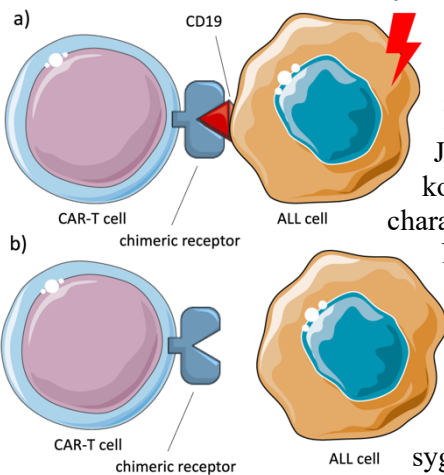


Mechanizmy i skutki utraty ekspresji błonowej CD19 we wznowie B-komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej po leczeniu CD19-CAR-T: identyfikacja nowych celów terapeutycznych

Ostra białaczka limfoblastyczna z komórek B (ang. B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia – B-ALL) jest poważną i potencjalnie śmiertelną chorobą, spowodowaną przez patologiczną, niekontrolowaną proliferację limfocytów B. W jej końcowym stadium następuje degradacja szpiku kostnego, prowadząca do pancytopenii – niedoboru czerwonych i białych krwinek, a także płytek krwi. Podstawą leczenia jest chemioterapia i przeszczep komórek macierzystych. Całkowita remisja choroby następuje szacunkowo w 80% przypadków. Niestety, około 60% pacjentów nie reaguje na terapię albo doświadcza nawrotu choroby, co znacznie pogarsza ich rokowanie. W ostatnich latach opracowano nową metodę leczenia – limfocyty T z chimerycznym receptorem antygenowym (ang. Chimeric Antigen Receptor T-cells - CAR-Ts). Wykorzystuje ona limfocyty T, odpowiedzialne za zabijanie obcych, najczęściej patologicznych, komórek. Ich działanie jest modulowane przez receptor komórek T (ang. T-cell receptor - TCR), wykrywający specyficzne białka powierzchniowe na potencjalnych celach. Technologia CAR-T modyfikuje TCR w sposób umożliwiający wykrywanie antygenów na powierzchni komórek nowotworowych. Co istotne, cel dla komórek CAR-T musi być obecny wyłącznie na patologicznych komórkach – w przeciwnym razie terapia uszkodzi zdrowe tkanki i spowoduje poważne skutki uboczne. Komórki B-ALL prezentują odpowiedni cel – białko CD19, obecne niemal wyłącznie w limfocytach B. Dzięki temu terapia CAR-T odniosła znaczny sukces w leczeniu B-ALL, powodując całkowitą remisję u 70%-90% pacjentów, którzy już wyczerпали standardowe środki terapeutyczne. Niestety, pomimo początkowego sukcesu, 30-60% tych pacjentów ostatecznie doświadcza nawrotu choroby. Około połowa tych przypadków jest spowodowana utratą celu dla CAR-T – białka CD19. Najczęściej jest to efekt mutacji w genie *CD19*, ale opisano również inne



mechanizmy, takie jak alternatywne składanie mRNA, prowadzące do produkcji uszkodzonego białka. Dynamika procesu utraty CD19 jest słabo poznana - Czy komórki CD19⁻ są obecne w małej liczbie jeszcze przed leczeniem? Ile mutacji genu *CD19* potrzeba, aby spowodować utratę CD19? Jeśli wystąpienie nawrotu CD19⁻ jest spowodowane obecnością subpopulacji komórek lub zdeterminowane obecnością mutacji *CD19*, to pacjenci z taką charakterystyką odniosą raczej niewielkie korzyści z terapii anti-CD19 CAR-T.

Narzędzie informatyczne służące do wykrywania pacjentów, u których prawdopodobnie dojdzie do nawrotu CD19- byłoby cenną pomocą w klasyfikacji chorych do terapii CAR-T. **Z tego powodu planujemy ocenić moc profilu mutacji CD19 do przewidywania i wykrywania nawrotów CD19- poprzez stworzenie matematycznych klasyfikatorów i ocenę ich dokładności.** Co również ważne, białko CD19 jest ważnym modulatorem sygnałów koniecznych do proliferacji i przeżycia komórek B. Zakładamy, że komórki B bez funkcjonalnego białka CD19, aby przeżyć muszą polegać na alternatywnych szlakach komórkowych. Zaburzenie takich szlaków dodatkowymi lekami powinno zatem prowadzić do ich śmierci. Naszą hipotezę potwierdziliśmy w badaniach wstępnych, analizując publicznie dostępne dane z profilowania transkryptomu próbki szpiku kostnego (w rozdzielczości pojedynczej komórki) od jednego pacjenta z B-ALL przed

Schemat prawidłowego działania CAR-T prowadzącego do śmierci komórki (a) i ucieczki nowotworu poprzez utratę CD19 (b)

podaniem CAR-T i po nastąpieniu nawrotu. Porównując transkryptom komórek CD19⁺ i CD19⁻, wykryliśmy wiele procesów komórkowych podatnych na leczenie, prawdopodobnie podtrzymujących życie komórek CD19⁻. Znaleźliśmy też kilka różnych subpopulacji komórek CD19⁻, co sugeruje heterogenność mechanizmów wykorzystywanych przez komórki nowotworu. **W związku z tym planujemy również zweryfikować i rozszerzyć nasze spostrzeżenia poprzez porównawczą analizę transkryptomu komórek CD19⁺ i CD19⁻ uzyskanych od pacjentów przed terapią CAR-T i po wystąpieniu nawrotu.** Do badania włączymy około 17 pacjentów, pobierając próbki szpiku kostnego przed infuzją CAR-T i po wystąpieniu nawrotu. Dla każdej próbki przeprowadzimy sekwencjonowanie DNA genu *CD19* w celu wykrycia mutacji, sekwencjonowanie RNA w celu oceny odsetka niefunkcyjnych izoform CD19 oraz sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek (po podzieleniu komórek na grupy CD19⁺ i CD19⁻). Korzystając z narzędzi bioinformatycznych, zbudujemy klasyfikatory przewidujące i wykrywające nawrót CD19 w oparciu o profil mutacji i ocenimy ich działanie. Następnie przeprowadzimy analizę porównawczą komórek CD19⁺ i CD19⁻, aby potwierdzić wnioski ze wstępnych badań i wybrać dodatkowe leki, potencjalnie zabijające komórki CD19⁻. Na koniec planujemy przetestować skuteczność wybranych leków w eksperymentach z liniami komórkowymi B-ALL z niefunkcyjnym CD19.