésemet és sikeres munkámat. Továbbá szeretném megköszönni Nekik dolgozatom alapos és kritikus javítását, valamint a végtelen kedvességet és türelmet, amit a munka folyamán tanusítottak.

Köszönöm Nagy Lőrinc és Gergely Bence PhD "testvéreim", illetve Kisgyörgy Máté barátságát és a jókedvű, humorban gazdag együtt töltött időket. Köszönöm Szilágyi Ádám hallgatómnak a szorgalmat és kitartást, amit a közös munka folyamán tanusított, és a lehetőséget, hogy általa témavezetőként is kipróbálhattam magam. Köszönöm Rebenku Istvánnak a tartalmas beszélgetéseket és az értékes meglátásait. Köszönöm Dr. Ujlaky-Nagy László, Tóth Csaba Tamás és Szilágyi Anikó közreműködését a kísérleti munka során. Külön köszönöm Vágóné Toldi Hajnalka szakmai segítségét és a baráti beszélgetéseket a sejtlaborban! Hálásan köszönöm Nagy Endre, Szikszainé Ritter Zsuzsanna, Batta Ágnes, Dr. Hajdu Tímea, Kormos József, és Dr. Bankó Csabika barátságát a Biofizikai Intézetben töltött idők folyamán.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Panyi Györgynek, a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette számomra az intézetben való kutatómunkát.

Köszönöm Prof. Dr. Hinrich Abken-nek és teljes kutatócsoportjának, hogy nagy szeretettel fogadtak vendégkutatóként, nagyon szép időszakként fogok visszaemlékezni a Regensburgban töltött időkre.

Köszönettel és örök hálával tartozom a családomnak, édesanyámnak, nagyszüleimnek és testvéreimnek a szeretetükért és támogatásukért. Végezetül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm férjem, Mezősi-Csaplár András végtelen türelmét, bíztatását és azt, hogy mindig hitt bennem.

A munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00044 és GINOP-2.2.1-15-2017-00050 pályázatok támogatták.

## XII. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai