

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
A gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Mezősi-Csaplár Marianna okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
Farmakológia doktori programja keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Szőr Árpád, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Kellermayer Zoltán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD
tagok: Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Kellermayer Zoltán, PhD
Prof. Dr. Buzás Krisztina, PhD
Dr. Tóth Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet
„A” épület tanterme, 2024. február 26., 13:00 óra.

1. Bevezetés

Az elmúlt évtized egyik legígéretesebb stratégiája a tumorelles immunterápia területén a betegek T limfocitáinak genetikai módosítása kíméra antigén receptorokkal, azaz CAR-okkal. Az első generációs CAR-ok két fő funkcionális eleme egy tumorantigénre specifikus, antitest természetű ektodomén, mely lehetővé teszi a daganatok célzott felismerését és egy – többnyire a T sejt receptorkomplex (TCR) CD3 ζ alegységéből 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 második generációjába egy további kostimulációs endodomént építettek be. A leggyakrabban alkalmazott CD28, illetve 41BB kostimulátorral rendelkező CAR-ok mára forradalmasították a terápia-rezisztens leukémiák és limfómák kezelését. Ezzel szemben a szolid daganatokat célzó CAR T sejt terápiák eddigi klinikai tesztelése nem hozott áttörést, sőt egy, a CD28 és a 41BB kostimulációs domént kombináló harmadik generációs CAR kipróbálása egy ízben a páciens halálához vezetett.

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 fiziológias folyamataiba. A felhasznált domének befolyásolhatják mind az akut molekuláris történéseket, mind a rövid- és hosszútávú citotoxikus aktivitást, illetve expanziót. Utóbbi tényezőket a CAR T sejt készítmény előállítási körülményei is jelentősen befolyásolhatják. Munkánk során ezért szolid tumorokat célzó I-III. generációs CAR-ok alkalmazásával tanulmányoztuk a CD28 és 41BB kostimulációs domének hatását a CAR-ok sejt felszíni szerveződésére és diffúziós kinetikájára. Megfigyeléseinket az immunszinapszis kialakulásának dinamikájával és a korai citolitikus jelátvitel hatékonyságával korreláltattuk. Végezetül feltártuk, hogy a T sejt differenciáció dinamikája hogyan hat az *in vitro* hatékonyságra, expanzióra és kimerülésre, valamint az *in vivo* tumorkontrollra.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Bevezetés az immuno-onkológiába

Az elmúlt évtizedek kutatási eredményei rávilágítottak arra, hogy az immunrendszer változatos mechanizmusok útján képes a daganatokat felismerni és elpusztítani. Ennek egyik eszköze a malignus sejtek felszínén fokozottan expresszálandó tumor asszociált antigénekre (tumor-associated antigen, TAA) specifikus antitestek termelése, melyek a daganatsejthez kötődve többek között az antitest függő sejt citotoxicitás (ADCC) illetve komplement mediálta citotoxicitás (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) aktiválásával indukálják a malignus sejtek eltávolítását. Gyakrabban fordul elő, hogy a dedifferenciáció során intracellulárisan kialakult tumorspecifikus neoantigének a fő hisztokompatibilitási komplexhez (Major Histocompatibility Complex, MHC) kötött peptidok formájában prezentálódnak a daganatsejt 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, amelyek további átalakulási lépésekben képesek rezisztanciát kialakítani.

Az immunrendszer működését befolyásoló terápiák elsődleges célja, hogy a természetes védelmi funkciók célzása és/vagy fokozása által ismét képessé tegyék az immunsejteket a hatékony tumorelles válasz kialakítására. A klinikai gyakorlatban számos módszert kidolgoztak az immunrendszer tumorspecifikus aktiválására. Míg a már több évtizede széles körben alkalmazott monoklonális antitestek (monoclonal antibody, mAb) az ADCC és CDC védelmi mechanizmusokat aktiválják, addig az úgynevezett adoptív immunsejt terápiák – mint a tumor infiltráló limfocitákon (Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL) alapuló kezelés – a T sejt immunválasz hatékonyságát fokozzák. Fontos megemlékezni ugyanitt az immunellenőrzőpont-gátló (Immune Checkpoint Inhibitor, ICI) monoklonális antitestekről. A klinikai áttörést hozó ICI mAb-ok olyan receptorokat, illetve ligandumokat blokkolnak, amelyek aktiválódása a T sejtek korai kimerüléséhez és anergiájához vezet.

Bár mind a mAb, TIL és ICI terápia jelentős eredményeket ért el a rosszindulatú daganatok kezelésében, mindhárom stratégiát sajátos módon limitálják a tumorok védekezési mechanizmusai.

A tumorsejtek számos módon képesek rezisztanciát kialakítani a monoklonális antitestekkel szemben. Leggyakrabban a target antigén expresszióját csökkentik, emellett gátolhatják az elpusztításukra irányuló immunválaszt, valamint felszabályozhatják az apoptózist elkerülő és proliferációt serkentő jelátviteli útvonalakat. 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 (extracellular matrix, ECM) felépítésével. A TIL és ICI kezelések hatékonyságát a tumor MHC expressziójának csökkenése vagy megszűnése, illetve a tumorreaktív T sejtek alacsony száma korlátozhatja.

A szervezetben ugyanakkor bőségesen rendelkezésre állnak aktív – de nem tumorreaktív – T limfociták. Ezek átprogramozása a daganatok célzott megtámadására olyan megoldást kínál, ami egyesíti a bemutatott terápiás rendszerek előnyeit, ugyanakkor kiküszöböli azok hátrányait. Ez az úgynevezett CAR T sejt terápia, mely a monoklonális antitestekre jellemző célzott daganatfelismerést kombinálja a T sejtek robosztus tumorelleses hatékonyságával.

A CAR T sejt terápiák alapja a betegek T limfocitáinak genetikai módosítása egy szintetikus receptorról, amely a tumorspecifikus antigének célzott felismerését követően képes aktiválni a T sejtek effektor funkcióit. A terápiás eljárás fő lépései a páciens T sejtjeinek izolálás, azok aktiválása, majd ezt követően a kiméra antigén receptort kódoló terápiás transzgen genomba integrálása és a CAR-t kifejező T sejtek autológ transzfere. 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 rezisztanciára.

2.2. CAR T sejt terápia

2.2.1. *A CAR felépítése és evolúciójának főbb állomásai*

A CAR T sejteken alapuló immunterápia fejlesztése során a mesterséges receptor felépítése többlépcsős evolúción ment keresztül. 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 sejtválaszt kiváltó, TCR eredetű effektor endodoménre – támaszkodott. Ez a konstrukció biztosította a T sejt aktivációhoz nélkülözhetetlen antigénfüggő első szignált, 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, korlátozott perzisztenciájuk révén I. fázisú klinikai kísérletekben nem váltottak ki érdemi tumorcsökkenést. Ennek oka, hogy a natív T limfocitákhoz hasonlóan CAR T sejteknek is szükségük van a kostimulációs receptorok biztosította második szignálra citolitikus és proliferatív képességeik teljes körű aktiválásához. A második generációba tartozó 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. A stratégia klinikai áttéréshez 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 tumorelleses aktivitást mutattak, 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 sejtét, ellenben alkalmazásuk gyakrabban vezetett súlyos mellékhatások kialakulásához.

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 kontaktfelzínre 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.

A CAR molekula szerkezetének rövid, de funkcionálisan igen jelentős építőelemei az extracelluláris antigénfelismerő és intracelluláris effektor domének között elhelyezkedő henge (más néven spacer vagy linker) és transzmembrán (TM) alegységek. Előbbi az antigénfelismerő egység rugalmasságáért, utóbbi a receptor stabil membránbeli expressziójának biztosításáért felelős. A legelterjedtebben alkalmazott henge-ek IgG1, IgG4, CD8 vagy CD28 eredetűek, míg a TM domén jellemzően a CD8, CD4 vagy CD28 receptorokból származik. Funkcionális hatásaik tekintetében a henge 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 távolság kellően szoros maradjon ahhoz, hogy az aktivációs jelátvitelt gátló T sejt szabályozók kiszoruljanak az immunológiai szinapsziszból. 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. 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.

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 CD3 ζ láncából származik. 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 jelátviteli útvonalakat.

A II. és III. generációs CAR-ok egy, illetve két kostimulátor endodoménje a TM- és a CD3z alegység között helyezkedik el. A két leghatékonyabban alkalmazott kostimulátor, a CD28 illetve a 41BB erőteljes proliferációs, túlélési, és aktivációs szignált biztosít, azonban eltérő módon modulálják az effektorválasz kimenetelét. A CD28 kostimuláció által nyújtott robusztus citotoxikus válasz során a CAR T sejtek gyorsan kimerülnek, és rövidebb ideig perzisztáló effektor memória sejtekké differenciálódnak. Ezzel szemben a 41BB közvetítette citolízis kevésbé intenzív; de a CAR T sejtek hosszabb ideig maradnak fenn centrális memória alcsoportként.

2.2.2. CAR T sejtélesztmények előállítás

A CAR T sejtélesztmények előállításának első lépése a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC) szeparálása, melyet a T sejtek expanziója követ. 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 szignál az IL-2, IL7 és IL15 citokin szupplementáció szolgáltatja. Az aktivált és expandált T sejtek genomjába legtöbbször virális génbeviteli módszerek segítségével integrálják a CAR-t kódoló transzgént. A géntranszfer serkenthető a T limfociták és a víruspartikulumok egyidejű megkötésére alkalmas RetroNectin reagenssel. A CAR T sejtek a transzdukciónak hatásfokának ellenőrzését követően kerülnek felhasználásra.

A terápiás készítmény kiindulásául szolgáló perifériás sejtpopuláció összetételét tekintve magában foglalja a T limfociták fő differenciációs stádiumainak naiv, centrális memória (CM), effektor memória (EM) és terminális effektor (TE) T sejtjeit. A CAR T sejtek előállítását megköveteli az izolált T limfociták expandálását, amely egyben a sejtek differenciációját is indukálja. A T sejtek citolitikus hatékonysága fokozatosan növekszik, proliferatív kapacitásuk fokozatosan csökken a naivtól a terminális effektor felé mutató átalakulásuk során. A TE fenotípusú sejtek, bár robusztus citotoxikus aktivitással bírnak, további expanszióra már nem képesek, így idővel apoptózis útján elpusztulnak, vagy működésképtelen „kimerült” fenotípust vesznek fel. A T sejtek ex vivo szaporítása során alkalmazott stimulációs- és tenyésztési körülmények eltérően befolyásolják a differenciáció sebességét, ezáltal megszbáják az elkészült a sejtermék fenotípusprofilját. A CAR T sejtek fenotípuseloszlásának további fontos markere a CD4⁺ helper és CD8⁺ citotoxikus limfociták aránya. Szinergikus aktivitásuk során az erőteljes citolitikus képességekkel rendelkező CD8⁺ CAR T sejtek proliferációját, túlélését és effektor funkcióját a CD4⁺ CAR T sejtek citokinek kibocsájtásával támogatják. A T sejtek ex vivo tenyésztésének körülményei a CD4⁺/CD8⁺ eloszlást is befolyásolhatják.

2.2.3. CAR T sejt terápiák a klinikumban

Az elmúlt évtizedben jelentős számú második fázisú klinikai vizsgálat történt, amely B sejt leukémiákat és limfómákat célzott különböző targetekre specifikus CAR T sejtekkel. Ezek leggyakrabban a natív, ugyanakkor malignus B sejteteken is expresszáló CD19-et, a CD22-t illetve a B sejt maturációs antigént (B-cell maturation antigen, BCMA) célozták. A klinikai vizsgálatokban a második generációs CAR T sejtek áttörést értek el és a betegek 40-80%-ában komplett remisszióhoz vezettek. Az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatal (Food and Drug Administration, FDA) mára négy CD19, és két BCMA specifikus CAR T terápia számára adta meg a törzskönyvi engedélyt.

A CAR T sejtek előzőekben részletezett forradalmi sikerei a szolid daganatokkal szemben történő alkalmazás felé is utat nyitottak, ezek azonban jóval

összetettebb célpontot jelentenek a hematológiai megbetegedéseknél. Ezekben ritkán áll rendelkezésre olyan TAA, ami kellően specifikus célpontot jelent a CAR T sejtek számára, valamint a génmódosított T sejtek expanziója és perzisztenciája a tumorban a legtöbb esetben nem elégséges a hatékony tumorlízis kiváltásához. Ezen akadályok ellenére világszerte megközelítőleg 200 CAR T sejt klinikai vizsgálat zajlik a legkülönbözőbb szervekre lokalizált szolid tumorokkal szemben.

A legkorábbi és mai napig leggyakrabban vizsgált terápiás célpont a HER2, mely fokozottan expresszálódik többek között emlő, tüdő, gyomor, vastagbél, glia és hasnyálmirigy eredetű tumorsejtek felszínén. A HER2-CAR T terápiát elsőként egy metasztatikus vastagbél karcinómát célzó klinikai vizsgálatban tesztelték, magas dóziszú III. generációs CAR T sejtek alkalmazásával. A terápiás sejtek infúzióját követően súlyos „citokin vihar” lépett fel, ami a beteg halálához vezetett. 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. Glioblasztómában szenvedő betegek I. fázisú klinikai vizsgálatában a CD28 kostimulált HER2-CAR T limfociták infúziója jól tolerálható volt a kezeléssel összefüggő súlyos toxicitások fellépése nélkül, de a 16 értékelhető beteg közül csak 1 esetben a mutatkozott részleges tumorválasz. A publikált adatok alapján ezidáig egy páciens teljes felépülését sikerült elérni HER2 specifikus CAR T sejt terápiával. Egy refrakter, csontáttéteket adó lágyszarkómában szenvedő gyermek hét ciklusban részesült CD28 kostimulációt alkalmazó CAR T sejt kezelésben, ami az utolsó infúziót követő 10. hétre teljes mértékben eradikálta a daganatot.

3. Célkitűzések

A B sejtés leukémiák és limfómák kezelésében alkalmazott CAR T terápiák sikerét a konstrukció felépítésétől a sejt készítmény fenotípus profiljáig a rendszer összetett optimalizálása alapozta meg. A szolid daganatokat célzó CAR T sejtek klinikai tapasztalatai azonban egyelőre elmaradnak a várakozástól. A HER2-CAR T terápiák klinikai teszthejében a kis mértékű, de a betegek egy részénél konzisztensen jelentkező tumorválasz 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⁺ 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 tumorelles hatékonyságát a kiméra receptor molekuláris szerkezete, sejt felszíni szerveződése, és membrándiffúziós dinamikája?
- Milyen T sejt fenotípus profil biztosítja a leghatékonyabb hosszú távú expanziót és effektor választ a HER2⁺ szolid tumorokat célzó CAR T sejtek számára?

4. Anyagok és módszerek

4.1. A kísérletek során alkalmazott sejtvonalak

A HER2-CAR kódoló retrovirális vektorok előállítására a HEK293T víruscsomagoló sejtvonalat használtuk. A CAR T sejtek in vitro tumorellenes aktivitását a transzdukált HER2-t stabilan expresszáló MDA-MB-468 (MDA-HER), a HER2⁺ N87 és JIMT-1 sejtvonalak; illetve luciferáz expresszáló variánsaik (MDA-HER2.ffLuc, N87.ffLuc és JIMT-1.ffLuc) segítségével vizsgáltuk. Kontrollként a HER2⁻ MDA/MDA.ffLuc sejtvonal szolgált. Sejtvonalainkat 2 mmol/l GlutaMAX-al, 10% magzati borjúszérummal (FBS) és antibiotikumokkal kiegészített DMEM médiumban tenyésztettük a JIMT-1/JIMT-1.ffLuc kivételével, melyeket 1:1 arányban kevert Ham-féle F12 és DMEM kulturáltunk 2 mmol/l GlutaMAX, 20% FBS, 300 U/l inzulin és antibiotikumok hozzáadásával. A CAR T sejtek in vivo tumorellenes hatékonyságát a JIMT-1/JIMT-1.ffLuc tumor xenograft alkalmazásával vizsgáltuk. Minden sejtvonalat 5% szén-dioxidot tartalmazó párásított atmoszférában tenyésztettünk 37°C-on.

4.2. CAR T sejtek előállítása

4.2.1. PBMC izolálás

A CAR T sejtek előállítására használt PBMC izolátumot egészséges donorok perifériás teljes vérből nyertük ki 1200 rpm-en, 10 percig, szobahőmérsékleten történő gradiens centrifugálással. A T sejt izolátumokat folyékony nitrogénben tároltuk, 10% dimetil-szulfoxid, 10% RPMI-1640 médiumban, és 80% FBS tartalmú krioprezerváló oldatban.

4.2.2. Az alkalmazott CAR konstrukciók

Kutatómunkánk során összesen négy különböző CAR konstrukciót alkalmaztunk. Az I. generációs CAR molekuláris szerkezetét a HER2 specifikus FRP5 eredetű scFv, az IgG1 „short hinge” (SH), a CD28 eredetű TM, valamint a CD3z effektor domén alkotta (.z CAR). A II. generációs CAR-okba ezen kívül a CD28 vagy 41BB (CD28.z, 41BB.z CAR) kostimulációs domén került beépítésre. A III. generációs CAR mindkét (CD28.41BB.z CAR) kostimulációs domént tartalmazta.

4.2.3. CAR kódoló retrovirális pszeudovírusok előállítása

Az adott CAR konstrukciót hordozó pSFG retrovirális vektort, a virionok strukturális fehérjéit és a virális replikációhoz szükséges enzimmészletet kódoló MoMLV Peg-Pam-e plazmidot, valamint a vírusburokfehérjét kódoló pMax.RD114 plazmidot tartalmazó mixet JetPRIME transzfekciós reagens (Polyplus, Illkirch, Franciaország) segítségével juttattuk be a HEK293T sejtekbe, a gyártó utasításait követve. Három napig tartó inkubációt követően a retrovírust tartalmazó felülülzót 0,22 µm pórusátmérőjű steril fecskendőszűrővel tisztítottuk, és felhasználásukig -80°C-on tároltuk.

4.2.4. T sejt stimulációs és tenyésztési protokollok, CAR transzdukció

Kísérleteink során kétféle CAR T sejt előállítási módszert alkalmaztunk. Az *antiCD3-antiCD28/RPMI protokoll* során T sejtek osztódását 1 µg/ml OKT3 és 1 µg/ml anti-CD28 antitesttel borított 24 kamrás sejttenyésztő edényben indukáltuk egy éjszakán keresztül, 2 mmol/l GlutaMAX-al, 10% FBS-el és antibiotikumokkal kiegészített RPMI médiumban (komplett RPMI). 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 20 µg/ml RetroNectinnel bevont 24 kamrás tenyésztőedényre cetnrifugáltuk a CAR konstrukciót hordozó retrovirális vektorokat 4000 rpm-en, 2 órán keresztül történő centrifugálással. A T sejteket 3 napon keresztül inkubáltuk a retrovírussal bevont tenyésztőedényben, 10 ng/ml IL-7 és 5 ng/ml IL-15 jelenlétében, komplett RPMI médiumban. Az előállított CAR T sejteket felhasználásukig friss 10 ng/ml IL-7 és 5 ng/ml IL-15 tartalmú komplett RPMI médiumban tenyésztettük. A CAR T sejtekkel párhuzamosan nem transzdukált (NT) T sejteket is előállítottunk, melyeket méréseink során kontrollként alkalmaztunk.

Az *antiCD3-RetroNectin/LymphoONE protokoll* esetén aT sejtek osztódását 1 µg/ml anti-CD3 antitesttel és 20 µg/ml RetroNectin reagenssel borított 24 kamrás sejttenyésztő edényben indukáltuk egy éjszakán keresztül, komplett LymphoONE tápfolyadékban. A T sejt transzdukció minden további körülménye megegyezett az *antiCD3-antiCD28/RPMI* protokollban leírtakkal.

4.3. Immunfluoreszcenciás jelölések, áramlási citometria

A HER2 specifikus CAR-ok expresszióját HER2-Fc fúziós proteinnel és Alexa Fluor 488 (A488) konjugált anti-IgG-vel való indirekt jelöléssel igazoltuk. A CAR T sejtermékek helper és citotoxikus limfocita arányát a CD4 és CD8 expresszió alapján határoztuk meg, FITC konjugált anti-humán CD4 illetve Alexa Fluor 647 (A647) konjugált anti-humán CD8 kettős jelölés segítségével. A CD4⁺ populáció a CD4⁺, CD8⁻ kvadráns, a CD8⁺ populáció pedig a CD8⁺ CD4⁻ kvadráns adatait tartalmazza, a CD4⁺, CD8⁺ dupla pozitív, illetve CD4⁻, CD8⁻ dupla negatív kvadránsbeli sejteket kizártuk az elemzésből. A memória fenotípusok eloszlásának vizsgálata során a CCR7 és a CD45RA receptorok expresszióját FITC konjugált anti-humán CD197 (CCR7) és APC konjugált anti-humán CD45RA monoklonális antitestekkel való kettős direkt jelöléssel határoztuk meg. A naiv sejteket CCR7⁺ és CD45RA⁺, a T_{CM} sejteket CCR7⁺, CD45RA⁻, T_{EM} sejteket CCR7⁻ és CD45RA⁻, a T_{TE} sejteket CCR7⁻, CD45RA⁺ populációként azonosítottuk. Az antitestekkel, illetve a HER2-Fc rekombináns fehérjével való jelölést 10 µg/ml végső koncentrációban, 10 percig, jégen végeztük. A mérések során minden esetben minimum 10⁴ sejtet vizsgáltunk, NovoCyte áramlási citométer és a NovoExpress szoftver segítségével.

4.4. 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. A diamino-fenilindol (DAPI) festéket 405 nm hullámhosszúságú lézerdióddával; az A488 és zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein, GFP), illetve a fikoeritrin (PE) festéket argon ion lézer 488 nm-es illetve 543 nm-es vonalával, az A647 festéket 633 nm hullámhosszúságú HeNe lézerrel gerjesztettük. A felvételeket az ImageJ/Fiji szoftver segítségével értékeltük ki.

4.4.1. A CAR-ok alkotta immunológiai szinapszis analízise konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával

A CAR-ok alkotta immunológiai szinapszis (IS) vizsgálata során kamránként 3×10^4 N87 tumor sejtet tapasztottunk ki sejttenyésztésre alkalmas tenyésztőedénybe. 2×10^5 CAR T sejtrel való, 15 percen keresztül tartó inkubációt követően a sejteket 1% PFA-ban fixáltuk, majd 10 $\mu\text{g/ml}$ A488 konjugált anti-HER2-vel valamint permeabilizálás után A647 konjugált anti-pCD3z-vel vagy PE konjugált anti-pLck-vel jelöltünk 30 percen keresztül, jégben. Ezután a sejteket először PBS-ben, majd 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI tartalmú PBS-ben, végül ismét PBS-ben mostuk. A konfokális lézer pásztázó üzemmódbeli felvétel során a fluoreszcens festékek emisszióját 32 elemű GaAsP fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk, melyek tartományait az alkalmazott festékek emissziós maximumaihoz állítottuk be. A felvételek váltott csatornás üzemmódban készültek.

4.4.2. CAR membránstruktúrák jellemzése Airyscan mikroszkópiával

A CAR-ok membránfelszíni szerveződését nyugvó CAR T sejtekben vizsgáltuk. A CAR T sejteket 37°C -on egy órán keresztül szérumentes RPMI tápoldatban inkubáltuk, majd 4°C -os PBS-el mostuk. A sejteket 5 $\mu\text{g/ml}$ A647 konjugált monomer HER2-vel jelöltük 10 percen keresztül jégben, mostuk, majd 10 mM glükóz-PBS-ben szuszpendáltuk. A sejteket a mérés során 37°C -on inkubáltuk. A jelölt CAR T sejtek apikális membránfelszínéről 600 nm vastag optikai szeleteket vettünk fel AiryScan üzemmódban, mely speciális detektálási elvének köszönhetően magasabb felbontást és kedvezőbb jel-zaj arányt biztosít a konfokális mikroszkópiához képest. Az A647 emisszió detektálására 660 nm-es felüláteresztő szűrőt alkalmaztunk. A felvételek intenzitásalapú szegmentálásával meghatároztuk az egyedi CAR klaszterek átlagos méretét és intenzitását, valamint a receptorklaszterek átlagos számát egységnyi membrán felületen.

4.5. CAR membrándiffúzió mérése fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával

A fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS) alapja fluoreszcensen jelölt, oldott részecskék helyzetében és számszerű sűrűségében jelentkező sztochasztikus ingadozások mérése egy fókuszált lézernyaláb által gerjesztett térfogatelemben. Az élő sejteken történő FCS vizsgálat a fókuszált lézernyaláb sejtmembrán általi metszetében jelentkező intenzitásfluktuáció detektálásán alapul. A mért fluktuáció matematikai átalakításával kapott időbeli $G(\tau)$ autokorrelációs függvényre megfelelő próbafüggvényt illetve becsülhető a vizsgált fluoreszcensen jelölt molekulák és/vagy receptorok lokális koncentrációja és diffúziója.

A CAR membrándiffúzió FCS-el való meghatározása során a CAR T sejtek előkészítése, jelölése és a mérési körülmények megegyeztek a 4.4.2-es fejezetben bemutatottakkal. A mérések hossza sejtenként 100 s volt, az autokorrelációs görbéket 10 s-os részintervallumokra bontva számoltuk ki. Az autokorrelációs görbékre egy komponens térbeli és egy komponens síkbeli szabad diffúzióját leíró, triplet korrekciót tartalmazó modellfüggvényt illesztettük. A 3D diffúziót mutató komponenst a disszociált monomer A647-HER2-ként, a 2D diffúziós karakterisztikájú komponenst a mobilis CAR frakcióként azonosítottuk.

4.6. Western-blot

A CAR-ok oligomerizációját Western blot segítségével vizsgáltuk. A CAR T sejteket 4°C-os PBS-el mostuk, majd lizáltuk. A dimer és oligomer CAR-okat natív körülmények között, a monomer receptorokat 0,1 mM ditiotreitol (DTT) tartalmú redukáló mintapufferben választottuk el 10%-os SDS-PAGE poliakrilamid gélen. A fehérjesávokat félszáraz blottolóval polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra vittük át. A membránt blokkoltuk, majd 1 µg/ml egér anti-humán CD3z antitesttel jelöltük egy éjszakán keresztül 4°C-on. A membránt mosást követően peroxidáz konjugált anti-egér IgG másodlagos antitesttel jelöltük, majd egy ismételt mosási lépést követően HRP szubsztrátot tartalmazó előhívó oldatban inkubáltuk 3 percre. A felvételeket a FluorChem Q képalkotó és analízis rendszer segítségével készítettük el.

4.7. A CAR molekuláris szerkezetének predikciója

A CAR-ok másod- és harmadlagos szerkezetét a RoseTTAFold algoritmussal modelleztük. A legmagasabb megbízhatósági pontszámmal rendelkező predikciós modelleket választottuk elemzésre.

4.8. „Rechallenge” próba

A CAR T sejtek proliferációs potenciálját ún. „rechallenge” próba segítségével vizsgáltuk. 2×10^5 CAR T sejtet helyeztünk 1 $\mu\text{g/ml}$ HER2-Fc molekulával fedett tenyésztőedényre. 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 $\mu\text{g/ml}$ HER2-Fc fedett tenyésztőedényen. A sorozatos stimuláció 0., 3,5. és 10,5. napján áramlási citometriával meghatároztuk a CAR T sejt készítmények CD4/CD8 és memória fenotípus eloszlását a 4.3-as fejezetben ismertetett módon.

4.9. CAR T sejtek citokin szekréciójának meghatározása

A CAR T sejtek antigén specifikus aktivációját az IL-2 és IFN γ citokinek kibocsátásával jellemeztük. 2×10^5 CAR T sejtet inkubáltunk 24 órán keresztül 1 $\mu\text{g/ml}$ HER2-Fc-vel fedett sejttenyésztő edényben. A felülúszó IL-2 és IFN γ koncentrációját a gyártó által előre összeállított puffer- és reagens készletek segítségével, ELISA módszerrel határoztuk meg, Synergy HT ELISA olvasó alkalmazásával. Kontrollként sejtmentes médiumot, valamint az NT T sejteket használtuk.

4.10. CAR T sejtek in vitro citotoxicitásának meghatározása

A CAR T sejtek citotoxicitását az MDA-HER2.ffLuc, N87.ffLuc és JIMT-1.ffLuc tumor sejt vonalak alkalmazásával vizsgáltuk. A target-és effektor sejteket 1:1 arányban kokultúráltuk 24 órán keresztül. A túlélő tumor target sejtek relatív arányát a D-luciferin bomlását követő lumineszcens jel detektálásán alapuló módszer segítségével határoztuk meg Synergy HT luminométer használatával. Kontrollként NT T sejteket, valamint a HER2⁻ MDA.ffLuc sejt vonalat használtuk.

4.11. CAR T sejtek in vitro citotoxicitásának mérése valós időben

A CAR T sejtek citotoxikus aktivitásának kinetikáját elektromos impedancia mérésen alapuló Elektromos Sejt-szubsztrát Impedancia szenzorral (ECIS) jellemeztük. A lemez alját borító arany elektródákra JIMT-1 tumorsejteket tapasztottunk ki.

A JIMT-1 sejteket a konfluens állapot eléréséig tenyészettük a lemezen, ami elengedhetetlen a különböző kezelések összehasonlításához. A 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. Az impedanciát 25 órán keresztül követtük. Az átlagolt impedancia értékeket először a kiindulási impedanciával, majd az NT T sejt kontrollban mért impedanciával normalizáltuk.

4.12. Xenograft tumorok CAR T sejt kezelése

A CAR T sejt kezelés JIMT-1 sejtekből álló xenograft daganatra gyakorolt hatását NSG egerekben vizsgáltuk. A xenograft oltást a nőstény egerek 7 hetes korában adtuk be, 100 µl PBS-ben szuszpendált 3×10^6 JIMT-1.ffLuc vagy 3×10^6 JIMT-1 sejt és ezzel megegyező térfogatú Matrigel keverékének szubkután injekciójával. 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 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 állatokat intraperitoneálisan D-luciferinnel (150 mg/kg) injektáltuk. A biolumineszcens felvételeket a Living Image szoftver 4.0 verziójával (Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA) elemeztük.

4.13. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis során a GraphPad Prism 5 szoftvert (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA) használtuk. Két csoport összehasonlítására kétoldali t-próbát alkalmaztunk. Három vagy több csoport összehasonlításához egyirányú ANOVA-t és Tukey vagy Bonferroni-féle post hoc tesztet használtunk. Az eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$ volt.

5. Eredmények

5.1. A kostimulációs domének meghatározzák a kiméra antigén receptorok sejtfelszíni szerveződését és a CAR T sejtek korai aktivációját

A CAR T sejtek rövid távú effektorválaszt 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. A legelterjedtebben alkalmazott kostimulációs endodomének szerepe azonban mindeddig nem került feltárára. Projektünk első részében ezért a CD28 és 41BB 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 a tumorsejt elimináció rövid távú kinetikájára.

Az első generációs .z, második generációs CD28.z, 41BB.z illetve harmadik generációs CD28.41BB.z HER2-CAR T sejteket retrovirális transzdukciós rendszerben állítottuk elő, *antiCD3-antiCD28/RPMI protokoll* alkalmazásával. A receptorra specifikus fluoreszcens jelölést követően áramlási citometriával meghatároztuk a transzdukciós hatékonyságot. Az előállított sejtkelesztmények 75-95 százaléka kifejezte a kiméra antigén receptort, nem tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eltérést a négy eltérő konstrukció között.

A receptorok oligomerizációját Western-blot segítségével jellemeztük. Megállapítottuk, hogy a .z és a CD28.z CAR-ok mintegy 90%-ban dimereket alkotnak, míg a 41BB kostimulációs doménnel rendelkező CAR-ok 40-60%-a magasabb rendű oligomereket képez. A CAR-ok antigénstimulustól független szerveződését ezt követően a sejtfelszíni membránstruktúrák szintjén vizsgáltuk Airyscan szuperrezolúciós mikroszkópiával és digitális képanalízissel. 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. Az egyedi klaszterek kiterjedésében és receptorsűrűségében azonban szignifikáns eltérést mutattunk ki a különböző CAR konstrukciók között. Az elsősorban dimereket alkotó .z és CD28.z CAR-ok kis számú, nagy méretű és denzitású szubmikronos doménekbe rendeződtek, az oligomert képző 41BB tartalmú CAR-ok nagy számú, kisméretű membrán klaszterekbe szerveződtek.

A különböző kostimulációs doménekkal rendelkező kiméra receptorok tehát eltérő morfológiájú sejt felszíni struktúrákat alkottak, 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 fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (FCS) megvizsgáltuk a különböző kostimulációs doménekkal rendelkező CAR-ok membrándiffúziós kinetikáját. Eredményeink szerint a .z CAR bizonyult a legkevésbé, a CD28.41BB.z CAR a leginkább mobilisnak, míg a II. generációs CD28.z, és a 41BB.z CAR-ok diffúziós sebessége az I.-és III. generációs CAR-ok közé esett. Megfigyeléseinket a RoseTTAFold gépi mélytanuláson alapuló fehérjeszerkezet-modellezéssel korreláltatva megállapítottuk, hogy a CAR-ok laterális diffúziója a CD3z domén membrán síkjától, így a natív TCR CD3 ζ pozíciójától távolodva arányosan nő.

A natív CD8⁺ T limfocitákhoz hasonlóan a CAR T sejtek is csak akkor képesek citolitikus funkciójuk ellátására, ha a célmolekula felismerését 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 citoskeletális hálózat átrendeződése és a kontaktfelszín szélén kialakuló adhézions 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 átmérőjüknel fogva mintegy előre összeszerelt aktivációs és adhéziós centrumként kínálóznak. Eredményeink szerint ugyanakkor a CAR T sejt membránfelszínének csupán harmadát fedik klaszterek. A fennmaradó területen is található mobilis receptorkomponensek, melyek szintén fontos szerepet játszhatnak a CAR szinapszis felépítésében és az aktivációs jel közvetítésében.

Következő lépésben tehát megvizsgáltuk a CAR-ok sejt felszíni szerveződésének és membránbeli mobilitásának az immunszinapszisok területén zajló szignáltranszdukció hatékonyságához való viszonyát. A különböző kostimulációs doménnel rendelkező HER2-CAR T sejteket 15 percen keresztül inkubáltuk tumorsejtekkel fedett lemezen. Fixálásukat követően konfokális mikroszkópia és digitális képanalízis segítségével kvantifikáltuk a CAR által közvetített jelátvitel első két lépését – a CD3z és Lck foszforilációját – az immunszinapszis területén. Eredményeink szerint mind a nagyfokú mobilitással és kisméretű klaszterekkel rendelkező CD28.41BB.z, mind a lassan diffundáló, nagyméretű klaszterekbe rendeződő .z CAR-ok hatékonyabban indukáltak CD3z foszforilációt mint a közepesen mobilis CD28.z és 41BB.z CAR-ok. Ugyanígy az Lck foszforiláció tekintetében is előnyösnek bizonyultak mind a nagyméretű .z klaszterek, mind a nagyobb diffúziós sebességű CD28.41BB.z oligomerek: előbbi a nagyobb kiterjedésű szinapszisok kialakulásának kedvezett, utóbbi fokozott Lck foszforilációval járt együtt.

A citotoxikus hatást elektromos impedancia mérésen alapuló ECIS bioszenzor segítségével jellemeztük, amely a tárgylemez felszínét fedő arany elektródákra tapadó sejtek által lefedett terület impedanciáját méri. Az ECIS-szel mért impedanciaváltozás alapján a kisméretű klaszterekkel és mobilis receptorokkal rendelkező CD28.41BB.z, és a szintén fragmentált klasztereket képző, közepes diffúziós sebességű 41BB.z CAR indukálta a legkisebb mértékű tumoreliminációt, míg a .z CAR-ok által képzett nagyméretű receptor aggregátumok jelenléte eredményezte a leghatékonyabb citolitikus aktivitást a kultiválás első 25 órájában.

5.2. A CAR T sejt készítmények fenotípus összetétele meghatározza a tumorelles aktivitás hosszú távú hatékonyságát

A CAR T sejtek hosszú távú hatékonyságában jelentős szerepet játszik a sejterápiás készítmény összetétele. A leukémiás és limfómás megbetegedéseket 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 tumorelles hatékonysággal. Szolid tumorok esetén azonban nem volt ismert, hogy a CAR T készítmény fenotípus összetétele és CD4⁺/CD8⁺ eloszlása hogyan befolyásolja a citolitikus hatékonyságot valamint a hosszú távú expanziót és túlélést. Irodalmi adatok alapján a T sejtek expanziójára optimalizált LymphoONE médium alkalmazása, valamint a RetroNectin rekombináns fibronectin fragmenssel történő előstimuláció lassíthatja a T sejt differenciációt.

Kutatómunkánk során az *antiCD3-antiCD28/RPMI*, valamint *antiCD3-RetroNectin/LymphoONE* protokollok alkalmazásával állítottunk elő CD28.z és 41BB.z HER2-CAR T sejteket retrovirális transzdukciós rendszerben. A transzdukciós hatékonyságot, a memória fenotípusok eloszlását, valamint a helper/citotoxikus CAR T limfociták arányát áramlási citometriával határoztuk meg, négy nappal a transzdukciót követően. A különböző protokollokkal előállított sejt készítmények esetén a transzdukciós hatékonyság illetve a CAR expresszió nem különbözött szignifikánsan. Ugyanakkor az *antiCD3-RetroNectin/LymphoONE* protokoll jelentős mértékben csökkentette a T sejt differenciáció sebességét, ami a CM fenotípusú CAR T sejtek szignifikáns dúsulásához vezetett. Ezzel szemben *antiCD3-antiCD28/RPMI* sejtermékek előrehaladott differenciációs szintet mutattak, ami az EM fenotípusú limfociták szignifikánsan magasabb arányában mutatkozott meg.

Az effektor sejtek target specifikus aktiválódását jelző IFN γ és IL-2 citokin kibocsájtást immobilizált HER2 targettel történő stimulációt követően határoztuk meg ELISA módszerrel. Az *antiCD3-antiCD28/RPMI* protokollal előállított, EM fenotípusú limfocita többlettel rendelkező CAR T sejtek jelentősen több IFN γ és IL-2 citokint termeltek, mely különbség a 41BB.z CAR T sejtek esetén szignifikánsnak bizonyult.

Az in vitro citotoxicitást luciferáz expresszálo tumorsejteken vizsgáltuk a D-luciferin bomlását követő lumineszcens jel detektálásán alapuló esszé segítségével. A citokin kibocsátás eredményeivel összhangban az EM fenotípusú CAR T sejteket nagyobb arányban tartalmazó sejtkészítmények jelentősen magasabb HER2 specifikus citotoxicitást mutattak a kevésbé differenciált sejtkészítményekkel szemben. A CAR T sejtek expanziós képességét és összetételének változását vizsgáló „rechallenge” kísérlet eredményei szerint a lassú differenciációt mutató, CM fenotípus domináns limfociták expanziója a kísérlet 7-10,5. napjától fokozatosan csökkent. A differenciált, EM fenotípusú sejtekben gazdag készítmények expanziója ezzel szemben folyamatos növekedést mutatott. A hosszú távú stimuláció során egyedül a differenciált CD28.z CAR limfociták őrizték meg a kiegyensúlyozott, kiindulásival közel azonos CD4/CD8 arányt, a többi készítményben a CD8 citotokikus limfociták fokozott expanziója mellett a CD4 helper T sejtek száma fokozatosan csökkent.

Az utolsó, preklinikai kísérletsorozatunkban összehasonlítottuk a késleltetett, illetve előrehaladott differenciációs fokú készítmények in vivo tumorellenes aktivitását és tumorinfiltrációs, illetve expanziós potenciálját JIMT-1 xenograft modellben. In vitro eredményeinkkel összhangban a differenciált, EM domináns CAR T sejtermékek nagyfokú tumorellenes aktivitása 100%-os túlélést biztosított. Ugyanakkor egyedül a kiegyensúlyozott CD4/CD8 eloszlású CD28.z CAR T sejtermékekkel való kezelés eredményezett teljes tumor eradikációt. Bár a lassan differenciálódó készítményekkel kezelt egerek a kontroll NT T sejtekhez képest lassabb tumor növekedést és jobb túlélést mutattak, a kísérlet 100. napjára az egerek mintegy 80%-a elpusztult. A differenciált, EM domináns CAR T sejtermékek kedvezőbb expanziót mutattak a tumorszövetben, ezen belül a CD28.z CAR T sejtek gyors proliferációs csúcst értek el, míg a 41BB.z limfociták lassabban és egyenletesebben szaporodtak. A késleltetett differenciációjú sejt készítményeknél az in vitro eredményeinkkel összhangban átmeneti expanzió jelentkezett, és a differenciált sejtekhez hasonlóan a CD28.z-nál magas proliferációs csúcs, a 41BB.z-nál alacsony növekedés volt megfigyelhető.

6. 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 ezen szálon kapcsolódik a mesterségesen beépített receptor és a T sejt fiziológiai működésének szinergiájához. A CAR, akár csak bármely más természetes membránreceptor, komplex sejt felszíni 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 sejt leukémiák és limfómák kezelésében alkalmazott CAR T terápiák sikerét a konstrukció felépítésétől a heterogén sejt készítmény fenotípus profiljáig a rendszer összetett optimalizálása alapozta meg. A szolid szervi daganatokat célzó CAR T sejtek klinikai tapasztalatai azonban egyelőre elmaradnak a várakozástól, szükségessé téve olyan beavatkozási pontok azonosítását, amelyek által hatékonyságuk növelhető.

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 állatkísérletes modellekben, de nem váltottak ki terápiás választ klinikai vizsgálatokban. A 41BB.z HER2-CAR T sejtek kutatócsoportunk eredményei szerint korlátozott daganatellenes aktivitással rendelkeznek HER2-pozitív xenograft modellben. A harmadik generációs CAR-okat abban a reményben fejlesztették ki, hogy a CD28 és 41BB kostimulációs domének kombinálásával összeadódnak 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. Ez a sajnálatos eset rámutat,

hogy a terápia klinikai fázisba lépését megelőzően szükséges az CAR-ok molekuláris működésének lehető legszélesebb körű feltárása.

A kostimulációs alegységek az antigénspecifikus stimulációt követő szignáltranszdukciós útvonalakra gyakorolt hosszú távú hatásuk mellett molekuláris szinten is befolyásolhatják a kiméra antigén receptorok viselkedését. 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 paramétereket a korai citolitikus aktivitás kinetikájával összefüggésben vizsgáltuk. Elsőként azt demonstráltuk, hogy az I. generációs .z és a II. generációs CD28.z CAR-ok főként dimereket alkotnak, és kevesebb, de nagyobb kiterjedésű sejtfelszíni klaszterbe szerveződnek. 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 terciér struktúrát eredményez, amely elősegíti 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.

A CAR-ok mobilitására vonatkozó 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 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.

Balagopalan és munkatársai kimutatták, hogy a TCR nanoklaszterek jelenléte a nyugvó T sejt membránban javítja stimulációt követő jelátvitelt. Ezen eredményekre alapozva feltételeztük, hogy az előre összeszerelődött receptor klaszterek, valamint a

klasztereken kívül elhelyezkedő receptorok mozgékonyasága 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 aktivációs szignál transzdukcióját konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk, p-CD3z és p-Lck specifikus jelölést alkalmazva. A felvételek kvantitatív elemzése szerint a .z és a CD28.41BB.z konstruktok erősebb CD3z és Lck foszforilációt váltottak ki, mint a CD28.z és a 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.

A hematológiai megbetegedéseket célzó CAR T terápiák nagyfokú sikeréhez hozzájárult a T limfociták differenciálódási folyamatainak eredményeként heterogén sejtpopulációkkal rendelkező sejtermékek fenotípus összetételének optimalizálása. Kutatómunkánk során különböző stimulációs és tenyésztési metodikák alkalmazásával eltérő fenotípus profilú CD28.z és 41BB.z HER2-CAR T sejteket állítottunk elő. Az *antiCD3-antiCD28/RPMI* protokoll előrehaladott differenciációs profilt mutató, EM fenotípus domináns; az *antiCD3-RetroNectin/LymphoONE* protokoll lassan differenciálódó, CM fenotípusú limfocitákban gazdag CAR T sejt készítményeket eredményezett.

Funkcionális in vitro vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az EM limfocitákat magasabb arányban tartalmazó CAR T készítmények jelentősen nagyobb mennyiségű IFN γ és IL-2 citokint szekretálnak immobilizált célantigének jelenlétében, és erősebb CAR-specifikus antitumor hatást váltanak ki, mint a CM domináns, lassan differenciálódó párjaik. A differenciáltabb EM-domináns CAR T sejtek továbbá magasabb hosszú távú proliferációs potenciált mutattak immobilizált célantigénnel való sorozatos stimuláció folyamán. In vitro megfigyeléseinkkel összhangban az EM fenotípusban dúsulást mutató CAR T sejt készítmények hatékonyan infiltrálják és

eliminálják a tumor xenograftot, és nagyobb mértékben expandálnak a lassabban differenciálódó, CM-ben gazdag sejtermékeknel.

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 frekvenciája hozzájárul a CD19-CAR T terápiás sejtek magas fokú tumorspecifikus citolitikus aktivitásához és akár éveken keresztül fenntartott perzisztenciájához. Ez számos tényezőtől fakadhat, ideértve az eltérő fenotípusú T limfociták szöveti elhelyezkedését: míg az EM sejtek jellemzően a perifériás szövetekben telepednek le, a CM limfociták nem lépnek ki a vérkeringésből. Emellett nem elhanyagolható a szolid szervi daganatok és a leukémiás sejtek sejtfelszíni molekuláinak eltérő összetétele, valamint a leukémiás sejtek könnyű hozzáférhetősége a véráramban keringő CAR T sejtek számára, ami erősen eltér a szolid tumorok komplex mikrokozonyezetétől. Ezek alapján feltételezhető, hogy a CM sejtek alacsonyabb inherens citotoxikus potenciálja, de kedvezőbb hosszú távú túlélése optimális tumorelles hatékonyaságot 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.

Bár *in vivo* kísérleteinkben mind a CD28.z, mind a 41BB.z EM-domináns CAR T sejtészítmény hatékonyabb tumorelles aktivitást mutatott a CM-domináns párjaiknál, egyedül az *in vitro* eredményeink során kimutatott, kiegyensúlyozott CD4/CD8 eloszlással rendelkező, érett fenotípus profillal rendelkező CD28.z CAR limfocita kezelés eredményezett teljes tumor eradikációt. Számos tanulmány kimutatta, hogy a CD4⁺ helper és a CD8⁺ citotoxikus T sejtek szinergikus daganatellens hatást fejtenek ki, ami pozitívan befolyásolta a tumorelles aktivitást, így megfigyeléseink alátámasztják azt a koncepciót, hogy szolid tumorokkal szemben előnyös lehet a kiegyensúlyozott CD4/CD8 arányú CAR T terápiás sejtészítmények alkalmazása.

7. Következtetések

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 klaszterre 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.z CAR-ok előre összeszerelődött nagyméretű klaszterei hatékonyabban indukáltak CD3z foszforilációt és gyűjtöttek pLck-t az immunológiai szinapszisba, mint a közepesen mobilis 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 leghatékonyabbnak. 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 sejtermékek fenotipikus összetételét, és igazoltuk ezen jellemzők jelentős hatását a CAR T sejtek működésére. Eredményeink szerint a jobban differenciált, effektor memória domináns CAR T sejtermékek 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+ citotoxikus CAR T sejtek aránya jelentős növekedést mutatott. Preklinikai modellünkben demonstráltuk, hogy az effektor memória irányú differenciáció, és a

kiegyensúlyozott CD4⁺/CD8⁺ arány kölcsönzi a legerőteljesebb expansziós és citolitikus hatékonyságot a HER2⁺ szolid tumorokat célzó CAR T sejteknek. Ez a felismerés azt a világos üzenetet közvetíti a klinikumnak, hogy CAR T sejtkelesztmények előállításnak optimalizálása és az ideális fenotípusprofil meghatározása a kezelt tumor típusának és antigénprofiljának függvényében elengedhetetlen feltétele a sikeres klinikai kipróbálásnak.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. 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)
2. **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 (Base). 15 (12), 3081-3097, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers15123081>
IF: 6.575 (2021)
3. **Mezősi-Csaplár, M.**, Szöllösi, 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 (Base). 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 közleményekre):
21,936**

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

Debrecen, 2023.06.26.

