

CAR-NK

Date de identificare proiect

Titlul: Oncoimunoterapii cu celule Natural Killer purtătoare de receptori chimerici de antigen (CAR-NK), Cod SMIS: 103662

Axa prioritară: Research, technological development and innovation (R&D) to support economic competitiveness and business development

Categorie proiect: Attracting high-level personnel from abroad in order to enhance RD capacity
Aria și sub-aria proiectului: 5 Health; 5.1 Early diagnosis, personalized treatment, monitoring and prognostic oncology

Durata proiectului: 48 luni

OncoGen-Spitalul Clinic Județean de Urgență "Pius Brânzeu" Timișoara

Obiectivele proiectului

Obiectivul principal al proiectului a fost de genera celule de tip CAR-NK, a căror țintă să fie molecula CD19 de pe suprafața unor limfocite B maligne, ca alternativă universală și eficientă pentru cele doua terapii cu celule CAR-T aprobate pentru uz clinic, Kymriah și Yescarta. Aceste opțiuni terapeutice cu celule modificate genetic, deși se bazează pe același tip celular CAR-T anti-CD19 sunt caracterizate de citotoxicitate și persistență *in vivo* după administrare diferite, particularități asociate cu elementele din structura CAR-ului transferat.

Chimeric Antigen Receptor Targeted Oncoimmunotherapy with Natural Killer cells - code SMIS 103662

General information

Name of applicant: Emergency Clinical County Hospital „Pius Brânzeu” Timișoara
Priority Axis: Research, technological development and innovation (RD&I) to support economic competitiveness and business development
Project category: Attracting high-level personnel from abroad in order to enhance the RD capacity
Area and sub-area of the project: 5 Health; 5.1 Early diagnosis, personalized treatment, monitoring and prognostic oncology
Duration of the project: 48 months
Project Director: Rauf Bhat, PhD



CAR-NK

Rezultate

Activități de cercetare fundamentală

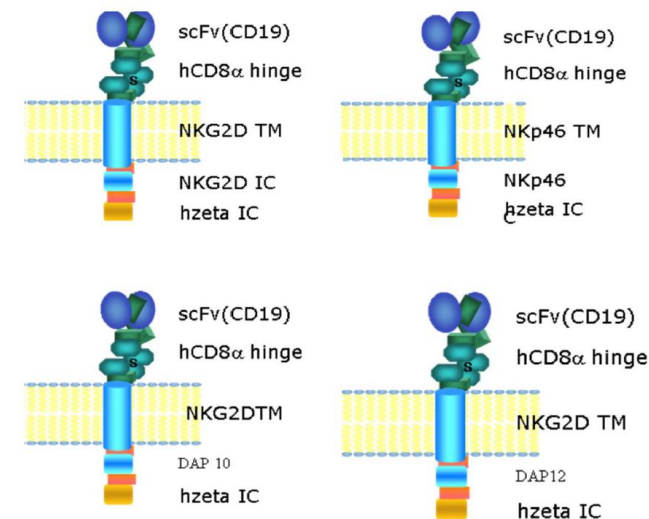
Sub-activitatea 1.1 Generarea de CAR destinate în mod special pentru activarea și expandarea NK primare specifice

- Clonarea anti-CD19 scFv CAR
- Clonarea domeniilor de semnalizare ITAM specifice celulelor NK

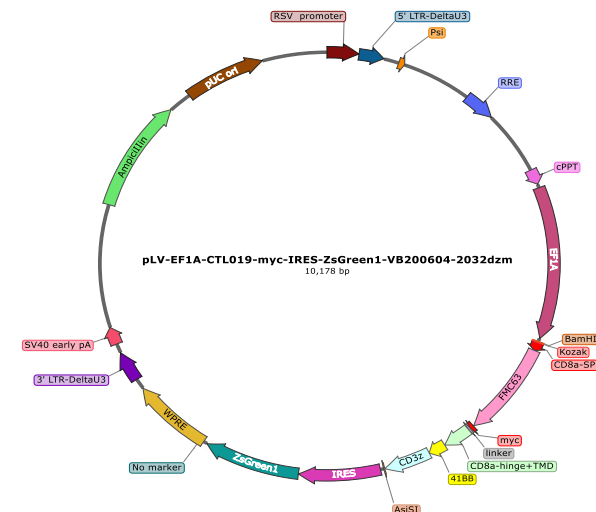
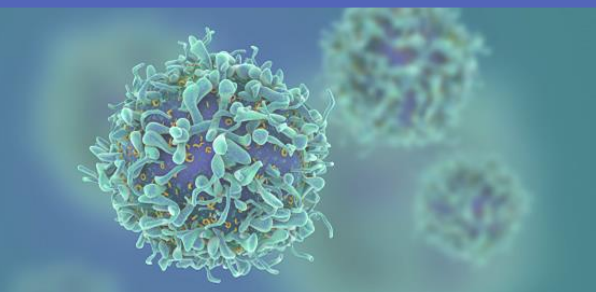
Domeniu de legare a antigenului	Domeniu balama	Domeniu transmembrantar	Domeniu co-stimulator	Domeniu stimulator/citotoxic
CD19	CD8a	NKG2D	NKG2D	CD3Z
CD19	CD8a	NKG2D	DAP10	CD3Z
CD19	CD8a	NKG2D	DAP12	CD3Z
CD19	CD8a	NKp46	NKp46	CD3Z
CD19	CD8a	CD8a	41BB	CD3Z
CD19-myc	CD8a	CD8a	41BB	CD3Z
CD19-myc	CD8a	CD28	CD28	CD3Z
EGFR	CD8a	CD8a	41BB	CD3Z
PDL-1	CD28	CD28		CD3Z

Constructe CAR construite în prima fază a proiectului

Harta unui vector lentiviral indicând regiunile funcționale ale vectorului și domeniile relevante ale constructului CAR



Constructe CAR propuse în cererea de finanțare



CAR-NK

Rezultate

Activități de cercetare fundamentală

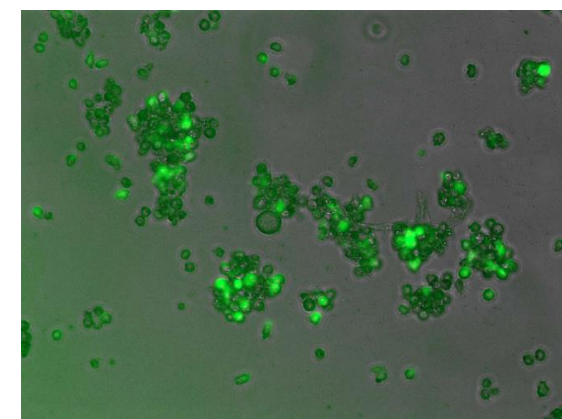
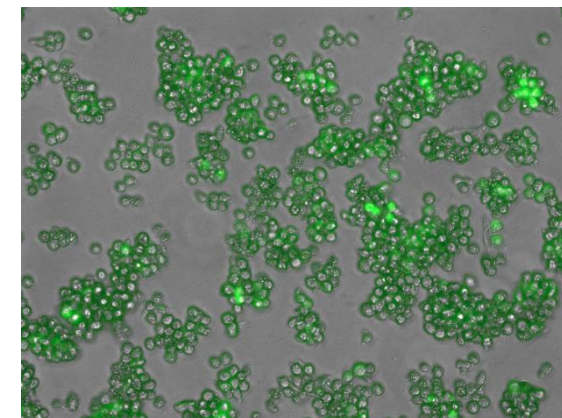
Sub-activitatea 1.1 Generarea de CAR destinate în mod special pentru activarea și expandarea NK primare specifice

- **Transfecția CAR în celule NK primare**

S-a comparat calitatea lentivirusurilor prepare în laborator cu cea a unui virus comercial, amândouă codând proteina fluorescentă GFP ca transgenă, prin determinarea eficienței transducției celulei Jurkat la diferite multiplicități de infecție (MOI=20, 2, 0.2 și 0.02).

Avantajele “echipării” unei populații mixte de celule NK polarizate, activate, din sângele periferic cu receptori chimerici de antigen (CAR) direcționați spre antigene tumorale:

- Recunoașterea diferitelor ținte tumorale nerestricționate de molecule MHC
- Activitate citotoxică puternică susținută prin multiple modalități de distrugere tumorală
- Manipulare redusă și expansiune celulară augmentată *in vivo*



Celule Jurkat transduse cu lentivirus comercial (sus) sau produs în laborator (jos), la MOI=2. Microscopie de fluorescență, Magnificație 100x.

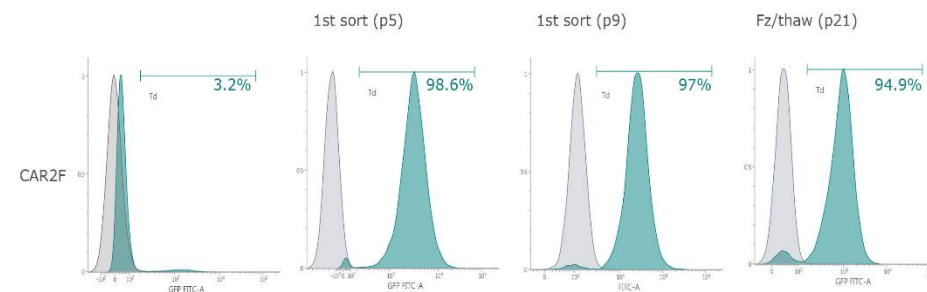
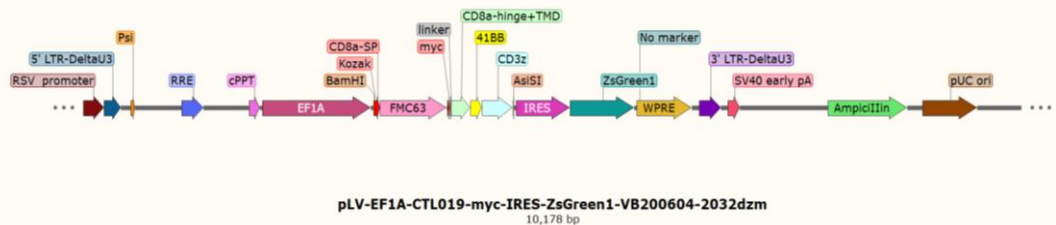
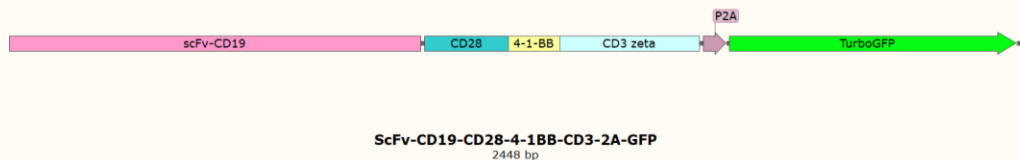
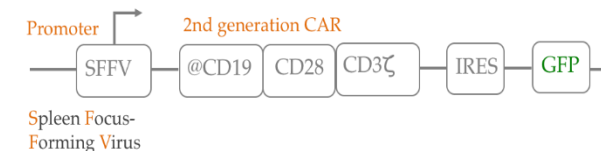
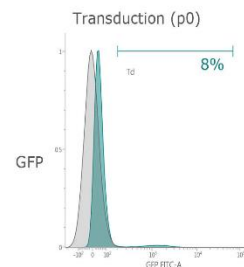
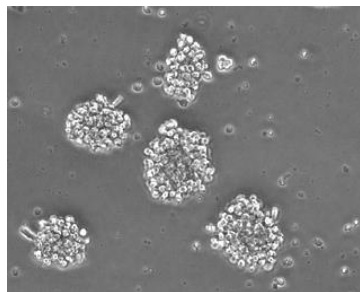
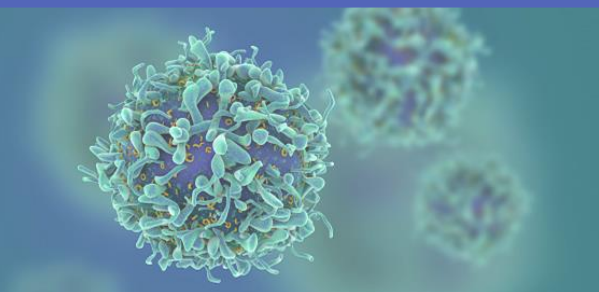
CAR-NK

Rezultate

Activități de cercetare fundamentală

Sub-activitatea 1.2 Caracterizarea *in vivo* și *in vitro* a CAR- NK anti-CD19

- Evaluarea expresiei genice și a stabilității expresiei genice a CAR-NK
- Analiza fenotipică a CAR-NK prin citometrie în flux



GFP expression

Expresia proteinei fluorescente GFP în urma transducției lentivirale a celulelor NK92, după prima sortare la pasaj 5 și la pasaj 9, apoi după congelare și decongelare la pasajul 21. Se constată menținerea expresiei GFP.

Hartă a unui CAR care co-exprimă o proteină fluorescentă după o secvență de tip 2A (panoul superior) sau IRES (panoul inferior).

CAR-NK

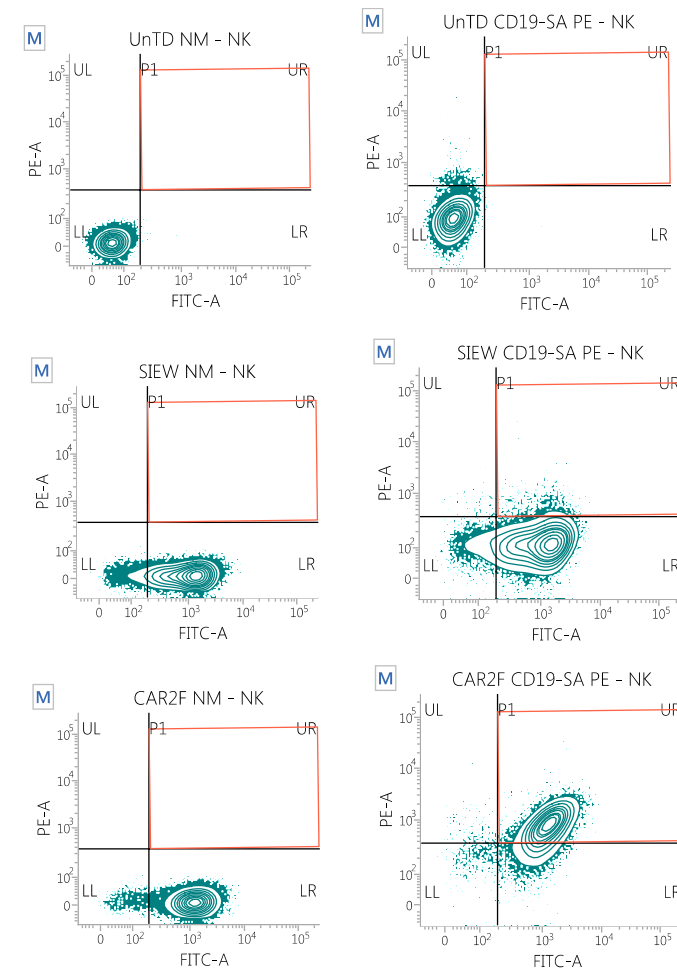
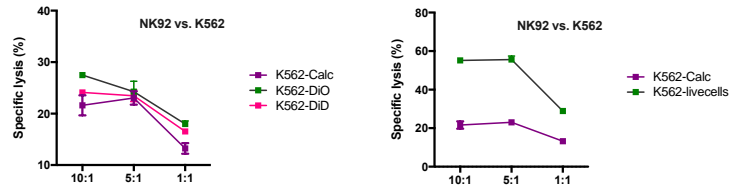
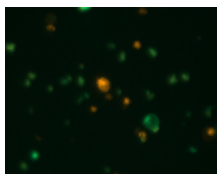
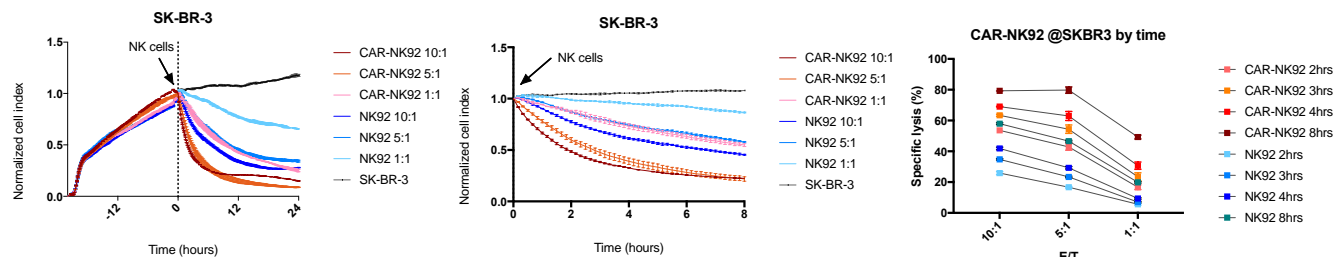
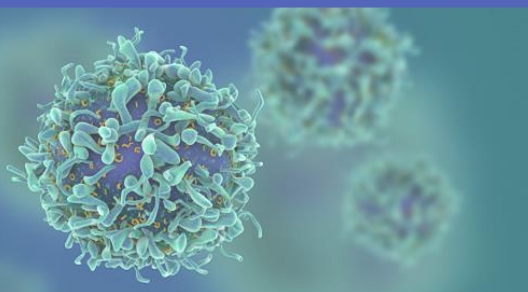
Rezultate

Activități de cercetare fundamentală

Sub-activitatea 1.2 Caracterizarea *in vivo* și *in vitro* a CAR- NK anti-CD19

- Evaluarea *in vitro* a citotoxicității și a capacității proliferative a CAR-NK generate

Exista o bună corelație între celulele care exprimă GFP și cele care exprimă CAR, deși cele două transgene se exprimă de la nivelul aceluiași promoter prin intermediul unui IRES, ceea ce poate uneori rezulta într-o expresie inegală a transgenelor.



Experimente de citotoxicitate efectuate pe linii celulare tumorale aderente (SK-BR3) și în suspensie (K562), prin metode diferite: sistemul xCELLigence (panel superior) și citometrie în flux (panel inferior)

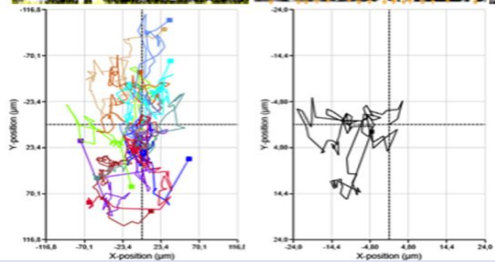
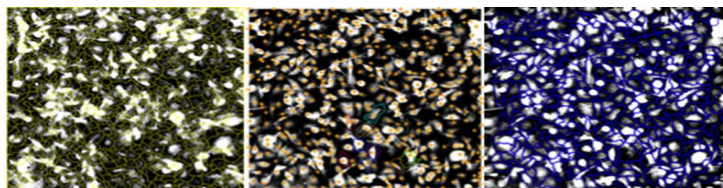
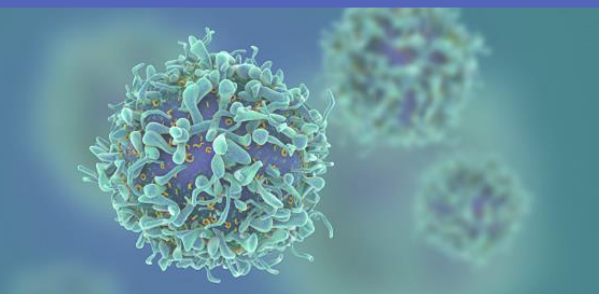
Rezultate

Activități de cercetare fundamentală

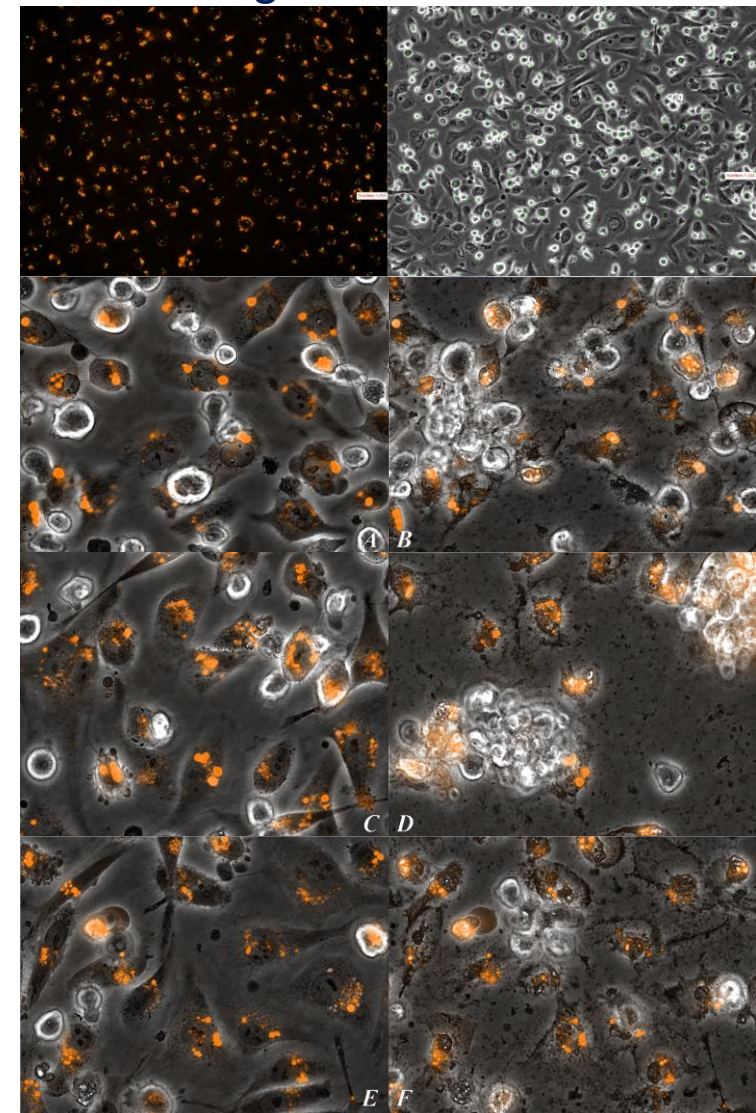
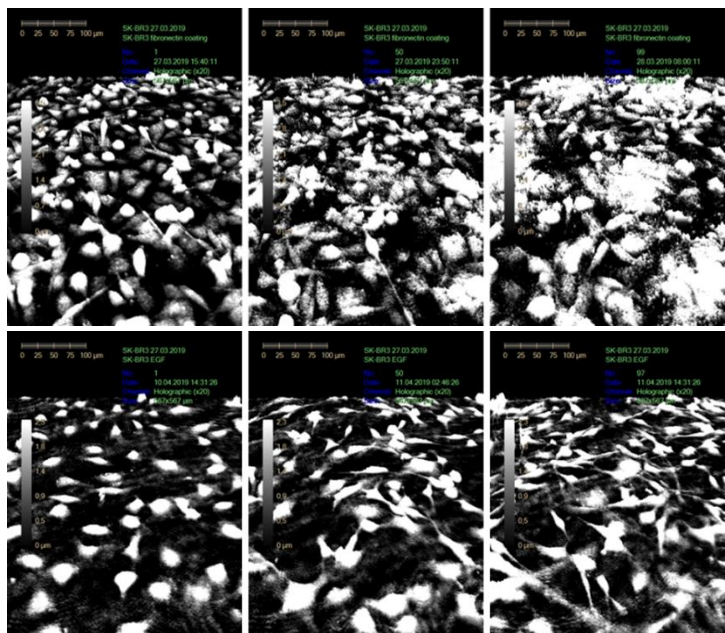
Sub-activitatea 1.2 Caracterizarea *in vivo* și *in vitro* a CAR- NK anti-CD19

- Evaluarea *in vitro* a citotoxicității și a capacității proliferative a CAR-NK generate

Alte modalități de evidențiere a citotoxicității au fost cu ajutorul sistemului de microscopie în timp real Biostation sau profilometrie laser (Holomonitor M4) - evaluarea capacității citotoxice a celulelor NK-92 față de celulele liniei tumorale SK-BR3



Graficul de motilitate al celulelor SK-BR3. Graficul din dreapta reprezintă media motilității pentru 10 celule selectate.

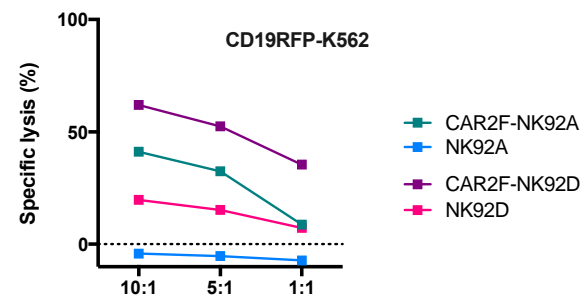
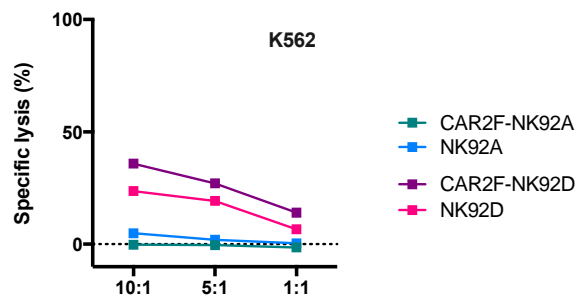


CAR-NK

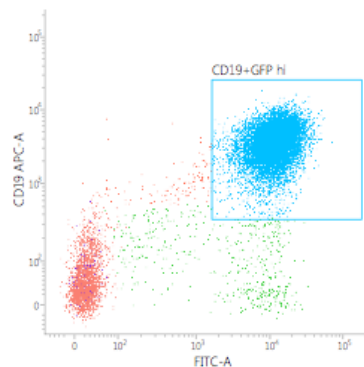
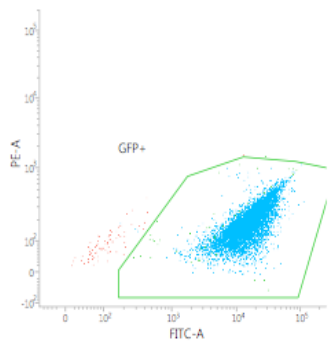
Rezultate

Activități de cercetare experimentală

- Analiza eficienței diferitelor constructe CD19 CAR-NK pe modele murine ale leucemiei B umane
- Analiza eficienței lanțului comun gama IL2/IL15 conținând CAR-NK într-un model murin de leucemie B



Citotoxicitatea celulelor NK92, transduse sau nu cu CAR, fata de celule target K562 si K562-CD19+, la diferite rapoarte efector:target. Liza specifica a fost calculata pe baza numarului de celule target ramase vii in probe, dupa incubare de 3 ore in prezenta de celule efectoare. Probele au fost realizate in triplicat, pe grafic fiind reprezentata valoarea medie.



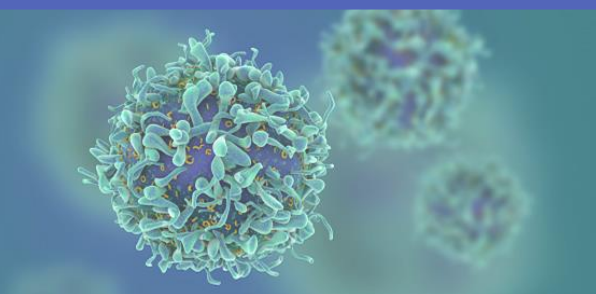
Expresia transgenelor CD19 și proteina fluorescentă marker în celulele K562 transduse, după sortare și expandare *in vitro*. Marcarea pentru CD19 s-a făcut cu anticorp anti-CD19 marcat APC, iar detecția prin citometrie în flux. În stânga, celule nemarcate, transduse cu vectorul CD19-ZsGreen; în dreapta celule marcate cu anticorp anti-CD19 conjugat cu APC; care exprimă semnal fluorescent atât pe canalul verde cât și pe canalul APC; se observă o bună concordanță între semnale, ceea ce indică co-expresia celor două transgene, la intensități similare.

CAR-NK

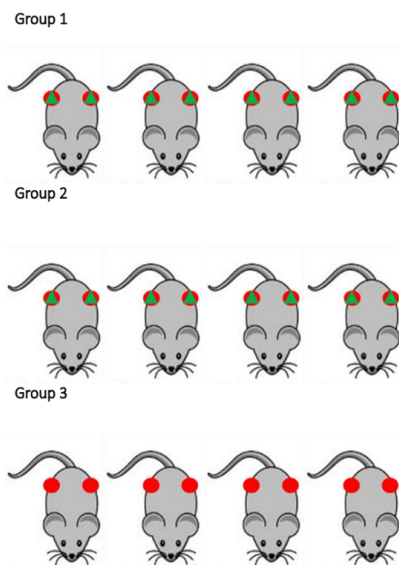
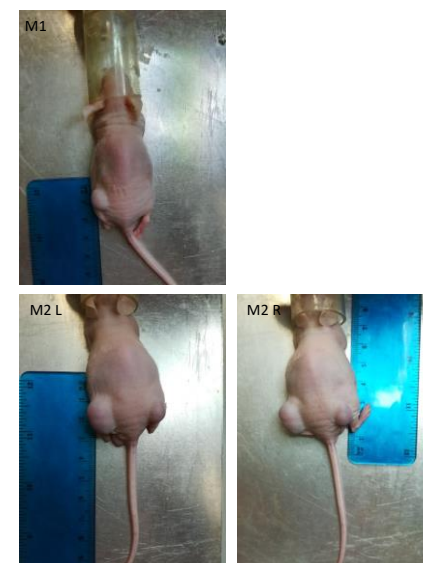
Rezultate

Activități de cercetare experimentală

- Analiza eficienței diferitelor constructe CD19 CAR-NK pe modele murine ale leucemiei B umane



R: K562 (CD19-) L: K562 CD19+ R: K562 (CD19-) L: K562 CD19+ R: K562 (CD19-) L: K562 CD19+



▲ NK92-CAR
● K562 CD19-(R)/CD19+(L)

▲ NK92
● K562 CD19-(R)/CD19+(L)

● K562 CD19-(R)/CD19+(L)

Monitorizarea tumorală - aspectul tumoral la 2 săptămâni în cele 3 loturi de șoareci

Modelul experimental animal - șoareci imunosupresați CD1 Nu/Nu

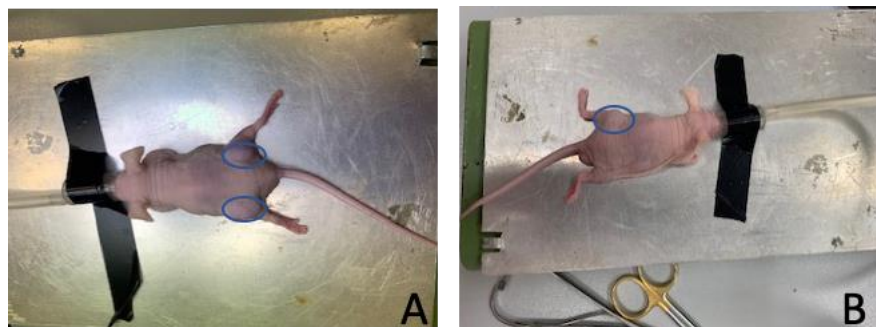
La un interval de timp de 5 săptămâni, doar la șoarecii din grupul de control (grupul 3) se detectează tumori de dimensiuni considerabile, pe ambele flancuri, mai ales la nivelul flancului stâng.

CAR-NK

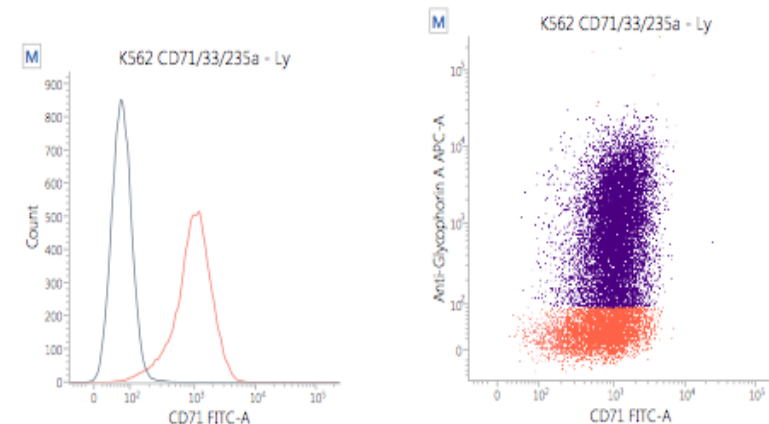
Rezultate

Activități de cercetare experimentală

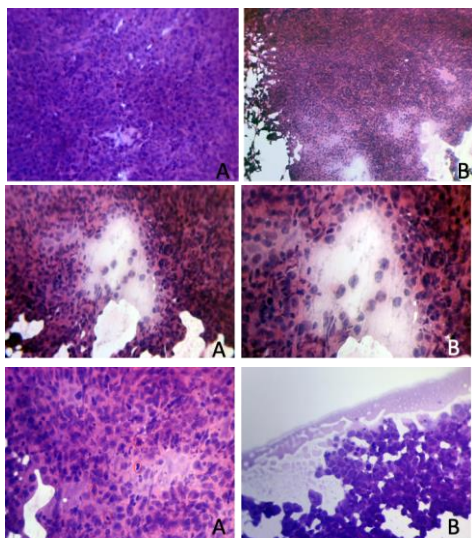
- Analiza eficienței lanțului comun gama IL2/IL15 conținând CAR-NK într-un model murin de leucemie B



Aspectul tumoral înainte de excizia tumorilor formate la grupul control. A. A1 grup control a dezvoltat tumori pe ambele flancuri (K562 CD19 – 17 mm / K562 CD19+ – 15 mm); B. A2 grup control a dezvoltat o tumoră cu diametrul de 11,5 mm la nivelul flancului stâng (K562 CD19+).



Expresia CD71 și a glicoforinei A (CD235a) la nivelul liniei celulare eritroleucemice K562. Determinare prin citometrie în flux pe celulele izolate din tumorile excizate de la modelul animal murin – *ex vivo*.



- Aspectul tumorilor *ex vivo*, colorație HE, grupul control. **A.** K562 CD19-, hipercelularitate, creștere în formă de plaje celulare, celule mononucleare, cu mitoze atipice; **B.** K562 CD19-, hipercelularitate, creștere în formă de plaje celulare, celule mononucleare;
- Aspectul tumorilor *ex vivo*, colorație HE, grupul control. **A.** K562 CD19+, celule mononucleare având o creștere sub formă de plaje celulare, cu numeroase celule mononucleare cu nucleu de mari dimensiuni cu aspect veziculos heterocromatic; **B.** K562 CD19+, aspect similar cu obiectiv mai mare pentru detalii nucleare.

CAR-NK

Publicații

1. Szekely Flavia Anne-Elise, Zogorean Roxana, Anghel Simona, Gavriliuc Oana, Bojin Florina, Păunescu Virgil. CAR-T cells therapy *versus* TILs therapy: the future of cancer immunotherapy. *Fiziologia-Physiology* 2018; Vol. 28, No. 1(95): 4-15.
2. Zogoreanu Roxana, Gavriliuc Oana, Bojin Florina, Păunescu Virgil. Real-time imaging of NK-92 cells interaction with tumoral cell lines. *Fiziologia-Physiology* 2018; Vol. 28, No. 2(96): 4-9.
3. Szekely Flavia, Zogorean Roxana, Anghel Simona, Păunescu Virgil. CAR-NK cell-based therapy: an era of a new potential immunotherapy. *Fiziologia-Physiology* 2019; Vol. 29, No. 1(97): 13-21.
4. Popa Laura, Crisnic Daniela, Nistor Daciana, Plesca Dana, Tatu Carmen, Tanasie Gabriela, Zogorean Roxana, Gavriliuc Oana, Anghel Simona, Bojin Florina, Păunescu Virgil. Modern application of Next-Generation Sequencing (NGS). *Fiziologia-Physiology* 2019; Vol. 29, No. 2(98): 9-16.
5. Plesca Dana, Crisnic Daniela, Nistor Daciana, Tatu Carmen, Tanasie Gabriela, Zogorean Roxana, Anghel Simona, Gavriliuc Oana, Bojin Florina, Păunescu Virgil. *Fiziologia-Physiology* 2019; Vol. 29, No. 2(98): 38-43.
6. Olteanu Gheorghe-Emilian, Mihai Ioana, Bojin Florina, Gavriliuc Oana, Paunescu Virgil. The natural adptive evolution of cancer: The metastatic ability of cancer cells. *Bosn J Basic Med Sci* 2020 Feb 3. doi: 10.17305/bjbms.2019.4565.
7. Zogorean Roxana, Anghel Simona, Gavriliuc Oana, Paunescu Virgil. Cryopreservation of Natural Killer Cells. *Fiziologia-Physiology* 2020; Vol. 30, No. 1(99): 21-26.
8. Olteanu Gheorghe-Emilian, Crisnic Daniela, Grijincu Manuela, Zbarcea Lauriana-Eunice, Cristea Mirabela, Zambori Csilla, Ivan Alexandra, Bojin Florina, Gavriliuc Oana, Nedea Eduard, Paunescu Virgil. Assessment of Cell Culture Media Variation Inducing Cytokine Secretion in PBMCs, CD3+, and CD8+ Immune Cells. *Fiziologia-Physiology* 2020; Vol. 30, No. 2(100): 50-58.

Brevete

1. Bojin MF, Gavriliuc OI, Tănasie G, Țațu CA, Panaitescu C, Păunescu V, Nedea CE. „Celule selective bispecifice CAR-T pentru tratamentul tumorilor solide și metoda de obținere” , nr. A/00704/2020, data depozit 06/11/2020, Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM), Direcția de brevete de invenție și informații tehnologice.
2. Nedea CE, Păunescu V, Gavriliuc OI, Zogoreanu R, Ivan A, Cristea IM, Țațu CA, Bojin MF, Anghel SS. „Celule citotoxice purtătoare de receptori himerici de antigen universali care țintesc antigene diverse și multiple pentru tratament adoptiv”, nr. A/00705/2020, data de depozit 06/11/2020, Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM), Direcția de brevete de invenție și informații tehnologice.