ABSTRAKT

T-lymfocyty exprimující chimérické antigenní receptory (CAR) představují nový léčebný postup, který je obzvláště účinný proti B-lymfocytárním malignitám, a mění dosavadní paradigma léčby rakoviny. V současné době existuje několik schválených a komerčně dostupných CAR T-lymfocytárních produktů. Nicméně tato léčba je stále neúnosně finančně nákladná. Proto existuje poptávka po nahrazení obzvláště nákladných retrovirových/lenvirových vektorů levnějšími, nevirovými alternativami. Navíc se současný výzkum nadále zaměřuje na další vylepšení CAR T-lymfocytů posílením jejich protinádorových funkcí, expanze a perzistence *in vivo*. Kromě toho je usilováno o rozšíření spektra antigenů a nemocí proti kterým by byly CAR T lymfocyty použitelné. Tato disertační práce se zabývá výrobou CD19 specifických CAR T-lymfocytů z hlediska použitých cytokinů při kultivaci, vektoru pro genetickou modifikaci, testováním nového konstruktu CARu sekretujícího interleukin (IL)-21 a analýzou CAR T-lymfocytů od pacientů léčených produktem tisagenlecleucel.

V rámci této práce byl vyvinut alternativní protokol kultivace CAR T-lymfocytů, nahrazující tradičně používaný IL-2, který způsobuje efektorovou diferenciaci T-lymfocytů. Je založen na cytokinech IL-4 a IL-7, které výrazně podporují přežívání T-lymfocytů, přidání IL-21 pak podporuje zachování časně paměťového fenotypu T-lymfocytů a nízkou expresi inhibičních receptorů. CAR T-lymfocyty byly navíc úspěšně produkovány pomocí transpozonového vektoru piggyBac.

Experimenty s přidáváním exogenního IL-21 navíc potvrdily jeho zesilující účinek na proliferaci CAR T-lymfocytů, snížení apoptózy a zamezení terminální diferenciaci. Proto byly připraveny CAR T-lymfocyty inducibilně sekretující IL-21, které vykazovaly zvýšenou míru infiltrace nádorů a inhibovaly jejich růst *in vivo* v myším modelu. IL-21 také snižoval imunosupresivní účinky buněk chronické lymfocytární leukemie (CLL) během společné kultivace. To naznačuje, že by CAR T-lymfocyty vyzbrojené IL-21 mohly zlepšit výsledky terapie malignit rezistentních vůči klasickým CAR T-lymfocytům.

V rámci výzkumné práce byla rovněž testována nová metoda produkce CAR T-lymfocytů pomocí transpozonového vektoru piggyBac. Namísto běžně používaných plazmidů byla použita enzymaticky produkovaná lineární DNA kódující CAR a mRNA kódující enzym transpozázu. Tímto přístupem – bez využití bakterií – bylo dosaženo účinné produkce CAR T-lymfocytů s kontrolovaným počtem kopií integrovaného vektoru. To jej činí kompatibilním se současnými standardy správné výrobní praxe (SVP) a usnadňuje schválení regulačním úřadem. Takto vyrobené CAR T lymfocyty se funkčně nelišily od buněk vyrobených standardní a v současnosti schválenou metodou.

V neposlední řadě byla provedena studie reálného použití CAR T-lymfocytů u pacientů s relabovaným/refrakterním difuzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) a B-buněčnou akutní lymfoblastickou leukemií (B-ALL) léčených produktem tisagenlecleucel. Imunofenotyp T-lymfocytů

aferetického materiálu, CAR T-lymfocytů produktu a vzorků periferní krve byl stanoven pomocí multiparametrické průtokové cytometrie. Účinnost léčby korelovala spíše s expanzí CAR T-lymfocytů *in vivo* než s imunofenotypem produktu. Dále bylo zjištěno, že pacienti s vyšším procentem časně paměťových T-lymfocytů ve vzorcích aferézy reagovali na léčbu lépe. Nejhorší výsledky měli pacienti s primárně refrakterním onemocněním a velkou nádorovou zátěží.

V souhrnu tato práce představuje několik metod zlepšení výroby CAR T-lymfocytů a posílení jejich funkcí. Na základě získaných výsledků byl pro potřeby klinické studie fáze I (NCT05054257) zaveden výrobní protokol pro přípravu CAR T-lymfocytů. Dizertační práce také poskytuje vhled do reálného použití CAR T-lymfocytů a parametrů ovlivňujících s výsledky léčby.

Klíčová slova: CAR T-lymfocyty, paměťový fenotyp, IL-21, piggyBac, tisagenlecleucel