



## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

Klinika dětské hematologie a onkologie

Přednosta: doc. MUDr. Lucie Šrámková, Ph.D.

V Úvalu 84, 150 06 Praha

Tel.: +420 22443 6400

V Praze dne 15.11.2024

### Oponentský posudek disertační práce Mgr. Martina Štacha

Mgr. Martin Štach předkládá disertační práci na téma Enhancing Anti-tumor Efficacy and Improving Manufacturing of Chimeric Antigenic Receptor T Cells (česky Zvyšování protinádorové účinnosti a zlepšování výrobních postupů T-lymfocytů nesoucích chimerické antigenní receptory).

Disertační práce obsahuje detailně zpracovaný úvod, cíle, čtyři publikace autora, z nichž každá je doprovozena vlastním oddílem v následné diskuzi a závěrečné shrnutí.

Úvod je dlouhý (má 54 stran), ale je velmi kvalitně a čtivě zpracován. Vnáší nás do tématu T-lymfocytů nesoucích chimerické antigenní receptory (tzv. CAR T-lymfocytů) a detailně popisuje jejich strukturu, funkci, vývoj a postupné vylepšování jejich kvality od CAR T-lymfocytů 1. generace až po 5. a další generace; a dále jejich výrobu a produkci pro podání pacientovi. Po odborné stránce je úvod velmi kvalitně napsán, s odkazy na nejnovější vědecké studie.

Cíle práce, kterými jsou

- 1) Stanovení vlivu kultivace v cytokinech IL-4, IL-7 a IL-21 na fenotyp CAR T-lymfocytů
  - 2) Ověření konstruktů CAR 4. generace s indukovatelnou sekrecí IL-21 a charakterizace účinku IL-21 na imunofenotyp a efektorové funkce CAR T-lymfocytů
  - 3) Implementace metody produkce CAR T-lymfocytů transposonovým vektorem pomocí elektroporace lineární DNA a mRNA
  - a 4) Měření a analýza imunofenotypu CAR T-lymfocytů u skupiny pacientů léčených přípravkem tisagenlecleucel,
- byly v předkládaných publikacích zcela naplněny.

Student předkládá čtyři publikace, z toho dvě jsou jeho prvoautorské.

V 1. publikaci „A new approach to CAR T-cell gene engineering and cultivation using piggyBac transposon in the presence of IL-4, IL-7, and IL-21“ autorů Ptáčková P, Musil J, **Štach M**, Lesný P, Němečková Š, Král V, Fábry M, Otáhal P. v časopise Cytotherapy. 2018 Apr;20(4):507-520 je popsáno vylepšení protokolu výroby CAR T-lymfocytů založeného na elektroporaci nevirového vektoru piggyBac a kultivaci buněk v přítomnosti cytokinů IL-4, IL-7 a IL-21, která vede k produkci dostatečného množství CAR T-lymfocytů se zachováním jejich paměťového fenotypu.

Ve 2. publikaci (**prvoautorské publikaci studenta**) „Inducible secretion of IL-21 augments anti-tumor activity of piggyBac-manufactured chimeric antigen receptor T cells“ autorů **Štach M**, Ptáčková P, Mucha M, Musil J, Klener P, Otáhal P. v časopise Cytotherapy. 2020 Dec;22(12):744-754



## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

**Klinika dětské hematologie a onkologie**

Přednosta: doc. MUDr. Lucie Šrámková, Ph.D.

V Úvalu 84, 150 06 Praha

Tel.: +420 22443 6400

je popsán pozitivní účinek IL-21 na diferenciaci, expanzi a efektorové funkce CAR T-lymfocytů a možné využití CAR T-lymfocytů s inducibilní sekrecí IL-21 pro léčbu onemocnění rezistentních vůči CAR T, jako je chronická B-lymfocytární leukemie.

Ve 3. publikaci „Enzymatically produced piggyBac transposon vectors for efficient non-viral manufacturing of CD19-specific CAR T cells“ autorů Kaštánková I, **Štach M**, Žižková H, Ptáčková P, Šmilauerová K, Mucha M, Šroller V, Otáhal P. v časopise Mol Ther Methods Clin Dev. 2021 Aug 26;23:119-127 je popsána metoda výroby CAR T-lymfocytů bez použití celých plazmidů, která je snadněji schvalitelná regulačním orgánem.

Ve 4. publikaci (**taktéž prvoautorské publikaci studenta**) „Characterization of the input material quality for the production of tisagenlecleucel by multiparameter flow cytometry and its relation to the clinical outcome“ autorů **Štach M**, Pytlík R, Šmilauerová K, Rychlá J, Mucha M, Musil J, Koladiya A, Nemeč M, Petráčková M, Kaštánková I, Pecherková P, Šrámková L, Polgárová K, Trněný M, Lesný P, Vydra J, Otáhal P. v časopise Pathol Oncol Res. 2023 Apr 20;29:1610914 byly imunofenotypicky charakterizovány CAR T-lymfocyty takto léčených pacientů a byla nalezena absence expanze CAR T-lymfocytů u pacientů nereagujících na tuto léčbu.

Jazyková a formální stránka práce je vysoká, nemám k ní žádné připomínky.

Zde předkládám několik doplňujících otázek:

**1)** Povolení k výrobě nových CAR T produktů pro klinické studie je jistě náročný proces. Jak dlouho trvá tento proces v České republice? Povoluje vám regulační orgán (Státní ústav pro kontrolu léčiv) zainkorporovat do výrobního procesu CAR T nejnovější vědecké poznatky a existuje nějaký současný „state-of-the-art“ ve výrobě CAR T? Můžete použít příklad z vašeho pracoviště nebo nastínit výsledky vaší nejnovější publikace Mucha et al. Front. Immunol. 2024.

**2)** Vy i jiní autoři jste zjistili, že neefektivnějšími CAR T-lymfocyty jsou buňky s paměťovým fenotypem, tzv. stem cell memory (SCM) a central memory (CM). Jaký je funkční rozdíl mezi SCM a CM buňkami? Je mezi těmito stádii (SCM a CM) popsán rozdíl co do funkce CAR T-lymfocytů, tj. jsou jedny z nich efektivnější?

**3)** Je pro dobré fungování CAR T-lymfocytů nutná přítomnost CD8+ i CD4+ T-lymfocytů? Kooperují spolu tyto dvě subpopulace? Je popsán nějaký ideální poměr CD8+ : CD4+ CAR T?

**4)** V publikaci „Characterization of the input material quality for the production of tisagenlecleucel by multiparameter flow cytometry and its relation to the clinical outcome“ popisujete podávání CAR T-lymfocytů pacientům s akutní lymfoblastickou leukémií z B-buněk a difuzním velkobuněčným B-lymfomem.



## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

**Klinika dětské hematologie a onkologie**

Přednosta: doc. MUDr. Lucie Šrámková, Ph.D.

V Úvalu 84, 150 06 Praha

Tel.: +420 22443 6400

**4a)** Jaké klinické a laboratorní parametry předurčují pacienta k nasazení této léčby? V které fázi léčby se CAR T-lymfocyty pacientovi podávají?

**4b)** Zjistili jste absenci expanze CAR T-lymfocytů u skupiny tzv. non-responding patients, tedy pacientů bez odpovědi na tuto léčbu. Proč u těchto pacientů CAR T-lymfocyty neexpandují? Může to být předchozí léčbou nebo např. imunofenotypem CAR T-lymfocytů a jejich aktivací či nedostatečným mikroprostředím pro expanzi CAR T-lymfocytů?

**4c)** V myším modelu (Markley and Sadelain, Blood, 2010) je popsáno přežití CAR T-lymfocytů ve slezině více než 100 dní. Je popsáno, jak dlouho přežívají CAR T-lymfocyty v těle pacientů? Dokázaly by potlačit případný relaps onemocnění?

### Závěrečné zhodnocení:

Celkově je práce vysoce kvalitní, předkládané výsledky přispěly k povolení fáze I klinické studie CD19-specifických CAR T-lymfocytů (NCT05054257) a přispívají k poznání a zkvalitňování v oblasti cílených terapeutik CAR T. **Práci hodnotím velmi kladně a doporučuji ji k obhajobě.**

RNDr. Veronika Kanderová, Ph.D.

Laboratorní centrum Kliniky dětské hematologie a onkologie

2. lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Motole

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

tel: (00420) 22443 6487