



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00704**

(22) Data de depozit: **06/11/2020**

(41) Data publicării cererii:  
**30/06/2021** BOPI nr. **6/2021**

(71) Solicitant:  
• SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE  
URGENTĂ "PIUS BRÎNZEU" TIMIȘOARA,  
BD. LIVIU REBREANU NR. 156, TIMIȘOARA,  
TM, RO

(72) Inventatori:  
• BOJIN MARIA FLORINA,  
BD. 16 DECEMBRIE 1989, NR. 61, AP. 11,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• GAVRILIUC OANA- ISABELLA,  
STR. MARTIR IOAN MERIUȚAC, BL. B27,  
SC. A, AP. 3, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• TĂNASIE GABRIELA, STR. MUNTENIEI,  
BL. C30, AP. 2, TIMIȘOARA, TM, RO;

• TAȚU CĂLIN-ADRIAN, STR. OGLINZILOR,  
NR. 5, BL. 80, SC. A, AP. 1, TIMIȘOARA, TM,  
RO;  
• PANAITESCU CARMEN,  
BD. TAKE IONESCU, NR. 41, AP. 1,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• PĂUNESCU VIRGIL,  
STR. TREBONIU LAURIAN, NR. 7, AP. 2,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• NEDEA COSMIN-EDUARD,  
STR. MIHAI BRAVU, BL. E15, SC. B, ET. 1,  
AP. 4, CURTEA DE ARGEȘ, AG, RO

(74) Mandatar:  
CABINET DE PROPRIETATE  
INDUSTRIALĂ TUDOR ICLĂNZAN,  
PIAȚA VICTORIEI NR. 5, SC. D, AP. 2,  
TIMIȘOARA, TM

(54) **CELULE SELECTIVE BISPECIFICE CAR-T  
PENTRU TRATAMENTUL TUMORILOR SOLIDE ȘI METODĂ  
DE OBTINERE**

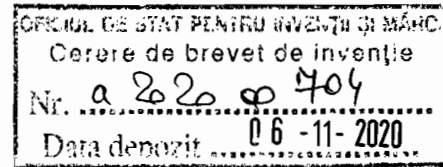
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unor celule selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide, care ținesc antigenul asociat tumorilor (TAA) și antigenul localizat pe celulele din mediul peri-tumoral (TmAA). Metoda, conform invenției, constă în etapele de: selectarea unui antigen tumoral (TAA = Her 2) și a unui antigen din mediul peri-tumoral (TmAA = FAP), proiectarea unui receptor himeric de antigen complet (CAR) pentru antigenul tumoral, respectiv, a unui antigen himeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR), generarea unui vector lentiviral

pentru CAR și, respectiv, pentru CCR, într-o linie producătoare 293T, realizarea transducției unor limfocite T cu vectorii lentivirali pentru CAR, respectiv, CCR, de tip CAR anti-Her 2, respectiv, CCR anti FAP, pentru a exprima SMaRT CAR, verificarea expresiei SMaRT CAR la nivelul limfocitelor T și validarea funcțională a celulelor selective bispecifice CAR-T prin metode *in vitro* și *in vivo*.

Revendicări: 11  
Figuri: 3





1

## CELULE SELECTIVE BISPECIFICE CAR-T PENTRU TRATAMENTUL TUMORILOR SOLIDE ȘI METODA DE OBTINERE

Invenția se încadrează în domeniul medicinei în general și a mijloacelor de tratament a tumorilor solide în special.

Prezenta invenție se încadrează în domeniul identificării posibilităților imunoterapeutice celulare anti-tumorale și se referă la obținerea unor limfocite T cu receptor de antigen chimeric bispecific selectiv (limfocite T cu SMaRT CAR), țintind atât antigene de pe celulele tumorale (TAA), cât și antigene de pe celulele din mediul peri-tumoral (TmAA). Acest SMaRT CAR este constituit dintr-un receptor chimeric de antigen complet (CAR) și un receptor chimeric de antigen incomplet, care are rolul de co-receptor (CCR), care permite limfocitelor T astfel obținute activarea specifică doar după legarea ambelor antigene țintă.

În imunoterapia anti-tumorală a fost obținut un succes clinic fără precedent prin utilizarea unor metode concepute pentru valorificarea capacității de distrugere tumorală a limfocitelor T [1,2]. Astfel, pentru a mobiliza limfocitele T citotoxice, în prezent sunt utilizate două strategii: i. structuri de anticorpi bispecifici (BsAb), care permit redirecționarea eficientă a activității citotoxice policlonale a limfocitelor T, prin legarea de CD3 și de un antigen asociat tumoral (TAA); ii. limfocite T modificate genetic astfel încât să exprime pe suprafață un receptor chimeric de antigen (CAR), specific pentru antigenele tumorale. Ambele metode induc redirecționarea răspunsului imun localizat la nivel tumoral și ocolirea activării limfocitare mediată de Fc sau restricționată de sistemul major de histocompatibilitate (MHC) [3,4].

Începând cu a doua generație de BsAb, o atenție specială a fost atrasă de formatul BiTE, o moleculă tandem a fragmentului variabil monocatenar (scFv) cu

specificitate pentru CD3 și un antigen tumoral. Moleculele de tip BiTE au fost dezvoltate pentru a ținti diverse tumori de tip hemopatii maligne (CD19, CD33) sau tumori solide (EGFR, HER2, CEA, EpCAM) [5]. În ultimii ani, doi dintre anticorpilor bispecifici, care redirecționează limfocitele T, au primit aprobarea pentru utilizare clinică: catumaxomab [6], pentru tratamentul ascitei maligne și blinatumomab [7], pentru leucemia acută limfoblastică, în timp ce multe alte molecule de acest tip se află în faze avansate ale studiilor clinice [8,9].

În anul 2016, *Vallera DA și colab.* [10] au dezvoltat un nou construct, trispecific (TriKEs), pentru inducerea citotoxicității celulare dependente de anticorpi (ADCC) la nivelul celulelor natural ucigașe (NK).

În domeniul limfocitelor T cu receptor chimeric de antigen (CAR-T), dezvoltarea acestor tehnologii până în prezent a dus la generarea celei de-a treia generații de astfel de constructe [11], care s-a dovedit a fi foarte eficientă în terapia tumorilor cu limfocite B, fiind o terapie promițătoare și pentru alte hemopatii maligne [2]. CAR bispecifici, care induc activarea limfocitelor T, au fost raportate ca fiind eficiente fie în combinația cu doi markeri pan-limfocite B (CD19 și CD20) [12], fie în combinația CD19 și HER2 [13].

Mai multe aspecte trebuie luate în considerare pentru fiecare dintre abordările imunoterapeutice menționate. Anticorpilor bispecifici (BsAb) sunt proteine mici, non-glicozilate (MW = 50-70 kDa), cu o structură cu un singur lanț; nu dețin domeniul de tip Fc (domeniul constant/cristalizabil; constant fragment = Fc), astfel încât nu este indusă reciclarea mediată de FcRn, iar timpul de înjumătățire plasmatică este în jur de 5-6 ore [14], ceea ce ar putea fi o problemă serioasă pentru utilizarea clinică a acestora. Cu toate acestea, experimentele preclinice au arătat atragerea eficientă a limfocitelor T la site-urile tumorale, fără dovezi de atingere a saturației la nivelul țintei tumorale, relevând totodată că fiecare limfocit T poate elimina mai multe celule tumorale (limfocite B, în cazul utilizării blinatumomab)

[15]. Deși este extrem de eficientă în limfoame/leucemii, terapia cu limfocite T cu CAR poate duce la fenomene de auto-agresiune și auto-distrugere a țesuturilor sănătoase proprii, datorită interacțiunii dintre CAR și antigenul cognat de pe suprafața celulelor proprii. În cazul terapiei cu limfocite T cu CAR pentru hemopatii maligne cu limfocite B, CAR este specific pentru recunoașterea unui antigen care se găsește doar pe suprafața limfocitelor B, CD19, iar limfocitele T cu CAR anti-CD19 vor induce citotoxicitate doar la nivelul acestor celule, depleția organismului de limfocite B, a căror funcție va fi clinic restaurată prin diverse strategii terapeutice (de exemplu administrarea de imunoglobuline umane). În cazul tumorilor solide, acestea nu prezintă un antigen unic tumoral pe suprafață, care să poată fi țintit specific prin constructe de tip limfocite T cu CAR. În aceste situații, limfocitele T cu CAR vor iniția fenomene de citotoxicitate și la nivelul celulelor sănătoase, care prezintă pe suprafață antigenul, de această dată specific tisular (de exemplu, ErbB2 sau Her2/neu este prezent pe toate celulele epiteliale din organismul uman, inclusiv pe celulele tumorale epiteliale în cazul adenocarcinoamelor), ducând la distrucție tisulară masivă, fără posibilitatea restaurării funcționale prin mijloace terapeutice existente [16]. În aceste situații, utilizarea limfocitelor T cu CAR este restrictivă, datorită activării limfocitelor T modificate pe modelul „on-target off-organ” (la țintă, în afara organului țintă). Mai mult, sindromul de furtună citokinică rezultat nu este specific țintei celulare, ci este datorat unei eliberări de la nivelul limfocitelor T cu CAR a citokinelor pro-inflamatorii cu niveluri toxice, mult mai crescute comparativ cu producerea de citokine de la nivelul limfocitelor T activate fiziologic, ceea ce poate duce la insuficiență multiplă de organ și exitus [17-19].

Una dintre metodele prin care se poate îmbunătăți activitatea țintită (on-target) a limfocitelor T este modificarea genetică prin care pot recunoaște antigene combinate. *Roybal KT și colab.* [20] a descris limfocite T modificate cu receptori duali de tip poartă AND-gate astfel încât să recunoască și să se activeze doar în

prezența ambelor antigene recunoscute de pe suprafața celulei tumorale. *Kloss CC și colab.* [21] descrie de asemenea un sistem de recunoaștere antigenică de tip combinatorial, bazat pe recunoașterea unui antigen exprimat suboptimal și a unui antigen specific tumoral prin utilizarea de limfocitele T cu CAR având în componență un receptor chimeric co-stimulator (CCR).

O altă problemă în imunoterapia tumorilor solide este faptul că puține terapii au ca țintă alte componente importante implicate în dezvoltarea tumorală, cum ar fi cele din stroma tumorală (TME). În timp ce celulele tumorale prezintă o varietate enormă de modificări genice, care duc la intensificarea tumorigenezei, modificările micromediului tumoral (TME) sunt reduse ca variabilitate genetică și pot fi comune multelor tipuri tumorale, iar terapiile țintite pe TME ar putea fi aplicabile la nivel general în tumorile solide [22]. Fibroblastele peri-tumorale (TAF), principalele componente celulare ale stromei tumorale, formează un micromediu puternic pro-tumorigenic și imunosupresor, care mediază și rezistența terapeutică a tumorilor solide. Prin țintirea simultană a TAF sau a altor molecule de pe suprafața celulelor non-tumorale de la nivelul micromediului tumoral (TmAA = tumor microenvironment associated antigens) și a celulelor tumorale se va putea augmenta răspunsul imun anti-tumoral [23].

Este cunoscută invenția WO2019136335 în care se furnizează compoziții și metode pentru imunoterapie, incluzând un CAR modular (mCAR) și un adaptor molecular de precizie (PMA) pentru direcționarea celulelor CAR-T modular către una sau mai multe antigene tumorale [16].

Este cunoscută invenția US2019/0388472 care se referă la metode și compoziții pentru imunoterapie, care utilizează limfocite T modificate, conținând receptorul limfocitelor T (TCR) și / sau molecule HLA modificate, care cuprind și un receptor chimeric de antigen. În anumite realizări, compozițiile sunt utilizate alogenic, ca reactivi universali pentru tratamentul „în afara raftului” („off the shelf”)

a afecțiunilor medicale precum cancerul, autoimunitatea și infecția. În realizări particulare, celulele T receptor-negative și / sau HLA-negative sunt generate cu nucleaze specifice de tip zinc-fingers.

Este cunoscută invenția WO2019/195017 care utilizează un anticorp monoclonal anti-uman sau un fragment variabil cu o singură catenă (scFv), cuprinzând lanțul greu, regiunea variabilă (VH) având secvența de aminoacizi SEQ ID Nr. 6 și regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) cu secvența SEQ ID Nr. 7. Această invenție utilizează de asemenea un receptor chimeric de antigen (CAR) pentru recunoașterea BCMA, cuprinzând de la capătul N-terminal la capătul C-terminal: (i) un fragment variabil cu o singură catenă (scFv); (ii) un domeniu transmembrantar; (iii) cel puțin un domeniu co-stimulator și (iv) un domeniu activator. Anticorpul monoclonal al acestei invenții prezintă legare selectivă și de afinitate ridicată pentru BCMA. Limfocitele T cu CAR anti-BCMA, bazate pe scFv duc la scăderea semnificativă a proliferării și dezvoltării tumorale în mielom multiplu, pe un model animal.

Problema tehnică a invenției constă realizarea ca produs și metodă a unor celule CAR-T bispecifice denumite limfocite T cu SMaRT CAR și realizarea unei combinații între antigenul specific tumoral (TAA) și antigenul pentru micromediul tumoral (TmAA) ca ținte bispecifice simultane în tumorile solide .

Metoda conform invenției inlatura dezavantajele cunoscute prin aceea că se realizează prin parcurgerea următoarelor etape:

- Selectarea unui antigen tumoral (TAA) și a unui antigen din micromediul tumoral
- Proiectarea unui receptor chimeric de antigen complet pentru antigenul tumoral (CAR)

- Proiectarea unui receptor chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR)
- Generarea unui vector-lentiviral pentru CAR și a unui vector lentiviral pentru CCR într-o linie producătoare 293T
- Realizarea transducției unor limfocite T cu vectorii lentivirali pentru CAR și CCR pentru a exprima SMaRT CAR
- Verificarea expresiei SMaRT CAR la nivelul limfocitelor T

Metoda conform invenției realizată prin parcurgerea etapelor mai sus menționate se definește de asemenea și prin următoarele particularități:

- antigenul tumoral (TAA) selectat este Her2, iar antigenul din micromediul tumoral este FAP (TmAA).
- receptorul chimeric de antigen complet pentru antigenul tumoral (CAR) este format din următoarele componente: secvența 5', peptidul semnal, scFV Transtuzumab VL, G4S linker, scFv Trastuzumab VH, Strep tag II, CD8a hinge, CD28, 4-1 BB, CD3 zeta.
- vectorul lentiviral pentru CAR anti-Her2 este generat în linia producătoare Lenti-X 293T prin metode de co-transfecție cu reactivul lipofectamină, a unui vector care conține transgena CAR pe baza secvenței genice a peptidelor componente, a plasmidului de împachetare virală psPAX2 și a plasmidului de anvelopă pMD2.G.
- receptorul chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR) este format din următoarele componente: secvența 5', peptidul semnal, scFV Sibrotuzumab VH, G4S linker, scFv Sibrotuzumab VL, Myc tag, CD8a hinge, CD28, 4-1 BB.
- vectorul lentiviral pentru receptorul chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR) anti-FAP este generat în linia

producătoare Lenti-X 293T prin metode de co-transfecție cu reactivul lipofectamină, a vectorului care conține transgena CCR pe baza secvenței genice a peptidelor componente, a plasmidului de împachetare virală psPAX2 și a plasmidului de anvelopă pMD2.G.

- limfocitele T sunt transduse cu CAR anti-Her2 și CCR anti-FAP folosind metode de spinoculare și polimerul cationic polybrene pentru a induce expresia transgenelor la nivelul limfocitelor T cu SMaRT CAR.
- expresia SMaRT CAR este evidențiată la nivelul limfocitelor T pe baza expresiei simultane a doi markeri fluorescenți (GFP și RFP), corespunzători receptorului chimeric de antigen complet pentru antigenul tumoral (CAR) și receptorului chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peritumoral (CCR).

Celule selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide, conform invenției sunt realizate și validate funcțional prin metode *in vitro* și *in vivo*, aceste celule fiind specifice pentru antigenele tumorale (Her2) și pentru antigenele din micromediul tumoral (FAP), inducând recunoașterea specifică și efect anti-proliferativ tumoral. Aceste celule sunt astfel încât testarea funcționalității limfocitelor care exprimă construcțiile SMaRT CAR se efectuează *in vitro* prin metode de tip culturi celulare, ELISA bispecifică (pentru citokine de activare limfocitară - IFN $\gamma$ , IL-2), citometrie în flux (expresia markerului CD107a), iar testarea funcționalității limfocitelor care exprimă construcțiile SMaRT CAR se efectuează *in vivo* pe modele tumorale biotipărite 3D, care conțin celule tumorale (Her2+), celule din mediul peri-tumoral (FAP+) și limfocite T cu SMaRT CAR, care sunt implantate la șoareci imunosupresați de tipul CD1 Nu/Nu și evaluate periodic.



Celule selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide și metoda de obținere conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Fiecare dintre țintele CAR și CCR sunt astfel construite încât să prezinte o mare specificitate de legare de celulele țintă;
- Permite identificarea corectă a celulelor tumorale și a celulelor peri-tumorale de către limfocitele T în cazul tumorilor solide;
- Limfocitele T cu SMaRT CAR au bispecificitate simultană și sunt activate doar atunci când ambele antigene țintă sunt legate de CAR-ul specific, ceea ce permite celulelor din sistemul imun să își exercite efectul citotoxic doar la nivel tumoral;
- Acest sistem de tip SMaRT CAR poate fi dezvoltat și aplicat și altor tumori solide, prin identificarea altor antigene de interes specifice tumorilor și combinarea acestora cu antigene din micromediul tumoral.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției și modalitățile de acțiune a celulelor T cu SMaRT CAR în legătură cu figurile, care reprezintă:

Figura 1- Exemplu de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) care vizează antigenul asociat tumorilor (TAA = Her2) și antigenul localizat pe celulele din mediul microtumoral (TmAA = FAP). În acest exemplu receptorul chimeric de antigen complet (CAR) este direcționat spre antigenul tumoral Her2, în timp ce receptorul chimeric costimulator (CCR) este direcționat spre antigenul din micromediul tumoral FAP. În lipsa interacțiunii ligand-receptor, celulele T cu SMaRT CAR nu sunt activate. (Legendă: 1. scFv Trastuzumab VL; 2.

G4S linker; 3. scFv Trastuzumab VH; 4. CD8a hinge; 5. CD28; 6. 4-1 BB; 7. CD3 zeta; 8. scFv Sibrotuzumab VH; scFV Sibrotuzumab VL).

Figura 2 - Exemplu de proiectare pentru activarea celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) care vizează antigenul asociat tumorilor (TAA = Her2) și antigenul localizat pe celulele din mediul microtumoral (TmAA = FAP). Activarea este posibilă doar atunci când ambii receptori chimerici de antigen (CAR și CCR) sunt legați de ținta specifică. Transducerea semnalului și funcția citotoxică a celulelor T cu SMaRT CAR se realizează prin CAR anti-Her2, care prezintă fragmentul CD3 zeta. (Legendă: 1. scFv Trastuzumab VL; 2. G4S linker; 3. scFv Trastuzumab VH; 4. CD8a hinge; 5. CD28; 6. 4-1 BB; 7. CD3 zeta; 8. scFv Sibrotuzumab VH; scFV Sibrotuzumab VL; 10. proteina Her2; 11. proteina FAP).

Figura 3 - Exemplu de proiectare care arată inactivarea celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) atunci când este legată o singură țintă. Legarea CCR de antigenul cognate (FAP), în lipsa legării antigenului de CAR (anti-Her2) nu induce activarea limfocitelor T cu SMaRT CAR. (Legendă: 1. scFv Trastuzumab VL; 2. G4S linker; 3. scFv Trastuzumab VH; 4. CD8a hinge; 5. CD28; 6. 4-1 BB; 7. CD3 zeta; 8. scFv Sibrotuzumab VH; scFV Sibrotuzumab VL; 11. proteina FAP).

Obținerea de celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) se face pentru fiecare dintre structurile CAR specifice. Pentru aceasta am generat lentivirus prin co-transfecția cu ajutorul reactivului Lipofectamine 3000 (Thermo), în linia producătoare Lenti-X 293T (Clontech), a unui vector ce conține transgena CAR împreună cu plasmidul de împachetare virală psPAX2 și plasmidul de anvelopă pMD2.G. Supernatantul viral a fost colectat la 48 de ore de la

transfecție, filtrat și utilizat pentru transducția celulelor primare. Transducția a fost efectuată prin spinoculare (centrifugare la 1800 xg, 1 hr, 32°C), urmată de incubare timp de 5 hr în prezență de virus și a polimerului cationic polybrene (Sigma). Celulele transduse au fost expandate și sortate cu aparatul FACS Aria II (BD) pe baza expresiei simultane a doi markeri fluorescenți (GFP și RFP), corespunzători celor două constructe CAR. Celulele sortate au fost din nou expandate prin cultivare in vitro, verificate pentru expresia fiecărui CAR prin marcarea cu antigenele biotiniliate corespunzătoare și streptavidina-APC, și crioconservate pentru utilizare ulterioară.

Receptorul chimeric de antigen complet (CAR) este direcționat spre antigenul tumoral Her2 și prezintă următoarele elemente, redate mai jos cu secvențele corespunzătoare: Secvența 5'; Peptidul semnal; scFv Trastuzumab VL (1); G4S linker (2); scFv Trastuzumab VH (3); Strep tag II; CD8a hinge (4); CD28 (5); 4-1 BB (6); CD3 zeta (7).

Elementele CAR anti-Her2 – secvențele (5' - 3')

**Secvența 5'** (conține secvența de restricție BamHI, secvența Kozak)

CGGGATCCGCCACC

**Peptid semnal** (peptid semnal uman FcGR1B)

ATGTGGTTCTTGACAACCTCTGCTCCTTTGGGTTCCAGTTGATGGG

**scFv Trastuzumab, VL (1)**

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGC  
 GACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGACGTGAACACCGCC  
 GTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATC  
 TACAGCGCCAGCTTCCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAGGTTTCAGCGGC

AGCAGGAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCC  
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACCCCCCA  
CCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCC  
CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCA  
CCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCA  
AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG  
GAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAG  
CAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA  
CGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAG  
CTTCAACAGGGGCGAGTGC

**G4S Linker (2)**

GGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGGGGAGGGCGGCTCTGG  
CGGAGGGGGATCT

**scFv Trastuzumab, VH (3)**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCGGCGGC  
AGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCAACATCAAGGACACC  
TACATCCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTG  
GCCAGGATCTACCCACCAACGGCTACACCAGGTACGCCGACAGCGTG  
AAGGGCAGGTTACCATCAGCGCCGACACCAGCAAGAACACCGCCTAC  
CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC  
AGCAGGTGGGGCGGCGACGGCTTCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAG  
GGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTG  
TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGGGCGGCACCGCCGCC  
CTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCT  
GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGC

12

TGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCA  
GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC  
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCC

**Strep tag II (WSHPQFEK)**

TGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAG

**CD8a hinge (4)**

GCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTC  
TGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCCAGC  
CCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGA  
CCTGCTGCTGGCGGAGCTGTGCATAACCAGGGGCCTGGAC

**CD28 (5)**

AAGCCCTTCTGGGTGCTGGTCGTGGTCGGCGGCGTGCTGGCCTGTTACA  
GCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGCAGCAAGAG  
AAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCCAGACGGCC  
TGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCTCCTAGAGATTTC  
GCCGCCTACCGGTCC

**4-1BB (6)**

AAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG  
AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTT  
CCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

**CD3z (7)**

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGC  
 CAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTAC  
 GATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAG  
 CCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA  
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGC  
 GCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAG  
 CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCG  
 CTAA

Secvențele VL și VH ale trastuzumab (anticorpul 1n8z) au fost obținute din PDB și reverstranslate în secvențe de nucleotide cu ajutorul EMBOSS Backtranseq (EMBL), cu setare pentru utilizarea de codoni în celule umane.

Receptorul chimeric de antigen incomplet, co-stimulator (CCR) este direcționat spre antigenul de pe fibroblastele peri-tumorale, FAP și prezintă următoarele elemente, redate mai jos cu secvențele corespunzătoare: Secvența 5'; Peptidul semnal; scFv Sibrotuzumab VH (8); G4S linker (2); scFv Sibrotuzumab VL (9); Strep tag II; CD8a hinge (4); CD28 (5); 4-1 BB (6).

Elementele CCR anti-FAP – secvențele (5' - 3')

**Secvența 5'** (conține secvența de restricție BamHI, secvența Kozak)

CGGGATCCGCCACC

**Peptid semnal** (peptid semnal uman FcGR1B)

ATGTGGTTCTTGACAACCTCTGCTCCTTTGGGTTCCAGTTGATGGG

**scFv Sibrotuzumab, VH (8)**

14

CAGGTACAGCTTGTGCAGTCCGGCGCTGAGGTCAAAAACCAGGCGCC  
 AGCGTTAAGGTGTCATGCAAGACTAGCAGGTATACATTCCTGAATAC  
 ACAATACTACTGGGTGCGACAGGCTCCCGGGCAAAGACTGGAGTGGATT  
 GGGGGCATAAACCCCAACAATGGGATCCCGAATTATAATCAGAAATTT  
 AAGGGTCGGGTGACAATCACAGTAGACACTAGCGCATCAACCGCCTAC  
 ATGGAGCTCAGCTCCCTTAGGTCTGAAGACACAGCAGTTTATTACTGCG  
 CAAGGCGCCGCATCGCCTACGGCTATGACGAAGGTCATGCTATGGACT  
 ATTGGGGGCAAG GGACACTCGTGACTGTCTCATCA

**G4S Linker (2)**

GGCGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGATCTGGGGGAGGCGGCTCTGG  
 CGGAGGGGGGATCT

**scFv Sibrotuzumab, VL (9)**

GACATTGTCATGACGCAGAGTCCTGACAGTCTCGCCGTGTCCTTGGGAG  
 AGCGGGCAACAATCAATTGTAAAAGCAGCCAATCTCTCCTGTACAGCC  
 GGAACCAGAAGA ACTACCTCGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGTCAGC  
 CGCCCAAGCTCCTGATTTTTTTGGGCCAGCACTCGGGAAAGCGGTGTCCC  
 CGACAGATTTTCCGGATCTGGCTTCGGGACAGATTTTACCCTGACGATC  
 TCATCACTTCAGGCAGAGGATGTGGCCGTCTACTACTGTCAACAGTATT  
 TTTCTACCCCCTCACTTTCGGCCAAGGAACCAAGGTGGAGATTAAA

**Myc tag**

GAGCAGAAGCTGATCTCCGAAGAGGACCTG

**CD8a hinge (4)**

GCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTC  
TGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCTAGACCTCCTACCCCAGC  
CCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGA  
CCTGCTGCTGGCGGAGCTGTGCATAACCAGGGGCCTGGAC

**CD28 (5)**

AAGCCCTTCTGGGTGCTGGTCGTGGTCGGCGGCGTGCTGGCCTGTTACA  
GCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGCAGCAAGAG  
AAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCCAGACGGCC  
TGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCTACGCCCTCCTAGAGATTTC  
GCCGCCTACCGGTCC

**4-1BB (6)**

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG  
AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTT  
CCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

Secvențele scFv ale Sibrotuzumab au fost obținute din patentul US 2003/0103968 A1.

Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide constă într-o abordare unică de a dezvolta noi strategii selective bispecifice pentru țintirea simultană a celulelor tumorale și a celulelor din micromediul tumoral. Sunt vizate celulele CAR T care poartă receptori selectivi bispecfici pentru antigenul asociat tumorilor (TAA) și antigenul FAP (fibroblast activation protein) de pe suprafața celulelor fibroblastice din micromediul tumoral. Pentru obținerea unor constructe celulare bispecifice



selective (celule T cu SMaRT CAR) se va genera recunoașterea și procesarea semnalului într-o manieră care necesită legarea ambelor antigene pentru activarea limfocitelor T cu SMaRT CAR.

Validarea funcționalității constructelor bispecifice anti-tumorale *in vitro* este efectuată prin diferite metode de validare a capacității lor funcționale, cum ar fi cocultura, citotoxicitatea și testele de migrare transwell. Eliberarea citokinelor și citometria în flux multiparametrică sunt o măsură cantitativă pentru activarea limfocitelor T, atât în condiții *in vitro*, cât și *in vivo*. Validarea *in vivo* a imunoterapiei bispecifice selective utilizând limfocitele T SMaRT CAR utilizează modele animale murine și se bazează pe tehnici de bioimprimare 3D care pot reconstitui mediul tumoral multicelular. Tumorile biotipărite 3D sunt implantate subcutan la șoareci nuzi, iar dezvoltarea tumorală este monitorizată la intervale de timp regulate (săptămânal, până la 8 săptămâni). Prezenta invenție propune generarea de celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR), cu dublă specificitate simultană, atât pentru celulele tumorale, cât și pentru celulele din micromediul tumoral de tip fibroblastic (fibroblaste peri-tumorale), urmată de caracterizarea extensivă a constructelor bispecifice, a efectelor și funcționalității acestora asupra dezvoltării tumorale, pentru setări *in vitro* și *in vivo*.

Metoda cuprinde proiectarea și generarea unui receptor chimeric de antigen (CAR) pentru un antigen tumoral (TAA) – Her2, și a unui receptor chimeric de antigen incomplet, care are rolul de co-receptor chimeric de antigen (CCR). Pentru CCR, din structura unui CAR complet lipsește fragmentul CD3 zeta (CD3ζ), astfel încât modul de activare al limfocitelor T este disociat fizic de semnalul stimulator (CD28). Pentru fiecare dintre constructele CAR specifice, se generează lentivirus prin co-transfecția cu ajutorul reactivului Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific), în linia producătoare Lenti-X 293T (Clontech), a unui vector ce conține transgena CAR împreună cu plasmidul de împachetare virală psPAX2 și plasmidul

de anvelopă pMD2.G. Supernatantul viral este colectat la 48 de ore de la transfecție, filtrat și utilizat pentru transducția celulelor primare. Transducția se efectuează prin spinoculare (centrifugare la 1800 x g, 1 hr, 32°C), urmată de incubare timp de 5 hr în prezență de virus și a polimerului cationic polybrene (Sigma). Celulele transduse sunt expandate și sortate cu aparatul FACS Aria II (BD) pe baza expresiei simultane a doi markeri fluorescenți (GFP și RFP), corespunzători celor două constructe CAR și CCR. Celulele sortate sunt expandate din nou prin cultivare *in vitro*, verificate pentru expresia fiecărui receptor chimeric de antigen (complet și incomplet) prin marcarea cu antigenele biotinilate corespunzătoare și streptavidina-APC, și crioconservate pentru utilizare ulterioară. Expresia SMaRT CAR pe suprafața limfocitelor T este determinată alternativ și cu proteina L, prin citometrie în flux, așa cum a fost descris anterior de *Zheng Z și colab.* [24].

Capacitatea receptorilor chimerici de tip scFv de a lega ambele antigene țintă (TAA = Her2 și TmAA = FAP) în același timp va fi determinată prin metoda ELISA bispecifică. Legarea specifică a celulelor de tip T SMaRT CAR la unul sau ambele antigene este evaluată prin citometrie în flux, folosind proteine de fuziune Fc din antigenele FAP și Her2 țintă și un anticorp conjugat cu un fluorocrom, cu detecție secundară cu un anticorp de tip Fc uman. Prin această metodă de citometrie în flux este comparat procentul de limfocite T cu SMaRT CAR de a angaja ambele ținte antigenice în același timp. De asemenea, se realizează o analiză statistică multivariabilă a legării limfocitelor T în raport cu diverse distribuții spațiale ale țintelor antigenice.

Monitorizarea distribuției și activității spațiale pe sistem *in vitro* este evaluată în sisteme de cultură celulară. Testul necesită utilizarea liniilor celulare tumorale sau celule tumorale primare (Her2 pozitive) și fibroblaste peri-tumorale (FAP pozitive). În sistemele de cultură sunt adăugate citokine și factori de creștere specifici. Pentru testele *in vitro*, celulele selective bispecifice CAR-T (limfocite T

cu SMaRT CAR) sunt cultivate în raport de 2:1 cu celulele tumorale (Her2+ sau Her2-) și cu fibroblatele peri-tumorale (FAP+) sau fibroblaste normale (FAP-). Supernatantul de cultură este recoltat la 48 de ore de la cultivarea celulelor și este analizat din punct de vedere al secreției de citokine specifice activării limfocitelor T (IFN $\gamma$ , IL-2), prin metoda ELISA, pentru a valida funcționalitatea limfocitelor T cu SMaRT CAR. Secreția de citokine este crescută în supernatantul de cultură al limfocitelor T activate. În modelele *in vitro* de cultivare celulară care utilizează limfocite T cu SMaRT CAR și doar celule tumorale (Her2+/Her2-) sau doar celule de tip fibroblastic (FAP+/FAP-), activarea limfocitelor T nu se realizează, iar secreția de citokine nu este crescută.

Funcționalitatea celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) este evaluată prin citometrie în flux și este reprezentată de capacitatea de liză a celulelor tumorale (Her2+) și fibroblastelor peri-tumorale (FAP+). Se folosește o metodă descrisă anterior [25]. Anticorpul CD107a este adăugat direct în tuburile celulelor T stimulate cu celulele țintă (raportul limfocite T cu SMaRT CAR / celule tumorale / fibroblaste peri-tumorale = 1 / 1 / 1). Celulele sunt spălate timp de 5 ore în prezența brefeldinei A și a monesinei (Golgi-stop), sunt colorate pentru markerii de suprafață ai limfocitelor T (CD4-PE și CD8-PE-Cy7) și fixate cu paraformaldehidă (4%), resuspendate în 0,5% saponină (Sigma-Aldrich) și colorate pentru evidențierea IFN $\gamma$  intracelular, înainte de efectuarea analizei prin citometrie în flux. Moartea celulară indusă de activare (AICD = activation-induced cellular death) este evaluată prin colorarea cu Anexină în cadrul unui set separat.

Validarea *in vivo* a constructelor de tip SMaRT CAR este realizată pe model de șoarece nud, de tip CD1 Nu/Nu, unde este evidențiată inhibarea creșterii și dezvoltării tumorale. Tumorile bioprintate 3D cu diametrul de 5 mm, conținând limfocite T cu SMaRT CAR, celule tumorale (Her2+) și celule peri-tumorale (FAP+) sunt implantate chirurgical subcutanat, la nivelul flancurilor, pe partea

dorsală a modelului animal. Evoluția tumorală este evaluată săptămânal, prin excizia chirurgicală a tumorilor și evaluarea componentelor celulare prin analize imunohistochimice. Sunt evaluați markerii caracteristici fiecărui tip celular în parte: CD4 și CD8 (limfocite T), Her2 (celule tumorale) și FAP (fibroblaste peri-tumorale). Este evaluată comparativ rata de proliferare tumorală prin expresia Ki67, pentru tumorile cu SMaRT CAR și tumorile control (fără SMaRT CAR).

### Index de termeni

|        |   |
|--------|---|
| 4-1 BB | CD137 (membru al familiei factorului de necroză tumorală)<br>citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi (antibody dependent<br>ADCC cellular cytotoxicity) |
| BCMA   | antigenul de maturare al limfocitului B (B-cell maturation antigen)   |
| BiTE   | potențatori bispecfici ai limfocitelor T (bispecific T cells enhancer)  |
| BsAb   | anticorpi bispecfici (bispecific antibodies)  |
| CAR    | receptor chimeric de antigen (chimeric antigen receptor)  |
| CCR    | receptor chimeric costimulator (chimeric costimulatory receptor)  |
| CD107a | clusterul de diferențiere 107a (cluster of differentiation)   |
| CD19   | clusterul de diferențiere 19 (cluster of differentiation)   |
| CD20   | clusterul de diferențiere 20 (cluster of differentiation)   |
| CD28   | clusterul de diferențiere 28 (cluster of differentiation)   |
| CD3    | clusterul de diferențiere 3 (cluster of differentiation)  |
| CD33   | clusterul de diferențiere 33 (cluster of differentiation)   |
| CD4    | clusterul de diferențiere 4 (cluster of differentiation)  |
| CD8    | clusterul de diferențiere 8 (cluster of differentiation)  |
| CEA    | antigenul carcinoembrionar (carcinoembryonic antigen)   |

|              |   |
|--------------|---|
|              | receptorul factorului de creștere epidermal (epidermal growth factor receptor)                |
| EGFR         | receptor)   |
|              | molecula de adeziune a celulelor epiteliale (epithelial cell adhesion molecule)               |
| EpCAM        | moleculă)   |
| FAP          | proteina de activare fibroblastică (fibroblast activation protein)                            |
|              | fragment constant al moleculei imunoglobulinice (constant fragment)                           |
| Fc           | fragment)   |
| FcRn         | receptorul neonatal pentru Fc al IgG (neonatal Fc receptor for IgG)                           |
| GFP          | proteina verde fluorescentă (green fluorescent protein)                                       |
|              | receptorul factorului de creștere epidermal uman 2 (human epidermal growth factor receptor 2) |
| Her2         | growth factor receptor 2)   |
| HLA          | antigenele leucocitare umane (human leukocytes antigen)                                       |
| IFN $\gamma$ | celule natural ucigașe (natural killer)   |
| IL-2         | interleukina 2 (interleukin 2)  |
| Ki67         | proteina nucleară Ki67 (nuclear Ki67 protein)   |
|              | sistemul major de histocompatibilitate (major histocompatibility complex)                     |
| MHC          | complex)  |
| PE           | ficoeritrină (phycoerythrin)  |
| PMA          | adaptor molecular de precizie (precision molecular adaptor)                                   |
| RFP          | proteina roșie fluorescentă (red fluorescent protein)   |
| scFv         | fragmentului variabil monocatenar (single chain variable fragment)                            |
| TAA          | antigen tumoral (tumor associated antigen)  |
| TAF          | fibroblate peri-tumorale (tumor-associated fibroblasts)                                       |
| TCR          | receptorul limfocitului T (T cell receptor)   |
|              | antigen din micromediul tumoral (tumor microenvironment-associated antigen)                   |
| TmAA         | associated antigen)   |

|        |   |
|--------|---|
| TME    | stroma tumorală (tumor microenvironment)  |
| TriKEs | potențatori trispesifici ai celulelor citotoxice (trispesific killer cell engagers) |
| VH     | regiunea variabilă a lanțului greu (variable heavy)                                 |
| VL     | regiunea variabilă a lanțului ușor (variable light)                                 |

### Referințe bibliografice

1. Tay SS, Carol H, Biro M. TriKEs and BiKEs join CARs on the cancer immunotherapy highway. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12(11): 2790-96.
2. Zhukovsky EA, Morse RJ, Maus MV. Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection. *Curr Opin Immunol.* 2016; 40:24-35.
3. Chen S, Li J, Li Q, Wang Z. Bispecific Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12(10): 2491-50.
4. Zhang H, Ye ZL, Yuan ZG, Luo ZG, Jin HJ, Qian QJ. New Strategies for the treatment of solid tumors with CAR-T cells. *Int. J. Biol. Sci.* 2016; 12: 718-728.
5. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R. BiTE: teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2009; 11: 22-30.
6. Eskander RN, Tewari KS. Epithelial cell-adhesion molecule-directed trifunctional antibody immunotherapy for symptom management of advanced ovarian cancer. *Clin Pharmacol.* 2013; 5:55-61.
7. Stieglmaier J, Benjamin J, Nagorsen D. Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2015; 15: 1093-99.
8. Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol Immunol.* 2015; 67: 95-106.

9. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today* 2015; 20: 838-47.
10. Vallera DA, Felices M, McElmurry RT, McCullar V, Zhou X, Schmohl J, et al. IL-15 Trispecific Killer Engagers (TriKEs) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(14): 3440-50.
11. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor (CAR) design. *Cancer Discov.* 2013; 3(4): 388-398.
12. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4(6): 498-508.
13. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; 2: e105.
14. Zhu M, Wu B, Brandl C, Johnson J, Wolf A, Chow A, Doshi S. Blinatumomab, a Bispecific T-cell Engager (BiTE®) for CD-19 Targeted Cancer Immunotherapy: Clinical Pharmacology and Its Implications. *Clin Pharmacokinet.* 2016; 55(10): 1271-88.
15. Hoffmann P, Hofmeister R, Brischwein K, Brandl C, Crommer S, Bargou R, et al. Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct. *Int J Cancer.* 2005; 115: 98-104.
16. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, et al. 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.
17. Brentjens R, Yeh R, Bernal Y, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a Phase I clinical trial. *Mol. Ther.* 2010; 18: 666-668.

18. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012; 119: 2709-20.
19. Grupp SA, Kalos M, Barrett D et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 1509-18.
20. Roybal KT, Rupp LJ, Morsut L, Walker WJ, McNally KA, Park JS, Lim WA. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits. *Cell* 2016; 164: 1-10.
21. Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, Bachmann M, Sadelain M. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(1): 71-5.
22. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 2005; 7: 513-520.
23. Kakarla S, Chow KH, Mata M, Shaffer DR, Song XT, Wu MF, et al. Antitumor effects of chimeric receptor engineered human T cells directed to tumor stroma. *Mol Ther.* 2013; 21(8): 1611-20.
24. Zheng Z, Chinnasamy N, Morgan RA. Protein L: a novel reagent for the detection of chimeric antigen receptor (CAR) expression by flow cytometry. *J Transl Med.* 2012; 10: 29.
25. Almasbak H, Rian E, Hoel HJ, Pule M, Walchli S, Kvalheim G, Gaudernack G, Rasmussen AM. Transiently redirected T cells for adoptive transfer. *Cytotherapy.* 2011; 13(5):629-40.



## REVENDICĂRI

1. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide, care vizează atât antigene tumorale, cât și antigene din mediul microtumoral, **caracterizată prin aceea că se realizează prin parcurgerea următoarelor etape:**
  - Selectarea unui antigen tumoral (TAA) și a unui antigen din micromediul tumoral
  - Proiectarea unui receptor chimeric de antigen complet pentru antigenul tumoral (CAR)
  - Proiectarea unui receptor chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR)
  - Generarea unui vector-lentiviral pentru CAR și a unui vector lentiviral pentru CCR într-o linie producătoare 293T
  - Realizarea transducției unor limfocitelor T cu vectorii lentivirali pentru CAR și CCR pentru a exprima SMaRT CAR
  - Verificarea expresiei SMaRT CAR la nivelul limfocitelor T
2. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** antigenul tumoral (TAA) selectat este Her2, iar antigenul din micromediul tumoral este FAP (TmAA).
3. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** receptorul chimeric de antigen complet pentru antigenul tumoral (CAR) este format din următoarele componente: secvența

- 5', peptidul semnal, scFV Trastuzumab VL, G4S linker, scFv Trastuzumab VH, Strep tag II, CD8a hinge, CD28, 4-1 BB, CD3 zeta.
4. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMART CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 3 **caracterizată prin aceea că** vectorul lentiviral pentru CAR anti-Her2 este generat în linia producătoare Lenti-X 293T prin metode de co-transfecție cu reactivul lipofectamină, a unui vector care conține transgena CAR pe baza secvenței genice a peptidelor componente, a plasmidului de împachetare virală psPAX2 și a plasmidului de anvelopă pMD2.G.
  5. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMART CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** receptorul chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR) este format din următoarele componente: secvența 5', peptidul semnal, scFV Sibrotuzumab VH, G4S linker, scFv Sibrotuzumab VL, Myc tag, CD8a hinge, CD28, 4-1 BB.
  6. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMART CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 5 **caracterizată prin aceea că** vectorul lentiviral pentru receptorul chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR) anti-FAP este generat în linia producătoare Lenti-X 293T prin metode de co-transfecție cu reactivul lipofectamină, a vectorului care conține transgena CCR pe baza secvenței genice a peptidelor componente, a plasmidului de împachetare virală psPAX2 și a plasmidului de anvelopă pMD2.G.
  7. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMART CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** limfocitele T sunt transduse cu CAR anti-Her2 și CCR anti-FAP folosind metode de spinoculare și polimerul cationic

polybrene pentru a induce expresia transgenelor la nivelul limfocitelor T cu SMaRT CAR.

8. Metoda de obținere a celulelor selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** expresia SMaRT CAR este evidențiată la nivelul limfocitelor T pe baza expresiei simultane a doi markeri fluorescenți (GFP și RFP), corespunzători receptorului chimeric de antigen complet pentru antigenul tumoral (CAR) și receptorului chimeric de antigen incomplet pentru antigenul din mediul peri-tumoral (CCR).
9. Celule selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide, **caracterizate prin aceea că** sunt realizate și validate funcțional prin metode *in vitro* și *in vivo*, aceste celule fiind specifice pentru antigenele tumorale (Her2) și pentru antigenele din micromediul tumoral (FAP), inducând recunoașterea specifică și efect anti-proliferativ tumoral.
10. Celulele selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide, validate funcțional prin metode *in vitro* și *in vivo* conform revendicării 9 **caracterizate prin aceea că** testarea funcționalității limfocitelor care exprimă constructurele SMaRT CAR se efectuează *in vitro* prin metode de tip culturi celulare, ELISA bispecifică (pentru citokine de activare limfocitară - IFN $\gamma$ , IL-2), citometrie în flux (expresia markerului CD107a).
11. Celulele selective bispecifice CAR-T (limfocite T cu SMaRT CAR) pentru tratamentul tumorilor solide, validate funcțional prin metode *in vitro* și *in vivo* conform revendicării 9 **caracterizate prin aceea că** testarea funcționalității limfocitelor care exprimă constructurele SMaRT CAR se efectuează *in vivo* pe modele tumorale biotipărite 3D, care conțin celule tumorale (Her2+), celule

din mediul peri-tumoral (FAP+) și limfocite T cu SMaRT CAR, care sunt implantate la șoareci imunosupresați de tipul CD1 Nu/Nu și evaluate periodic.

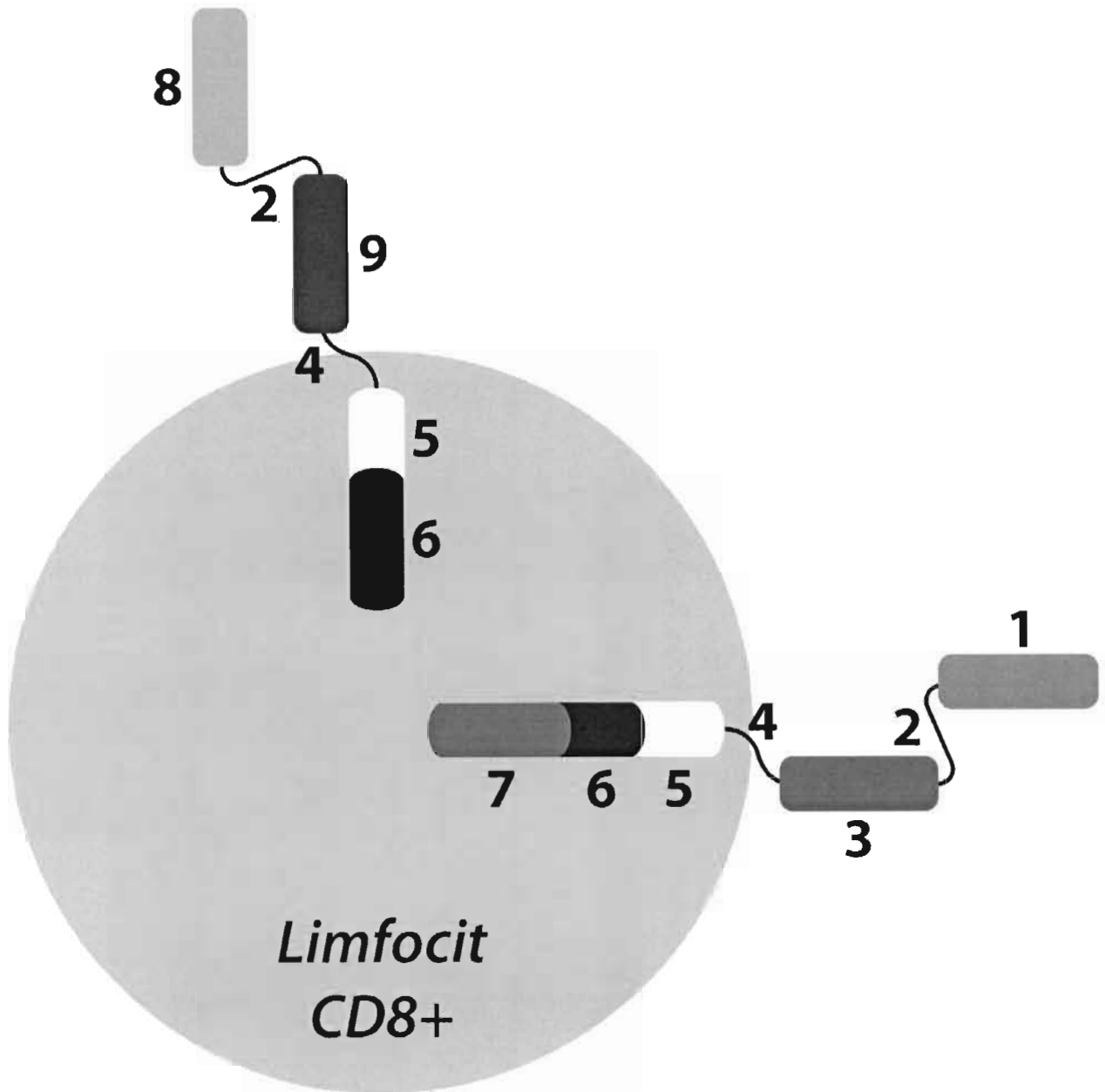


Figura 1

65

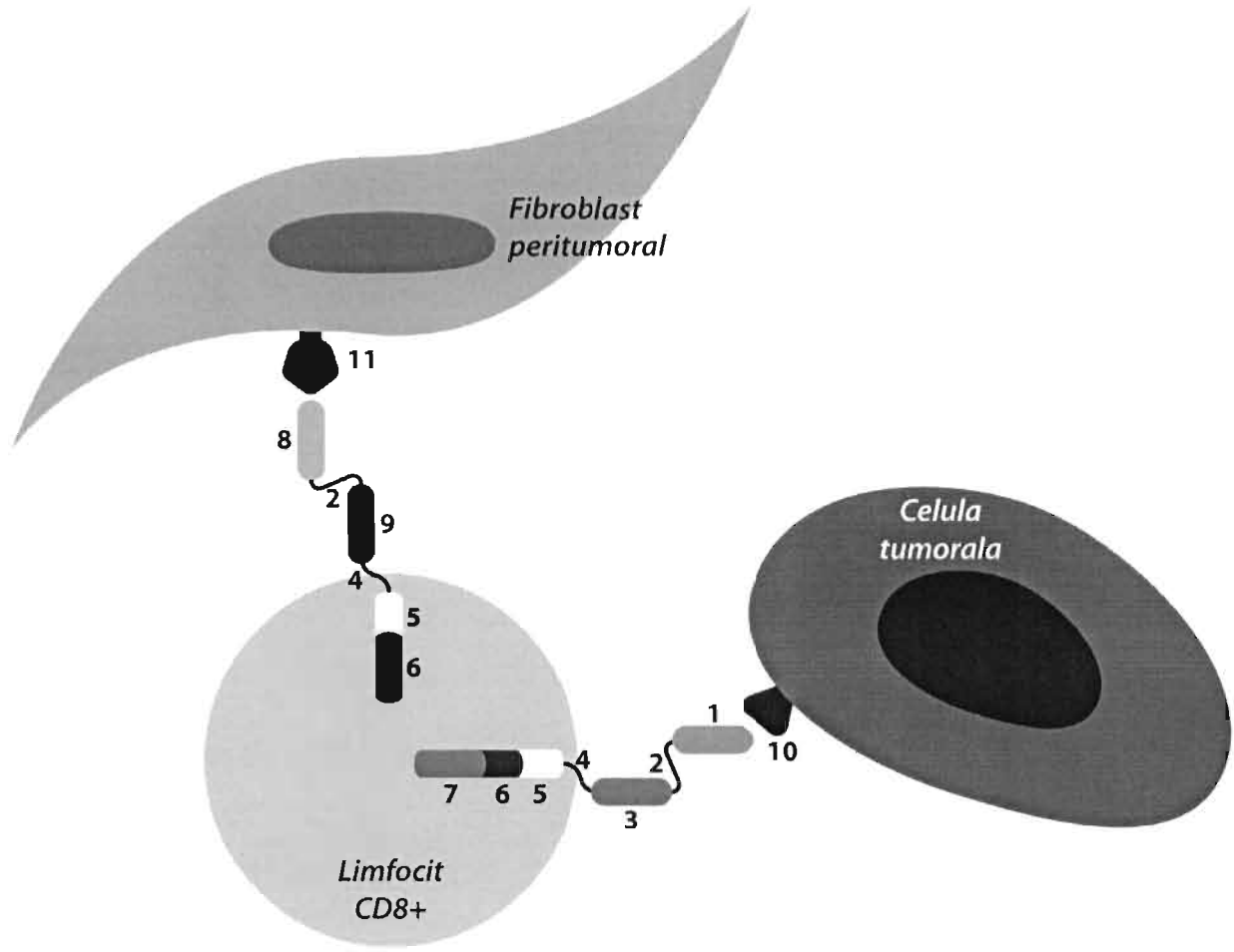


Figura 2

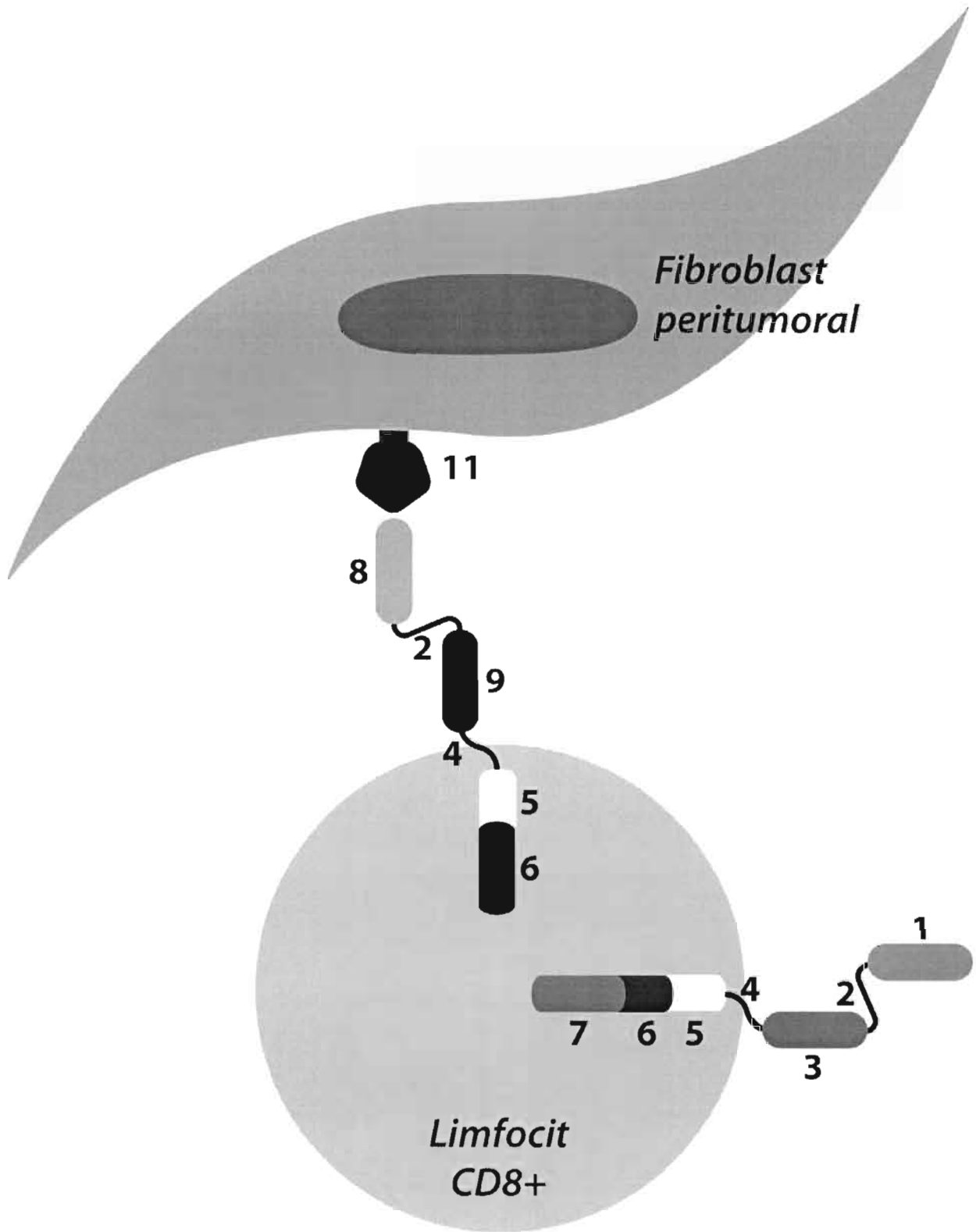


Figura 3