

A tumorban felhalmozódó B-limfociták genetikai információja, mint az immun T-sejt vezette tumorellenes „autó” (CAR, kiméra antigénreceptor) célba irányító „GPS”-e

KOTLAN BEATRIX¹, CSUKA ORSOLYA², TÓTH LÁSZLÓ³, FARKAS EMIL³, PLÓTÁR VANDA⁴, HORVÁTH SZABOLCS⁴, ÉLES KLÁRA⁴, OLASZ JUDIT², TÓTH JÓZSEF⁴, KÁSLER MIKLÓS⁵, LISZKAY GABRIELLA⁶

Országos Onkológiai Intézet, ¹Molekuláris Immunológiai és Toxikológiai Osztály, ²Patogenetikai Osztály, ³Daganatsebészeti Központ, ⁴Sebészeti és Molekuláris Patológiai Osztály, ⁵Igazgatóság, ⁶Bőrgyógyászati Osztály, Budapest

Levelezési cím:

Dr. Kotlan Beatrix, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7–9. Tel.: 224-8600/ 3294, e-mail: kotlanb@netscape.net

Közlésre érkezett:

2016. február 11.

Elfogadva:

2016. február 18.

A géntechnológiai fejlesztések nagy lendületet adtak T-sejtek kombinált antigénreceptorainak (chimeric antigen receptors, CARs) előállítására, amelyek ígéretes rákterápiás lehetőségek alapjai. Kiindulási célunk pontos és jól tolerálható tumorellenes antitestek definiálása volt, mivel az a CAR T-sejtes technika fontos igénye. Tumorinfiltráló B-limfocita (TIL-B) eredetű fágkönyvtárak létrehozásával tumorellenes egyláncú antitestfragmenseket (scFv) sikerült szelektálnunk. Ezen immunglobulin variábilis génrégiók DNS-szekvenciáját megfelelő génmódosító technika révén T-sejtekbe építve, azok új tumorantigén-kötő specificitást kapnak. Az általunk bevezetett új stratégia a TIL-B-sejtek egyedi, erősen tumor-asszociált diszialisált glikoszfinolipideket (GD3 gangliosidok) felismerő képességét használja fel. Az ily módon feltárt specifikus antitestfragmenseket használtuk szolid tumorokban potenciálisan alkalmazható GD3 gangliosid CAR génkonstrukciók létrehozására. Magyar Onkológia 60:64-71, 2016

Kulcsszavak: tumorinfiltráló B-limfocita, kiméra antigénreceptor, diszialisált glikoszfinolipid

The rapidly growing field of gene therapy techniques to modify T cells with chimeric antigen receptors (CARs) for cancer care solutions, reached considerable achievements. However, there is an urgent need of reliable, well tolerable tumor-associated antigen specific antibodies. Tumor-infiltrating B (TIL-B) cell originated single chain Fv (scFv) gene regions could be selected with tumor specificity. DNA sequences of these antibody variable regions were subjects to get engineered into new CAR constructs. Our novel strategy harnesses tumor-infiltrating B cells' unique capacity to reveal highly tumor-associated disialylated glycosphingolipids (GD3 gangliosides). We used these human antibody fragments for generating GD3 ganglioside specific CAR gene constructs for potential usage in solid tumors.

Kotlan B, Csuka O, Tóth L, Farkas E, Plótár V, Horváth S, Éles K, Olasz J, Tóth J, Kásler M, Liszkay G. Genetic information from tumor-infiltrating B lymphocytes as a driver tool ("GPS") for anti-tumor T cell CARs. Hungarian Oncology 60:64-71, 2016

Keywords: tumor-infiltrating B lymphocytes, chimeric antigen receptor, disialylated glycosphingolipids

BEVEZETÉS

A daganatkutatás és rákterápiás lehetőségek szempontjából az új immunterápiás stratégiák nagy előretörést jelentettek az elmúlt években [1]. A tumorimmunológia szinte minden tumor vonatkozásában igazolta ennek fontosságát, és a megvalósítható lehetőségek egész arzenálját kínálja. A folyamatosan képződő tumorsejtekkel szemben a gazdaszervezet immunrendszere felveszi a harcot, és egy ideig sikeres a küzdelem. A tudományos és technológiai fejlődés főleg a tumorelles T-sejtes immunválaszra épített, mivel a ráksejteken fellelhető jellegzetes struktúrákat legelőször tumorelles T-sejt-klónok révén tudták meghatározni. A tumorimmunológiai kérdéskör keresttüzében állnak a T-sejtek, az általuk felismert vagy felismerhető fehérjealapú tumorasszociált antigének (mint pl. a NY-ESO-1, MAGE, MART-1) [2], illetve az immunválasz gátlása alól való felszabadítás révén (pl. ipilimumab) [3]. Az egyik sok lehetőséget kínáló fontos irányzat a T-sejtes géntechnológia, amelynek fő célja hatékony és specifikus tumorelles immunválasz gyors létrehozása. A géntechnológiai módosítás révén a T-sejtek megszerezhetik akár egy fontos tumorantigén felismerő képességét is. A T-sejtek vagy az élettani fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) korlátozott T-sejt-receptorral (T cell receptor, TCR), vagy egy több molekula fúziójából létrehozott, ún. kiméra antigénreceptor (chimeric antigen receptor, CAR) szintéziséért felelős génrégió beépítése révén vehetik célba a „kiszemelt” tumorsejteket [4].

A CAR T-sejteken való expressziójával egy monoklonális ellenanyag antigénköti helyének és a T-sejt-aktivációért felelős mechanizmusnak az együttese hozható létre. Ezáltal MHC-korlátozástól mentes antigénfelismerés válik lehetővé, míg a T-sejtek kedvező tumorelles aktivitása megmarad. Az első kiméra antigénreceptorokat kb. 30 évvel ezelőtt konstruálták [5]. Eshhar és munkacsoportjának fejlesztése építette be az első, még antigénköti képességgel rendelkező egyláncú ellenanyagfragmenst (scFv), mint ektodomént. Az ektodomén transzmembrán doménen keresztül kapcsolódik az intracelluláris endodoménhez, amely a T-sejt-receptor sejtszignalizációs zéta-láncához kötődik [6]. Több, lymphomákkal reagáló scFv van már alkalmazásban, illetve további CAR-fejlesztések tárgya, amelyeknél az affinitás és a felismerendő antigénepitóp tulajdonságai a meghatározók. Szolid tumorokra vonatkozóan még igen kevés az adat, több a megoldatlan kérdés, és főleg a célzandó tumorantigének problémája vitatott.

A fehérjealapú tumorasszociált antigének mellett egy még nehezebben feltárható terület a tumorsejtek jellegzetes abnormális glikoziláltságának feltérképezése, új tumorasszociált biomarkerek meghatározása céljából. Amikor az immunrendszer tumorban felhalmozódó T-sejtjei már nagy hírnévnek örvendtek számos közlemény és klinikai vizsgálat kapcsán [7], a szörványosan előforduló, ún. tumorinfiltráló B-sejtekről (TIL-B) még alig tettek említést. A tumorelles immunválasz szempontjából nem tulajdonítottak jelentősé-

get a TIL-B-sejteknek, mivel többnyire csak kis százalékban mutatkoztak immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatokban. Pedig a B-sejtek eredendően rendelkeznek azzal a tulajdonsággal, ami révén képesek felismerni a legkülönbözőbb eredetű és összetételű, idegen vagy megváltozott saját struktúrákat. Végül a tumorimmunológiai érdeklődés fellendülése és a molekuláris biológiai módszerfejlesztések hívták fel a figyelmet a TIL-B limfocitákra [8, 9]. Az Epstein-Barr-vírussal (EBV) transzformált B-limfocita sejtkultúra felülűszók tumorsejtekhez való kötődését sikerült kimutatnunk a vizsgált emlőtumorkok nagy részében, hasonlóan a melanoma vonatkozásában tapasztaltakhoz [10]. Feltételezésünk szerint a TIL-B-sejtek rendelkeznek olyan genetikai információval, ami egy tumorelles stratégia felállításához kiaknázható. A molekuláris genetikai és biotechnológiai alkalmazások egy szellemes új technológia, az ún. fágmegjelenítéses módszer kifejlesztése és tumorokban való alkalmazása révén lehetővé tették a TIL-B-sejtek „vallatását” [11]. A medullaris emlőcarcinomákban feldúsuló B-sejtekről nemzetközileg is elsőként igazoltuk így a tumorasszociált diszialisált glikoszfinbolipideket (GD3 gangliozidok) felismerő képességüket. A TIL-B-sejtektől nyert új genetikai információ rávezetett tehát az abnormális glikoziláltságú fehérjék és lipidek összetett struktúráinak, így a tumorasszociált glikoproteinek és glikolipidek új felismerési lehetőségére. A szialisált glikoszfinbolipidek komplex családjának IHC-vel való standardizált kimutatását a GD3 gangliozidokra vonatkozó eredményeink segítették [12]. A tumort infiltráló B-sejtek által termelt ellenanyagok mélyebb szintű elemzésében az összehasonlító DNS-szekven-
cia-analízis igen jó szolgálatot tett [13, 14]. A kapott eredmények lendületet adtak a további TIL-B-sejtekkel kapcsolatos adatok gyűjtéséhez, ami, úgy tűnik, elindította az immun B-sejtek „tumorimmunológiai éráját” is [15–18]. A szialisált glikoszfinbolipidek molekulacsaládjára egymásra épülő molekulák összetett láncolata, amelyek megismerése igen lényeges a rákkutatásban, a tumordiagnosztikai és -terápiás fejlesztések tekintetében [19–21]. A különböző glikoszfinbolipideknek számos sejtfiziológiai folyamatban tulajdonítanak fontos szerepet, pl. a membrántranszport-folyamatokban, sejtdhézióban, sejtmigrációban, fertőzésekben, intracelluláris jelátviteli folyamatokban, illetve különböző sejtfelszíni receptorok által indukált sejtválasz kiváltásában. Több betegség patogenezisében, így a rák kialakulásában is fontosnak tartják ezeket a mikrodoméneket [22, 23]. Ezen erősen tumorasszociált antigéneket felismerő immunoglobulin variábilis génrégiók kiválasztása és diagnosztikus és terápiás célból való kiaknázása a jelen munka célja.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

A vizsgálatok korábbi fázisában medullaris emlőcarcinomás (n=3) és invazív ductalis emlőcarcinomás betegektől származó sebészeti anyagból (n=8), majd a későbbiekben melanomás betegek műtétje kapcsán nyert tumorszövetmintából dolgoz-

tunk (n=6). Az emlőtumorokra vonatkozóan az aktuális Intézeti Etikai Ellenőrző Bizottság (IRB) szabályainak megfelelő be-tegtájékoztató és beteg-beleegyező nyilatkozatok aláírásával, míg a melanómák esetében az ETT TUKEB 16462- 02/2010 engedélyben foglaltak szerint történt a mintagyűjtés.

Immunhisztokémia és hisztológia

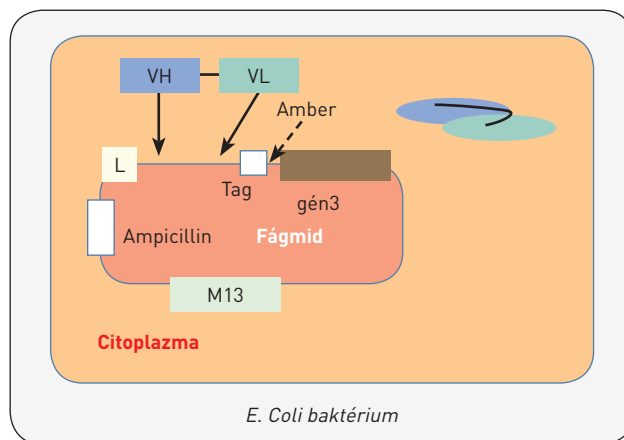
A formalinnal fixált és paraffinba ágyazott tumorszövetminták metszeteit (2–4 µm) hematoxinil-eozinnal (HE) festettük. Az immunhisztokémiai vizsgálatokban anti-CD20 (Dako) anti-testet és egy lépéses polimer detektálási rendszert (One Step Polymer IHC Detection Kit, BioGenex) alkalmaztunk. A fa-gyaszott tumorszövetmetszeteket (6–8 µm) paraformalde-hiddel (PFA) való fixálást követően a diszialisált glikoszfin-go-lipidek elleni antitestfragmensekkel, illetve a pozitív kontroll (HCBC3 hibridóma, GD3, Calbiochem, Axxora) antitesttel, valamint FITC-jelölt anti-egér IgG (Fab)'2-vel reagáltattuk (Vector Laboratories) az indirekt immunfluoreszcens tesztben.

Sejtvonalak tenyésztése

Az amerikai sejtbankból (American Type Cell Collection, ATCC) származó invazív ductalis emlőcarcinoma (MDA-MD231, ZR751), melanoma (SK-Mel28) és HEK293 embrionális vese, K562 myeloid leukaemia sejtvonalakkal, valamint a Dr. Meenhard Herlyn professzortól kapott A2058 melanomasej-tekkel dolgoztunk. Standard steril sejtenyésztési feltételeket alkalmaztunk (RPMI-1640 médium, 5% (melanoma esetén) vagy 10% (emlőtumor esetén) foetal calf szérummal (FCS) és antibiotikumokkal (penicillin/streptomycin) kiegészítve, 5% CO₂ termosztát, 37 °C, 90% páratartalom). A HEK293 sejtek tenyésztése 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben történt. Mind emlőtumorok, mind melanoma esetében tumorszövetből létrehozott primer tumorsejtenyészetekkel is dolgoztunk.

Fágmegjelenítési módszer

Az Epstein–Barr-vírus transzformációval nyert B-sejt-klónok felülúszóinak tesztelése adott alapot a molekuláris genetikai és biotechnológiai lépéseket és immunológiai elvű teszte-lést magában foglaló TIL-B fágmegjelenítési módszer és fág-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kidolgo-zására. Az egyláncú ellenanyagok, az ún. egyláncú antitest-fragmensek (single chain Fv, scFv) előállítása rekombináns géntechnológiával történt. A többlépéses PCR-technika és bakteriális klónozás után kapott scFv molekulákat PHEN1 vagy pCANTAB fágmid alapú expressziós rendszerbe vittük. Ezt követően natív tumorsejtmembránnal szemben reagáltat-va lehetett a pozitív klónokat kiválasztani (1. ábra). A módszer lényege a különböző tumorszövetmintákból való RNS-pre-parálást (RNeasy, Qiagen, NucleoSpin, Macherey-Nagel) és cDNS-átírást (High capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit, Applied Biosystems) követő immunglobulin (Ig) variábilis nehéz (VH) és könnyűláncrégiók (Vk, VL) klónozása. Ig VH és Ig Vk génrégiókat megfelelő primerkombinációkkal, polimeráz láncreakciós technikával (PCR I) amplifikáltattuk (9, 24). Az



1. ÁBRA. Tumorfiltráló B-limfocita eredetű ellenanyagok tesztelésére kidolgozott fágmegjelenítési módszer elve. A fágmid vektor semati-kus képe, megjelölve az Ig nehéz- (VH) és könnyűlánc (VL) génrégiók, illetve az scFv beépülési helyét és a jellegzetes marker és rezisztencia kódoló régiókat

analitikai, majd preparatív gélelektroforézissel kiválasztott megfelelő méretű IgVH (kb. 360 bp) és IgVk (kb. 340 bp) gén-régiókat egy ún. „blunt end” klónozóvektorba (pUC18/SmaI/ BAP vektor) beépítve *E. coli* TG1 baktériumok transzformá-lása következett. A szelektált bakteriális klónokból preparált (Qiaquick, Qiagen GmbH) megfelelő beépített DNS-szakaszt (inszeret) hordozó plazmidok képezték az összehasonlító nukleinsavsorrend-elemzés tárgyát. A DNS-elemzésekkel párhuzamosan megkezdődött a IgVH és IgVk génrégiókból az scFv antitest konstrukciója egy kapcsoló (Gly4Ser)3-at kódoló DNS-híd segítségével egymást követő PCR (PCR I, PCR II, PCR III) reakciók és preparatív gélelektroforézissel való feldolgozás révén. A kétféle scFv-fágkönyvtár generálása során alkalma-zott primerekhez és a PCR-protokolloknál a korábbiakban beállított, ismertetett módszereket vettük alapul (9, 24).

DNS-szekvencia-analízis

A PCR-screen technikával választottuk ki az IgVH-t és IgVk-t hordozó bakteriális klónokat, valamint a generált scFv ellen-anyagfragmensre pozitív klónokat. A plazmidpreparátumok (Qiaquick, Qiagen GmbH) mennyiségét és minőségét optikai denzitás mérésével és analitikai gélelektroforézissel pon-to-san meghatároztuk. A DNS-szekvencia meghatározásához BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosy-stems) segítségével szekvenálási reakciót végeztünk LMB2 és LMB3, illetve pCANTAB5 s1 és s3 primerekkel (Amersham Pharmacia Biotech). A reakciótermékeket NucleoSeq kittel (Macherey Nagel) tisztítottuk, majd ABI 3130 Genetic Ana-lyzer (Applied Biosystems) alkalmazásával választottuk el. A DNS-szekvencia-elemzés a Chromas 2, Bioedit 2, Clustal W, TreeView és VECTOR NTI 11 software (Invitrogen, Kromat Kft.) valamint IMGT és Blast DNS-adatkezelő programokkal

történt. A korábban definiált speciális tulajdonságú, halmozott előfordulást mutató szekvenciákkal való összehasonlító elemzést is végeztünk.

Kiméra antigénreceptor genetikai tervezése és előállítása

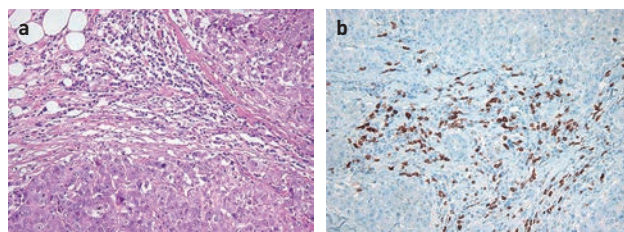
A szerkesztett kiindulási vázvektorba VECTOR NTI 11 DNA analízáló és tervező szoftver révén megszerkesztettük a kiválasztott antitestfragmens génrégiók és jelölő szakaszok bevitelével azokat a génkonstrukciókat, amelyek a szintetizálást követően a kiméra antigénreceptor alapját képezik. Egy több klónozóhellyel rendelkező vektorral, LR Clonase – Gateway (Invitrogen) reagens kit révén lehet az scFv inszertet tartalmazó génkonstrukciókat létrehozni. Kompetens *E. coli* baktériumok (*E. coli*, Lucigen) hőmérsékleti sokkal kiváltott transzformációját követően, a szelekciós táptalajon tenyésztett baktériumok pozitív klónjaiból enzimemésztés (BSRG1, BGL, PVU2) fingerprint módszerrel határoztuk meg a génkonstrukció jelenlétét. A CAR-vektor génkonstrukciót hordozó plazmidpreparátumok (Qiaprep Spin Miniprep Kit, Qiagen) ellenőrző DNS-szekvencia-elemzése csak több lépésben, új specifikus primerek tervezésével (www.idtdna.com) lehetséges. Endotoxinmentes plazmid-maxipreparátumokat EndoFree Plasmid Maxi Kittal (Qiagen) állítunk elő megfelelő mennyiségben és minőségben a transzfekciókhoz.

Sejttranszfekció

A CAR-vektor génkonstrukciókat első ellenőrző lépésként HEK293 embrionális vesesejtekbe juttattuk. Erre két módszert alkalmaztunk: sejtmembránnal reagáló vegyülettel lipofekciót (Lipofection reaction kit, Lonza), valamint elektrosokk alkalmazásával végzett elektrotranszfekciót (Nucleofection transfection Kit, Lonza) végeztünk. A létrehozott kiméra antigénreceptor – vektor konstrukciók perifériás mononukleáris sejtekbe (PBMC) juttatása elektrosokkal, a PBMC-nek megfelelő kittel (Nucleofector Kits for Human T cells, Lonza) történik. Egészséges kontrollok perifériás vér mononukleáris sejtjeit Ficoll-Uromiro sűrűséggradiens centrifugálással szeparáljuk és alikvotokban fagyaszttva tároljuk a felhasználásig. A HEK293 sejtek és a PBMC-k viabilitása a transzfekció szempontjából elsődleges, így azt automata számlálóval (Nexcelom Cellometer, Nexcelom Biosciences LCC) ellenőrizzük.

Immunfluoreszcens teszt áramlási citometriás és konfokális mikroszkópos elemzéssel

Az indirekt immunfluoreszcens jelölés során diszialisált glikoszfinolipidek elleni antitestfragmenseket, pozitív kontroll (HCBC3 hibridóma, GD3, Calbiochem, Axxora) antitesteket, valamint FITC-jelölt anti-egér IgG (Fab)'2-t alkalmaztunk (Vector Laboratories). A minták értékelését áramlási citométerrel (CyFlow SL-Green, FloMax Partec és Ariel/Becton Dickinson), FloMax és FloJoe10 szoftverekkel, valamint konfokális (Nikon Eclipse E600, Model C1-LU3) és immunfluo-

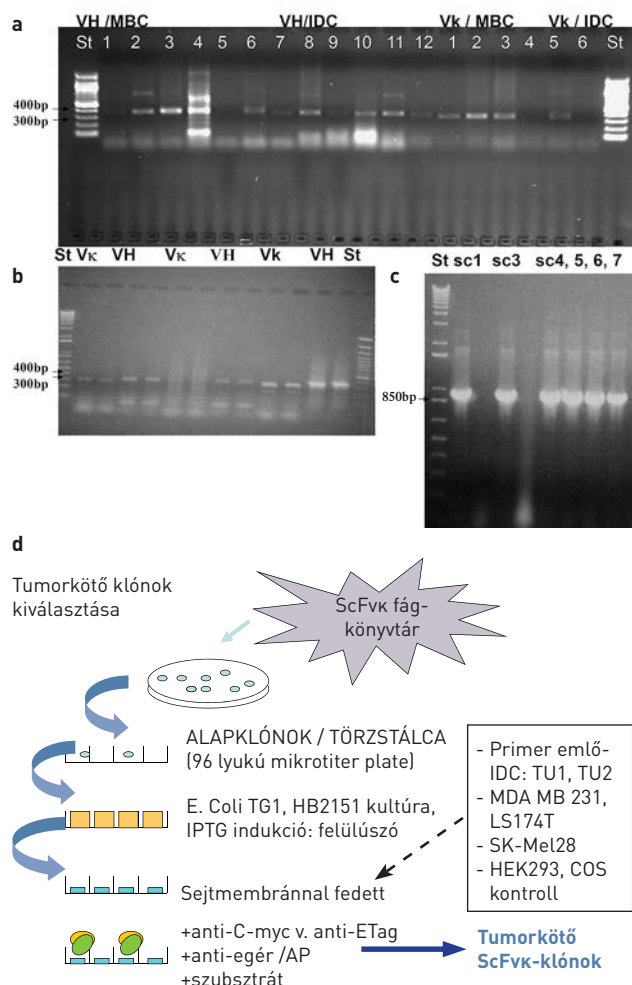


2. ÁBRA. Egy reprezentatív medullaris emlőcarcinoma paraffinos metszetének hematoxinil-eozinnal festett (a) és anti-CD20 antitesttel jelölt immunhisztokémiai reakciójának a képe (b) (10×10)

reszcens mikroszkóppal (Leica, illetve Nikon) végeztük. Az immunfluoreszcens teszthez sejtenyészítő szövetkamramezeket használtunk és citospin preparátumokat készítettünk a primer tumorsejtekből és sejtvonalakból, megfelelő sejtszámú sejtszuspenzió FCS-es közegben, tárgylemezre való centrifugálásával és szárításával.

EREDMÉNYEK

Néhány korábbi emlőtumoros esetben sikerült igazolnunk a szeparált TIL-B-sejtek EBV-vel történő transzformációját és agarózos klónozását követően a kapott B-sejt-vonalak sejtkultúra-felülszóiában levő antitestek tumorsejtekhez való kötődését. Ez adott indítást a mélyebb szintű molekuláris biológiai munkákhoz. A munka kiindulása az immunhisztokémiai vizsgálatok kapcsán jelentős B-sejt-infiltrációt mutató medullaris emlőcarcinomás minták vizsgálatához kötődik (2. ábra). Invazív ductalis emlőcarcinomás mintában, valamint melanomás szövetmetszetekben is kimutattuk B-sejtek jelenlétét, de jóval alacsonyabb és változó mértékben. Különböző medullaris emlőcarcinoma, invazív ductalis emlőcarcinoma és melanomaminták felhasználásával kívántuk alátámasztani és bővíteni a TIL-B-sejtektől nyerhető genetikai információt a CAR-konstrukció miatt. A kiválasztott parányi fagyasztott tumorszövetmintákból megfelelő mennyiségben és minőségben tudtunk RNS-t izolálni a többirányú molekuláris feldolgozáshoz. Az RT-PCR technikával amplifikált nehéz- és könnyűlánc variábilis génrégiók bakteriális klónozása révén nyert, a kérdéses DNS-inszertet hordozó plazmidpreparátumok (3.a,b ábra) képezték az alapját egy összehasonlító DNS-szekvencia-analízisnek, valamint a TIL-B eredetű fág-megjelenítési technológiáknak. A tisztított IgVH és IgVk variábilis génszakaszokat több egymást követő PCR (PCR I, PCR II és PCR III) segítségével megfelelő pHEN1 vektorba klónozva scFv proteint kódoló szekvenciákká alakítottuk (3.c ábra). A PCR-lépések között preparatív gélelektroforézis révén lehetett a megfelelő méretű DNS-fragmenseket a gélből kivágni, majd azt a következő PCR-reakció előtt tisztítani. Módszereinkkel sikerült kombinációs és teljes scFv fágkönyvtárakat is előállítani. A fágkönyvtárak tumorsejtmembránhoz való kitapasztásos dústását (panning) követően fág- és szolubilis scFv ELISA-val tudtunk tumorkötő antitestfragmenseket



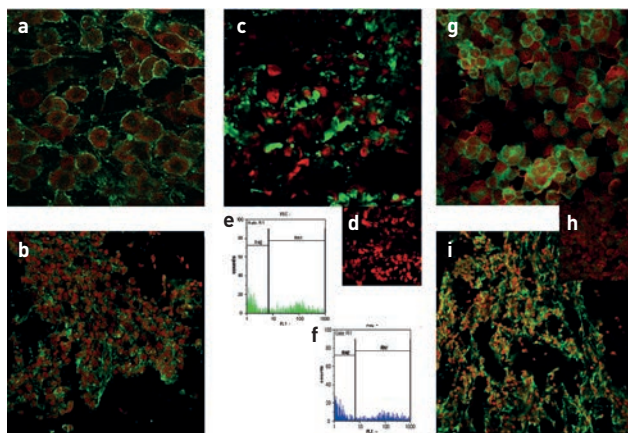
3. ÁBRA. TIL-B ScFv konstrukció: TIL-B-eredetű amplifikált immunoglobulin variábilis nehéz- és könnyűlánc génrégiók medullaris emlőcarcinomákból (VH/MBC, Vκ/MBC) és invazív ductalis emlőcarcinomákból (VH/IDC, Vκ/IDC) (a), valamint melanomákból (b). Három egymást követő PCR-rel konstruált, klónozott, majd szelektált ScFv ellenanyag-fragmensek (c); reprezentatív klónok analitikai gélelektroforézissel detektált képe. d) Tumorkötő antitestfragmensek szelektálása szolubilis scFv fág-ELISA módszerrel natív tumorsejtmembrán-preparátumokhoz való kötődés tesztelésével. Az ScFv fágkönyvtárakból 96 lyukú mikrotiter tálcán növesztett bakteriális klónok felülűszőit IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) indukciót követően teszteltük. Szolubilis ScFv ellenanyag-fragmensek kötődését háromlépcsős ELISA rendszerben (anti-C-myc vagy anti-ETag monoklonális ellenanyag és alkalikus foszfatázzal jelölt anti-egér IgG, valamint paranitrofenil-foszfat szubsztrát használatával)

kinyerni (3.d ábra). Beállítottuk ehhez a műtétből származó tumorszövetmintákból előállított primer sejtenyészetek és sejtmembrán-preparátumok technológiáját.

Az összehasonlító DNS-szekvencia-elemzés főbb elemeit a csírvonal-szekvenciáktól való eltérés mértékének meghatározása, az átrendezett immunoglobulin variábilis génrégiókról kapott jellegzetes információk gyűjtése, valamint az általunk már korábban meghatározott kulcsszekvenciákhoz

való homológiafok definiálása képezte. A preparatív munkák eredményei lehetővé teszik a kérdéses antitestfragmensek fágmegjelenítéses könyvtár formájában való hatékony tesztelését tumorkötő képesség szempontjából. A BioEdit, Clustal X, majd a Vector NTI 11/Advanced, valamint a BLAST és IMGT programokkal és felhasználható adatbázisokkal kivitelezett összehasonlító antitestrepertoár-elemzéssel megerősítettük a korábban definiált immunoglobulin variábilis génrégiók gyakoriságát, valamint lényegesen bővült a TIL-B antitest-repertoárra vonatkozó információink, ami egy másik közlemény tárgyát képezi majd. Az összehasonlító DNS-analízis az eredeti, diszialisált glikosztingolipideket felismerő antitestfragmens nehéz- és könnyűláncrészt kódoló DNS-szakaszokat megerősítette. A halmazott előfordulású immunoglobulin nehéz- és könnyűlánc variábilis génrégiók és ezek VH3/1 és Vκ4.1 alcsoportjainak tagjai komplex DNS-szekvencia-elemzések és antigénkötés-tesztelések alá estek. A korábbi TIL-B fág-ELISA rendszerben kiválasztott tumorsejtkötő antitestfragmenseket sikerült más expressziós rendszerekbe, így pl. anti-ETag alkalmazású kimutatáshoz (ún. „detection module”) átklónoznunk. Egyes klónok egyedi, GD3 gangliozidot kötő képességét már dotblot és ELISA-gátlásos módszerekkel kimutattuk (9), most újabb sejtes és szövettani rendszerekben teszteltük tovább a specifikus kötési tulajdonságokat. A fág-ELISA rendszerben kiválasztott specifikus antitestfragmenseinkkel (melyek jelölése: ScFv G2 és ScFv B2) többféle immunhisztokémiai rendszerben (így szövetkamramódszerrel, citospin mintán és áramlási citométerrel) vizsgáltuk a tumorsejteken kimutatható, erősen tumorasszociált diszialisált glikosztingolipideket (4. ábra). A TIL-B eredetű scFv antitestfragmensek pozitív reakciót mutattak invazív ductalis emlőcarcinoma primer sejtvonalalaival, valamint több emlőtumor-sejtvonallal (MDA-MD 231, ZR 751). Hasonlóképpen a különböző melanomákból indított sejtvonalainkkal és a hagyományos sejtvonalakkal (SK-Mel28, A2058) is erősen reagáltak az antitestmintáink. A GD3 gangliozidok erős expresszióját tudtuk kimutatni a vizsgált melanomaszövet-minták legnagyobb részén. Ezen eredmények, valamint az összehasonlító szekvenciaanalízis és TIL-B fágmegjelenítéses módszer alkalmazása különböző glikosztingolipid-kötő antitestek meghatározását teszik lehetővé.

Az EZCAR Platform technológia alkalmazásával lehetett az összetett DNS-szekvenciaanalízissel meghatározott GD3R CD28 CD3ξCAR génszakaszt a Sleeping Beauty transzpozon vektorba építeni. A transzformált kompetens E. coli baktériumok pozitivitását a plazmid-minipreparátumok megfelelő helyeken hasító restrikciós enzimes emésztésével tudtuk meghatározni (5. ábra). A génkonstrukcióba bevitt ETag és a pozitív kontroll (EZ CD19Ig IgG4 CD28 CD27) Fc-kötő helye szolgált az immunfluoreszcens teszt első szintű detektor molekuláiként. Négy kiméra antigénreceptor konstrukciót hoztunk létre egyedi GD3 gangliozid specificitással. Ezek közül kettő lerövidített formájú scFv (truncated) volt, és kettő



4. ÁBRA. Antitestfragmensek tumorkötő kapacitásának tesztelése immunfluoreszcens módszerrel, konfokális mikroszkópos, valamint áramlási citometriás detektálással. a) SK-mel 28 melanomasejtek TIL-B scFv G antitestfragmenssel jelölve (szövetkamramódszer); b) A2058 melanomasejtek TIL-B scFv G antitestfragmenssel jelölve (szövetkamramódszer); c) melanomaszövet metszete GD3-specifikus antitesttel jelölve; d) negatív kontroll; e, f) SK-mel 28 melanomasejtek TIL-B scFv antitestfragmensekkel jelölve (áramlási citometriás detektálás); g) Primer invazív ductalis emlőcarcinoma-sejtek (TU1) TIL-B scFv G antitestfragmenssel jelölve (citospin); h) negatív kontrollminta (citospin); i) invazív ductalis emlőcarcinoma-sejtek TIL-B scFv G antitestfragmenssel jelölve (szövetkamra). FITC anti-egér IgG (Fab')₂ detektáló antitest alkalmazása

egy jelölő ETag kötőhellyel is rendelkezett. Az előállított CAR vektor génkonstrukciókkal (1. GD3 scFv IgG4Fc CD28 CD3 ξ , 2. GD3 trunc scFv IgG4Fc CD28 CD3 ξ 3. GD3 scFv Etag IgG4Fc CD28 CD3 ξ 4. GD3 trunc Etag scFv IgG4Fc CD28 CD3 ξ) és pozitív kontroll CAR-molekulákkal HEK293 sejteket lipofektinnel vagy elektroporációval transzfektáltunk. A CAR (4) HEK 293 transzfektáns sejteket immunfluoreszcenciával, áramlási citometriás vizsgálattal ellenőrizve a receptormolekula sejtmembránon való elhelyezkedése meghatározható volt: 15% pozitivitást kaptunk az anti-ETag antitesttel. A következő fázisban a CAR vektor génkonstrukcióval transzformált kompetens *E. coli* baktériumokat felnövesztettük, és megfelelő mennyiségben és minőségben (endotoxinmentes) tudtunk maxi plazmidpreparátumot előállítani a limfocitánszektációhoz. A kiválasztott GD3 (4) scFv CAR génkonstrukcióval és a pozitív kontrollt hordozó plazmid-maxipreparátummal a Ficoll-Uromiro sűrűséggradiens-centrifugálással szeparált humán perifériás vér mononukleáris sejteket elektrosokkal transzfektáltuk. A GD3scFv CAR génkonstrukciót hordozó limfociták viabilitását és osztódását automata sejtszámlálóval detektáltuk az indirekt immunfluoreszcens áramlási citometriával való teszteléséig. Az így kapott, kb. 8%-nak megfelelő PBMC-transzfektánsokat még egy-két hétre kultúrában tudtuk tartani, hogy a fagyasztva tároláshoz megfelelő mennyiségben legyenek a projekt további fázisaihoz. A protokoll szerint a transzfektált limfociták életképességét és osztódását az előzetesen besugárzott stimulátorsejtek (K562 sejtvonal)

és citokinkoktól hozzáadását követően lehet újból értékelni és tovább tesztelni citotoxikus reakciókban. A K562 sejtek stimulátorként („antigen-boost”) való alkalmazhatóságához előzetesen a GD3 gangliozidra specifikus antitestekkel való pozitivitást sikerült meghatározni, immunfluoreszcens áramlási citometriás vizsgálattal.

MEGBESZÉLÉS

Az eredeti hipotézisünk alapján kidolgozott TIL-B fágmegjelenítési technológia az új immunglobulin repertoár analízissel együtt megfelelően bizonyult tumorasszociált sejtfelszíni struktúrákat felismerő humán antitestfragmensek kinyerésére. Kiindulási eredményeink szerint a medullaris emlőcarcinomában felhalmozódó immun B-sejtek vizsgálata jó választásnak bizonyult a TIL-B-sejtek tárolta genetikai információk kinyeréséhez. Ez a sokat vitatott, igen ritka, magas malignitási fokú, de viszonylag jó prognózist mutató emlőtumortípus (25) tumorimmunológiai szempontból is igen érdekes. Jellegzetessége, hogy magas százalékban tartalmaz B-limfocitákat és plazmasejteket. Nem véletlen tehát, hogy a megfelelő módon feltett kérdés, a kellően összetett molekuláris genetikai és biotechnológiai módszereink révén, olyan hasznos genetikai információkkal szolgált, mint pl. az erősen tumorasszociált, szialilált glikoszfinolipid típusú antigének felismerésére képes immunglobulin variábilis génrégiók nukleinsavsorrendje. Az emlőrák- és melanomaeredetű tumorinfiltráló B-sejtek ellenanyag-repertoárjának DNS-szintű elemzése nemzetközileg is új információval szolgált az e tumorokból potenciálisan kinyerhető tumorspecifikus kötőképességű molekulákra vonatkozólag. Az eredményül kapott, a tumorsejtek GD3-expressziójára vonatkozó adataink, valamint az összehasonlító szekvenenciaanalízis és TIL-B fágmegjelenítési módszer alkalmazása lehetővé teszik különböző glikoszfinolipidkötő antitestek meghatározását. A műtétből származó tumorszövetmintákból primer sejtenyészeteket állítottunk elő, valamint olyan sejtmembrán-preparátumokat is gyártottunk, amelyek jól megőrzött membránstruktúráik révén hozzájárulnak a sikeres „antitesthalászathoz” és alkalmazhatóak az immunfluoreszcenciával történő visszatesztelésben is. Mindezek alapján kidolgoztuk melanomás betegek tumorimmunológiai immunglobulinprofil-vizsgálatát (26).

Az anti-GD3 gangliozid specifitású scFv immunglobulinfragmens génrégiókat új hordozó vektormolekulákba beépítve, majd alkalmas expressziós rendszerek bakteriális transzformációja révén, sikerült megfelelő mennyiségben és minőségben előállítanunk az antitesteket a szélesebb körű tumorteszteléshez. A TIL-B-sejt eredetű fágmegjelenítési technológiából kiválasztott klónok diszialisált glikoszfinolipid kötő kapacitására kapott eredmények újak és fontosak. A tumorszöveteken reprezentált különböző struktúrák közül a komplex szerkezetű és összetételű glikoproteinek és glikolipidek megismerése a tumordiagnosztikai lehetőségek bővülését eredményezheti, így igen fontos. A szialilált és egyéb glikolipidek összetett családjának feltárása nagy kihívás, amelyhez

erőfeszítést kell tenni. Mindazonáltal a kezdeti, monoklonális antitestek felhasználásával előállított CAR T-sejtekre vonatkozó tapasztalatok és első klinikai próbálkozások nem zárják ki a várható jobb eredményeket e téren [30]. Az itt vázolt megközelítés mindenképpen új utat nyitott diagnosztikailag és terápiásan felhasználható, erősen tumorasszociált antigének feltárására mind a neuroektodermális eredetű, mind az epiteliális tumorok esetében. A fontosságot alátámasztja, hogy e diszialisált glikoszfinbolipidek a szolid tumorok szinte minden fajtáján képviseltetik magukat. Az eredeti hipotézisen alapuló eljárásunk révén az eddig nyert és még a továbbiakban kianalizálható genetikai információk a célzott rákterápiás, illetve immunsejtek génmódosításával megvalósuló tumorelles stratégia esszenciális építőelemei. A TIL-B-sejtek révén így erősen tumorasszociált struktúrák felismerése válik lehetővé. Ez a stratégia olyan membránstruktúrákkal jelentős kötődésre képes antitestkonjugátumok, valamint tumorasszociált antigénre specifikus, kiméra antigénreceptorral felvértezett immun T-sejtek létrehozását segíti, amelyek nem esnek az MHC-korlátozás alá. Ezen felül, a TIL-B-sejtek, közvetlenül a tumor mikro-

környezetéből való eredetük révén, az itt vázolt eredeti hipotézisen alapuló stratégiával reprezentálhatóan, jól ismerik a környező tumorsejtek „változó köpenyét”, a sejtmembránon megjelenő egyedi tumorasszociált molekulákat. Ezek alapján feltehetően még további, újabb antitestfragmensek is nyerhetők a TIL-B-alapú fágkőnyvtárakból. Így a tumorelles antitestrepertoár sokkal szélesebb spektrumát tudjuk majd további CAR-T-sejtek generálásához felhasználni, mintha azt csak az eddig meglévő antitestekből klónoztuk volna ki. Igen fontos továbbá, hogy a tumorasszociált antitestfragmens-preparátumok humán eredetűek, ami a terápiás fejlesztések esetében kiemelkedő jelentőségű.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúttal köszönöm a témához kapott OTKA T030380, Fulbright No 1206103, Harry J. Lloyd Charitable Trust Melanoma Research Award, Fulbright No1214104 grantokat. Köszönet illeti az OOI Tumorbiológiai Laboratóriumának munkatársait, valamint a munka késői szakaszát illetően nagyon köszönöm Dr. A Korngold, Dr. TJ Laskowski, Dr. B Jena, Dr. N Belousova és Prof. Dr. L.J.N Cooper (MDACC) segítségét.

IRODALOM

1. Fox BA, Schendel DJ, Butterfield LH, et al. Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy. *J Transl Med* 9:214–221, 2011
2. Hunder NN, Wallen H, Cao J, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med* 358:2698–2703, 2008
3. Vennepureddy A, Thumallapally N, Motial Nehru V, et al. Novel drugs and combination therapies for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Med Res* 8:63–75, 2015
4. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126–129, 2006
5. Beckler ML, Near R, Mudgett-Hunter M, et al. Expression of hybrid-immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice. *Cell* 58:911–921, 1989
6. Oren R, Hod-Marco M, Haus-Cohen M, et al. Functional comparison of engineered T cells carrying a native TCR versus TCR-like antibody-based chimeric antigen receptors indicates affinity/avidity thresholds. *J Immunol* 193:5733–5743, 2014
7. Giraldo NA, Becht E, Remark R, et al. The immune contexture of primary and metastatic human tumours. *Curr Opin Immunol* 27:8–15, 2014
8. Kotlan B, Gruel N, Zafrani B, et al. Immunoglobulin variable regions usage by B-lymphocytes infiltrating a human breast medullary carcinoma. *Immunol Lett* 65:143–151, 1999
9. Kotlan B, Simsa P, Gruel N, et al. A scFv phage display mini library generated from the immunoglobulin repertoire of breast medullary carcinoma infiltrating B lymphocytes. *Dis Markers* 16:25–27, 2000
10. Punt CJA, Barbuta JAM, Zhang H, et al. Anti tumor antibody produced by human tumor infiltrating and peripheral blood B lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 35:225–232, 1994
11. Kotlan B, Simsa P, Teillaud JL, et al. Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: the proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes. *J Immunol* 175:2278–2285, 2005
12. Kotlan B, Toth J, McKnight M, Glassy MC. Characteristics of tumor gangliosides revealed by B cells infiltrating human breast carcinomas. *Hum Antibodies* 15:9–13, 2006
13. Kotlan B, Simsa P, Foldi J, et al. Immunoglobulin repertoire of B lymphocytes infiltrating breast medullary carcinoma. *Hum Antibodies* 12:113–121, 2003
14. Simsa P, Teillaud JL, Sott DI, Kotlan B. Tumor infiltrating B cell immunoglobulin variable region gene usage in invasive ductal breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 11:92–97, 2005
15. Pavoni E, Monteriù G, Santapaola D, et al. Tumor infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells. *BMC Biotechnol* 7:70–87, 2007
16. Nielsen JS, Nelson BH. Tumor-infiltrating B cells and T cells working together to promote patient survival. *Oncoimmunology* 1:1323–1325, 2012
17. Nzula S, Going JJ, Stott DI. Antigen driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 63:3275–3280, 2003
18. Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 28:490–500, 2015
19. Ravindranath MH, Gonzales AM, Nishimoto K, et al. Immunology of gangliosides. *Int J Exp Biol* 38:301–312, 2000
20. Ravindranath MH, Yesowitch P, Sumobay C, et al. Glycoimmunomics of human cancer: current concepts and future perspectives. *Future Oncol* 3:201–214, 2007
21. Krengel U, Bousquet AP. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front Immunol* 5:325, 2014
22. Hakomori S. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* 491:369–402, 2001
23. Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 87:851–857, 2007
24. Kotlan B, Glassy M. Antibody phage display: overview of a powerful technology that has quickly translated to the clinic. *Methods Mol Biol* 562:1–15, 2009
25. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* 9:1–15, 2007
26. Kotlan B, Liskay G, Blank M, et al. The novel panel assay to define tumor-associated antigen-binding antibodies in patients with metastatic melanomas may have diagnostic value. *Immunol Res* 61:11–23, 2015
27. Izsvák Z, Ivics Z. Sleeping Beauty transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol Ther* 9:147–156, 2004
28. Hackett PB, Largaespada DA, Cooper JN. A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* 18:674–683, 2010
29. Jena B, Dotti G, Cooper L.J.N. Redirecting T cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood* 116:1035–1044, 2010
30. Junghans RP. Strategy escalation: An emerging platform for safe clinical development of T cell gene therapies. *J Transl Med* 8:1–8, 2010