



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Jan Barczyński

Produkcja, oczyszczanie i analiza potencjału
przeciwnowotworowego przeciwciał
bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezoetelina x
PD-L1.

Production, purification and antitumor potency
evaluation of ROR-1 x PD-L1 and Mesothelin x PD-L1
bispecific antibodies.

Praca przedstawiona

Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie Biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Bielawski

Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

GDAŃSK 2024

Gdańsk 2024

Rozprawa doktorska została przygotowana w Recepton Sp. z o.o. pod opieką dr. Tomasza Sitara, w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy, współfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu DWD/4/54/2020).

Chciałbym złożyć serdeczne podziękowania wszystkim, którzy przyczynili się do realizacji tego projektu. Szczególne podziękowania kieruję do:

Dr. Tomasza Sitara

Za rozbudzenie ducha naukowego, wieloletnią opiekę i całą przekazaną wiedzę.

Prof. dr. hab. Krzysztofa P. Bielawskiego

Za opiekę nad projektem.

Dr. Przemysława Bielskiego i Michała Mikitiuka

Za wszelką pomoc naukową i duchową.

Kamila Rykały

Za pomoc i chęć do nauki.

Dr Andrei D. Lipińskiej i Dr Amandine Hauer

Za pomoc w realizacji i zrozumieniu eksperymentów z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

Ewy Wiwatowskiej i Roberta Barczyńskiego

Za całe okazane wsparcie i wyrozumiałość.

1. SPIS TREŚCI

1.	Spis treści	4
2.	Streszczenie.....	7
3.	Abstract.....	8
4.	Wykaz skrótów	9
5.	Wstęp.....	12
5.1.	Immunoterapia nowotworów	12
5.1.1.	Podstawy immunoterapii.....	12
5.1.2.	Formy immunoterapii	14
5.2.	Przeciwciała monoklonalne	18
5.2.1.	Struktura przeciwciał	18
5.2.2.	Produkcja przeciwciał monoklonalnych.....	20
5.2.3.	Przeciwciała monoklonalne w terapii nowotworów.....	21
5.3.	Przeciwciała bispecyficzne.....	22
5.3.1.	Koncepcja i zalety przeciwciał bispecyficznych.....	22
5.3.2.	Formaty przeciwciał bispecyficznych	22
5.3.3.	Przeciwciała bispecyficzne w terapii nowotworów	25
5.4.	Cele molekularne: ROR-1, Mezetelina i PD-L1	27
5.4.1.	ROR-1	27
5.4.2.	Mezetelina	28
5.4.3.	PD-L1.....	31
6.	Cel pracy	34
7.	Materiały i metody	35
7.1.	Materiały	35
7.1.1.	Materiały zużywalne i odczynniki	35
7.1.2.	Aparatura	46
7.2.	Metody	48
7.2.1.	Projektowanie konstruktywów genetycznych	48
7.2.2.	Hodowla bakteryjna i przygotowanie komórek kompetentnych.....	51
7.2.3.	Transformacja	52

7.2.4.	Oczyszczanie DNA	52
7.2.5.	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	53
7.2.6.	Elektroforeza w żelu agarozowym	53
7.2.7.	Ligacja	53
7.2.8.	Reakcja PCR.....	54
7.2.9.	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (SDS-Page).....	55
7.2.10.	Określanie stężenia białek posiadających fragment Fc wykorzystaniem ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej	56
7.2.11.	Analityczna chromatografia wykluczania.....	56
7.2.12.	Hodowle komórkowe.....	57
7.2.13.	Produkcja białek w ssących komórkach zawiesinowych	60
7.2.14.	Oczyszczanie białek.....	62
7.2.15.	ELISA	63
7.2.16.	Analiza blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1	63
7.2.17.	Analiza poziomu ekspresji receptorów na powierzchni komórek nowotworowych	64
7.2.18.	Izolacja ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej.....	65
7.2.19.	Test cytotoksyczności w ko-kulturze komórek nowotworowych z komórkami jednojądrzastymi krwi obwodowej	65
7.2.20.	Analiza poziomu cytokin w ko-kulturze komórki nowotworowe/komórki PBMC	66
7.2.21.	Określenie zmian w populacji regulatorowych limfocytów T w ko-kulturze komórek nowotworowych i komórek PBMC w obecności badanych przeciwciał.....	67
7.2.22.	Analiza danych.....	68
8.	Wyniki	69
8.1.	Produkcja białek i przeciwciał referencyjnych	69
8.2.	Produkcja przeciwciał bispecyficznych	75
8.3.	Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne wiążą swoje cele molekularne z podobną skutecznością co przeciwciała monospecyficzne.....	82
8.4.	Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne skutecznie blokują ścieżkę sygnalizacyjną PD-1/PD-L1.....	85
8.5.	Testowane nowotworowe linie komórkowe mają różny poziom ekspresji celów molekularnych (ROR-1, Mezetelina, PD-L1).....	87

8.6.	Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne istotnie zwiększają liczbę komórek nowotworowych w porównaniu do kombinacji przeciwciał monospecyficznych.	89
8.7.	Skuteczność przeciwciał bispecyficznych zależy od zastosowanego stężenia.	91
8.8.	Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne prowadzą do wzrostu produkcji cytokin prozapalnych w komórkach PBMC.	92
8.9.	Badane przeciwciała bispecyficzne wpływają na zmiany w subpopulacjach limfocytów T CD4+.	96
8.9.1.	Zastosowanie przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1 prowadzi do zmniejszenia populacji limfocytów T regulatorowych.....	96
8.9.2.	Przeciwciała Mezetelina x PD-L1 zwiększają subpopulację limfocytów CD4+CD25-CD127-	99
9.	Dyskusja	101
10.	Wnioski	111
11.	Bibliografia	112
12.	Spis rycin	134
13.	Spis tabel.....	137

2. STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe są jedną z wiodących przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Od wielu lat jedną z najbardziej obiecujących form walki z nowotworami jest immunoterapia. Niestety, pomimo jej niezwykle dynamicznego rozwoju wciąż istnieje duża grupa nowotworów które są odporne na ten rodzaj terapii. ROR-1 i Mezetelina są białkami, których obecność w zdrowych tkankach dorosłych ludzi jest bardzo niewielka, natomiast podlegają wysokiej nadekspresji w wielu różnych typach nowotworów gdzie są zaangażowane między innymi w proliferację i przeżywalność. Ponadto w dużej liczbie przypadków ich obecność na powierzchni komórek nowotworowych została skorelowana z gorszymi prognozami dla pacjentów. PD-L1 z kolei jest jednym z najlepiej opisanych punktów kontroli układu odpornościowego. Receptor ten został zidentyfikowany jako źródło ucieczki przed kontrolą układu immunologicznego dla wielu rodzajów nowotworów. Celem projektu była produkcja i analiza potencjału przeciwnowotworowego zestawu symetrycznych przeciwciał bispecyficznych : ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1 w formatach IgG1 i IgG4. Przeciwciała uzyskano z dwóch systemów ekspresji w komórkach ssaczych: produkcji przejściowej w komórkach HEK293 i stabilnych linii komórkowych CHO. Otrzymane przeciwciała bispecyficzne posiadały zgodne z oczekiwanymi parametry fizyko-chemiczne i wykazywały zdolność wiązania celów molekularnych oraz blokady interakcji PD-1/PD-L1 ze zblizoną siłą jak referencyjne przeciwciała monospecyficzne. Dodanie badanych przeciwciał do ko-kultury komórek PBMC z komórkami nowotworowymi (linii Panc1, Panc 05.04, BT20 i RL95-2) prowadziło do istotnie zwiększonej lizy komórek nowotworowych względem analogicznych kombinacji przeciwciał monospecyficznych, a poziom tej lizy zależny był od stężenia przeciwciał. Ponadto w ko-kulturach z komórkami Panc1 i RL95-2 zaobserwowano znacząco podniesiony poziom cytokin (IL-10, TNF α , IFN γ , Granzym B) oraz zmniejszenie wielkości subpopulacji limfocytów T regulatorowych (CD4+ CD25+ CD127low FoxP3hi oraz CD4- FoxP3+). Przeciwciała Mezetelina x PD-L1 promowały skuteczniejszą odpowiedź przeciwnowotworową niż przeciwciała ROR-1 x PD-L1. Przeciwciała klasy IgG1 wykazywały nieznacznie wyższą aktywność od przeciwciał klasy IgG4. Podsumowując, zastosowanie przeciwciał bispecyficznych do jednoczesnej blokady receptorów ROR-1 i PD-L1 lub Mezeteliny i PD-L1 jest nowatorskim i obiecującym podejściem do terapii nowotworów. Niewątpliwie jednak, koniecznym jest potwierdzenie ich skuteczności w bardziej skomplikowanych modelach, w szczególności *in vivo*.

3. ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death in developed countries. For many years, one of the most promising forms of cancer treatment has been immunotherapy. Unfortunately, despite its highly dynamic development, there remains a significant group of cancers that are resistant to this type of therapy. ROR-1 and Mesothelin are proteins that have minimal presence in healthy adult tissues but are highly overexpressed in many different types of cancers, where they are involved in processes such as proliferation and survival. Moreover, their presence on the surface of cancer cells has been correlated with poorer patient prognoses in many cases. PD-L1, in turn, is one of the best-characterized immune checkpoint regulators, identified as a source of immune evasion for many types of cancer. The goal of this project was the production and analysis of the anti-cancer potential of a set of symmetric bispecific antibodies: ROR-1 x PD-L1 and Mesothelin x PD-L1 in IgG1 and IgG4 formats. The antibodies were produced using two mammalian expression systems: transient production in HEK293 cells and stable cell lines in CHO cells. The obtained bispecific antibodies exhibited the expected physicochemical properties and demonstrated the ability to bind molecular targets and block PD-1/PD-L1 interactions with similar efficacy to reference monospecific antibodies. Adding the studied antibodies to co-cultures of PBMCs and cancer cells (lines Panc1, Panc 05.04, BT20, and RL95-2) led to significantly increased cancer cell lysis compared to similar combinations of monospecific antibodies, with the level of lysis depending on the antibody concentration. Additionally, in co-cultures with Panc1 and RL95-2 cells, a significantly elevated level of cytokines (IL-10, TNF α , IFN γ , Granzyme B) and a reduction in regulatory T-cell subpopulations (CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} FoxP3^{hi} and CD4⁺ FoxP3⁺) were observed. The Mesothelin x PD-L1 antibodies promoted a more effective anti-cancer response than the ROR-1 x PD-L1 antibodies, and IgG1 antibodies exhibited slightly higher activity than IgG4 antibodies. In summary, the use of bispecific antibodies for the simultaneous blockade of ROR-1 and PD-L1 or Mesothelin and PD-L1 receptors is an innovative and promising approach to cancer therapy. However, confirming their effectiveness in more complex models, particularly in vivo, remains essential.

4. WYKAZ SKRÓTÓW

ADCC – Antibody dependent cellular cytotoxicity
ADCP – Antibody ependent cellular phagocytosis
ALL - Acute lymphoblastic leukemia
APC - Antigen Presenting Cell
APS - Ammonium Persulfate
ATCC - American Type Culture Collection
BCA - Bicinchoninic Acid
BSA - Bovine Serum Albumin
CAR-T - Chimeric Antigen Receptor T cell
CDC – Component dependent cytotoxicity
CDS - Chromatographic Data System
CHO - Chinese Hamster Ovary
CRS – Cytokine Release Syndrome
DC – Dendritic cells
DLBCL - Diffuse large B cell lymphoma
DMSO – Dimethyl Sulfoxide
DNA - Deoxyribonucleic Acid
EC50 - Half maximal effective concentration
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGFR – Epidermal growth factor receptor
EMA - European Medicines Agency
EMT - Epithelial-Mesenchymal Transition
EPC - Endothelial Progenitor Cells
Fab - Fragment antigen binding
Fc - Fragment crystallizable
FDA - Food and Drug Administration
GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HC - Heavy Chain
HEK - Human Embryo Kidney
HRP - Horseradish Peroxidase
HVEM - Herpesvirus entry mediator
IC50 - Half maximal inhibitory concentration

IFN γ – Interferon gamma
IL-2 - Interleukina 2
IL-6 – Interleukina 6
IL-10 – Interleukina 10
IMAC - Immobilized Metal Affinity Chromatography
irAEs - Immune-Related Adverse Events
KiH - Knob Into Hole
LB - Lysogeny Broth
LC - Light Chain
MHC - Major Histocompatibility Complex
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B - Nuclear Kactor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK - Natural Killer
OD600 - Optical Density at 600 nanometers
PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS - Phosphate Buffered Saline
PBST - Phosphate Buffered Saline Tween
PCR - Polymerase Chain Reaction
PD-1 - Programmed cell death protein 1
PD-L1 - Programmed death-ligand 1
PE - Phycoerythrin
PEI - Polyethylenimine
PES - Polyethersulfone
PVDF - Polyvinylidene Fluoride
RCF - Relative Centrifugal Force
ROR-1 – Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1
RPM - Revolutions Per Minute
RT - Room Temperature
scFv - single chain variable fragment
SD - Standard Deviation
SDS - Sodium Dodecyl Sulfate
SEC - Size Exclusion Chromatography
TAA - Tumor Associated Antigens
TAE - Bufor TRIS Acetic Acid EDTA

TAM - Tumor-Associated Macrophages

TE - Buffer TRIS EDTA

TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

Th - Helper T-cell (CD4+)

TIL - Tumor Infiltrating Lymphocyte

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF α - Tumor necrosis factor alfa

Treg - regulatory T cells

TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethane

U - unit

UPLC - Ultra (High) Performance Liquid Chromatography

v/v - volume per volume

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

w/v - weight per volume

5. WSTĘP

5.1. Immunoterapia nowotworów

5.1.1. Podstawy immunoterapii

Immunoterapia jest przełomowym podejściem w leczeniu chorób nowotworowych wykorzystującym własny układ odpornościowy organizmu do identyfikacji i zwalczania komórek nowotworowych. Strategia ta opiera się na koncepcji, że układ odpornościowy, gdy jest odpowiednio stymulowany lub przeprogramowany, może przewyciężyć mechanizmy pozwalające nowotworom unikać nadzoru immunologicznego (D. S. Chen & Mellman, 2013). Skomplikowana sieć komórek i sygnałów układu odpornościowego jest naturalnie zaprojektowana do ochrony organizmu przed infekcjami i nowotworami, ale komórki nowotworowe mogą rozwijać zaawansowane metody ukrywania się przed odpowiedzią immunologiczną lub jej tłumienia (Hanahan & Weinberg, 2011). Procesy te obejmują ekspresję punktów kontroli układu odpornościowego, które hamują aktywację immunologiczną, wydzielanie czynników immunosupresyjnych oraz zmiany w prezentacji antygenów, co przyczynia się do niezdolności układu odpornościowego do skutecznego celowania i niszczenia komórek nowotworowych (Dutta et al., 2023).

Immunoterapia ma na celu przeciwdziałanie tym strategiom poprzez wzmacnianie odpowiedzi immunologicznej przeciwko nowotworom, poprzez zwiększenie ogólnej aktywności układu odpornościowego lub poprzez celowanie w specyficzne elementy, które mogą prowadzić do bardziej skoncentrowanego ataku na komórki nowotworowe (Pardoll, 2012). To podejście opiera się na głębszym zrozumieniu podwójnych ról układu odpornościowego, zarówno jako supresora rozwoju nowotworu, jak i jako potencjalnego promotora progresji nowotworu w określonych kontekstach (Grivennikov et al., 2010). Rozwój i wdrażanie immunoterapii są uzależnione od wyjaśnienia tych złożonych interakcji i identyfikacji celów molekularnych, które można modulować w celu osiągnięcia korzyści terapeutycznych (Ribas & Wolchok, 2018).

Dynamiczny rozwój immunoterapii oznaczał znaczną zmianę paradygmatów leczenia nowotworów, oferując nadzieję na bardziej skuteczne i mniej toksyczne terapie. W przeciwieństwie do tradycyjnych metod, takich jak chemioterapia i radioterapia, które bezpośrednio atakują komórki nowotworowe, ale również uszkadzają zdrowe tkanki, mechanizm działania immunoterapii ma na celu bardziej selektywne działanie, atakując specyficznie komórki nowotworowe przy jednoczesnym oszczędzeniu zdrowych komórek (Couzin-Frankel, 2013). Ta

selektywność jest szczególnie ważna w redukcji efektów ubocznych i poprawie jakości życia pacjentów poddawanych leczeniu (Fragkiadakis & Spiliotopoulou, 2022).

Ponadto, potencjał długotrwałej pamięci immunologicznej, podobnej do tej, która jest nabywana dzięki szczepionkom, sugeruje, że immunoterapia może zapewnić trwałe odpowiedzi i długoterminową kontrolę nad nowotworem, zmniejszając prawdopodobieństwo nawrotu (Waldman et al., 2020). Koncepcja ta jest poparta obserwacjami klinicznymi, gdzie pacjenci doświadczyli przedłużonych remisji po immunoterapii, nawet po zaprzestaniu leczenia (H. Kim et al., 2022).

Jednym z centralnych punktów w koncepcji immunoterapii są punkty kontroli układu immunologicznego. Są to receptory zaangażowane w złożoną sieć szlaków regulacyjnych, które utrzymują równowagę między aktywacją a tolerancją immunologiczną, zapewniając, że odpowiedź immunologiczna jest wystarczająco silna, aby zwalczać infekcje i nowotwory, nie powodując uszkodzeń zdrowych tkanek (Guo et al., 2023). Centralnymi punktami kontroli układu immunologicznego są CTLA-4 (ang. *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*) i PD-1 (ang. *Programmed cell Death protein 1*) (Topalian et al., 2015). Oba te receptory mają za zadanie ograniczać odpowiedź immunologiczną przez hamowanie aktywacji limfocytów T. CTLA-4 konkuruje z CD28 (receptorem stymulującym aktywację limfocytów) o wiązanie białek CD80 i CD86, by następnie poprzez szlak sygnalizacyjny w który zaangażowana jest kinaza PI3K promować anergię limfocytów T, apoptozę i spadek produkcji IL-2 (Rudd et al., 2009). Natomiast PD-1 wiąże dwa ligandy – PD-L1 i PD-L2, a następnie poprzez zaburzenie kaskady sygnalizacyjnej receptora TCR (na drodze defosforylacji) – również wywołuje efekty hamujące aktywację limfocytów T (Parvez et al., 2023). W regulację układu immunologicznego zaangażowane są również inne punkty kontrolne, dla przykładu OX-40, CD40, VISTA i LAG-3. OX40 i CD40 mają działanie stymulujące układ immunologiczny, podczas gdy VISTA i LAG-3 negatywnie go regulują (Mahoney et al., 2015). Wyjątkowo interesującym przypadkiem jest receptor HVEM (ang. *Herpesvirus entry mediator*), który może wiązać 3 różne białka – LIGHT, BTLA i CD160. W zależności od związanych białek receptor HVEM może stymulować aktywację limfocytów T (LIGHT) lub ją hamować (CD160, BTLA) (Šedý & Ramezani-Rad, 2019). Receptorów zaliczanych do grupy punktów kontroli układu odpornościowego jest wiele, ich rola w ucieczce spod kontroli układu immunologicznego może być różna w zależności od typu nowotworów, a wykorzystanie ich w immunoterapii może być zależne również od zastosowanej formy terapii.

5.1.2. Formy immunoterapii

Immunoterapia jest koncepcją spójną w swoim celu – nakierowanie silnej odpowiedzi immunologicznej na walkę z nowotworem, jednakże środki wykorzystywane do osiągnięcia tego celu mogą być bardzo zróżnicowane. Spośród nich wyróżnić można: terapie wirusami onkolitycznymi, szczepionki przeciwnowotworowe, terapie cytokinami, terapię CAR-T, przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom specyficznym dla nowotworów i inhibitory punktów kontroli układu odpornościowego (Y. Zhang & Zhang, 2020).

Wirusy onkolityczne (OV) są podejściem w terapii nowotworów, wykorzystującym genetycznie zmodyfikowane lub naturalnie występujące wirusy do selektywnego zakażenia i niszczenia komórek nowotworowych. Wirusy te mogą bezpośrednio powodować lizę komórek nowotworowych oraz stymulować odpowiedź immunologiczną przeciwnowotworową (Hemminki et al., 2020). Znaczącym sukcesem klinicznym było zatwierdzenie przez FDA talimogenu laherparepweku (T-VEC), onkolitycznego wirusa opryszczki do leczenia zaawansowanego czerniaka. Terapia T-VEC wykazała nie tylko skuteczność w zmniejszaniu rozmiaru guza, ale także dawała efekty systemowe, zwiększając ogólne przeżycie u niektórych pacjentów (Fukuhara et al., 2016). Niemniej jednak, kliniczne zastosowanie wirusów onkolitycznych jest obarczone wieloma wyzwaniami. Sukces tego rodzaju terapii często ograniczają złożone interakcje między wirusem a mikrośrodowiskiem guza, a także odpowiedź immunologiczna gospodarza, która może przedwcześnie usunąć wirusa zanim ten osiągnie efekt terapeutyczny (Lawler et al., 2017). Jednakże, ciągle trwające badania i próby kliniczne testują różne strategie zwiększania skuteczności terapii wirus onkolitycznymi, takie jak łączenie ich z inhibitorami punktów kontrolnych i innymi terapiami immunologicznymi (Cook & Chauhan, 2020).

Szczepionki przeciwnowotworowe mają na celu stymulowanie układu odpornościowego do rozpoznawania i eliminowania komórek nowotworowych poprzez intensywną prezentację antygenów specyficznych dla nowotworów (Saxena et al., 2021). Można je podzielić na kilka rodzajów, w tym szczepionki DNA, szczepionki RNA, szczepionki oparte na peptydach, szczepionki z komórek dendrytycznych oraz szczepionki oparte na wektorach wirusowych i bakteryjnych (T. Fan et al., 2023). Mimo obiecującej koncepcji, wyniki badań klinicznych nie zawsze były pozytywne. Dla przykładu, terapeutyczna szczepionka przeciwnowotworowa Sipuleucel-T wykazała pewne sukcesy w leczeniu raka prostaty, jednak wiele innych szczepionek nie osiągnęło zamierzonych celów (Baxevanis & Perez, 2016). Sukces szczepionek przeciwnowotworowych często zależy od ich zdolności do skutecznego prezentowania antygenów i indukowania silnej odpowiedzi limfocytów T. Połączenie szczepionek przeciwnowotworowych z innymi terapiami,

takimi jak inhibitory punktów kontrolnych, wykazało potencjał w zwiększaniu ich skuteczności poprzez przełamanie wywołanej przez guz supresji układu odpornościowego (van der Burg et al., 2016). Wciąż jednakże istnieją wyzwania związane z optymalizacją formulacji szczepionek i identyfikacją najbardziej odpowiednich antygenów – zapewniających wystarczająco silną odpowiedź immunologiczną, przy zachowaniu niskiej immunotoksyczności (Buonaguro & Tagliamonte, 2020).

Terapia cytokinowa wykorzystuje białka modulujące układ odpornościowy (cytokiny) do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej organizmu na nowotwory. Cytokiny, takie jak interleukina-2 (IL-2) i interferon-alfa (IFN- α), są wykorzystywane w leczeniu nowotworów. IL-2 okazała się skuteczna w leczeniu przerzutowego raka nerki i czerniaka (Bulgarelli et al., 2021), a IFN- α w terapii białaczki włochatokomórkowatej (Bohn et al., 2016). Ponadto inne cytokiny takie jak: interleukiny -12, -15 i -21 oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) były testowane w badaniach klinicznych (Waldmann, 2018). Jednakże, kliniczne zastosowanie terapii cytokinowej napotkało znaczące wyzwania z powodu wysokiej toksyczności i ograniczonej skuteczności, przede wszystkim z powodu zdolności do generowania odpowiedzi immunologicznej w tkankach zdrowych, prowadząc do efektów ubocznych i ogólnoustrojowego zapalenia (Rallis et al., 2021). Jedną z odpowiedzi na te problemy jest opracowanie białek fuzyjnych przeciwciało-cytokina (immunocytokiny), które dążą do zwiększenia specyficzności i zmniejszenia toksyczności terapii cytokinowych poprzez skierowanie odpowiedzi immunologicznej w miejsca guza (Neri, 2019). Ostatnie badania podkreślają potencjał łączenia terapii cytokinowej z innymi środkami immunoterapeutycznymi, takimi jak inhibitory punktów kontrolnych układu immunologicznego, aby wzmocnić odpowiedzi przeciwnowotworowe przy minimalizowaniu działań niepożądanych (Bonati & Tang, 2021).

Terapia CAR-T (ang. *Chimeric Antigen Receptor T-cell*) polega na genetycznej modyfikacji limfocytów T pacjenta w celu zwiększonej ekspresji receptorów specyficznych dla antygenów komórek rakowych. Dzięki temu zmodyfikowane limfocyty T mogą precyzyjnie niszczyć komórki nowotworowe. Terapia ta wykazała znaczną skuteczność, szczególnie w przypadku nowotworów hematologicznych, takich jak ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) i chłoniak rozlany z dużych komórek B (DLBCL). Dla przykładu terapia CAR-T celująca w CD19 uzyskała zatwierdzenie przez FDA z powodu istotnie zwiększonej remisji nowotworu (Long et al., 2018). Jednakże terapia CAR-T napotyka również na liczne wyzwania i ograniczenia. Jednym z głównych problemów jest czas utrzymywania się zmodyfikowanych limfocytów T w organizmie pacjenta. Innym istotnym problemem są poważne skutki uboczne, takie jak zespół uwalniania cytokin (CRS) i neurotoksyczność, które mogą nawet zagrażać życiu (Shah & Fry, 2019). Dodatkowo,

mechanizmy oporności, w tym utrata lub modyfikacja antygenów, mogą prowadzić do niepowodzenia leczenia u znacznej liczby pacjentów (Majzner & Mackall, 2018).

Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom nowotworowym mogą zabijać i ograniczać wzrost komórek nowotworowych poprzez różne mechanizmy. Główną ścieżką jest blokada receptorów i ligandów zaangażowanych w proces wzrostu i proliferacji komórek nowotworowych, ale wyróżnić również warto mechanizmy w które zaangażowane są komórki układu immunologicznego – cytotoksyczność zależną od przeciwciał (ADCC), cytotoksyczność zależną od dopełniacza (CDC) czy też fagocytozę zależną od przeciwciał (ADCP) (Zahavi & Weiner, 2020). W wielu przypadkach terapie oparte przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom nowotworowym osiągnęły znaczące sukcesy i stanowią często pierwszą lub drugą linię leczenia. Jako przykłady można wymienić: Rituximab skierowany przeciwko białku CD20 stosowany powszechnie w leczeniu chłoniaków komórek B (Teo et al., 2016), Trastuzumab celujący w białko HER2, używany w terapii HER2-pozytywnych nowotworów piersi (Swain et al., 2023), czy też Cetuximab, którego celem jest receptor epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR) – wykorzystywany w leczeniu płaskonabłonkowego raka głowy i szyi (Kabolizadeh et al., 2012) lub też nowotworu jelita grubego (Xie et al., 2020). Pomimo znaczących sukcesów na wielu polach walki z nowotworami przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko antygenom nowotworowym napotykać wiele przeszkód ograniczających ich skuteczność. Dla przykładu można wymienić problemy z penetracją guzów litych (M. Bordeau & P. Balthasar, 2021) lub też skutki uboczne w obrębie układu immunologicznego: choroba posurowicza, zespół rozpadu guza, a nawet sztorm cytokinowy (Hansel et al., 2010). Wiele obiecujących rezultatów sprawia jednak, że technologia przeciwciał monoklonalnych jest ciągle rozwijana, zarówno na polu podejścia terapeutycznego (terapię kombinowane) jak i zakresu działania, poprzez tworzenie koniugatów przeciwciał z różnymi cząsteczkami (Si et al., 2021).

Punkty kontroli układu immunologicznego są integralną częścią układu odpornościowego, które są wykorzystywane przez komórki nowotworowe do unikania odpowiedzi immunologicznej, pozwalając im na niekontrolowany wzrost. Blokując te białka, inhibitory punktów kontrolnych mogą przywrócić zdolność układu odpornościowego do atakowania komórek nowotworowych, eliminację ich lub zahamowanie wzrostu (Alturki, 2023). Wszystkie dotychczasowe zatwierdzone do terapii nowotworów inhibitory punktów kontroli to przeciwciała monoklonalne (D. Wang et al., 2023). Jednakże podejście eksperymentalne nie ogranicza się do przeciwciał, równolegle testowane są inne technologie, takie jak: aptamery (Bertrand, 2023), związki drobnocząsteczkowe (Hec-Gałązka et al., 2024), peptydy (Sasikumar & Ramachandra, 2020) czy technologie degradujące białka (Mikitiuk et al., 2023).

Dotychczasowo głównie eksplorowanymi punktami kontroli w terapiach przeciwnowotworowych były receptory zaangażowane w dwie ścieżki: PD-1/PD-L1 i CTLA-4/CD80/CD86. Przeciwciała skierowane przeciwko PD-1 i PD-L1 stosowane są szeroko w terapii niedrobnokomórkowego raka płuca – pembrolizumab (Reck et al., 2016); raka nerkowokomórkowego – nivolumab (Motzer et al., 2015); czerniaka – atezolizumab (Madden & Kasler, 2019) czy raka trzonu macicy – durvalumab (Westin et al., 2024). Ipilimumab – przeciwciało skierowane przeciwko CTLA-4, jest z kolei wykorzystywane w terapii między innymi: raka prostaty (Beer et al., 2017) lub raka wątrobowokomórkowego (Kaseb et al., 2022). Jednakże wraz ze wzrostem wiedzy na temat funkcjonowania układu immunologicznego w kontekście wzrostu nowotworów wytypowano również inne potencjalne cele dla inhibitorów punktów kontrolnych, np.: LAG-3, TIGIT, TIM-3, Vista (Q. Sun et al., 2023). Wiele z nich jest obecnie na różnym etapie badań klinicznych. Pomimo tego, że ta klasa immunoterapeutyków nazywana jest inhibitorami zalicza się do niej również cząsteczki stymulujące układ immunologiczny. OX40, CD40 czy 4-1BB to ko-stymulujące cząsteczki, które pośród wielu innych są obiecującymi celami molekularnymi w tej dziedzinie immunoterapii (Kraehenbuehl et al., 2022).

Pomimo wielu sukcesów na polu terapeutycznym stosowanie inhibitorów punktów kontrolnych nie jest pozbawione wad. Jednym z głównych wyzwań są zdarzenia niepożądane związane z układem odpornościowym (irAE), które związane są z ogólnoustrojową stymulacją układu odpornościowego, i mogą prowadzić do zapalenia różnych narządów, takich jak skóra, wątroba, płuca i gruczoły dokrewne (Kyi & Postow, 2016). Dodatkowo, skuteczność inhibitorów punktów kontrolnych jest często ograniczona przez oporność pierwotną i nabytą. Oporność pierwotna występuje, gdy mikrośrodowisko guza nie zawiera wystarczającej liczby infiltrujących komórek odpornościowych lub posiada mechanizmy hamujące aktywację odporności, takie jak obecność immunosupresyjnych komórek lub cytokin (Jenkins et al., 2018). Oporność nabyta może rozwijać się po początkowych odpowiedziach, gdy guzy ewoluują, aby unikać wykrycia przez układ odpornościowy, czasami poprzez utratę docelowych antygenów lub zwiększenie ekspresji alternatywnych punktów kontrolnych, takich jak LAG-3 i TIM-3 (Barrueto et al., 2020). Ponadto istnieje potrzeba znalezienia niezawodnych biomarkerów, które pozwolą przewidzieć jacy pacjenci będą beneficjentami terapii inhibitorami punktów kontrolnych, ponieważ tylko u części pacjentów obserwuje się pozytywną odpowiedź na tę formę leczenia (Darvin et al., 2018).

Immunoterapia niewątpliwie zrewolucjonizowała podejście do zwalczania chorób nowotworowych. Jednakże wciąż istnieje szereg przeszkód i problemów, które stawiają wymagania dalszych, intensywnych, prac nad pogłębieniem zrozumienia i ulepszeniem immunoterapii w walce z nowotworami. Jednym z koronnych przykładów może być

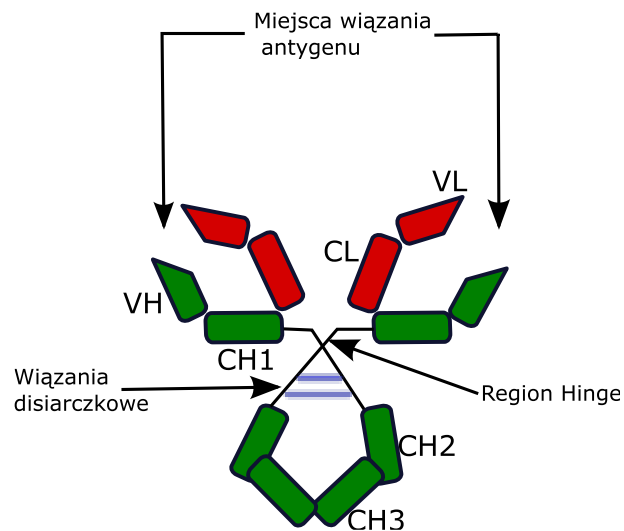
nieskuteczność immunoterapii w zwalczaniu nowotworów trzustki (Laface et al., 2023). Podejmuje się wiele różnych prób zwiększenia skuteczności immunoterapii. Terapie kombinowane, koniugaty przeciwciał czy też wnikliwa selekcja pacjentów skutkują nierzadko znaczącą poprawą wyników leczenia. W niniejszej pracy zaproponowano połączenie dwóch form immunoterapii: przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom nowotworowym i inhibitorów punktu kontroli układu immunologicznego.

5.2. Przeciwciała monoklonalne

5.2.1. Struktura przeciwciał

Przeciwciała (immunoglobuliny) są glikoproteinami należącymi do nadrodziny immunoglobulin (IgSF), produkowanymi w trakcie swoistej odpowiedzi immunologicznej przez plazmoblasty i komórki plazmatyczne (Nutt et al., 2015). Struktura przeciwciał obejmuje dwa łańcuchy ciężkie (HC) oraz dwa łańcuchy lekkie (LC), z których każdy zawiera domeny zmienne odpowiedzialne za wiązanie antygeny oraz domeny stałe pełniące funkcje efektorowe (Schroeder & Cavacini, 2010). W zależności od różnic w budowie domen stałych łańcuchów ciężkich, rozróżnia się pięć klas przeciwciał: IgA, IgD, IgE, IgG oraz IgM. Immunoglobuliny klasy IgG występują w największej ilości w organizmie, a obecnie wszystkie przeciwciała dostępne na rynku farmaceutycznym należą do tej klasy (Valenzuela & Schaub, 2018). Przeciwciała IgG są dużymi cząsteczkami o masie molekularnej około 150 kDa, składającymi się z dwóch łańcuchów ciężkich (każdy około 50 kDa) oraz dwóch łańcuchów lekkich (każdy około 25 kDa). Łańcuch ciężki zawiera cztery domeny immunoglobulinowe stabilizowane przez wiązania disiarczkowe, z czego trzy (CH1, CH2 oraz CH3) są konserwatywne, a jedna jest zmienna (VH). Największą zmiennością wykazują się rejony determinujące dopasowanie (CDR1, CDR2 i CDR3). Łańcuch lekki składa się z jednej domeny zmiennej (VL) i jednej stałej (CL) (H. Liu & May, 2012). Łańcuchy ciężkie i lekkie są połączone wiązaniami disiarczkowymi, tworząc dwa miejsca wiązania antygeny na powierzchni przeciwciała. Przeciwciała monoklonalne to populacja immunoglobulin, w której każde przeciwciało ma powinowactwo do tego samego epitopu antygeny. Taka populacja pochodzi z jednego klonu komórki plazmatycznej lub w przypadku produkcji przeciwciał w innych systemach ekspresji, z linii komórkowej wywodzącej się od pojedynczej komórki produkującej dane przeciwciało – tzw. linii monoklonalnej (Ehlers et al., 2021).

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie przeciwciała klasy IgG.



Przeciwciała typu IgG mogą zostać podzielone na 4 podklasy (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), gdzie numeracja podklasy odpowiada porządkowi występowania danego przeciwciała w surowicy zdrowej osoby (IgG1>IgG2>IgG3≥IgG4) (Schroeder & Cavacini, 2010). Pomimo ponad 90% podobieństwa w sekwencji aminokwasowej, każda z podklas IgG wykazuje szereg unikalnych cech, które wpływają na ich zdolność do wiązania antygenów, typ wiążanego antygenów, formowanie kompleksu immunologicznego, funkcje efektorowe oraz czas półtrwania w surowicy (Vidarsson et al., 2014). Przeciwciała monoklonalne obecnie stosowane w terapiach przeciwnowotworowych są w znacznej większości klasy IgG1 lub IgG4. Przeciwciała IgG1 są wysoce skuteczne w angażowaniu receptorów Fc i aktywowaniu układu dopełniacza, co czyni je szczególnie odpowiednimi do terapii wymagających silnych funkcji efektorowych układu odpornościowego, takich jak cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC) i cytotoksyczność zależna od dopełniacza (CDC) (Damelang et al., 2023). Z kolei przeciwciała IgG4 wykazują bardzo niskie lub w niektórych warunkach żadne funkcje efektorowe (Vidarsson et al., 2014). Różnice te są istotne w kontekście terapii przeciwnowotworowych z dwóch powodów: po pierwsze, potencjalnej skuteczności w angażowaniu komórek układu odpornościowego do zabijania komórek nowotworowych, po drugie potencjalnej immunotoksyczności i związanych z nią skutków ubocznych. Dodatkową cechą charakterystyczną przeciwciał klasy IgG4 jest specyficzna budowa regionu Hinge - która umożliwia proces nazywany wymianą ramion Fab (*ang. Fab-arm exchange*). W jego trakcie przeciwciało rozpada się na pół – zachowując jeden łańcuch ciężki i jeden lekki, by następnie w sposób spontaniczny połączyć się z drugą połową przeciwciała, nie koniecznie tego samego, finalnie skutkując wytworzeniem nowego, bivalentnego przeciwciała (Kolfshoten et al., 2007). W przypadku przeciwciał terapeutycznych jest to zjawisko

niepożądane i aby go uniknąć stosuje się mutację punktową w regionie Hinge, wymieniając w pozycji 228 serynę na prolinę (Handlogten et al., 2020). Taki zabieg zastosowano w niniejszej pracy.

5.2.2. Produkcja przeciwciał monoklonalnych

Pozyskiwanie przeciwciał specyficznych względem sprecyzowanych celów molekularnych jest długim i skomplikowanym procesem. W najbardziej rozpowszechnionym wariantie rozpoczyna się zwykle od immunizacji zwierząt (najczęściej myszy), izolacji splenocytów, generacji mysich hybrydom i następnie analizy przeciwciał produkowanych przez poszczególne populacje hybrydom pod kątem pożądanych cech (Laustsen et al., 2021). Istnieją również inne metody pozyskiwania przeciwciał lub fragmentów przeciwciał, niewykorzystujące modeli zwierzęcych, np. *phage display* (Ledsgaard et al., 2018). Ostatecznie kluczowe jest pozyskanie sekwencji aminokwasowej przeciwciała, jego domen zmiennych (VH i VL) lub co najmniej regionów warunkujących dopasowanie (CDR). Na początku rozwoju technologii przeciwciał monoklonalnych próbowano wykorzystywać w pełni mysie przeciwciała – uzyskane z wygenerowanych hybrydom. Było to jednak obarczone licznymi problemami – niskim czasem półtrwania przeciwciał w ludzkim organizmie, malejącej skuteczności i skutkami ubocznymi związanymi z wytwarzaniem ludzkich anty-mysich przeciwciał (Kimiz-Gebologlu et al., 2018). Dlatego też, dzięki rozwojowi technik inżynierii genetycznej, obecnie stosuje się przeciwciała chimeryczne (fragmenty wiążące antygeny mysie, regiony stałe ludzkie), humanizowane i w pełni ludzkie (Simpson & Caballero, 2014).

W przemyśle farmaceutycznym znaczna część przeciwciał monoklonalnych produkowana jest w ssaczych komórkach zawieszinowych, z czego aż 80% dostępnych na rynku przeciwciał w komórkach CHO (W. J. Xu et al., 2023). Komórki CHO posiadają szereg zalet, które wyróżniają je spośród innych potencjalnych systemów ekspresji: 1) dobry wzrost w chemicznie zdefiniowanym, wolnym od surowicy medium, 2) stosunkowe bezpieczeństwo pod względem replikacji ludzkich patogennych wirusów, 3) zdolność do ekspresji białek terapeutycznych z modyfikacjami post-translacyjnymi zbliżonymi do ludzkich (J. Y. Kim et al., 2012). Ponadto, znaczną przewagą nad innymi liniami komórkowymi, jest łatwość wytwarzania klonów komórkowych zdolnych do stabilnej produkcji pożądanego białka terapeutycznego, w zadowalających ilościach (z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego) i o jakości odpowiedniej dla wykorzystywania u ludzi (Fischer et al., 2015). Inne linie komórkowe wykorzystywane do produkcji przeciwciał monoklonalnych to NS0, SP2/0, HEK293 i PER.C6 (Posner et al., 2019).

5.2.3. Przeciwciała monoklonalne w terapii nowotworów

Pierwszym zarejestrowanym przez agencję FDA przeciwciałem do walki z nowotworami było chimeryczne przeciwciało anti-CD20 – Rituximab (Neves & Kwok, 2015). Od tego czasu na rynek medyczny wprowadzono niemal 100 różnych przeciwciał monoklonalnych i cząsteczek pochodnych (Crescioli et al., 2024), zarówno specyficznych względem antygenów nowotworowych jak i inhibitorów punktów kontroli układu immunologicznego.

Tabela 1. Zestawienie przykładowych przeciwciał monoklonalnych stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych (AntibodySociety, 2024).

Nazwa	Cel molekularny	Format	Pierwsze wskazanie	Data zatwierdzenia do użycia w UE
Dostarlimab	PD-1	Humanizowane IgG4	Nowotwór endometrium macicy	2021
Isatuximab	CD38	Chimeryczne IgG1	Szpiczak mnogi	2020
Atezolizumab	PD-L1	Humanizowane IgG1	Nowotwór pęcherza	2017
Pembrolizumab	PD-1	Humanizowane IgG4	Czerniak	2015
Ramucirumab	VEGFR2	Ludzkie IgG1	Rak żołądka	2014
Ipilimumab	CTLA-4	Ludzkie IgG1	Czerniak	2011
Bevacizumab	VEGF	Humanizowane IgG1	Rak jelita grubego	2005
Trastuzumab	HER2	Humanizowane IgG1	Rak piersi	2000

Przeciwciała monoklonalne odniosły niewątpliwy sukces na wielu polach walki z nowotworami. Stanowią one często pierwszą lub drugą linię terapeutyczną, są też szeroko wykorzystywane w terapiach kombinowanych. Na podstawie sukcesów przeciwciał monoklonalnych opartych na formacie IgG inne formaty przeciwciał (np. fragmenty przeciwciał, przeciwciała bispecyficzne) oraz pochodne przeciwciał (np. koniugaty przeciwciał z lekami (ADCs) i immunocytokiny) są intensywnie badane i stopniowo wprowadzane do terapii szerokiej grupy nowotworów (Jin et al., 2022).

5.3. Przeciwciała bispecyficzne

5.3.1. Koncepcja i zalety przeciwciał bispecyficznych

Przeciwciała bispecyficzne są innowacyjną klasą terapeutycznych przeciwciał zaprojektowanych do rozpoznawania i wiązania dwóch odrębnych epitopów. Ta podwójna specyficzność umożliwia im angażowanie się w różne funkcje biologiczne, których przeciwciała monospecyficzne nie są w stanie osiągnąć. Zostało dowiedzione, że terapie kombinowane z wykorzystaniem dwóch różnych monospecyficznych przeciwciał monoklonalnych mogą dawać znaczącą poprawę w terapii nowotworów (Henricks et al., 2015). Jednakże podejście takie związane jest z ryzykiem znaczącego podniesienia toksyczności terapii (Boutros et al., 2016; Wolchok et al., 2017). W odpowiedzi na te problemy rozpoczęto intensywne rozwijanie technologii przeciwciał bispecyficznych, których potencjalne zalety wykraczają poza zmniejszoną toksyczność. W zależności od wybranych celów molekularnych i zastosowanych formatów przeciwciała bispecyficzne mogą pozwalać między innymi na: 1) skuteczniejszą rekrutację komórek układu odpornościowego prowadząc tym samym do zwiększenia efektu cytotoksycznego (Ma et al., 2021); 2) jednoczesną blokadę więcej niż jednego szlaku sygnalizacyjnego i tym samym zwiększoną skuteczność w ograniczaniu wzrostu nowotworów (Brinkmann & Kontermann, 2017); 3) podniesienie specyficzności terapii (G. Fan et al., 2015); 4) docieranie w miejsca niedostępne dla przeciwciał monospecyficznych, np. pokonanie bariery krew-mózg (Pardridge, 2016) lub zwiększenie penetracji guzów litych (Kopp et al., 2024); 5) zwiększonej stabilności i czasu półtrwania w surowicy (G. Fan et al., 2015).

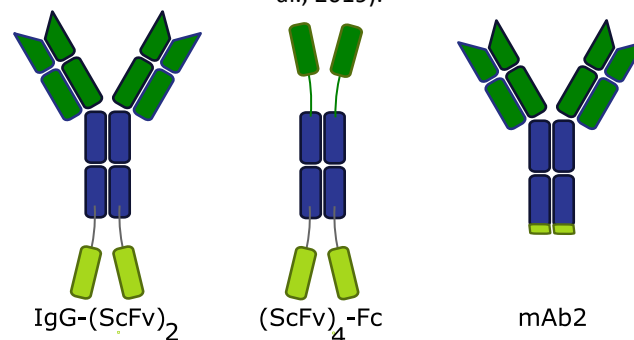
5.3.2. Formaty przeciwciał bispecyficznych

Przeciwciała bispecyficzne mogą zostać ogólnie podzielone na dwa rodzaje: podobne do IgG (*ang. IgG-like*, posiadające fragment Fc) i niepodobne do IgG (*ang. non-IgG like*, pozbawione fragmentu Fc). Przeciwciała podobne do IgG zachowują funkcje efektorowe związane z fragmentem Fc, takie jak cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC), cytotoksyczność zależna od dopełniacza (CDC) oraz fagocytoza zależna od przeciwciał (ADCP) (Spiess et al., 2015). Ponadto obecność fragmentu Fc ułatwia oczyszczanie oraz poprawia rozpuszczalność i stabilność przeciwciał. Dodatkowo, przeciwciała bispecyficzne w formatach podobnych do IgG zazwyczaj mają dłuższy okres półtrwania w surowicy dzięki większemu rozmiarowi i zdolności wiązania receptora FcRn (Kontermann & Brinkmann, 2015). Przeciwciała niepodobne do IgG są znacznie mniejsze, co prowadzi do lepszej penetracji tkanek (Kontermann & Brinkmann, 2015).

Przeciwciała bispecyficzne podobne do IgG mogą być dalej podzielone na formaty symetryczne i asymetryczne. Formaty symetryczne są to najczęściej pełne przeciwciała wiążące

jeden cel molekularny, z dołączonymi fragmentami przeciwciał wiążącymi drugi cel molekularny (Labrijn et al., 2019). Taki przeciwciała są zwykle tetrawalentne (mają 4 miejsca wiązania antygeny w układzie 2+2) (Brinkmann & Kontermann, 2017). Symetryczne formaty przypominają natywne przeciwciała, ale różnią się rozmiarem i architekturą. Te różnice mogą negatywnie wpływać na korzystne właściwości charakterystyczne dla normalnych przeciwciał (takie jak stabilność i rozpuszczalność) i tym samym pogarszać właściwości fizykochemiczne i/lub farmakokinetyczne tych cząsteczek (Chames & Baty, 2009). Bliska odległość miejsc wiążących antygen może jednak utrudniać optymalne zaangażowanie obu celów jednocześnie, potencjalnie zmniejszając funkcjonalność (C. Wu et al., 2009). Dużą zaletą praktyczną symetrycznych przeciwciał bispecyficznych jest konieczność ekspresji tylko jednego lub dwóch łańcuchów polipeptydowych, co zmniejsza znacznie ilość pracy w etapach generowania linii komórkowych. Jako przykładowe formaty symetrycznych przeciwciał bispecyficznych można wymienić: IgG-(ScFv)₂ – gdzie do C-końca pełno formatowego przeciwciała podłączone są dwa fragmenty ScFv; (ScFv)₄-Fc – w miejsce fragmentów Fab przeciwciała dwa fragmenty ScFv i ponownie dwa fragmenty ScFv podłączone do C-końca; mAb2 – gdzie na C-końcu pełno formatowego przeciwciała wstawiono krótkie fragmenty pochodzące z domeny zmiennej łańcucha lekkiego drugiego przeciwciała (Labrijn et al., 2019).

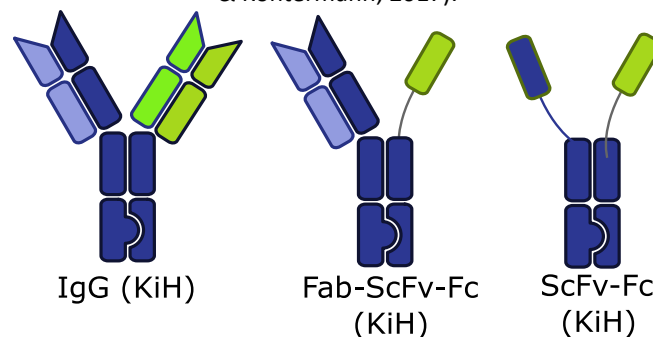
Rycina 2. Przykładowe formaty symetrycznych przeciwciał bispecyficznych. Zaadaptowane z (Labrijn et al., 2019).



Format przeciwciał asymetrycznych zakłada, że każda połowa przeciwciała wiąże jeden antygen. Przeciwciała takie w większości wypadków są biwalentne (w formie 1+1) (Labrijn et al., 2019). Ta asymetria wprowadza jednak wyzwania związane z zapewnieniem prawidłowego parowania łańcuchów ciężkich i lekkich podczas produkcji, często wymagając zaawansowanych technik inżynieryjnych, takich jak metoda knob-into-hole lub technologia CrossMab, aby promować prawidłowe złożenie i funkcjonalność (Klein et al., 2019). Ponadto, większe wyzwanie stanowi również generowanie linii komórkowych z powodu konieczności ekspresji jednocześnie trzech lub czterech łańcuchów polipeptydowych (Madsen et al., 2024). Również proces

oczyszczania przeciwciał asymetrycznych może być bardziej skomplikowany, ze względu na konieczność usunięcia źle złożonych przeciwciał – żadna z technologii wymuszających odpowiednie parowanie łańcuchów lekkich i ciężkich nie jest skuteczna w 100 procentach (C. Wang et al., 2018). Ponieważ większość asymetrycznych formatów ściśle przypomina naturalne przeciwciała i nie zawiera dodatkowych nienatywnych domen przeciwciał ani sekwencji linkerów, uważa się, że mają one najniższy potencjał immunogenności (Labrijn et al., 2019). Wśród formatów asymetrycznych wyróżnić można: IgG (KiH) – w którym parowanie łańcuchów ciężkich wymuszone jest przez mutację knob-into-hole; Fab-ScFv-Fc (KiH) – w którym jedno ramię przeciwciała jest natywne, a drugie zastąpione jest fragmentem ScFv, parowanie łańcuchów ciężkich wymuszone jest przez mutację knob-into-hole; czy ScFv-Fc (KiH) – w którym oba ramiona Fab zastąpione są przez fragmenty ScFv, parowanie łańcuchów ciężkich wymuszone przez mutację knob-into-hole (Brinkmann & Kontermann, 2017). Specyfika asymetrycznych przeciwciał bispecyficznych sprawia, że dostępnych do rozważenia formatów jest znacznie więcej niż w przypadku przeciwciał symetrycznych, co może pozwalać na większy potencjał optymalizacyjny.

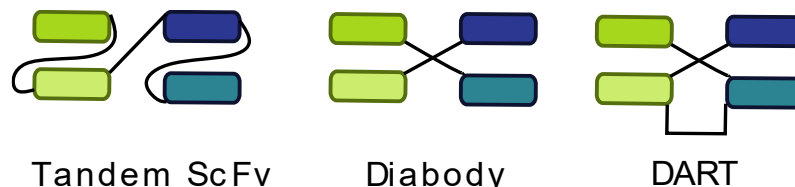
Rycina 3. Przykładowe formaty asymetrycznych przeciwciał bispecyficznych. Zaadaptowane z (Brinkmann & Kontermann, 2017).



Przeciwciała nie-podobne do IgG stanowią minimalistyczne podejście do tworzenia bispecyficznych cząsteczek. Tak jak wspomniano wyżej, są pozbawione fragmentu Fc, i jest to proste połączenie fragmentów przeciwciał zdolnych do wiązania antygenów (Labrijn et al., 2019). Większość z nich zbudowana jest na podstawie fragmentów ScFv (*ang. Single chain fragment variable*) – które składają się tylko z fragmentów zmiennych łańcucha ciężkiego i lekkiego (G. Fan et al., 2015). Ich różna aranżacja może prowadzić do tworzenia np.: Tandem-ScFv – dwa ScFv połączone elastyczną sekwencją linkerową, Diabody – gdzie fragment zmienny łańcucha ciężkiego jednego przeciwciała połączony jest z fragmentem zmiennym łańcucha lekkiego drugiego przeciwciała, i na odwrót, czy DART (*ang. Dual-affinity retargeting molecules*) które w swojej strukturze przypominają Diabody, jednakże są stabilizowane dodatkowym mostkiem

disiarczkowym (Zhang, 2023). Warto zauważyć, że technologie przeciwciał nie podobnych do IgG bardzo często wykorzystywane są przy tworzeniu przeciwciał bispecyficznych podobnych do IgG, zarówno w formatach symetrycznych jak i asymetrycznych.

Rycina 4. Przykładowe formaty przeciwciał bispecyficznych nie podobnych do IgG. Zaadaptowane z (G. Fan et al., 2015).



Z punktu widzenia mechanizmu działania przeciwciała bispecyficzne można podzielić na funkcjonujące w układzie *-trans* i *-cis* (Madsen et al., 2024). Przeciwciała działające w układzie *-trans* wiążą dwa cele molekularne znajdując się na różnych komórkach, tym samym mogąc je do siebie zbliżyć – np. komórki nowotworowe i komórki układu odpornościowego. Przeciwciała funkcjonujące w układzie *-cis* celują w białka znajdujące się na tych samych komórkach, np. dwa różne receptory ważne w proliferacji i wzroście nowotworów, lub dwa różne punkty kontroli układu immunologicznego.

5.3.3. Przeciwciała bispecyficzne w terapii nowotworów

Rozwój technik inżynierii genetycznej, a tym samym umożliwienie względnie szybkiego generowania przeciwciał bispecyficznych w różnych formatach, sprawił ogromny wzrost zainteresowania wykorzystaniem tej technologii w terapiach przeciwnowotworowych (Wei et al., 2022). Pierwszym zarejestrowanym przeciwciałem bispecyficznym był Catumaxomab, skierowany przeciwko CD3 i EpCAM (antygen adhezyjny komórek nabłonkowych, ang. *epithelial cell adhesion molecule*). Było to szczurzo-mysie przeciwciało z zachowanym fragmentem Fc, stosowane do terapii wodobrzusza związanego z nowotworami gastrycznymi i jajników (Frampton, 2012). Zostało ono wycofane z rynku medycznego w 2017 roku, jednakże z przyczyn ekonomicznych. Od tego czasu kilka innych przeciwciał bispecyficznych zostało zatwierdzonych do terapii (Tabela 2), a bardzo wiele jest na różnych etapach badań klinicznych (Wei et al., 2022).

Tabela 2. Przeciwciała bispecyficzne zarejestrowane do użycia w terapiach przeciwnowotworowych (AntibodySociety, 2024).

Nazwa	Cele molekularne	Format	Pierwsze wskazanie	Data zatwierdzenia do użycia w UE
Talquetamab	CD3xGPC5D	Asymetryczne, podobne do IgG4	Szpiczak mnogi	2023
Epcoritamab	CD3xCD20	Asymetryczne, podobne do IgG1	Chłoniak rozlany	2023
Glofitamab	CD3xCD20	Asymetryczne, podobne do IgG1, 2+1 CrossMab	Chłoniak rozlany	2023
Teclistamab	CD3xBCMA	Asymetryczne, podobne do IgG4	Szpiczak mnogi	2022
Mosunetuzumab	CD3xCD20	Asymetryczne, podobne do IgG1	Chłoniak grudkowy	2022
Tebentafusp	CD3x IMCgp100	Tandem ScFv	Czerniak oka	2022
Amivantamab	EGFRxMET	Asymetryczne, podobne do IgG1	Niedrobnokomórkowy rak płuca	2021
Blinatumomab	CD3xCD19	Tandem ScFv	Ostra białaczka limfoblastyczna	2015

Jak łatwo zauważyć, znaczna część zarejestrowanych przeciwciał bispecyficznych skierowana jest przeciwko CD3 oraz antygenom specyficznym dla nowotworów. Takie połączenie umożliwia tworzenie synapsy immunologicznej, podobnej do naturalnego kompleksu receptora limfocytów T (TCR) i głównego peptydu kompleksu zgodności tkankowej (MHC) (H. Xu et al., 2015). Prowadzi to do aktywacji limfocytów T, a tym samym do wydzielania cytokin zapalnych i cząsteczek cytotoxicznych, a dalej do eliminacji komórek nowotworowych. Wiele przeciwciał bispecyficznych obecnie testowanych w badaniach klinicznych również zakłada taki mechanizm działania (Wei et al., 2022). Jednakże, nie brakuje innych propozycji wykorzystania technologii przeciwciał bispecyficznych. Dla przykładu można wymienić: 1) celowanie równocześnie w dwa antygeny nowotworowe (Amivantamab – Tabela 2, lub Zenocutuzumab przeciwciało HER2 x HER3 obecnie czekające na zatwierdzenie przez agencję FDA); 2) celowanie w dwa punkty kontroli układu

odpornościowego, np. PD-1 x CTLA-4 (badanie kliniczne NCT05235542) lub PD-1 x TIM3 (badanie kliniczne NCT05216835); 3) celowanie w punkt kontroli układu odpornościowego i antygen nowotworowy, np. Mezotelina x CD47 (badanie kliniczne NCT05403554) lub PD-1 x HER2 (badanie kliniczne NCT04162327).

5.4. Cele molekularne: ROR-1, Mezotelina i PD-L1

5.4.1. ROR-1

ROR-1 (ang. *Receptor tyrosine kinase-like orphan 1*) należy do rodziny kinaz tyrozynowych i jest białkiem transmembranowym, złożonym z 5 domen: 3 zewnątrzkomórkowe (domenę Kringle, domenę bogatą w cysteinę i domenę immunoglobulinową), rejon transmembranowy, 2 wewnątrzkomórkowe (domenę kinazową i domenę bogatą w prolinę) i motyw serynowo-treoninowy (Kamrani et al., 2019). Białko to składa się z 937 aminokwasów i w pełnej formie ma masę teoretyczną ok. 104 kDa, jednakże modyfikacje post-translacyjne, przede wszystkim liczne glikozylacje na N-końcu, skutkują masą faktyczną ok. 130 kDa (Reddy et al., 1997). Sformułowanie „orphan” w nazwie białka wynikało początkowo z braku zidentyfikowanych ligandów, jednakże dalsze badania wykazały, że wiąże białko Wnt-5a (J. Yu et al., 2016). Trwają spory dotyczące faktycznej aktywności katalitycznej ROR-1. Z jednej strony brakuje mu kilku silnie konserwowanych aminokwasów obecnych w innych kinazach tyrozynowych (Green et al., 2008), niektóre badania wykazywały, że ROR-1 jest pseudokinazą bez wewnętrznej aktywności katalitycznej (Borcherding et al., 2014), a raportowana aktywność wynika z zanieczyszczenia kofaktorami lub innymi kinazami (Bainbridge et al., 2014). Inne badania z kolei wykazały wysoką aktywność w fosforylacji białka c-Src, w układzie komórkowym HEK293 i COS7 (Yamaguchi et al., 2012).

Wydaje się, że biologiczna istotność białka ROR-1 skupiona jest w fazie rozwoju embrionalnego. Badania na myszach wykazały, że pełni ważną rolę w rozwoju układów szkieletowego, krążeniowo-oddechowego i nerwowego (Oishi et al., 1999), biorąc udział w procesach agregacji, migracji, różnicowania komórek i angiogenezy (Green et al., 2008) a także w metabolizmie i sygnalizacji komórkowej podczas embriogenezy (Matsuda et al., 2001). U ludzi ekspresja ROR-1 jest głównie ograniczona do embrionu i płodu i praktycznie nie występuje u dorosłych, z wyjątkiem bardzo niskich poziomów w adipocytach komórkach trzustki, płuc i pewnych subpopulacji limfocytów B (Baskar et al., 2008). Sytuacja wgląda diametralnie inaczej w przypadku nowotworów. Nadekspresję ROR-1 wykazano między innymi w: przewlekłej białaczce limfoblastycznej (Baskar et al., 2008), białaczce włochatokomórkowej i chłoniaka z

komórek płaszczka (Daneshmanesh et al., 2013), nowotworach trzustki, prostaty, piersi, jajnika i płuc (S. Zhang et al., 2012). Ponadto w przypadku nowotworów trzustki, jajnika, piersi i płuc nadekspresję ROR-1 powiązano z gorszą progresją choroby (S. Zhang et al., 2012). Proponowane modele zaangażowania ROR-1 w promocję nowotworzenia obejmują między innymi: promocję proliferacji komórek nowotworowych poprzez szlaki sygnalizacyjne kinaz AKT i MAPK i przerzutowania poprzez szlak sygnalizacyjny kinaz SRC (Aghebati-Maleki et al., 2017). Tak więc, zakłada się, że sygnalizacja ROR-1 bierze udział w przeżyciu, proliferacji i przerzutowaniu nowotworów (Hojjat-Farsangi et al., 2014)

W związku z minimalną obecnością w tkankach zdrowych i dużym nagromadzeniem w komórkach nowotworowych, receptor ROR-1 został wytypowany jako obiecujący kandydat do celowania w terapiach przeciwnowotworowych. Cirmtuzumab jest humanizowanym monoklonalnym przeciwciałem anti-ROR-1 wprowadzony do badań klinicznych fazy 1. i fazy 1./2. (w kombinacji z irbutinibem) w leczeniu chłoniaków z komórek płaszczka i przewlekłych białaczek limfocytowych (Choi et al., 2018; Lee et al., 2021). W badaniach przed-klinicznych przeciwciało to wykazało zdolność do eliminacji ludzkich komórek nowotworowych przewlekłej białaczki limfocytowej oraz guzów litych piersi i trzustki jako koniugat z monometylową aurystatyną E (Cui, Widhopf, et al., 2013). Inne przeciwciała monoklonalne anti-ROR-1 również wykazywały obiecujące wyniki, skutecznie promując śmierć komórek nowotworu trzustki (Daneshmanesh et al., 2013), czerniaka (Hojjat-Farsangi et al., 2013) a także hamując przerzutowanie nowotworów piersi (Cui, Zhang, et al., 2013). Receptor ROR-1 został wykorzystany jako potencjalny cel w terapii CAR-T, która na wczesnych etapach badań wykazała podobną skuteczność w terapii chłoniaka z komórek płaszczka jak terapia CAR-T skierowana przeciwko CD19 (Hudecek et al., 2013). W innym badaniu drobnocząsteczkowe inhibitory ROR-1 powodowały apoptozę komórek nowotworowych pochodzących z trzustki, a efekt ten był dodatkowo wzmacniany w kombinacji z erlotinibem lub ibrutinibem (Daneshmanesh et al., 2018). ROR-1 został wykorzystany również jako cel molekularny dla przeciwciał bispecyficznych (CD3xROR-1) w formie Tandem ScFv, wykazując promocję lizy komórek nowotworowych trzustki, piersi i jajnika w obecności ludzkich limfocytów T (Gohil et al., 2017).

5.4.2. Mezetelina

Mezetelina jest glikoproteiną zakotwiczoną w błonie komórkowej za pomocą glikofosfatydyloinozytolu (GPI). Początkowo gen *MSLN* koduje 69 kDa białko prekursorowe (pre-pro-mezetelina). Następnie, po odcięciu sekwencji sygnałnej, do seryny w miejscu 598 dodawana

jest kotwica GPI, a po zakotwiczeniu w błonie białko prekursorowe jest przecinane w pozycji R295 przez furynę, skutkując powstaniem dwóch fragmentów – zakotwiczonej mezoteliny (40 kDa) i białka wydzielanego – *ang. megakaryocyte-potentating factor* (31 kDa) (Faust et al., 2022). Ponadto forma zakotwiczona może ulegać dodatkowym cięciom przez obecne w macierzy międzykomórkowej proteazy, czego wynikiem jest powstawanie rozpuszczalnych fragmentów mezoteliny (X. Liu et al., 2020).

U dorosłego człowieka mezotelina wykrywana jest w niewielkich ilościach w osierdziu, opłucnej i otrzewnej (Hilliard et al., 2021). Białka zakotwiczone w błonie przez GPI często są zaangażowane w sygnalizację międzykomórkową i procesy adhezji (Paladino et al., 2015), jednakże dokładna rola mezoteliny u zdrowych osób nie została określona. W badaniach w modelach mysich z inaktywacją genu *MSLN* nie wykazano wpływu mezoteliny na rozwój i zdolności reprodukcyjne myszy, tym samym sugerując, że funkcjonalność tego białka nie jest kluczowa dla przeżycia (Bera & Pastan, 2000).

Rola mezoteliny jest znacznie lepiej opisana w kontekście nowotworów. Nadekspresja tego białka została wykazana w przypadku m.in.: międzybłoniaka, raka jajnika, gruczolakoraka trzustki, raka płuc czy macicy (Faust et al., 2022). W niektórych przypadkach nadmierną ilość mezoteliny powiązano również ze złośliwością i agresywnością nowotworu (Weidemann et al., 2021). Międzybłoniak i rak jajnika to dwa typy nowotworów, w których ekspresja mezoteliny jest wyjątkowo wysoka. Nowotwory te produkują również CA125/MUC16, białko z rodziny mucyn, które jest zdolne wiązać zakotwiczoną w błonie formę mezoteliny. Interakcja ta promuje migrację nowotworów przez ścieżkę sygnalizacyjną SGK3/FOXO3 (Huo et al., 2021). Co interesujące błonowa forma mezoteliny wiąże również formy rozpuszczalne, prowadząc do nadekspresji metaloproteiny macierzy-7 (MMP-7) poprzez szlaki sygnalizacyjne MAPK/ERK i JNK (M. C. Chang et al., 2012). MMP-7 promuje nowotworzenie poprzez hamowanie apoptozy, zmniejszanie adhezji komórek oraz indukowanie angiogenezy (Liao et al., 2021). Nadekspresja mezoteliny promuje również tranzycję epithelialno-mezenchymalną, proces bardzo istotny w inwazji nowotworów (He et al., 2017). Inne badania dowodzą związku nadekspresji mezoteliny z: większą proliferacją komórek nowotworowych poprzez szlak sygnalizacyjny STAT-3 (Bharadwaj et al., 2008) oraz przeżycia nowotworu poprzez sygnalizację IL-6 (Bharadwaj et al., 2011) a także kinaz MAPK/ERK i PI3K/Akt (Z. Tang et al., 2013). Podsumowując, dotychczasowe badania wykazują potencjalną rolę nadekspresji mezoteliny w adhezji komórek nowotworowych, rozwoju nowotworu, jego proliferacji, przeżycia i inwazji odległych tkanek.

Podobnie jak w przypadku receptora ROR-1, niewielka obecność w tkankach zdrowych i potencjalnie duże znaczenie w funkcjonowaniu komórek nowotworowych, sprawia, że

mezotelina jest dobrym kandydatem na cel w terapii nowotworów. W związku z tym została wykorzystana w różnych formach immunoterapii, takich jak: przeciwciała monoklonalne, koniugaty przeciwciał, szczepionki przeciwnowotworowe, terapia CAR-T czy przeciwciała bispecyficzne. Amatumimab (MORAb-009) jest chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym anty-Mezotelina. Badania przed-kliniczne dowiodły, że skutecznie blokuje wiązanie CA125/MUC16 jak również promuje występowanie cytotoksyczności zależnej od przeciwciał. Jego skuteczność w badaniach w mysim modelu płaskonabłonkowego raka skóry wykazały niską skuteczność w monoterapii, jednakże w kombinacji z chemioterapeutykami (Taxol lub gemcitabina) zahamowanie wzrostu nowotworu było znaczne. W tych samych badaniach wykazano również, że po związaniu mezoteliny przeciwciało jest internalizowane do komórki, dając podwaliny pod dalsze badania związane z koniugatami przeciwciał (Hassan et al., 2007). Amatumimab został wprowadzony do badań klinicznych, w których dowiedziono skutecznej inhibicji adhezji komórek nowotworowych w trakcie przerzutowania (Hassan et al., 2010). Mechanizm internalizacji przeciwciała po związaniu z mezoteliną został wykorzystany w przypadku związku Anatumab raptansine (BAY-94 9343) – ludzkim przeciwciele IgG1 anty-mezotelina, połączonym wiązaniem disiarczkowym z inhibitorem tubulin – maytansine. Po internalizacji wiązanie disiarczkowe jest przecinane uwalniając inhibitor, co prowadzi do zahamowania polimeryzacji mikrotubuli ostatecznie skutkując apoptozą komórek nowotworowych. Badania *in-vitro* wykazały silnie cytotoksyczny efekt na liniach komórkowych pochodzących z nowotworów jajnika, trzustki, nie drobnokomórkowego raka płuca i międzybłoniaków, jednocześnie badania *in vivo* w mysich modelach nowotworów (trzustki, jajnika i międzybłoniaka) również skutkowały obiecującymi wynikami (Golfier et al., 2014). Związek ten, w kombinacji z pegylowaną liposomalną doxorubicyną, nie wykazał znacznych efektów toksycznych i pomyślnie przeszedł badania kliniczne fazy I (Santin et al., 2023). ABBV-428 jest bispecyficznym, symetrycznym przeciwciałem monoklonalnym zaprojektowanym jako antagonistą mezoteliny i agonistą CD40. W eksperymentach *in-vivo* w mysich modelach raka piersi osiągnięto znaczące zahamowanie wzrostu nowotworu (Ye et al., 2019). W 1 fazie badań klinicznych wykazano bezpieczny profil stosowania, jednakże wstępne wyniki dotyczące aktywności przeciwnowotworowej wskazują raczej na stabilizację choroby niż jej zwalczanie (Luke et al., 2021). Inne bispecyficzne przeciwciało, w formie Tandem-ScFv – CD3 x mezotelina (NAV-003), wykazywało znaczą aktywność przeciwnowotworową zarówno *in-vitro* (linie komórkowe międzybłoniaka, raka trzustki i jajnika), jak i *in-vivo* (mysie modele międzybłoniaka, komórki nowotworowe pochodzące od pacjentów) (Grasso et al., 2023).

5.4.3. PD-L1

PD-L1 (*ang. Programmed Death Ligand 1*) znane również jako B7-H1 lub CD274 jest białkiem transmembranowym typu 1., zbudowanym z zewnątrzkomórkowej domeny immunoglobulinowej, hydrofobowego rejonu transmembranowego i krótkiego fragmentu wewnątrzkomórkowego z trzema silnie konserwowanymi motywami aminokwasowymi (Escors et al., 2018). Na domenę zewnątrzkomórkową składa się rejon stały (bliżej błony komórkowej) i rejon zmienny wraz z motywami warunkującymi dopasowanie (CDR), które formują kompleks z receptorem PD-1, podobny w swojej charakterystyce do rozpoznania antygeny przez przeciwciała (Zak et al., 2015). W zdrowych tkankach interakcja pomiędzy PD-L1 i PD-1 jest kluczowa dla utrzymania homeostazy immunologicznej (C. Sun et al., 2018). PD-1 występuje na powierzchni limfocytów T, podczas gdy PD-L1 na komórkach pochodzenia hematopoetycznego, w tym na limfocytach T, limfocytach B, makrofagach i komórkach dendrytycznych (DC), a także na niehematopoetycznych komórkach zdrowych tkanek, takich jak komórki śródbłonna naczyń, keratynocyty, komórki wysp trzustkowych czy astrocyty (Zhou et al., 2023). Interakcja PD-1/PD-L1 zmienia aktywność limfocytów T na wiele sposobów, hamując proliferację, przeżywalność, produkcję cytokin oraz inne funkcje efektorowe (Patsoukis et al., 2020). Ekspresja PD-L1 jest regulowana poprzez wiązanie czynników transkrypcyjnych z promotorem jego genu, aktywowanych przez szereg cząsteczek sygnalizacyjnych, takich jak IFN γ , IL-2, IL-10 czy TNF. Szlaki sygnalizacyjne prowadzące do ekspresji PD-L1 mogą być różne w zależności od rodzaju cząsteczki sygnalizacyjnej, typu komórki lub stanu fizjologicznego (Escors et al., 2018). Dla przykładu interferon gamma (IFN γ) produkowany przez komórki T aktywuje szlak kinaz JAK/STAT, co prowadzi do aktywacji transkrypcyjnej interferonowego czynnika regulacyjnego 1 (IRF1), który następnie wiąże się z promotorem PD-L1 (Garcia-Diaz et al., 2017). PD-L1 może również wiązać się bezpośrednio z CD80 na tej samej komórce, co prowadzi do zaburzenia struktury homodimeru CD80, zmniejszając spektrum potencjalnych partnerów wiążących CD80 (Beenen et al., 2022). Taka sytuacja może prowadzić do częściowej inhibicji szlaku PD-1/PD-L1, jak również CTLA-4/CD80, nie zaburzając jednocześnie wiązania CD28/CD80 – utrzymując stymulację układu odpornościowego (Zhao et al., 2019).

Komórki nowotworowe wykorzystują naturalnie występujący mechanizm regulujący funkcjonowanie układu odpornościowego, jakim jest interakcja PD-1 i PD-L1, aby unieważnić się na przeciwnowotworowe działanie układu immunologicznego. Ciągła nadekspresja PD-L1 została zidentyfikowana wśród wielu rodzajów nowotworów (Escors et al., 2018). Powiązane jest to z anormalną aktywacją ścieżek sygnalizacyjnych w komórkach nowotworowych, takich jak: AKT-mTOR (Lastwika et al., 2016), Ras (Coelho et al., 2017) czy MEK-ERK (Ota et al., 2015). W

wielu przypadkach nadmierna ekspresja PD-L1 powiązana jest z gorszą prognozą przebiegu choroby. Takie zjawisko można zaobserwować między innymi dla: nowotworów przełyku (L. Chen et al., 2014), raka żołądka (Qing et al., 2015) czy trzustki (Geng et al., 2008). Związek pomiędzy nadekspresją PD-L1 a przebiegiem choroby nie zawsze jest jasny. Dla przykładu, w przypadku nowotworów płuc część analiz wykazuje, że zwiększona ilość PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych jest potencjalnym predyktorem gorszego przebiegu choroby (Azuma et al., 2014; Mu et al., 2011), podczas gdy inne badania prowadzą do kompletnie odwrotnych wniosków (Velcheti et al., 2014; Yang et al., 2014). Istnieją również przypadki, w których dotychczasowe dane jednoznacznie wskazują na pozytywny związek pomiędzy nadekspresją PD-L1 a lepszą prognozą, takie jak rak endokryny skóry (Lipson et al., 2013). Informacje te sugerują, że związek pomiędzy ekspresją PD-L1 a przebiegiem choroby w dużej mierze zależy od typu, a nawet podtypu nowotworu, jak również jego stadium. Oczywiście w tych rozważaniach należy uwzględnić, że wysoka ekspresja PD-L1 jest powiązana z lepszym rokowaniem jedynie ze względu na możliwość zastosowania terapii celującej w PD-L1, jak na przykład w czerniakach (Taube et al., 2012).

Interakcja PD-1/PD-L1 wzbudza zainteresowanie jako cel w terapiach przeciwnowotworowych właściwie od momentu jej odkrycia (C. Sun et al., 2018). Dotychczasowo na rynku europejskim i amerykańskim do terapii nowotworów zatwierdzono 3 przeciwciała monoklonalne – Atezolizumab (2017 rok, pierwsze to wskazanie rak pęcherza), Durvalumab (2018 rok, pierwsze - wskazanie rak pęcherza) i Avelumab (2017 rok, pierwsze wskazanie rak - neuroendokryny skóry) (Akinleye & Rasool, 2019). Dwa inne przeciwciała – Cosibelimab (kolczystokomórkowy rak skóry) i Sugemalimab (niedrobnokomórkowy rak skóry) – oczekują właśnie na zatwierdzenie do użycia w Stanach Zjednoczonych. Ponadto 4 inne zatwierdzone zostały tylko na rynku chińskim (AntibodySociety). Terapie wykorzystujące inhibicję PD-L1 okazały się skuteczne w przypadku różnych rodzajów nowotworów. Co prawda pierwsze rejestracje przeciwciał anty-PD-L1 dotyczyły wykorzystania ich w monoterapii, jednakże dalsze badania wskazały, że ich efektywność w niektórych przypadkach rośnie w kombinacji z chemioterapeutykami lub innymi przeciwciałami monoklonalnymi (Akinleye & Rasool, 2019). Dla przykładu, atezolizumab w kombinacji z vemurafenibem i cobimetinibem zwiększa czas wolny od postępu choroby o średnio 5 miesięcy u pacjentów z czerniakiem (E. Chang et al., 2021). Osoby chore na drobnokomórkowego raka płuc leczone durvalumabem w kombinacji z cisplatyną i etopozydem wykazywały średnio o 3 miesiące dłuższy czas przeżycia (FDA, 2020). Z kolei pacjenci cierpiący na raka nerki otrzymujący avelumab w kombinacji z axitinibem wykazywali czas wolny od postępu choroby średnio o ponad 5 miesięcy dłuższy w porównaniu do chemioterapii

sunitinibem (Motzer et al., 2019). Niestety, nie we wszystkich rodzajach nowotworów inhibicja PD-L1 przynosiła dobre rezultaty. Jako przykłady można wymienić raka trzustki, niektóre podtypy nowotworu piersi czy raka prostaty (Majidpoor & Mortezaee, 2021). Innym problemem jest fakt, że nawet wśród nowotworów które zostały wytypowane jako odpowiednie do leczenia inhibitorami PD-L1, nie u wszystkich pacjentów terapia taka przynosi spodziewane rezultaty (Q. Tang et al., 2022). Zjawisko to nazywa się opornością na inhibitory PD-L1 i można je podzielić na oporność pierwotną i nabytą. Oporność pierwotną odnosi się do pacjentów, którzy nie reagowali na terapię anti-PD-L1 od samego początku. Do przyczyn takiego stanu rzeczy zalicza się między innymi: silnie immunosupresyjne środowisko nowotworu (Antonios et al., 2017), niska immunogenność nowotworu (Kawakami et al., 2020), rearanżacje w genie *ALK* i mutacje epidermalnego czynnika wzrostu (EGFR) (Gainor et al., 2016) czy wykluczenie limfocytów T ze środowiska nowotworu (Mariathasan et al., 2018). Opornością nabytą określa się natomiast sytuację, w której pacjent początkowo dobrze reagował na terapię anti-PD-L1, jednakże z czasem skuteczność takiego leczenia znacznie zmalała. Wpływ na to mogą mieć: zjawisko „wyczerpania” (*ang. exhaustion*) i utraty funkcji efektorowych limfocytów T (Huang et al., 2017), zmiany ekspresji antygenów nowotworowych i składników mikrośrodowiska nowotworu (Bai et al., 2017; Veldman et al., 2020), a także ekspresja innych punktów kontroli układu odpornościowego, a tym samym ominięcie szlaku PD-1/PD-L1 (Koyama et al., 2016).

Inhibitory PD-L1 niewątpliwie odniosły ogromny sukces na polu terapii przeciwnowotworowych. Jednakże jak wskazano powyżej wciąż istnieje potrzeba rozwijania tej technologii, tak aby przezwyciężyć pojawiające się przeszkody. Dlatego też intensywnie rozwijane są inne niż przeciwciała monospecyficzne technologie celujące w PD-L1. Dla przykładu można wymienić przeciwciała bispecyficzne (np. PD-L1 x CTLA-4, PD-L1 x TIM3, PD-L1 x VEGF) (T. Fan et al., 2023), inhibitory peptydowe, inhibitory drobnocząsteczkowe, aptamery (J. Liu et al., 2021) czy technologie degradacji białek (Mikitiuk et al., 2023).

6. CEL PRACY

Celami pracy było:

- Wyprodukowanie białek (ROR-1, Mezetelina, PD-L1) i przeciwciał (anty-ROR-1, anty-Mezetelina, anty-PD-L1) referencyjnych w produkcji przejściowej lub stabilnych liniach komórkowych.
- Wyprodukowanie 4 symetrycznych przeciwciał bispecyficznych (w formie IgG1-ScFv₂ i IgG4-ScFv₂) ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1 w produkcji przejściowej i w stabilnych liniach komórkowych.
- Analiza parametrów fizyko-chemicznych wyprodukowanych białek i przeciwciał.
- Ocena potencjalnych różnic między przeciwciałami bispecyficznymi wyprodukowanymi w systemie przejściowym i w stabilnych liniach.
- Analiza poziomu ekspresji celów molekularnych (ROR-1, Mezetelina, PD-L1) na powierzchni wykorzystywanych komórek nowotworowych.
- Określenie wpływu przeciwciał bispecyficznych na indukcję lizy komórek nowotworowych (RL95-2, BT20, Panc1, Panc 05.04) przez ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) w odniesieniu do przeciwciał monospecyficznych i terapii kombinowanych.
- Ocena zmiany w profilu produkowanych cytokin przez komórki PBMC w ko-kulturze z komórkami nowotworowymi i w obecności przeciwciał bispecyficznych.
- Analiza subpopulacji limfocytów T CD4⁺ po ko-kulturze z komórkami nowotworowymi w obecności przeciwciał bispecyficznych.

7. MATERIAŁY I METODY

7.1. Materiały

7.1.1. Materiały zużywalne i odczynniki

7.1.1.1. Hodowle bakteryjne

Odczynniki wykorzystywane do hodowli bakteryjnych zostały wymienione w Tabeli 3.

Tabela 3 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach bakteryjnych

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Komórki kompetentne DH5 α	Thermo Fisher Scientific	EC0112
Podłoże LB	BTL	P-0279
Ampicylina	Cayman Chemical Company	14417
Kanamycyna	Carl Roth	T832.2
Agar bakteriologiczny	BTL	S-0001

7.1.1.2. Inżynieria genetyczna

Odczynniki wykorzystywane do prac związanych z inżynierią genetyczną (oczyszczanie, ligacja, analiza restrykcyjna DNA, PCR, elektroforeza DNA itp.) zostały wymienione w Tabeli 4.

Tabela 4 Odczynniki wykorzystywane do prac związanych z inżynierią genetyczną.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Zestaw do oczyszczania DNA (miniprep)	EURx	E3500
Zestaw do oczyszczania DNA (midiprep)	Thermo Fisher	K2100-04
Zestaw do oczyszczania DNA (maxiprep)	Thermo Fisher	K2100-07
Zestaw do oczyszczania DNA z żelu agarozowego	EURx	E3540
Zestaw do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych	EURx	E3520
Bufor Ligazy DNA T4	New England Biolabs	B0202S
Ligaza DNA T4	New England Biolabs	M0202

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Bufor CutSmart™	New England Biolabs	B7204S
BamHI-HF	New England Biolabs	R3136
XhoI	New England Biolabs	R0146
KpnI-HF	New England Biolabs	R3142
HindIII-HF	New England Biolabs	R3104
Sall	New England Biolabs	R0138
NheI-HF	New England Biolabs	R3131
NruI-HF	New England Biolabs	R3192
MluI-HF	New England Biolabs	R3198
Agaroza	Thermo Scientific	R0492
Midori Green	Nippon Genetics	MG04
2-propanol	Chempur	117515002
Polimeraza Phusion	New England Biolabs	M0530
Bufor 5x Phusion HF	New England Biolabs	B0518SVIAL
DMSO	New England Biolabs	B0515AVIAL
dNTP Mix	New England Biolabs	N0447
Startery	Genomed	N/D

7.1.1.3. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE i western blot

Odczynniki i materiały zużywalne wykorzystywane do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz analizy Western blot zostały wymienione kolejno w Tabeli 5 i Tabeli 6.

Tabela 5 Odczynniki wykorzystywane do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz analizy Western blot.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Akrylamid (Acryl/BIS™ 19:1)	VWR	0496
TRIS	Fisher Bioreagents	BP152-1
SDS	VWR	0227
Błękit bromofenolowy	VWR	0449
Gliceryna	Chempur	114433204
TEMED	VWR	0761
APS	VWR	M133

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
2-merkaptoetanol	VWR	0482
Glicyna	Sigma Aldrich	33226
Metanol	Chempur	116219904
Przeciwciała anty-ludzkie IgG, biotynylowane	Thermo Fisher	31789
Przeciwciała anty-HisTag biotynylowane	Southern Biotech	4603-08
Przeciwciała anty-mysie IgG skoniugowane z HRP	Thermo Fisher	31430
Koniugat streptawidyna-HRP	Pierce	21124
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
Mleko w proszku	PanReac AppliChem	A0830
NaCl	VWR	27810.295
KCl	VWR	0395
Na ₂ HPO ₄	Chempur	117992300
KH ₂ PO ₄	VWR	26925.295
TWEEN 20	VWR	M147

Tabela 6 Materiały zużywalne wykorzystywane do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz analizy Western blot.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Membrana PVDF	Cytiva	10600023
Bibuły do western blot	Cytiva	10426880

7.1.1.4. Chromatografia analityczna

Odczynniki i materiały zużywalne niezbędne do prowadzenia eksperymentów z zakresu chromatografii analitycznej zostały wymienione kolejno w Tabeli 7 i Tabeli 8.

Tabela 7 Odczynniki wykorzystywane do chromatografii analitycznej.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Kwas octowy	VWR	20104.334
Chlorek potasu	VWR	26925
Chlorek sodu	VWR	26925

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Na ₂ HPO ₄	VWR	TS44814
NaH ₂ PO ₄	VWR	470302-664
Octan sodu	VWR	0602
TRIS	Alfa Aesar	31801
TRIS-HCl	VWR	0234
Standard wielkości białek	Sigma Aldrich	69385

Tabela 8 Materiały zużywalne wykorzystywane do chromatografii analitycznej.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Kolumna, białko A	Tosoh	0023483
Kolumna SEC	Waters	186005226
Fiolki HPLC	Polygen	11 09 2275
Zakrętki do fiolek	Chrom4	C39RE-09B
Strzykawki 3 mL	Henke Sass Wolf	8300005762
Filtry strzykawkowe 0,22 µm	VWR	514-0073

7.1.1.5. Chromatografia preparatywna

Odczynniki i materiały zużywalne niezbędne do prowadzenia prac związanych z chromatografią preparatywną przedstawione są kolejno w Tabeli 9 i Tabeli 10.

Tabela 9 Odczynniki wykorzystywane do chromatografii preparatywnej

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Złoże – Protein A (MabSelect Sure)	Cytiva	17543804
Złoże niklowe (Ni Sepharose excel)	Cytiva	17371202
Kwas octowy	Carl Roth	T179
Imidazol	Aldrich Chemistry	I202
Na ₂ HPO ₄	VWR	TS44814
NaH ₂ PO ₄	VWR	470302-664
Chlorek sodu	VWR	26925
Wodorotlenek sodu	VWR	28244.295
TRIS	Alfa Aesar	31801

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
TRIS-HCl	VWR	0234

Tabela 10 Materiały zużywalne wykorzystywane do chromatografii preparatywnej

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Kolumna SEC (HiLoad 26/600 Superdex 200 µg)	Cytiva	28-9893-36
Kolumna ze złożem z niklem (HisTrap HP), 1 mL	Cytiva	17524701
Kolumna szklana	YMC	10/200MOV
Sterylizujące filtry kapsułowe 200 cm ²	mdi	DKS55101AARX301

7.1.1.6. ELISA

Odczynniki i materiały zużywalne wykorzystywane przy testach immunoenzymatycznych (ELISA) zostały wymienione kolejno w Tabeli 11 i Tabeli 12.

Tabela 11 Odczynniki wykorzystywane do testów ELISA.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
TMB	Sigma Aldrich	T0440
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
Przeciwciała anty-ludzkie IgG, biotynylowane	Thermo Fisher	31789
Przeciwciała anty-HisTag biotynylowane	Southern Biotech	4603-08
H ₂ SO ₄	POCH	575000115
TWEEN 20	VWR	M147

Tabela 12 Materiały zużywalne wykorzystywane do testów ELISA.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe	Thermo Fisher	439454
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025
Folia do płytek	greiner bio-one	676001

7.1.1.7. Linie komórkowe

Linie komórkowe użyte w projekcie zostały przedstawione w Tabeli 13.

Tabela 13 Linie komórkowe wykorzystywane w projekcie.

Linia komórkowa	Producent	Numer katalogowy
CHO-K1	ATCC	CCL-61
Freestyle 293F	Thermo Fisher	R79007
RL95-2	ATCC	CRL-1671
Panc-1	ATCC	CRL-1469
Panc 10.05	ATCC	CRL-2547
Panc 05.04	ATCC	CRL-2557
BT20	ATCC	HTB-19

7.1.1.8. Hodowle komórek zawieszonych

Odczynniki i materiały zużywalne wykorzystywane do hodowli komórek zawieszonych zostały wymienione kolejno w Tabeli 14 i Tabeli 15.

Tabela 14 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach komórek zawieszonych

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
BalanCD CHO Growth A	Fujifilm Irvine Scientific	94120
BalanCD HEK	Fujifilm Irvine Scientific	94137
L-glutamina	Carl Roth	HN08.3
G418 Disulfate	TOKU-E	G021-100ML
Higromycyna B	PAN Biotech	P06-08100
D-Glukozę	VWR	0188
OptiMEM	gibco	31985070
Polietylenoimina	Polysciences	23966
DMSO	Sigma Aldrich	2650
NaOH	STANLAB	011-002-00-6

Tabela 15 Materiały zużywalne wykorzystywane przy hodowlach komórek zawieszonych.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Kolby Erlenmeyera 125 mL	Nalgene	TMO4115-0125

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Kolby Erlenmeyera 250 mL	Corning	CLS431144
Kolby Erlenmeyera 500 mL	Corning	CLS431255
Kolby Erlenmeyera 1 L	Corning	CLS431147
Kolby Erlenmeyera 2 L	Corning	CLS431145
Płytki 96-dołkowe nieotraktowane	Greiner Bio-One	655161
Płytki 24-dołkowe nieotraktowane	VWR	734-2779
Płytki 6-dołkowe nieotraktowane	NEST	703001
Mini bioreaktor	Corning	431720
Zestaw do filtracji próżniowej 500 mL	Nalgene	566-0020
Zestaw do filtracji próżniowej 1 L	Nalgene	567-0020
Szkiełka do automatycznego licznika komórek	NanoEnTek	EVS-050
Kuwety do elektroporacji	BTX	45-0126
Krioprobówki	VWR	10018-754

7.1.1.9. Hodowle komórek adherentnych.

Odczynniki i materiały zużywalne niezbędne do hodowli komórek adherentnych zostały przedstawione kolejno w Tabeli 16 i Tabeli 17.

Tabela 16 Odczynniki wykorzystywane do hodowli komórek adherentnych.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
EMEM	PAN Biotech	P04-08056
DMEM:F12	PAN Biotech	P04-41250
RPMI-1640	PAN Biotech	P04-18047
DMEM	PAN Biotech	P04-03596
Ham's F12	PAN Biotech	P04-14500
FBS	PAN Biotech	P30-19375
Rekombinowana insulina ludzka	Sigma	I9278
Trypsyna-EDTA 0,25%	Thermo Fisher	25200-072

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
DPBS	PAN Biotech	P04-361000

Tabela 17 Materiały zużywalne wykorzystywane do hodowli komórek adherentnych.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Płytki 6-dołkowe traktowane	NEST	703001
Płytki 24-dołkowe traktowane	NEST	702001
Płytki 96-dołkowe traktowane	NEST	701001
Kolby 75 cm ² traktowane	VWR	734-2313
Zestaw do filtracji próżniowej 1 L	Nalgene	567-0020
Szkiełka do automatycznego licznika komórek	NanoEnTek	EVS-050
Krioprobówki	VWR	10018-754

7.1.1.10. Analiza zdolności blokowania ścieżki PD-1/PD-L1.

Odczynniki i materiały zużywalne niezbędne do przeprowadzenia analizy zdolności blokowania ścieżki PD-1/PD-L1 zostały przedstawione kolejno w Tabeli 18 i Tabeli 19.

Tabela 18 Odczynniki do analizy zdolności blokowania ścieżki PD-1/PD-L1.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Test blokady ścieżki PD-1/PD-L1	Promega	J1250
Odczynnik do wywoływania luminescencji Bio-Glo™	Promega	G7940

Tabela 19 Materiały zużywalne do analizy zdolności blokowania ścieżki PD-1/PD-L1.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe białe	Thermo Fisher	136101
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.1.11. Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC).

Odczynniki niezbędne w procesie izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) zostały przedstawione w Tabeli 20.

Tabela 20 Odczynniki wykorzystywane do izolacji komórek PBMC.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Medium z gradientem gęstości	Cytiva	17144002
DPBS	PAN Biotech	P04-361000
FBS	PAN Biotech	P30-19375
DMSO	Sigma Aldrich	2650
RPMI-1640	ATCC	30-2001

7.1.1.12. Cytometria przepływowa.

Odczynniki i materiały zużywalne wykorzystane w cytometrii przepływowej zostały wymienione kolejno w Tabeli 21 i Tabeli 22.

Tabela 21 Odczynniki wykorzystywane w cytometrii przepływowej

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Przeciwciało anty-ludzkie PD-L1	Thermo Fisher	14-5983-82
Przeciwciało anty-ludzkie ROR-1	Thermo Fisher	PA5-14725
Przeciwciało anty-ludzka Mezetelina	Thermo Fisher	MA551862
Przeciwciało anty-mysie IgG, wyznakowane PE	BD Biosciences	550589
Przeciwciało anty-królicze IgG, wyznakowane PE	Thermo Fisher	A10542
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
NaCl	VWR	27810.295
KCl	VWR	0395
Na ₂ HPO ₄	Chempur	117992300
KH ₂ PO ₄	VWR	26925.295
Etanol 96%	STANLAB	603-002-00-5

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
eBioscience™ Essential Human Treg Phenotyping Kit	ThermoFisher	A42925
eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506	ThermoFisher	65-0866-14
eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer	ThermoFisher	00-4222-26
UltraComp eBeads™ Compensation Beads	ThermoFisher	01-2222-42

Tabela 22 Materiały zużywalne wykorzystywane w cytometrii przepływowej

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Probówki do cytometru przepływowego	Corning	352008
Płytki 96-dołkowe, v-shape	Thermo Fisher Scientific	277143
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.1.13. Analiza cytotoksyczności w ko-kulturze PBMC/komórki nowotworowe.

Odczynniki i materiały zużywalne niezbędne do przeprowadzenia eksperymentów wykazujących zmiany w potencjale cytotoksycznym komórek PBMC w obecności badanych przeciwciał zostały przedstawione kolejno w Tabeli 23 i Tabeli 24.

Tabela 23 Odczynniki wykorzystywane w testach cytotoksyczności.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
FBS	PAN Biotech	P30-19375
EMEM	PAN Biotech	P04-08056
DMEM:F12	PAN Biotech	P04-41250
RPMI-1640	PAN Biotech	P04-18047
DMEM	PAN Biotech	P04-03596
MTT	PanReac AppliChem	A2231
SDS	VWR	0227
HCl	Chempur	115752837

Tabela 24 Materiały zużywalne wykorzystywane w testach cytotoxycności.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe traktowane	NEST	701001
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.1.14. Analiza poziomu cytokin.

Odczynniki i materiały zużywalne niezbędne do przeprowadzenia analizy poziomu cytokin w hodowlach komórkowych zostały przedstawione kolejno w Tabeli 25 i Tabeli 26.

Tabela 25 Odczynniki wykorzystywane do analizy poziomu cytokin.

Odczynnik	Producent	Numer katalogowy
Human Granzyme B DuoSet ELISA	R&D Systems	DY2906-05
Human IL-2 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY202-05
Human TNF-alpha DuoSet ELISA	R&D Systems	DY210-05
Human IFN-gamma DuoSet ELISA	R&D Systems	DY285B-05
Human IL-10 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY217B-05
TMB	Sigma Aldrich	T0440
BSA	Fisher Bioreagents	BP9702
H ₂ SO ₄	POCH	575000115
TWEEN 20	VWR	M147

Tabela 26 Materiały zużywalne wykorzystywane do analizy poziomu cytokin.

Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Przedmiot	Producent	Numer katalogowy
Płytki 96-dołkowe	Thermo Fisher	439454
Rezerwuary na odczynniki do pipet wielokanałowych	BIOLOGIX	25-1025

7.1.2. Aparatura

Lista aparatury wykorzystanej do wykonania badań została przedstawiona w Tabeli 27.

Tabela 27 Lista aparatury wykorzystanej przy realizacji projektu

Aparatura	Model	Producent
Inkubator CO ₂ z wytrząsaniem	New Brunswick S41i	Eppendorf
Inkubator CO ₂	CellXpert C170	Eppendorf
Inkubator CO ₂	INCO108med	Memmert
Inkubator z wytrząsaniem	AI 70 Minitron	Infors
Wirówka	MPW-352R	MPW
Wirówka	5415 R	Eppendorf
Wirówka preparatywna	J2 - 21M	Beckman
Chromatograf wysokociśnieniowy	Vanquish UHPLC system + CDS Chromeleon 7.2	Thermo Fisher Scientific
Chromatograf preparatywny	AKTA Pure 25	GE Healthcare
Czytnik mikroplątek	Spark	Tecan
Komora laminarna	BIO130 A2	Alpina
Zestaw jednokanałowych pipet automatycznych (0,1 – 2,5 µL; 2 – 20 µL; 20 – 200 µL; 100 – 1000 µL; 0,5 – 5 mL)	Research plus	Eppendorf
Pipeta 12-kanałowa 30 - 300 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 12-kanałowa 10 - 100 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 8-kanałowa 30 - 300 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 8-kanałowa 10 - 100 µL	Research plus	Eppendorf
Pipeta 8-kanałowa 0,5 – 10 µL	Research plus	Eppendorf
Automatyczny licznik komórek	EVE	NanoEnTek
Mikroskop	VisiScope IT415 PH + kamera VisiCam 5.0 plus	VWR
Mikroskop konfokalny	SP8X	Leica

Aparatura	Model	Producent
Cytometr przepływowy	FACScalibur	BD Biosciences
System wizualizacji membran i żeli	ChemiDoc	BIO-RAD
Transiluminator	Fast Gene Blue/White LED Tab	Nippon Genetics
System do elektroforezy w żelu agarozowym	Mini Gel II	VWR
System do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD
Zasilacz do elektroforezy	PowerPro 3AMP	Cleaver Scientific
System do transferu western blot	Trans-Blot Turbo	BIO-RAD
Zamrażarka niskotemperaturowa	U445 2.5	Telstar
Elektroporator	GenePulser xCell	BIO-RAD
Termocykler	System CFX 96 Touch C1000 Touch Thermal Cycler	BIO-RAD
Spektrometr UV-VIS	UV-1600PC	VWR
pH-metr	FiveEasy Plus FP20	Mettler Toledo
Konduktometr	SevenCompact S231	Mettler Toledo
Waga laboratoryjna	PS 4500.3Y.M	RADWAG
Waga analityczna	AS 60/220.X2	RADWAG
System do demineralizacji wody	HLP 5UV	Hydrolab
Autoklaw	Vapour Line 135 EU	VWR
Dewar	BSS-750	VWR
Wytrząsarka	3500 Advanced Orbital Shaker	VWR
Wytrząsarka	Rocker 2D Basic	VWR
Mieszadło magnetyczne	MR HEI-TEC	Heidolph
Worteks	REAX TOP	VWR
Pompa próżniowa	Rocker 400	Rocker

7.2. Metody

7.2.1. Projektowanie konstruktów genetycznych

W ramach prac zaprojektowano konstrukty genetyczne dla przeciwciał bispecyficznych, monospecyficznych i receptorów które te przeciwciała mają wiązać. Sekwencje aminokwasowe, wraz ze źródłem pochodzenia zostały przedstawione w Tabeli 28.

Tabela 28. Źródłowe sekwencje aminokwasowe z których projektowane były konstrukty genetyczne.

<p>Przeciwciało anty-ROR-1 (Wniosek patentowy: WO2016172726A1)</p> <p>łańcuch ciężki</p> <p>QVQLQQSGAELRPGASVTLCKASGYTFSDYEMHWVIQTPVHGLEWIGAI DPETGGTAYNQKFKGKAILT ADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTGYDYDSFTYWGQGT LVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD</p> <p>łańcuch lekki</p> <p>DIVMTQSQKIMSTTVGDRVSITCKASQNVDA AVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGT DFTLTISNMQSEDLADYFCQQYDIYPYTFGGG TKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p>
<p>Przeciwciało anty-Mezotelina (Wniosek patentowy: US8206710B2)</p> <p>łańcuch ciężki</p> <p>QVQLQQSGPELEKPGASWKISCKASGYSFTGYTMNWWKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKA TLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAWYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPWTWSSASTKGPSWFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVD</p> <p>łańcuch lekki</p> <p>DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLGAVPGRFSGSGNSY SLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL TLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC</p>
<p>Przeciwciało anty-PD-L1 (Atezolizumab) (Numer dostępu Drugbank: DB11595)</p>

Łańcuch ciężki

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVWISPYGGSTYYADSVKGRFT
 ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Łańcuch lekki

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFT
 LTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ROR-1 ektodomena aminokwasy 30-406 (Numer dostępu Uniprot: Q01973)

QETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQ
 EPRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPY
 RGIACARFIGNRTVYMESELMQGEIENQITAFTMIGTSSHLSKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPR
 DLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYNST
 GVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDE
 NFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILY

Mezotelina ektodomena aminokwasy 296-580 (Numer dostępu Uniprot: Q13421)

EVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPES
 VIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSELETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLAFYP
 GYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLK
 ALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGL
 QG

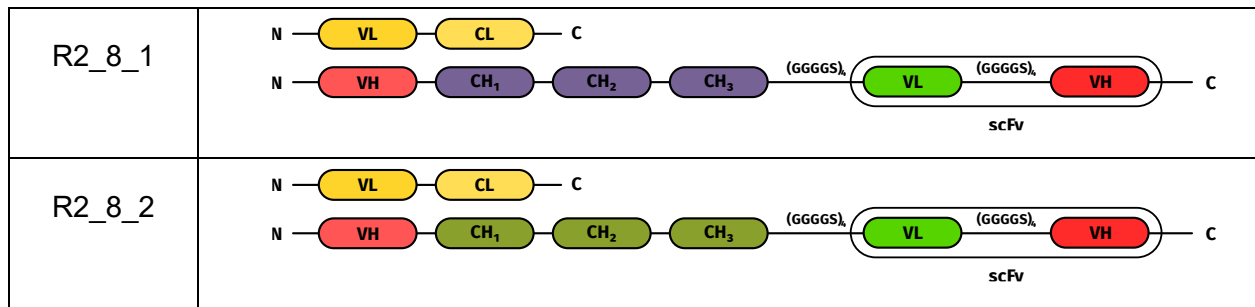
PD-L1 ektodomena aminokwasy 19-238 (Numer dostępu Uniprot: Q9NZQ7)

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLK
 DQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGY
 PKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVPELPLAHP
 PNER

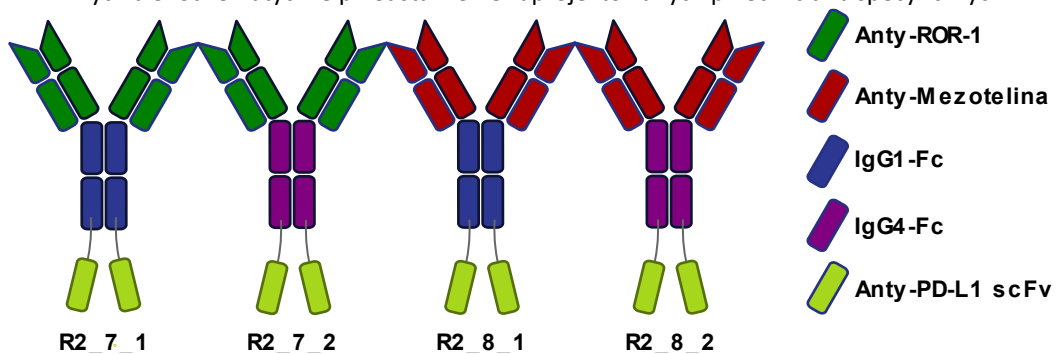
Przeciwciała bispecyficzne projektowane były w formie symetrycznym, w którym scFv celujące w PD-L1 podłączone jest do C-końca domeny CH3 przeciwciała anty-ROR-1 lub anty-Mezotelina. Dla obu przeciwciał bispecyficznych zastosowano dwa rodzaje fragmentu Fc – IgG1 i IgG4, otrzymując tym samym 4 przeciwciała bispecyficzne: R2_7_1 (anty-ROR-1/anty-PD-L1 IgG1), R2_7_2 (anty-ROR-1/anty-PD-L1 IgG4), R2_8_1 (anty-Mezotelina/anty-PD-L1 IgG1), R2_8_2 (anty-Mezotelina/anty-PD-L1 IgG4). Przeciwciała monospecyficzne zaprojektowano w formie IgG1 – R1_A6 (anty-PD-L1, atezolizumab), R1_A7 (anty-ROR-1), R1_A8 (anty-Mezotelina). Do ektodomen receptorów przyłączony został fragment Fc IgG1 (do oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na białku A) oraz His-Tag (6-krotnie powtórzony aminokwas histydyna – do celów analitycznych). Schematyczne przedstawienie konstruktów genetycznych zestawione zostało w Tabeli 29, natomiast schematyczne przedstawienie formatu przeciwciał bispecyficznych na Rycinie 5.

Tabela 29. Schematyczne przedstawienie zaprojektowanych konstruktów genetycznych.

Białko	Schemat zaprojektowanego konstrukt genetycznego
PD-L1	
ROR-1	
Mezotelina	
R1_A6	
R1_A7	
R1_A8	
R2_7_1	
R2_7_2	



Rycina 5. Schematyczne przedstawienie zaprojektowanych przeciwciał bispecyficznych.



Zaprojektowane konstrukty genetyczne zostały zsyntezowane zewnątrz, przez firmę Eurofins Genomics oraz dostarczone w dostępnych komercyjnie wektorach do klonowania udostępnianych przez dostawcę: pEX-A128 lub pEX-A258, warunkujących oporność na ampicylinę. Otrzymane liofilizaty plazmidów zostały zawieszono w buforze Tris-EDTA (TE), w objętości koniecznej do uzyskania stężenia 100 ng/ μ L, a następnie wykorzystane do transformacji komórek kompetentnych.

7.2.2. Hodowla bakteryjna i przygotowanie komórek kompetentnych

Komórki *E. coli* DH5 α hodowano w pożywce LB, wzbogaconej ampicyliną (100 μ g/mL). W przypadku komórek nietransformowanych nie dodawano antybiotyków. Jeśli nie wskazano inaczej, hodowlę prowadzono przez noc w temperaturze 37°C, przy wytrząsaniu 180 RPM w inkubatorze Infors AI 70 Minitron.

Z nocnej hodowli komórek DH5 α przygotowano świeżą hodowlę o objętości 120 mL, rozcieńczając ją w stosunku 1:100 (v/v). Gdy OD₆₀₀ osiągnęło wartość między 0,8 a 1,0, komórki odwirowano przy 4000 RCF przez 10 minut w temperaturze 4°C. Supernatant usunięto, a osad zawieszono w 10 mL zimnego, 100 mM chlorku magnezu. Następnie komórki ponownie odwirowano. Procedurę płukania chlorkiem magnezu i wirowania powtórzono. Komórki zawieszono w 10 mL zimnego, 100 mM chlorku wapnia i inkubowano na lodzie przez 10 minut. Komórki odwirowano przy 4000 RCF przez 10 minut w temperaturze 4°C. Po usunięciu

supernatantu, osad zawieszono w 4 mL zimnego roztworu 100 mM chlorku wapnia z 20% glicerolu. Uzyskaną zawiesinę rozdzielono do mikroprobówek wirówkowych po 50 μ L i zamrożono w temperaturze -80°C .

7.2.3. Transformacja

Do transformacji komórek kompetentnych stosowano zwykle 100 ng DNA plazmidowego. Transformacja prowadzona była metodą szoku cieplnego, zgodnie z informacjami przedstawionymi w Tabeli 30.

Tabela 30 Warunki transformacji komórek kompetentnych

Warunki	Czas
Lód	30 minut
42°C	45 sekund
Lód	2 minuty
0,5 mL LB bez antybiotyków, 37°C	25 – 45 minut
LB z ampicyliną; 37°C ; 5 - 10 mL z wytrząsaniem 180 RPM dla hodowli zawiesinowych lub szalka Petriego dla hodowli na podłożu stałym	Hodowla przez noc

7.2.4. Oczyszczanie DNA

Plazmidowy DNA przeznaczony do dalszych procesów klonowania zostało oczyszczone przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji plazmidowego DNA, zgodnie z zaleceniami producenta (EURx).

Podobnie, w przypadku izolacji plazmidowego DNA w większej skali, które miało być stosowane do elektroporacji lub przejściowej produkcji białek na kolejnych etapach badań, zastosowano komercyjny zestaw do oczyszczania plazmidowego DNA. Zestaw ten zapewnia odpowiednią czystość preparatu, niezbędną do wymienionych zastosowań. Proces oczyszczania przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta (Thermo Fisher Scientific).

Oczyszczanie fragmentów DNA wyciętych z żelu agarozowego oraz po reakcjach enzymatycznych (trawienie restrykcyjne) odbywało się z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów przeznaczonych do tego typu zastosowań; oczyszczanie prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (EURx).

7.2.5. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi było prowadzone według zaleceń producenta enzymów (New England Biolabs). Warunki przykładowej reakcji trawienia zostały przedstawione poniżej (Tabela 31).

Tabela 31 Warunki przykładowej reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi

Warunek	Wartość
BamHI-HF	0,5 μ L
XhoI	1 μ L
DNA plazmidowe	10 μ L
Bufor CutSmart 10x	2 μ L
Woda	6,5 μ L
Temperatura inkubacji	37°C
Czas trawienia	\geq 60 minut

W przypadku rutynowego trawienia restrykcyjnego stosowano 1-2 U/ μ g DNA.

Linearyzacja plazmidowego DNA do przeznaczonego do dalszych prac z hodowlami ssaczymi była przeprowadzana z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych w stosunku 0,5 – 1 U/ μ g DNA przez noc. Całkowita objętość reakcji była tak dobrana, aby objętość użytych enzymów nie przekraczała 10% całkowitej objętości reakcji. Objętość buforu do trawienia została odpowiednio dostosowana, aby uzyskać końcowe stężenie buforu na poziomie 1x.

7.2.6. Elektroforeza w żelu agarozowym

Elektroforeza w żelu agarozowym (długość 6 cm, 1% agaroz) była prowadzona przy użyciu buforu TAE pod napięciem 100 V przez 30-40 minut. Po elektroforezie, żel barwiono przez 15-25 minut (midori Green) i wizualizowano w świetle niebieskim.

7.2.7. Ligacja

Konstrukty genetyczne wycięte z dostarczonych plazmidów do klonowania lub przygotowane poprzez ligację elementów pozyskanych z biblioteki elementów genetycznych zostały wklonowane do plazmidów do ekspresji: pcDNA3.1(+) (ThermoFisher Scientific) – do produkcji przejściowej, pREC3G (Recepton) lub pREC3H (Recepton) – do produkcji w stabilnych liniach komórkowych.

Ligację prowadzono z wykorzystaniem rekombinowanej ligazy faga T4 (New England Biolabs), w warunkach kontrolowanej temperatury. Stosunek molowy wstawki DNA do wektora zawierał

się w zakresie 5:1 do 10:1. Stosowano 80-100 ng wektora. Przykładowe warunki ligacji przedstawiono w Tabeli 32.

Tabela 32 Przykładowe warunki ligacji fragmentu DNA do wektora.

Element	Wartość
Fragment DNA	15 μ L
Wektor	2 μ L
Ligaza	1 μ L
Bufor 10x	2 μ L
Temperatura	21°C
Czas	1 h

Po zakończonej ligacji całość mieszaniny ligacyjnej była użyta do transformacji komórek kompetentnych i wysiewana na szalki Petriego.

7.2.8. Reakcja PCR

Startery do reakcji PCR syntetyzowane były zewnętrznie (Genomed lub SigmaAldrich). Przykładowy skład mieszaniny reakcyjnej oraz schemat reakcji przedstawione zostały kolejno w Tabeli 33 i Tabeli 34.

Tabela 33 Przykładowy skład mieszaniny do reakcji PCR

Składnik	Objętość [μ L]
Polimeraza Phusion (New England Biolabs)	0,2
Bufor do reakcji (5x)	4
Mieszanina dNTPs	1
Starter Forward (roztwór 10 μ M)	2
Starter Reverse (roztwór 10 μ M)	2
Matryca (1 ng/ μ L)	1
Woda	9,8

Tabela 34 Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR

Temperatura [°C]	Czas [s]	
98	180	
98	20	x30
60	30	
72	15	

Temperatura [°C]	Czas [s]
72	300
10	∞

7.2.9. Elektrofreza w żelu poliakrylamidowym (SDS-Page)

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) prowadzono w buforze TRIS-glicyna (skład 10x stężonego buforu przedstawiony w Tabeli 35).

Tabela 35 Składniki buforu do elektroforezy SDS-PAGE

Składnik buforu	Ilość
TRIS	30,29 g
Glicyna	144 g
SDS	10 g
Woda dejonizowana	Do końcowej objętości 1000 mL

Do przeprowadzenia rozdzielania stosowano żele poliakrylamidowe – żel zagęszczający 5%, żel rozdzielający 10% lub 12%. Składniki żeli zostały przedstawione kolejno w Tabeli 36 i Tabeli 37.

Tabela 36 Skład 10% i 12% poliakrylamidowych żeli rozdzielających.

Składnik żelu rozdzielającego	Objętość – żel 10% [mL]	Objętość – żel 12% [mL]
Woda dejonizowana	2,400	2,150
Acrylamide/N,N'-methylene-bis-acrylamide mix	1,250	1,500
Tris (1,5 M; pH 8,8; SDS-0,39% w/v)	1,300	1,300
APS 10%	0,050	0,050
TEMED	0,004	0,004

Tabela 37 Skład 5% poliakrylamidowego żelu zagęszczającego.

Składnik żelu zagęszczającego	Objętość – żel 5% [mL]
Woda dejonizowana	1,470
Acrylamide/N,N'-methylene-bis-acrylamide mix	0,250
Tris (1,0 M; pH 6,8; SDS-0,39% w/v)	0,260
APS 10%	0,020
TEMED	0,002

Elektroforezę prowadzono zarówno w warunkach redukujących, jak i nieredukujących. W obu wypadkach do odpowiedniej ilości białka (zwykle między 1-3 μg) dodawano 5x stężony bufor do próbek (250 mM TRIS, 40% glicerol (v/v), 8% SDS (w/v), 0,1% błękit bromofenolowy (w/v); w przypadku warunków redukujących dodatkowo 5% 2-merkaptoetanolu (v/v)) w stosunku 4:1 (v/v)) do stężenia 1x, a następnie podgrzewano przez 5 min w 95°C.

Rozdział prowadzono stosując napięcie 120 V przez 20 minut (wyjście próbek z żelu zagęszczającego), a następnie zwiększano napięcie do 180 V. Po zakończonym rozdziale żel inkubowany był przez 15 – 30 minut w barwniku (FastGene Q-Stain), a następnie odbarwiany wodą dejonizowaną (1 – 24 h).

7.2.10. Określanie stężenia białek posiadających fragment Fc wykorzystaniem ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej

Stężenia białek zawierających fragment Fc było określane przy użyciu ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (UPLC), z zastosowaniem kolumny z wypełnieniem oplotaszczonym białkiem A (Tosoh), co umożliwia analizę próbek bez konieczności ich wcześniejszego oczyszczania. Próbkę hodowli była wirowana przy 4400 RCF przez 5 minut, po czym uzyskany supernatant był filtrowany przez filtr strzykawkowy z hydrofilową membraną (PES lub PVDF) o porach nie większych niż 0,22 μm .

Na zrównoważoną kolumnę (bufor równoważący: 20 mM NaHPO₄ + 150 mM NaCl, pH 7,0) aparat automatycznie nastrzykiwał 10 x 0,1 mL próbki. Po nastrzyku kolumna była ponownie płukana buforem równoważącym, a następnie białka eluowano 100 mM kwasem octowym, pH 3,0.

Stężenie białka było określane poprzez porównanie powierzchni pików analizowanej próbki do krzywej kalibracyjnej.

7.2.11. Analityczna chromatografia wykluczania

Analityczna chromatografia wykluczania (SEC) była stosowana do określania wielkości białek i czystości preparatu. Przed rozpoczęciem analizy kolumna (ACQUITY UPLC Protein BEH SEC, Waters) została zrównoważona buforem 100 mM NaHPO₄, pH 6,8, przy przepływie 0,3 mL/min. Na kolumnę nastrzykiwano wcześniej przefiltrowany (membrana PES/PVDF, 0,22 μm) lub zwirowany (16000 RCF, 10 min) preparat białka, zawierający około 10 μg analizowanego białka. Analiza była przeprowadzana przy przepływie 3 mL/min. Masa molekularna została określona przez porównanie czasu retencji analizowanej próbki z czasem retencji pików wzorca (Protein Standard Mix, Sigma Aldrich).

7.2.12. Hodowle komórkowe

7.2.12.1. Linie ssaczych komórek zawieszinowych

Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli i składu medium hodowlanego dla ssaczych linii komórek zawieszinowych przedstawione zostały w Tabeli 38.

Tabela 38 Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli ssaczych komórek zawieszinowych.

Nazwa linii	Pochodzenie	Medium i suplementacja	Warunki hodowli	Pasaż
CHO K1	Jajnik chomiczaka pręgowanego	BalanCD CHO + 8mM L-glutamina +/- antybiotyki do selekcji (genetycyna lub higromycyna) – jeśli potrzebne	37°C, 8% CO ₂ , wytrząsanie 135 RPM (przy orbicie 25 mm)	0,15 – 0,6 x 10 ⁶ komórek /mL
Freestyle 293F	Ludzkie, embrionalne komórki nerki	BalanCD HEK + 4mM L-glutamina	37°C, 8% CO ₂ , wytrząsanie 135 RPM (przy orbicie 25 mm)	0,15 – 0,6 x 10 ⁶ komórek /mL

7.2.12.2. Linie ludzkich nowotworowych komórek adherentnych.

Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli i składu medium hodowlanego dla ludzkich, nowotworowych linii komórek adherentnych przedstawione zostały w Tabeli 39.

Tabela 39 Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych.

Nazwa linii	Pochodzenie	Medium i suplementacja	Warunki hodowli	Pasaż
Panc-1	Nowotwór trzustki	DMEM + 10% FBS	37°C, 5% CO ₂	PAS 1:2 do 1:4
Panc 10.05	Gruzołakorak trzustki	RPMI1640 + 15% FBS + 10 U/mL ludzkiej insuliny	37°C, 5% CO ₂	PAS 1:2 do 1:4
Panc 05.04	Gruzołakorak trzustki	RPMI1640 + 15% FBS + 20 U/mL ludzkiej insuliny	37°C, 5% CO ₂	PAS 1:2 do 1:5
RL95-2	Nowotwór endometrium macicy	DMEM:F12 + 10% FBS + 0,005 mg/mL ludzkiej insuliny	37°C, 5% CO ₂	PAS 1:2 do 1:5
BT20	Nowotwór piersi	EMEM + 10% FBS	37°C, 5% CO ₂	PAS 1:2 do 1:4

7.2.12.3. Hodowla komórek zawiesinowych

7.2.12.3.1. Rozmrażanie banków komórek zawiesinowych

Banki komórkowe wyjęte z ciekłego azotu były inkubowane w 37°C, w łaźni wodnej i aż do momentu całkowitego rozmrożenia banku. Następnie, były one przeniesione pod komorę laminarną, gdzie sterylnie były transferowane do odpowiedniego, wcześniej przygotowanego i nagrzanego do 37°C medium hodowlanego. Zwykle, bank zawierał 10×10^6 komórek, a objętość medium hodowlanego wynosiła 30mL, tym samym stężenie komórek w hodowli po rozmrożeniu wynosiło w przybliżeniu $0,3 \times 10^6$ komórek/mL.

7.2.12.3.2. Pasażowanie komórek zawiesinowych

Komórki zawiesinowe pasażowane były po upływie czasu zależnym od gęstości inokulacji przy poprzednim pasażu. Przy planowanym pasażu co 2 dni gęstości inokulacji wynosiła $0,6 \times 10^6$ komórek/mL, co 3 dni – $0,3 \times 10^6$ komórek/mL, co 4 dni – $0,15 \times 10^6$ komórek/mL.

Przed rozpoczęciem procedury przygotowywania medium mierzono stężenie komórek w hodowli z wykorzystaniem automatycznego licznika komórek Eve (NanoEntek). Następnie, w sposób aseptyczny, przygotowywano odpowiednią objętość medium, w zależności od dalszych potrzeb. Medium pozostawiano do ogrzania w 37°C przez co najmniej 2 godziny. Finalnie odpowiednią objętość hodowli przenoszono do świeżego medium i hodowano zgodnie z informacjami zawartymi w Tabeli 34. Hodowle prowadzono w jednorazowych, sterylizowanych fabrycznie kolbach Erlenmeyera (Thermo Fisher Scientific, Corning), oraz na wczesnych etapach rozwoju linii komórkowych, w mini bioreaktorach o pojemności 50 mL (Corning). Objętość robocza wynosiła maksymalnie połowę nominalnej pojemności kolby, natomiast w przypadku mini bioreaktorów, objętość robocza stanowiła 10% ich nominalnej pojemności.

7.2.12.3.3. Przygotowywanie banków komórek zawiesinowych

Banki komórek zawiesinowych przygotowywane były w standardowym medium hodowlanym z dodatkiem 10% DMSO. Docelowa ilość komórek w każdym z banków wynosiła 10×10^6 komórek, przy objętości banku równej 1mL.

Objętość hodowli niezbędna do przygotowania określonej liczby banków była wirowana przy 200 RCF przez 5 minut. Następnie usuwano supernatant i zawieszano osad komórkowy w zimnym medium przeznaczonym do bankowania, po czym porcjowano go do krioprobówek. Krioprobówki inkubowano w Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific) przez 15 minut w temperaturze 4°C, następnie w -80°C przez noc, a ostatecznie przenoszono je do przechowywania w fazie gazowej ciekłego azotu.

7.2.12.4. Hodowla komórek adherentnych

7.2.12.4.1. Rozmrażanie banków komórek adherentnych

Banki komórkowe wyjęte z ciekłego azotu były inkubowane w 37°C, w łaźni wodnej i aż do momentu całkowitego rozmrożenia banku. Następnie, były one przeniesione pod komorę laminarną, gdzie sterylnie były transferowane do odpowiedniego, wcześniej przygotowanego, zimnego medium hodowlanego (9mL, w 15mL probówce). Następnie mieszanina była wirowana (125 RCF, 7 minut), supernatant usunięty, a pozostały osad komórkowy zawieszony w 15mL, nagrzanego do 37°C, medium hodowlanego. Tak przygotowaną hodowlę przenoszono następnie do butelki hodowlanej o powierzchni wzrostowej 75 cm² i pozostawiono w inkubatorze bez wytrząsania (37°C, 5% CO₂).

7.2.12.4.2. Pasażowanie hodowli komórek adherentnych.

Przed rozpoczęciem faktycznego procesu pasażowania komórek adherentnych przygotowywano najpierw wszystkie odczynniki niezbędne do pracy (medium hodowlane, trypsyna, dPBS) i ogrzewano je do 37°C, przez minimum 2 godziny. Po upływie tego czasu usuwano z nad komórek stare medium hodowlane, komórki przepłukiwano 10mL dPBS (w celu usunięcia resztek FBS, który hamuje działanie trypsyny), dodawano 2-3mL trypsyny, a następnie pozostawiano w inkubatorze (37°C, 5% CO₂) na 5-15 minut, w zależności od tempa odklejania się komórek od powierzchni płytki. W momencie, gdy zauważono odklejenie większości komórek (potwierdzone obserwacją pod mikroskopem), do komórek dodawano medium hodowlane do końcowej objętości 10mL. Następnie dokonywano pomiaru stężenia komórek i przenoszono je do świeżego medium hodowlanego w objętości zależnej od dalszych planowanych prac. Wszystkie stosowane media posiadały dodatek czerwieni fenolowej, dlatego też w toku hodowli, jeżeli zauważono wyraźne zażółcenie hodowli (świadczące od zakwaszeniu środowiska, które może być szkodliwe dla prawidłowego wzrostu) – wymieniano medium na świeże (zwykle co 2-3 dni). Do kolejnego pasażu przystępowano po osiągnięciu przez hodowlę co najmniej 70% stopnia konfluencji.

7.2.12.4.3. Przygotowywanie banków komórek adherentnych

Banki komórek adherentnych przygotowywane były w standardowym medium hodowlanym z dodatkiem 5% DMSO. Docelowa ilość komórek w każdym z banków wynosiła 2-4 x 10⁶ komórek, przy objętości banku równej 1mL.

Hodowle przygotowywano zgodnie z opisem w punkcie 6.2.12.4.2, do momentu pomiaru komórek – odpowiednią objętość hodowli przenoszono do sterylnej probówki i wirowano (125RCF, 7 minut). Następnie usuwano supernatant i zawieszano osad komórkowy w zimnym

medium przeznaczonym do bankowania, po czym porcjowano go do krioprobówek. Krioprobówki inkubowano w aparacie Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific) przez 15 minut w temperaturze 4°C, następnie w -80°C przez noc, a ostatecznie przenoszono je do przechowywania w fazie gazowej ciekłego azotu.

7.2.13. Produkcja białek w ssących komórkach zawieszinowych

7.2.13.1. Produkcja białek w stabilnych liniach komórkowych CHO K1

7.2.13.1.1. Transfekcja komórek CHO K1

Do transfekcji komórek CHO K1 wykorzystywano metodę elektroporacji. Komórki były pasażowane co najmniej 2-krotnie przed przystąpieniem do transfekcji. Stosowane DNA było liniowe (linearyzacja zgodnie z punktem 6.2.5) i oczyszczone z użyciem właściwego zestawu do oczyszczania (zgodnie z punktem 6.2.4). Warunki elektroporacji zostały zestawione w Tabeli 40.

Tabela 40 Parametry elektroporacji komórek CHO K1

Parametr	Wartość
Napięcie [V]	300
Czas pulsu [ms]	18
Ilość pulsów	1
Przerwa między pulsami	N/D
Szerokość kuwety [mm]	4
Ilość komórek [mln]	1
Objętość elektroporacji [μ L]	400
Stężenie komórek [mln kom./mL]	2,5
Ilość DNA [μ g]	5 - 25
Medium do elektroporacji	OptiMEM
Objętość po elektroporacji [mL]	3,4

Bezpośrednio po elektroporacji komórki przeniesione były na 6-dołkową płytkę hodowlaną i umieszczone w inkubatorze (37°C, 8% CO₂), w medium bez selekcji. Następnego dnia do wszystkich dołków dodawano medium z obecnymi antybiotykami, na które oporność warunkowały stosowane plazmidy (genetycyna, higromycyna lub oba). Następnie w dniu 3 i 5 od procesu transfekcji stopniowo zwiększano stężenie antybiotyków (stężenie dobierane na podstawie obrazu mikroskopowego hodowli), by w końcu w dniu 5 przenieść hodowle z 6-dołkowych płytek do mini-bioreaktorów (objętość hodowli 5mL, 37°C, 8% CO₂, wytrząsanie 135

RPM). Od tego momentu dalsze zwiększanie, utrzymywanie stałego lub zmniejszanie stężenia antybiotyków zależało od kondycji hodowli – głównym parametrem oceny był wzrost komórek i ich żywotność. Zwiększanie stężenia następowało do momentu osiągnięcia bardzo niskiej żywotności przez hodowlę kontrolną (elektroporowaną bez dodatku DNA warunkującego oporność na antybiotyki) – poniżej 30%. Po zakończeniu selekcji weryfikowano skuteczność transfekcji poprzez analizę ilości produkowanego białka – dla białek posiadających fragment Fc poprzez UHPLC (opisane w sekcji 6.2.10).

7.2.13.1.2. Produkcja białek w stabilnych liniach CHO K1

Produkcja białek w stabilnych liniach komórkowych CHO K1 odbywała się poprzez rozmrożenie banku komórkowego oraz ekspansję inokulum, prowadzoną zgodnie z ogólnymi zasadami hodowli komórek CHO (sekcja 6.2.12 i następujące podsekcje). Hodowla produkcyjna była prowadzona przez 7-10 dni, w zależności od jej kondycji, tj. żywotności komórek.

Żywotność komórek oraz stężenie glukozy w hodowli mierzono w dniu 3., 5. i 7., a także w miarę możliwości, przy wydłużonych hodowlach, w każdym kolejnym po dniu 7. W zależności od wyniku pomiaru, stężenie glukozy uzupełniano do poziomu 4 g/L poprzez dodanie sterylnego roztworu glukozy o stężeniu 0,2 g/L.

Ostatniego dnia hodowli ponownie mierzono parametry hodowli (liczbę komórek, żywotność komórek, stężenie glukozy), po czym całą objętość wirowano przy (średnio) około 7750 RCF. Ostatnim krokiem odzysku pierwotnego była filtracja przez sterylizujący filtr kapsułowy z hydrofilową membraną PES lub PVDF o porach nie większych niż 0,22 μm . Tak uzyskany filtrat poddawano dalszemu oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa lub mrożono w temperaturze -80°C do późniejszego oczyszczenia.

7.2.13.2. Produkcja białek w systemie przejściowym w komórkach Freestyle293F

Komórki Freestyle293F hodowano w odpowiedniej objętości (sekcja 6.2.12 i następujące podsekcje), aby ich stężenie w dniu transfekcji nie przekroczyło 3×10^6 komórek/mL. Komórki pasażowano do 90% końcowej, zakładanej objętości hodowli przy gęstości 10×10^6 komórek/mL. Pozostałe 10% medium pozostawiano w temperaturze pokojowej. Adaptacja komórek do świeżego medium trwała co najmniej 3 godziny. W pozostawionych 10% medium zawieszano DNA i odczynnik do transfekcji (PEI 25K linear, Polysciences) w stosunku 1 μg DNA na 1 milion komórek oraz 30 μL odczynnika o stężeniu 1 mg/mL na 10 mL hodowli. Tak przygotowane medium pozostawiano na 30 minut w celu uformowania kompleksów DNA-PEI. Po zakończeniu inkubacji mieszaninę medium-DNA-PEI przenoszono do hodowli, tym samym uzyskując 100% zakładanej objętości. Hodowla prowadzona była od 5-10 dni, w zależności od jej kondycji. W

dniach 3, 5 i 7 mierzono stężenie komórek, ich żywotność oraz stężenie rozpuszczonej glukozy – w miarę potrzeby suplementowano hodowlę 0,2 g/L roztworem glukozy do finalnego stężenia 4 g/L. Ostatniego dnia hodowli ponownie mierzono parametry hodowli (liczbę komórek, żywotność komórek, stężenie glukozy), po czym całą objętość wirowano przy średnio około 7750 RCF. Ostatnim krokiem odzysku pierwotnego była filtracja przez sterylizujący filtr kapsułowy z hydrofilową membraną PES lub PVDF o porach nie większych niż 0,22 μm . Tak uzyskany filtrat poddawano dalszemu oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa lub mrożono w temperaturze -80°C do późniejszego oczyszczenia.

7.2.14. Oczyszczanie białek

7.2.14.1. Chromatografia powinowactwa – Białko A

Chromatografia powinowactwa wykorzystująca białko A była stosowana jako pierwszy etap oczyszczania konstruktów zawierających fragment Fc (przeciwciał lub białek chimerycznych). Kolumna wypełniona złożem (MabSelectSure, Cytiva) była przygotowana poprzez zrównoważenie buforem równoważącym (4 objętości kolumny; bufor 20 mM NaHPO_4 + 150 mM NaCl , pH 7,0). Następnie, mieszanina uzyskana w trakcie odzysku pierwotnego (opisanego w punkcie 6.2.13.) nakładano na kolumnę, zapewniając 4-minutowy czas kontaktu. Kolumna była następnie płukana 3 objętościami kolumny buforu równoważącego oraz 4 objętościami kolumny 40 mM roztworu octanu sodu, pH 5,0. Białka związane do złoża były eluowane 40 mM roztworem octanu sodu, pH 3,3. Całość procesu prowadzona była na zautomatyzowanym aparacie do chromatografii – Akta Pure 25. Uzyskany preparat białka był natychmiast neutralizowany poprzez doprowadzenie pH do zakresu 6,8–7,0 przy użyciu 1 M roztworu TRIS, pH 8,0.

W przypadku stosowania oczyszczonego białka w testach komórkowych bez dalszych etapów oczyszczania, preparat poddawano wymianie buforu na PBS z wykorzystaniem koncentratorów (minimum 3 objętości pierwotnego preparatu), filtrowano przez filtr sterylizujący, aseptycznie porcjowano i przechowywano w temperaturze -80°C .

7.2.14.2. Chromatografia wykluczenia

Preparatywna chromatografia wykluczenia (SEC) była stosowana jako drugi krok oczyszczania, mający na celu eliminację agregatów, zanieczyszczeń pozostałych po chromatografii powinowactwa oraz ewentualnych frakcji zawierających produkty degradacji. Używano kolumny Superdex 200 pg 26 x 600 (Cytiva). Kolumna była równoważona PBS. Próbkę przed nałożeniem na

kolumnę były dostosowywane do pH 7,4. Rozdział prowadzono nieprzerwanie, przy przepływie 1 mL/min. Całość procesu prowadzona była na zautomatyzowanym aparacie do chromatografii – Akta Pure 25.

7.2.15. ELISA

Test ELISA został zastosowany do określenia siły wiązania ligandów i przeciwciał do receptorów i/lub celów molekularnych. Płytki zostały opłaszczane 50 μ L roztworu białka w określonym stężeniu i inkubowane przez noc w 4°C. Następnego dnia płytki były równoważone w temperaturze pokojowej przez minimum 1 godzinę, następnie wypłukane (4 x 300 μ L PBST) i zablokowane 1% roztworem BSA (1 godzina, temperatura pokojowa, bez wytrząsania).

Testowane białka wiążące się do białek opłaszczonych na płytce zostały rozcieńczone do żądanych stężeń w PBS, a następnie 50 μ L przygotowanych roztworów dodano do wybranych studzienek, po uprzednim usunięciu roztworu blokującego. Płytke inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem. Następnie płytki wypłukano (4 x 300 μ L PBST), dodano po 50 μ L przygotowanego roztworu przeciwciał pierwszorzędowych (zależnie od testowanych związków) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej bez wytrząsania. Kroki płukania i inkubacji powtórzono z przeciwciałami drugorzędowymi lub koniugatem streptawidyna-HRP.

Wszystkie dołki wypłukano 6 x 300 μ L PBST. Do wywołania reakcji użyto 100 μ L/dołek wcześniej ogrzanego do temperatury pokojowej TMB. Po 6 minutach reakcję zatrzymano poprzez dodanie 100 μ L/dołek 0,2 M H₂SO₄. Absorbancja była odczytywana przy 450 nm i 655 nm (odjęcie tła), przy użyciu czytnika mikropłytek Tecan Spark.

7.2.16. Analiza blokady ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1

Weryfikacja zdolności badanych cząsteczek do blokowania ścieżki sygnałnej PD-1/PD-L1 prowadzona była z użyciem komercyjnie dostępnego testu (Promega). Test ten opiera się na zastosowaniu ko-kultury dwóch rodzajów komórek: linii adherentnej CHO K1 z ekspresją PD-L1 i linii zawieszinowej Jurkat z ekspresją PD-1. Blokada szlaku PD-1/PD-L1 skutkuje produkcją lucyferazy, dzięki której (po zastosowaniu odpowiedniego odczynnika) można zmierzyć sygnał bioluminescencyjny, proporcjonalny do efektywności blokady. Adherentne komórki CHO K1 hodowane były w medium: Ham's F12 + 10% FBS + 250 μ g/mL genetycyna + 200 μ g/mL higromycyna. Zawieszinowe komórki Jurkat hodowane były w medium: RPMI1640 + 10% FBS + 500 μ g/mL genetycyna + 200 μ g/mL higromycyna + 1 mM Sodium Pyruvate + 0,1 mM MEM NEAA. Zgodnie z zaleceniami producenta adherentne komórki CHO-K1 pasażowane były w reżimie 2-,3- i 4- dniowym, przy gęstości inokulacji: pasaż co 2 dni – 0,04-0,03 x10⁶ komórek/cm²,

pasaż co dwa dni – $0,01-0,02 \times 10^6$ komórek/cm², pasaż co 4 dni $0,0075-0,01 \times 10^6$ komórek/cm². Zawieszono komórki Jurkat hodowane były w reżimie 2- i 3-dniowym, przy gęstości inokulacji: pasaż co 2 dni – $0,4 \times 10^6$ komórek/mL, pasaż co 3 dni – $0,25 \times 10^6$ komórek/mL.

W pierwszym dniu eksperymentu komórki adherentne CHO K1 były przygotowywane jak do pasażu, po pomiarze ilości i ich żywotności, odpowiednia objętość hodowli była wirowana (10 min, 200 RCF) i zawieszana w takiej ilości medium hodowlanego aby osiągnąć stężenie $0,4 \times 10^6$ komórek/mL, a następnie przeniesiona na 96-dołkową, białą, płaskodenną płytkę (100 μ L na dołek). Płytkę pozostawiono na noc w inkubatorze (37°C, 5% CO₂). Następnego dnia medium z nadkomórek adherentnych było usuwane, a w jego miejsce dodawano: 40 μ L zawiesiny komórek Jurkat o stężeniu $1,25 \times 10^6$ komórek/mL (medium: RPMI1640 + 1% FBS) i 40 μ L seryjnie rozcieńczonych testowanych przeciwciał (medium RPMI1640 + 1% FBS). Tak przygotowaną ko-kulturę komórek pozostawiano w inkubatorze na 6 godzin (37°C, 5% CO₂). Po upływie tego czasu płytkę równoważono w temperaturze pokojowej przez co najmniej 5 minut, a następnie do dołków dodawano 80 μ L odczynnika wywołującego reakcję bioluminescencji (Bio-Glo™ (Promega)). Po dodaniu odczynnika płytkę dodatkowo inkubowano przez 15 minut w ciemności, a następnie przystępowano do odczytu sygnału na czytniku mikroplatek Tecan Spark.

7.2.17. Analiza poziomu ekspresji receptorów na powierzchni komórek nowotworowych

Do analizy poziomu ekspresji wykorzystywano komórki uzyskiwane w trakcie rutynowych pasażów ludzkich nowotworowych adherentnych linii komórkowych.

Po trypsynizacji, stężenie komórek było określane za pomocą automatycznego licznika, a następnie $0,4 \times 10^6$ komórek zostało przeniesione do mikroprobówek wirówkowych. Komórki były wirowane przy 1300 RCF przez 3 minuty, a następnie inkubowane w zimnym 0,5% roztworze BSA w PBS, zawierającym mysie przeciwciało anti-ludzkie PD-L1 (1:50, Thermo Fisher Scientific, nr kat. 14-5983-82), królicze przeciwciała anti-ludzkie-ROR-1 (1:10, Thermo Fisher, nr kat. PA5-14725) lub królicze przeciwciała anti-ludzka-Mezotelina (1:100, Thermo Fisher, nr kat. MA5-51862). Po 60 minutowej inkubacji na lodzie, komórki zostały dwukrotnie wypłukane 0,5% roztworem BSA w PBS i kolejno inkubowane przez 60 minut na lodzie, w ciemności, w 0,5% roztworze BSA w PBS zawierającym II-rzędowe przeciwciała anti-mysie-IgG znakowane fikoerytryną (1:350, BD Biosciences, nr kat. 550589), lub II-rzędowe przeciwciała anti-królicze-IgG znakowane fikoerytryną (1:250, Thermo Fisher, nr kat. A10542). Następnie, komórki zostały poddane dwukrotnemu płukaniu i zawieszono w zimnym 0,5% roztworze BSA w PBS. Analizie poddano 10 000 komórek z każdej próbki. Dla kontroli tła pomijano etap inkubacji z

przeciwciałami I-rzędowymi. Do analizy wykorzystano cytometr BD FACSCalibur; do analizy wyników wykorzystano oprogramowanie Cell Quest Pro (wersja 5.2.1).

7.2.18. Izolacja ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) izolowane były z kożuszków leukocytnych (otrzymanych z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Gdańsku) poprzez wirowanie w gradiencie gęstości (Ficoll Paque-Plus™). W skrócie, otrzymane kożuszki rozcieńczane były dPBS w stosunku 1:1, a następnie 20 mL tak otrzymanej mieszaniny nakładane było na 25 mL roztworu Ficoll-Paque Plus. Próbkę wirowaną była w 400 RCF przez 30 minut (z powolnym rozpędzaniem się i wyłączonym hamulcem wirówki), a następnie odbierano frakcje zawierającą komórki PBMC. Frakcje płukano dwukrotnie dPBS (pomiędzy płukaniem, wirowanie 10 minut, 300 RCF) w celu usunięcia zanieczyszczeń płytkami krwi. Komórki PBMC liczono z wykorzystaniem automatycznego licznika komórek i bankowano (medium: 90% FBS, 10% DMSO; objętość banków: 2 mL; liczba komórek w banku: 20×10^6 komórek/mL lub 30×10^6 komórek na mL). W razie potrzeby komórki rozmrażano i hodowano w medium RPMI1640 z dodatkiem 10% FBS.

7.2.19. Test cytotoksyczności w ko-kulturze komórek nowotworowych z komórkami jednojądrzastymi krwi obwodowej

Dzień przed planowanym eksperymentem, ludzkie komórki nowotworowe zostały przesiane na płytkę 96-dołkową w stężeniu 3×10^4 komórek na dołek, w odpowiednim kompletnym medium hodowlanym dla danej linii komórkowej. Równocześnie, komórki PBMC zostały rozmrożone i przeniesione do wcześniej nagrzanego do 37°C medium RPMI 1640 zawierającego 10% FBS, po czym pozostawiono je na noc w inkubatorze. Następnego dnia do komórek nowotworowych dodawano PBMC w stosunku 1:10 oraz testowane związki w odpowiednich stężeniach. Tak przygotowane płytki były inkubowane przez 120 godzin w temperaturze 37°C, przy 5% CO₂ w atmosferze.

Po zakończeniu okresu inkubacji usuwano medium wraz z komórkami PBMC z nad pozostałych komórek nowotworowych, na następnie dołki płukano dwukrotnie (100 µL dPBS na dołek). Następnie do każdej studzienki dodano 90 µL medium RPMI1640 + 10% FBS oraz 20 µL roztworu MTT o stężeniu 5 mg/mL i inkubowano przez 2 godziny. Następnie, do wszystkich studzienek dodano 100 µL rozpuszczalnika MTT zawierającego 10% SDS i 0,01 N HCl, po czym płytki pozostawiono na noc w inkubatorze (37°C, 5% CO₂). Następnego dnia absorbancja była mierzona przy 570 nm, z odcięciem tła przy 690 nm, za pomocą czytnika mikroplatek Tecan Spark. Procent lizy komórek obliczano jako stosunek sygnału w próbkach zawierających testowane związki

(komórki nowotworowe + PBMC + testowane związki) do kontroli (komórki nowotworowe + PBMC).

7.2.20. Analiza poziomu cytokin w ko-kulturze komórki nowotworowe/komórki PBMC

Poziom cytokin mierzony był na próbkach pochodzących z ko-kultur komórek nowotworowych i komórek PBMC, z dodatkiem badanych przeciwciał bispecyficznych lub kontroli. Hodowle takie prowadzone były na płytkach 6-dołkowych, podobnie jak w przypadku analizy cytotoksyczności, przez 120 godzin, przy stosunku komórek PBMC do komórek nowotworowych – 10:1, oraz stężeniu testowanych związków: 50nM dla przeciwciał bispecyficznych, 50 nM dla przeciwciał monospecyficznych, 50nM + 50nM dla kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Po zakończeniu inkubacji medium z adherentnych komórek nowotworowych było zbierane, wirowane (10 minut, 300 RCF) i filtrowane (filtry strzykawkowe, grubość porów 0,2 μm).

Płytkę 96-dołkową została opłaszczona 100 μL odpowiedniego przeciwciała wiążącego (IL-2 i TNF- α – 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$; IL-10 i INF- γ - 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Granzym B - 800 ng/mL) i inkubowana przez noc w 4°C. Następnego dnia płytka była równoważona w temperaturze pokojowej przez co najmniej 45 minut, i wypłukana – 3 x 300 μL buforem do płukania (1xPBS + 0,05% Tween 20). Następnie, płytka była blokowana buforem do rozcieńczania reagentów (1% BSA w PBS, pH 7,2-7,4) i inkubowana przez godzinę w temperaturze pokojowej. Procedura płukania została powtórzona. Następnie do każdego dołka dodano 100 μL próbek lub kolejnych punktów krzywych standardowych (IL-2 i TNF- α – 1000–15,6 pg/mL; IL-10 – 2000- 31,2 pg/mL, INF- γ – 600-9,38 pg/mL; Granzym B – 2500-39,1 pg/mL) rozcieńczonych w wyżej opisanym buforze i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Procedura płukania została powtórzona. Następnie do stosownych dołków dodano 100 μL przeciwciał detekcyjnych (IL-2 – 100 ng/mL, TNF- α , IL-10 i Granzym B 50 ng/mL; INF- γ - 200 ng/mL). Na płytkę naklejona została nowa folia adhezyjna i następnie inkubowana była ona przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Procedurę płukania powtórzono. Dodano 100 μL roztworu Streptawidyna-HRP (rozcieńczenie 1:40) i inkubowano płytkę przez 20 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności. Procedurę płukania powtórzono. Następnie, do wszystkich dołków dodano 100 μL TMB i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, w ciemności. Ostatecznie do wszystkich dołków dodano 100 μL buforu hamującego reakcję barwną (0,2 m H₂SO₄). Pomiar prowadzono z wykorzystaniem czytnika mikropłytek – pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm (z odcięciem tła przy 655 nm).

7.2.21. Określenie zmian w populacji regulatorowych limfocytów T w ko-kulturze komórek nowotworowych i komórek PBMC w obecności badanych przeciwciał.

Do określenia zmian w subpopulacji limfocytów regulatorowych wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw eBioscience™ Essential Human Treg Phenotyping Kit (Thermo Fisher, A42925). Przed rozpoczęciem właściwej analizy przeprowadzono testowe pomiary na nietraktowanych komórkach PBMC w celu wybrania odpowiedniego bramkowania komórek i kompensacji sygnału. Bramkowanie przeprowadzono na niebarwionych, permabilizowanych komórkach PBMC. Kompensację sygnału wykonano z wykorzystaniem permabilizowanych komórek PBMC wyznakowanych tylko jednym rodzajem przeciwciał dla każdego badanego parametru: CD4 (CD4 (RPA-T4)-FITC- Mouse IgG1, kappa), CD25 (CD25 (CD25-4E)- PerCP-eFluor710- Mouse IgG1, kappa), CD127 (CD127 (eBioRDR5) - PE- Mouse IgG1, kappa), FoxP3 (FoxP3 (PCH101) – eFluor450- Rat IgG2a, kappa), Viability (eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506). Po przeprowadzeniu kompensacji sprawdzono czy sygnał pochodzący z dwóch różnych przeciwciał nie nakłada się na siebie poprzez analizę permabilizowanych komórek PBMC barwionych: dwoma rodzajami każdego z przeciwciał, trzema rodzajami każdego z przeciwciał, czterema rodzajami każdego z przeciwciał i pełnego zestawu barwienia. Uzyskane parametry pomiaru zapisano i wykorzystano do właściwych analiz.

Analizowane komórki PBMC pochodziły z ko-kultur komórek nowotworowych i komórek PBMC, z dodatkiem badanych przeciwciał bispecyficznych lub kontroli. Hodowle takie prowadzone były na płytkach 6-dołkowych, podobnie jak w przypadku analizy cytotoksyczności, przez 120 godzin, przy stosunku komórek PBMC do komórek nowotworowych – 10:1, oraz stężeniu testowanych związków : 50nM dla przeciwciał bispecyficznych, 50 nM dla przeciwciał monospecyficznych, 50nM + 50nM dla kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Po zakończeniu inkubacji zawiesinowe komórki PBMC znad adherentnych komórek nowotworowych były liczone (1×10^6 komórek na jeden test) i odpowiednia objętość wirowana (5 minut, 200 RCF) i jednokrotnie płukana (Flow Cytometry staining buffer). Następnie, komórki zostały zawieszono w 100 μ L buforu do barwienia i dodano do nich po 5 μ L roztworu przeciwciał: anty-CD4, anty-CD25, anty-CD127 oraz 1 μ L barwnika znaczącego żywotność. Próbki inkubowano w lodzie przez 30 minut. Po upływie tego czasu komórki były dwukrotnie płukane 2 mL buforu do barwienia (wirowanie 5 minut, 200 RCF). Po zakończonym płukaniu do komórek dodano 1 mL roztworu do permabilizacji (*1X Foxp3 Fixation/Permeabilization*) Solution i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, komórki dwukrotnie płukano 2mL odpowiedniego buforu (*1X Permeabilization Buffer*) – wirowanie 5 minut, 500 RCF. Po zakończonym płukaniu komórki zawieszono w 100 μ L buforu i dodano 5 μ L przeciwciał anty-FoxP3 (inkubacja 30 minut, RT). Po

zakończonych inkubacji ponownie dwukrotnie płukano komórki, zawieszono w 180 μ L buforu do barwienia i przeniesiono na płytkę 96-dołkową. Analiza prowadzona była z wykorzystaniem cytometru przepływowego Attune CytPix (Thermo Fisher) wyposażonego w oprogramowanie Attune Cytometric Software (wersja 6.21).

7.2.22. Analiza danych.

Analiza statystyczna danych prowadzona była z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism (wersja 10.0.2). Krzywe oraz wartości EC_{50} dla testów ELISA i blokady ścieżki sygnalizacyjnej PD-1/PD-L1 obliczane były za pomocą modelu: *log(inhibitor) vs. response -- Variable slope (four parameters)*. Dla pozostałych testów przyjęto następujące symbole oznaczające istotność statystyczną: $p > 0,5$ – ns (*non significant*), $p \leq 0,05$ - *, $p \leq 0,01$ - **, $p \leq 0,001$ - ***, $p \leq 0,0001$ - ****. Istotność statystyczna dla lizy komórek nowotworowych obliczana była za pomocą parametrycznego testu t-studenta dla prób niesparowanych. Istotność statystyczna dla pomiaru stężenia cytokin oraz określania subpopulacji limfocytów T regulatorowych obliczana była za pomocą dwuczynnikowego testu ANOVA po którym dokonywano wielokrotnych porównań testem Tukey'a.

8. WYNIKI

8.1. Produkcja białek i przeciwciał referencyjnych

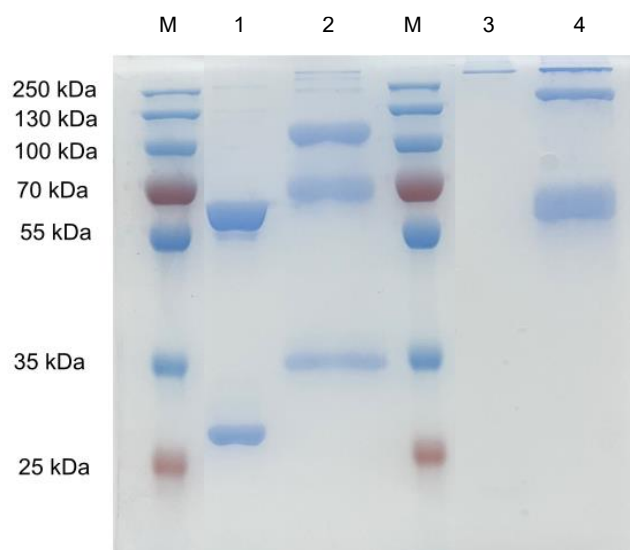
Pierwszym etapem realizacji projektu była produkcja białek (ROR-1, Mezetelina, PD-L1) i przeciwciał (anty-ROR-1, anty-Mezetelina, anty-PD-L1) które niezbędne były do określenia prawidłowego funkcjonowania przeciwciał bispecyficznych oraz służyły jako kontrole w części eksperymentów dotyczących analizy potencjału przeciwnowotworowego. Sekwencje aminokwasowe oraz schematyczne przedstawienie konstruktów genetycznych przedstawione zostały w sekcji 6.2.1. Białka ROR-1 i Mezetelina oraz przeciwciała anty-ROR-1 i anty-Mezetelina wyprodukowane zostały w systemie przejściowym w komórkach HEK293 (Tabela 41).

Tabela 41. Szczegółowe informacje dotyczące produkcji przejściowej i oczyszczania białek i przeciwciał referencyjnych.

Białko	Stężenie żywych komórek w 7 dniu hodowli [liczba komórek x 10⁶/mL]	Żywotność [%]	Stężenie białka [mg/mL]	Całkowita ilość oczyszczonego białka [mg]
ROR-1 (R1_045)	5,5	80	0,19	0,95
Mezetelina (R1_046)	6,1	86	0,37	1,85
Anty-ROR-1 (R1_A7)	6,6	88	0,27	2,6
Anty-Mezetelina (R1_A8)	6,2	84	0,98	8,5

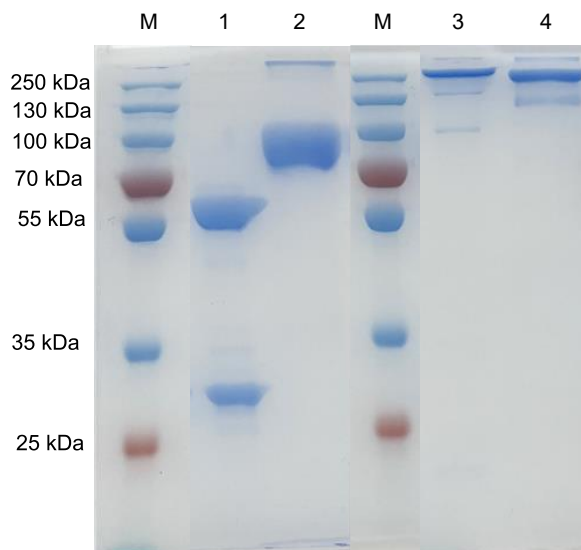
Supernatant po odwirowaniu hodowli komórkowych poddany został oczyszczaniu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa (złożę z białkiem A), a następnie oczyszczone białka analizie SDS-Page w warunkach redukujących i nieredukujących oraz chromatografii wykluczenia (SEC).

Rycina 6. Obraz żelu SDS-Page dla białka ROR-1 i przeciwciała anti-ROR-1.



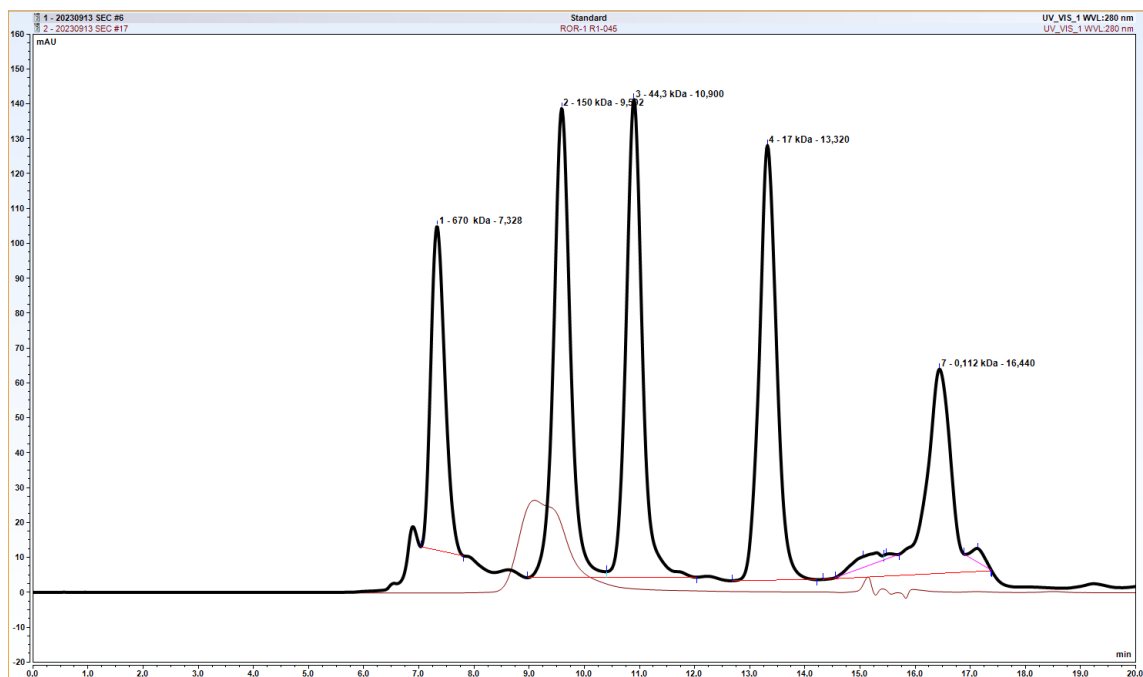
M – Marker, 1 – przeciwciało anti-ROR-1 (R1_A7) warunki redukujące, 2 – ROR-1 (R1_045) warunki redukujące, 3 – przeciwciało anti-ROR-1 (R1_A7) warunki nieredukujące, 4 – ROR-1 (R1_045) warunki nieredukujące

Rycina 7 Obraz żelu SDS-Page dla białka Mezoteliny i przeciwciała anti-Mezotelina.

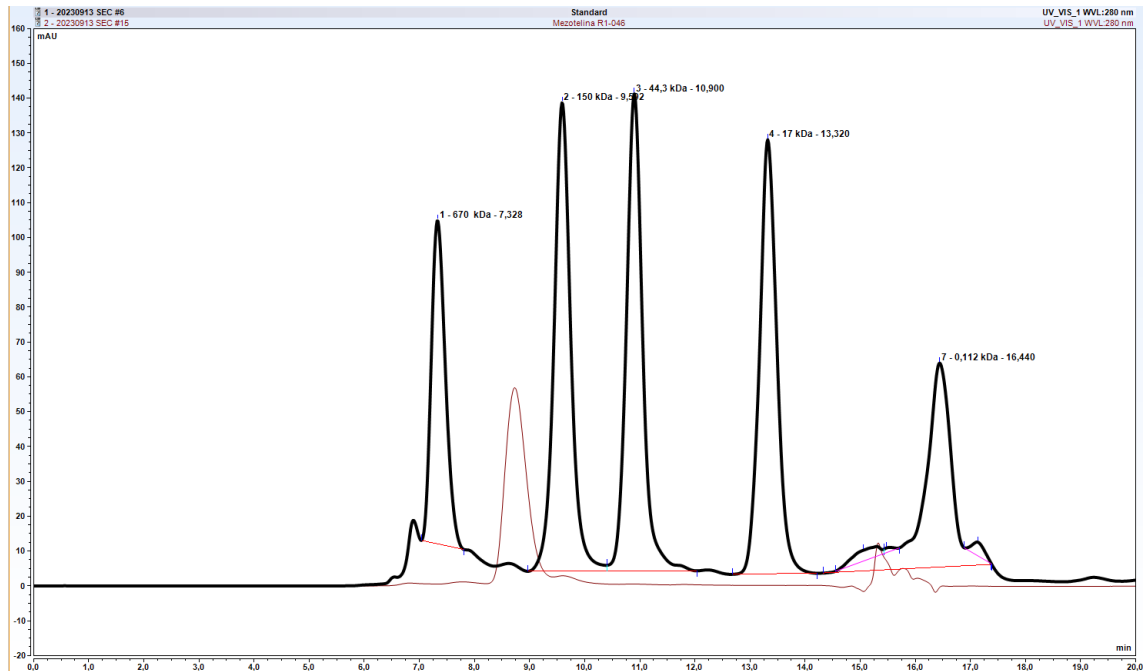


M – Marker, 1 – przeciwciało anti-Mezotelina (R1_A8) warunki redukujące, 2 – Mezotelina (R1_046) warunki redukujące, 3 – przeciwciało anti-Mezotelina (R1_A8) warunki nieredukujące, 4 – Mezotelina (R1_046) warunki nieredukujące

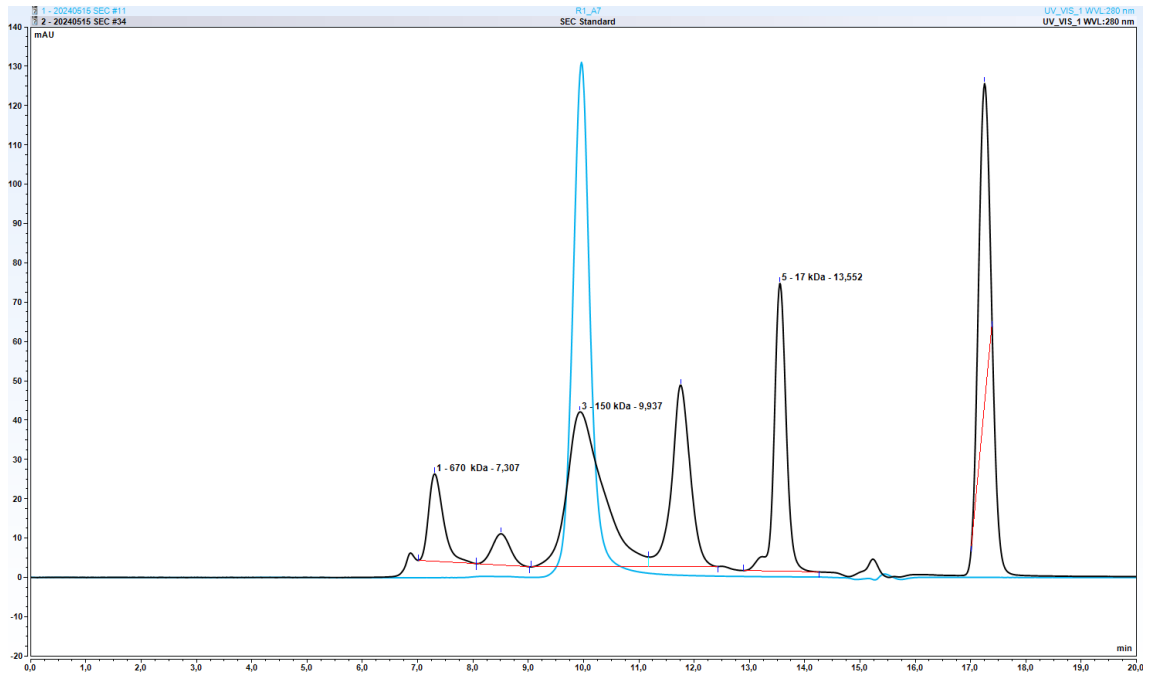
Rycina 8. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla białka ROR-1.



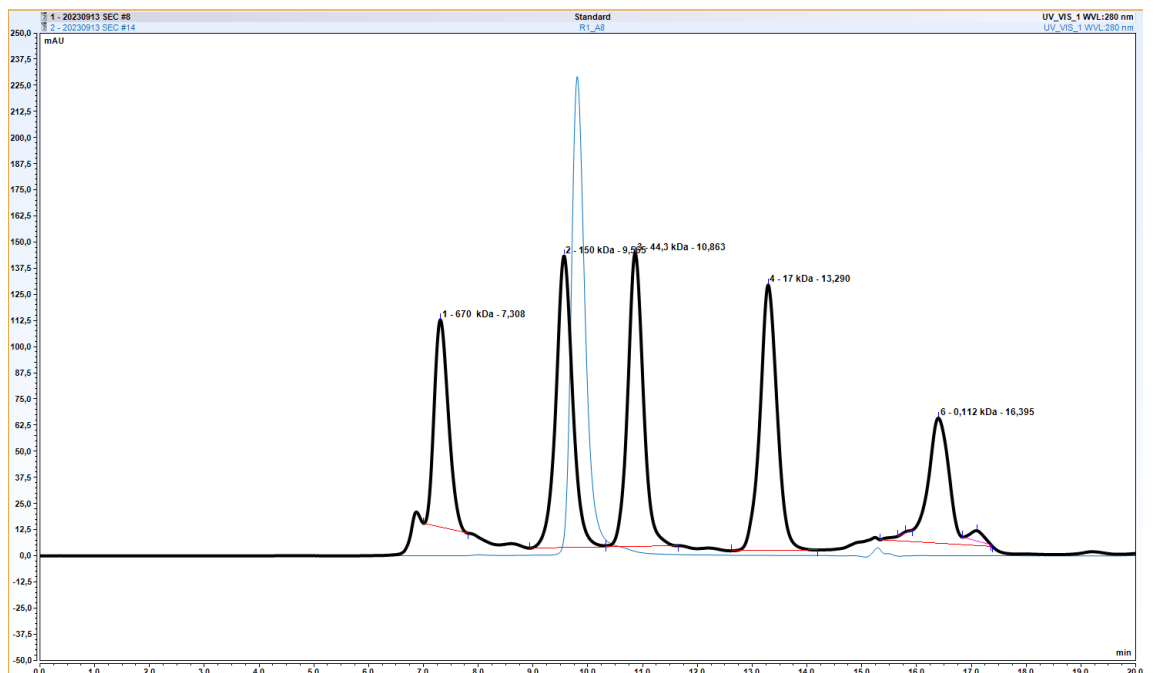
Rycina 9. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla białka Mezeteliny.



Rycina 10. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciała anti-ROR-1.



Rycina 11. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciała anti-Mezotelina.

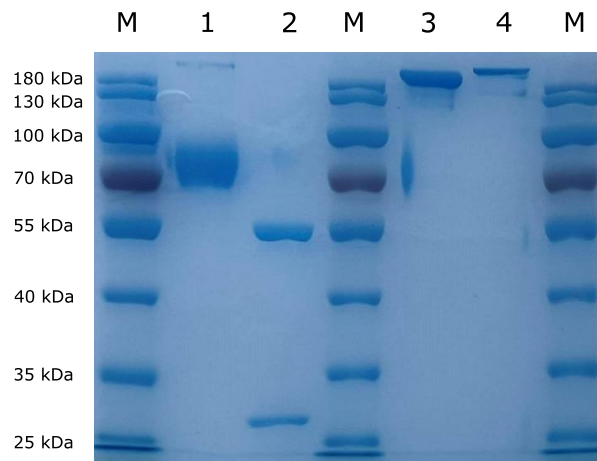


Teoretyczna masa białek referencyjnych ROR-1 i Mezoteliny (w połączeniu z fragmentem Fc i His-tagiem, Tabela 29) to odpowiednio 60 kDa i 70,1 kDa. Analizując obraz żeli SDS-Page można stwierdzić, że układ prążków dla Mezoteliny jest zgodny z oczekiwanymi - >70 kDa w warunkach redukujących. W przypadku białka ROR-1, w warunkach redukujących zaobserwować można 3

prążki, dwa powyżej 70 kDa i jeden na wysokości 35 kDa. Prążek na wysokości 35 kDa jest najprawdopodobniej samym fragmentem Fc który został odcięty od białka na którymś z etapów produkcji lub oczyszczania. Natomiast obecność dwóch pozostałych prążków może świadczyć o tym że białko to występuje w dwóch formach – monomerycznej i dimerycznej. Obraz chromatogramów wskazuje natomiast, że w warunkach natywnych białko Mezotelina jest trimerem, natomiast ROR-1 dimerem. Obraz żeli SDS-Page i chromatogramów dla obu przeciwciał referencyjnych jest zgodny z oczekiwaniami.

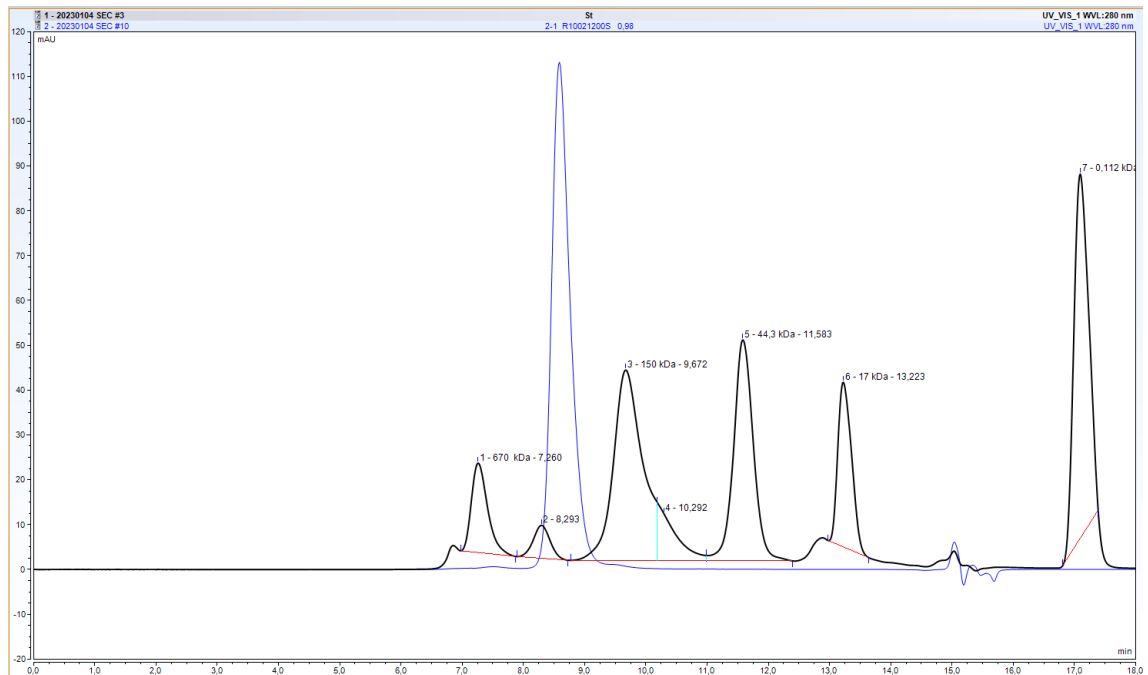
Białko PD-L1 oraz przeciwciało anti-PD-L1 zostały wyprodukowane w stabilnych liniach komórkowych CHO K1.

Rycina 12. Obraz żelu SDS-Page dla białka PD-L1 i przeciwciała anti-PD-L1.

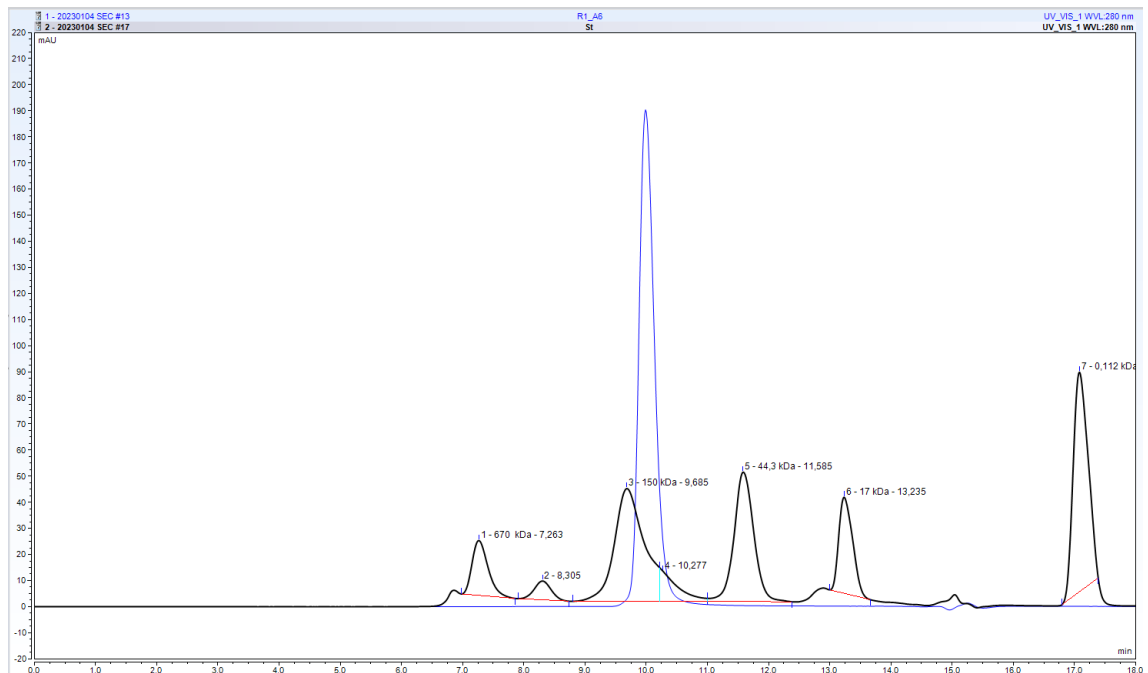


M – marker, 1 – PD-L1 (R1_002) warunki redukujące, 2 – przeciwciało anti-PD-L1 (R1_A6) – warunki redukujące, 3 – PD-L1 (R1_002) warunki nieredukujące, 4 – przeciwciało anti-PD-L1 (R1_A6) warunki nieredukujące

Rycina 13. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla białka PD-L1.



Rycina 14. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciała anti-PD-L1.



Analiza SDS-Page wskazuje, że preparat białka PD-L1 i przeciwciała anti-PD-L1 jest wysokiej jakości, brak widocznych agregatów lub produktów degradacji. Wysokość prążków jest zgodna z teoretycznymi masami molekularnymi. Podobne wnioski można wyciągnąć z analizy chromatograficznej. Ponadto można wnioskować, że PD-L1 w warunkach natywnych przyjmuje struktury multimeryczne (di- lub trimer).

8.2. Produkcja przeciwciał bispecyficznych

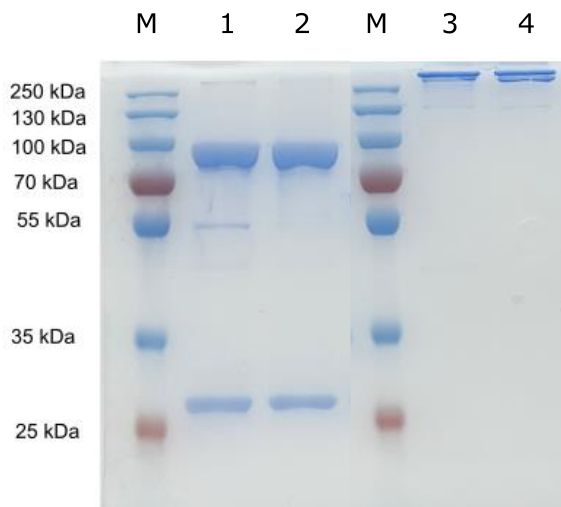
Następnym etapem było wyprodukowanie przeciwciał bispecyficznych. Schematyczne przedstawienie konstruktów genetycznych zestawione zostało w podrozdziale 6.2.1.

W pierwszym kroku przeprowadzono produkcję przejściową w komórkach HEK293.

Tabela 42. Szczegółowe informacje dotyczące produkcji przejściowej i oczyszczania przeciwciał bispecyficznych.

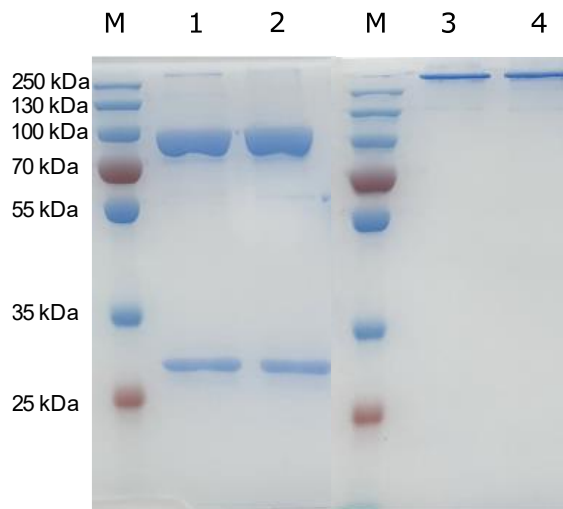
Przeciwciało	Stężenie żywych komórek w 7 dniu hodowli [liczba komórek x 10 ⁶ /mL]	Żywotność [%]	Stężenie białka [mg/mL]	Całkowita ilość oczyszczonego białka [mg]
R2_7_1	4,6	79	0,16	0,80
R2_7_2	4,3	78	0,21	1,05
R2_8_1	4,0	75	0,24	1,2
R2_8_2	4,2	74	0,19	0,95

Rycina 15. Obraz żelu SDS-Page dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1



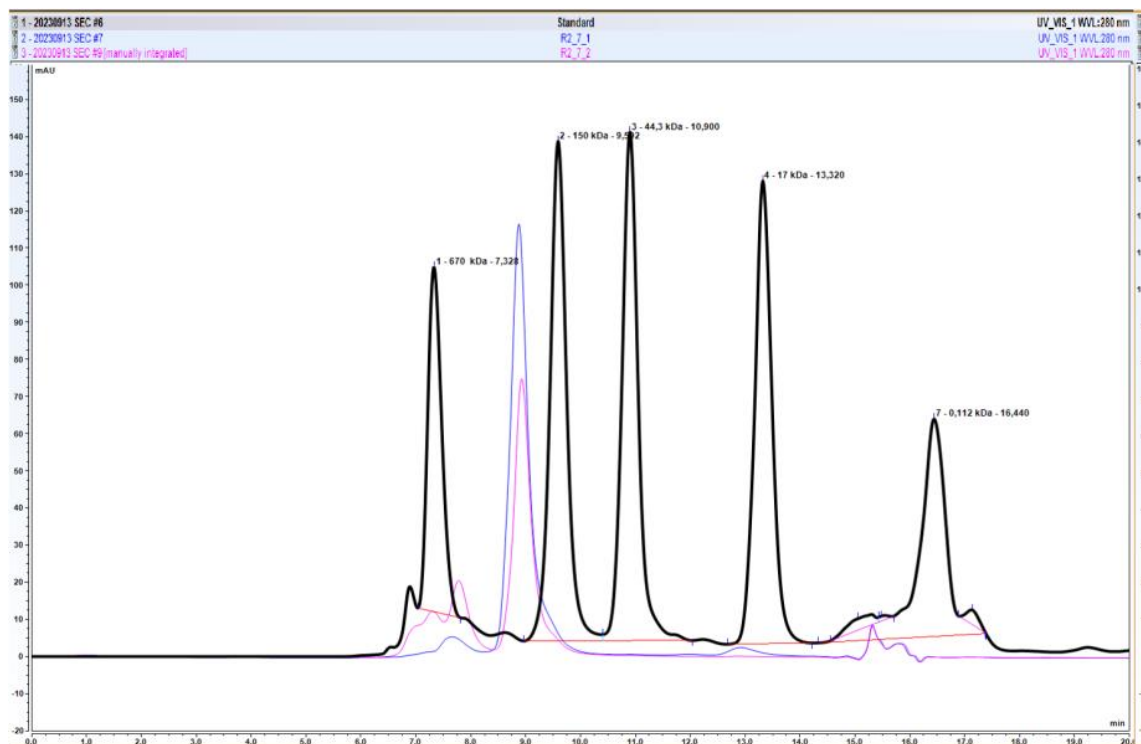
M-Marker, 1 – R2_7_1 warunki redukujące, 2 – R2_7_2 warunki redukujące, 3 – R2_7_1 warunki nieredukujące, 4 – R2_7_2 warunki nieredukujące

Rycina 16. Obraz żelu SDS-Page dla przeciwciał Mezotelina x PD-L1.

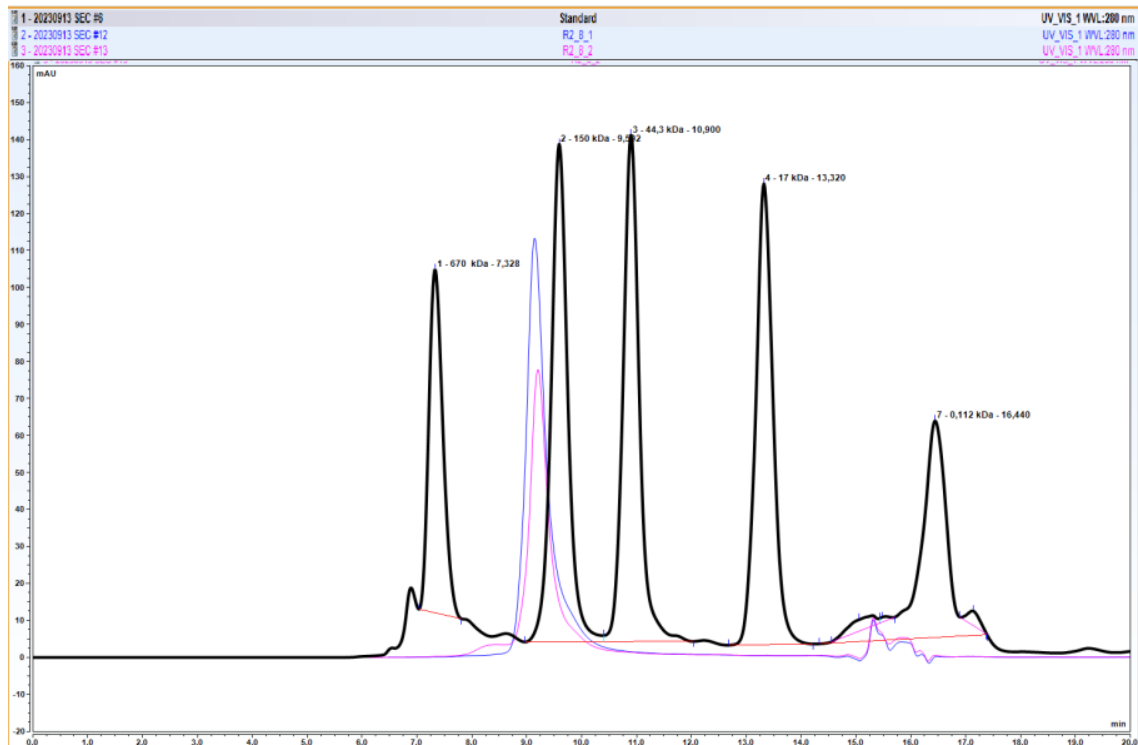


M-Marker, 1 – R2_8_1 warunki redukujące, 2 – R2_8_2 warunki redukujące, 3 – R2_8_1 warunki nieredukujące, 4 – R2_8_2 warunki nieredukujące

Rycina 17. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1.



Rycina 18. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał Mezotelina x PD-L1.



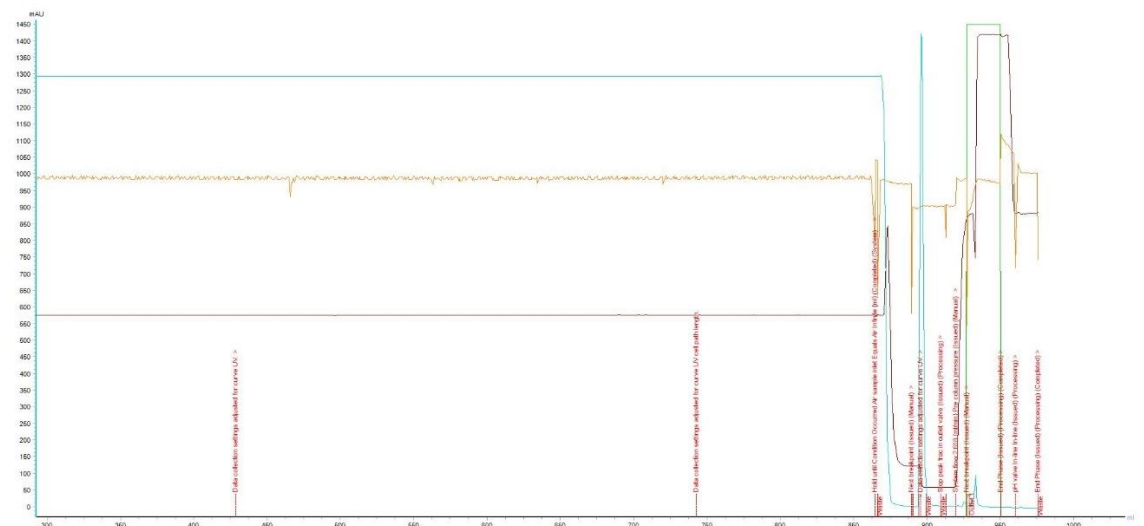
Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić, że wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne posiadają prawidłową strukturę. Wynik elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach redukujących wskazuje na prawidłowe wysokości prążków odpowiadających łańcuchom ciężkim i lekkim przeciwciał. Rozdział w warunkach nieredukujących wskazuje na brak degradacji przeciwciał. Teoretyczna masa przeciwciał bispecyficznych wynosi około 200 kDa – co zgadza się z analizą chromatograficzną (piki odpowiadające przeciwciałom obecne tuż przed standardem masy 150 kDa). Dla przeciwciała R2_7_2 można zaobserwować frakcję agregatów przed głównym pikiem, stanowi to jednak niewielką część preparatu i wynika najprawdopodobniej ze sposobu przechowywania próbki. Co ważne, brak jest strukturalnych różnic pomiędzy klasami przeciwciał (IgG1 i IgG4) – różnice w wysokości pików na chromatogramach wynikają z różnic w stężeniach nastrzykiwanych prób.

W przemyśle farmaceutycznym standardem jest produkcja przeciwciał terapeutycznych w stabilnych liniach komórkowych. Z tego względu oraz z powodu niskiej wydajności produkcji w systemie przejściowym (Tabela 43) omawiane przeciwciała bipeptyczne zostały również wyprodukowane w stabilnych liniach komórkowych CHO K1. Po wyprowadzeniu stabilnej linii, przystąpiono do produkcji i następnie do oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa.

Tabela 43. Szczegółowe informacje dotyczące produkcji przeciwciał bispecyficznych w stabilnych liniach komórkowych.

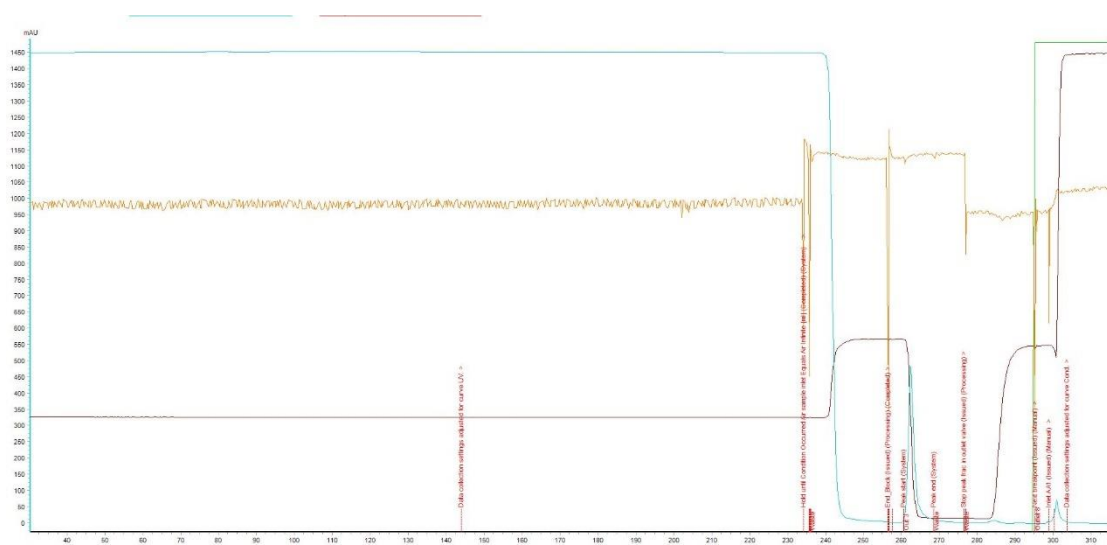
Przeciwciało	Stężenie żywych komórek w 10 dniu hodowli [liczba komórek x 10 ⁶ /mL]	Żywotność [%]	Objętość hodowli [mL]	Całkowita ilość oczyszczonego białka [mg]
R2_7_1	9,4	97	860	9,87
R2_7_2	9,4	94	475	4,21
R2_8_1	9,4	94	470	3,73
R2_8_2	8,8	94	850	8,35

Rycina 19. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_7_1 na drodze chromatografii powinowactwa.



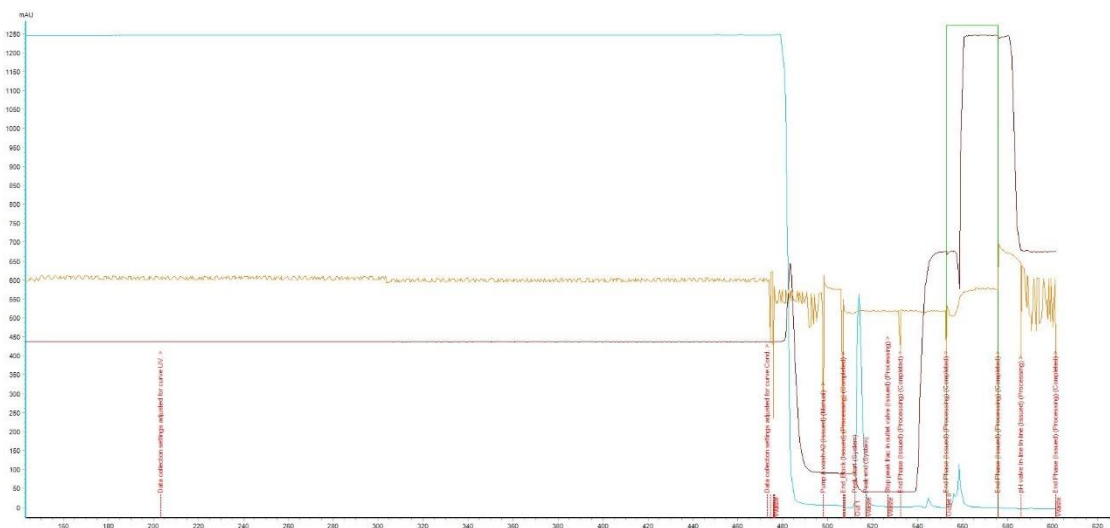
Niebieska linia to odczyt sygnału UV.

Rycina 20. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_7_2 na drodze chromatografii powinowactwa.



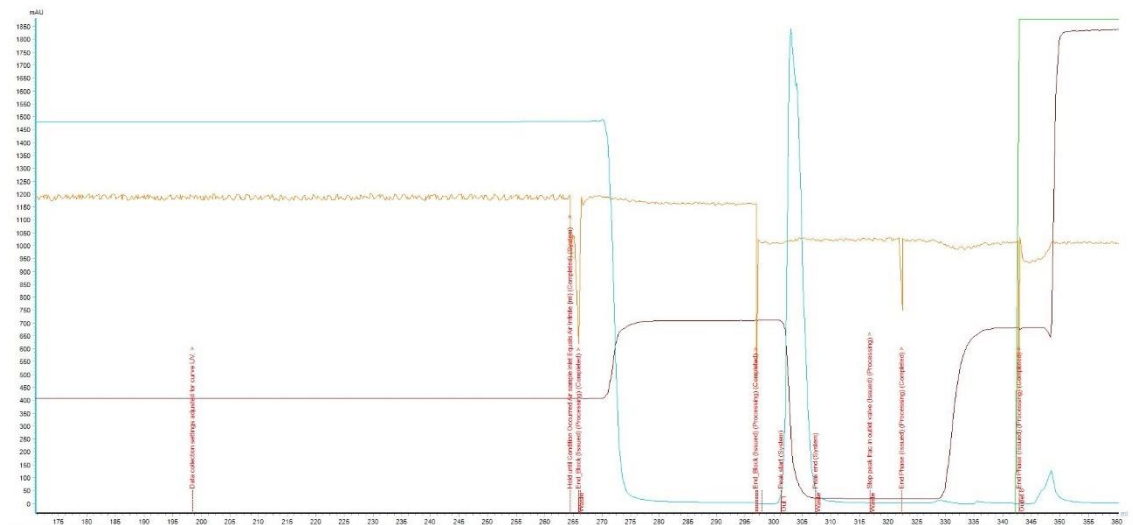
Niebieska linia to odczyt sygnału UV.

Rycina 21. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_8_1 na drodze chromatografii powinowactwa.



Niebieska linia to odczyt sygnału UV.

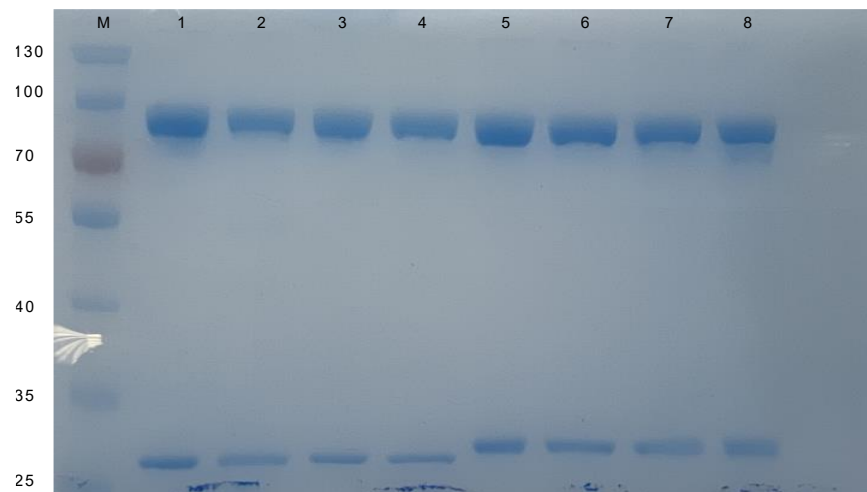
Rycina 22. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_8_2 na drodze chromatografii powinowactwa.



Niebieska linia to odczyt sygnału UV.

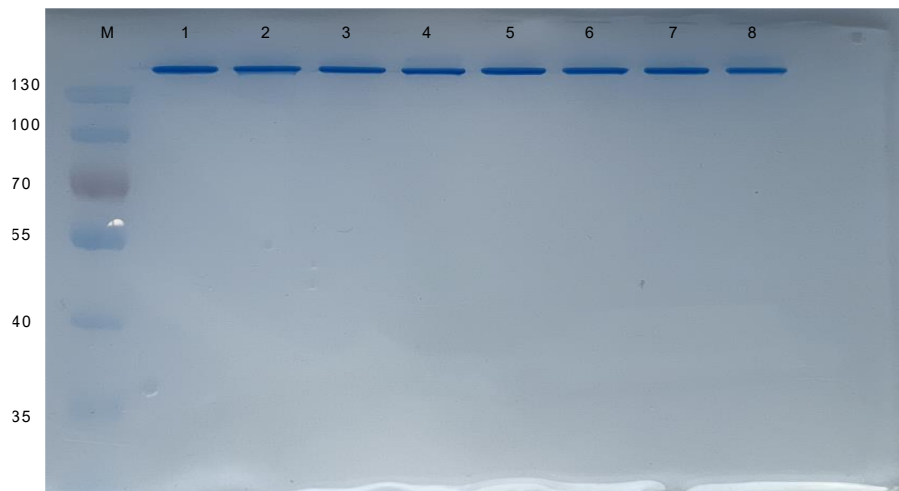
Po wyprodukowaniu i oczyszczeniu przeciwciał ze stabilnych linii komórkowych sprawdzono czy ich jakość w ujęciu fizyko-chemicznym różni się od przeciwciał wyprodukowanych w systemie przejściowym.

Rycina 23. Obraz żelu SDS-Page w warunkach redukujących dla przeciwciał bispecyficznych wyprodukowanych w systemie przejściowym i w stabilnych liniach.



M-Marker, 1 – R2_7_1 CHO, 2 – R2_7_1 HEK293, 3 – R2_7_2 CHO, 4 – R2_7_2 HEK293, 5 – R2_8_1 CHO, 6 – R2_8_1 HEK293, 7 – R2_8_2 CHO, 8 – R2_8_2 HEK293

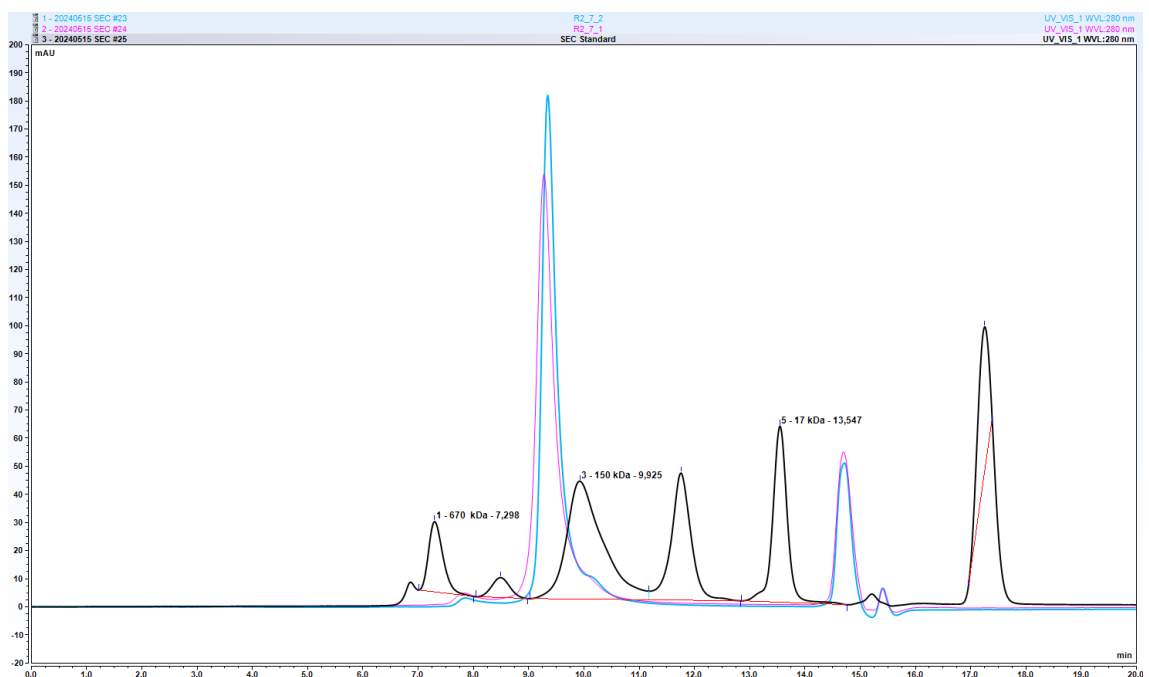
Rycina 24. Obraz żelu SDS-Page w warunkach nieredukujących dla przeciwciał bispecyficznych wyprodukowanych w systemie przejściowym (HEK293) i w stabilnych liniach (CHO).



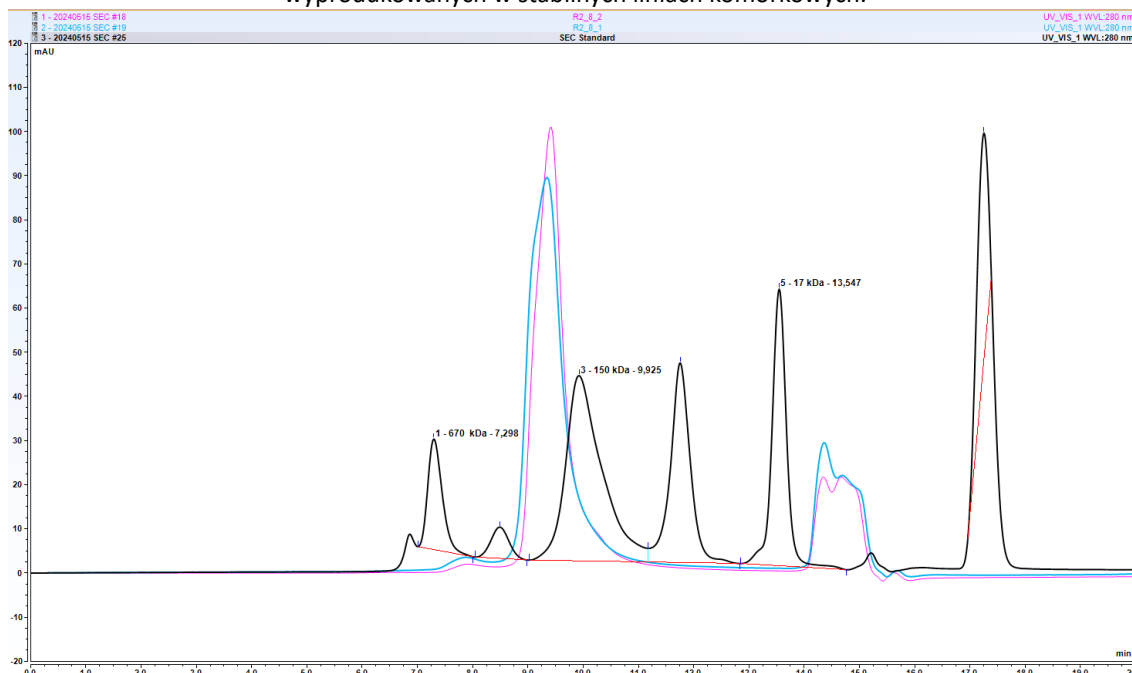
M-Marker, 1 – R2_7_1 CHO, 2 – R2_7_1 HEK293, 3 – R2_7_2 CHO, 4 – R2_7_2 HEK293, 5 – R2_8_1 CHO, 6 – R2_8_1 HEK293, 7 – R2_8_2 CHO, 8 – R2_8_2 HEK293

Na podstawie obrazu żeli poliakrylamidowych prowadzonych w warunkach redukujących i nieredukujących nie stwierdzono różnic w jakości pomiędzy przeciwciałami wyprodukowanymi w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych.

Rycina 25. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych.



Rycina 26. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał Mezotelina x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych.

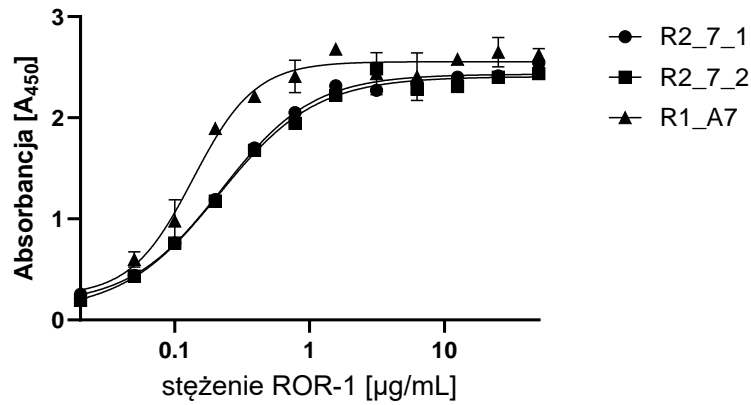


Wynik analizy chromatograficznej pokrywa się z wcześniejszymi rezultatami dla przeciwciał wyprodukowanych w systemie przejściowym. Jediną zauważalną różnicą jest obecność niewielkich pików o wielkości mniejszej niż 17kDa. Stanowią one najprawdopodobniej produkt niespecyficznego degradacji przeciwciał, która wyniknęła ze zbyt długiego przechowywania ich w temperaturze 4°C. Niemniej jednak, taka obserwacja prowadzi do wniosku o konieczności dostosowywania buforu formułacyjnego przeciwciał, tak aby zwiększyć ich stabilność w warunkach chłodniczych i uniknąć wymogu każdorazowego zamrażania preparatów.

8.3. Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne wiążą swoje cele molekularne z podobną skutecznością co przeciwciała monospecyficzne.

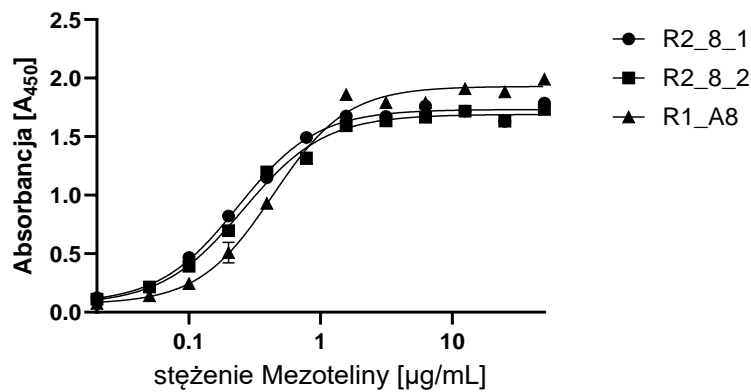
W celu weryfikacji zdolności przeciwciał do wiązania odpowiednich celów molekularnych przeprowadzono testy ELISA.

Rycina 27. Wiązanie ROR-1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i przeciwciała anty-ROR-1.



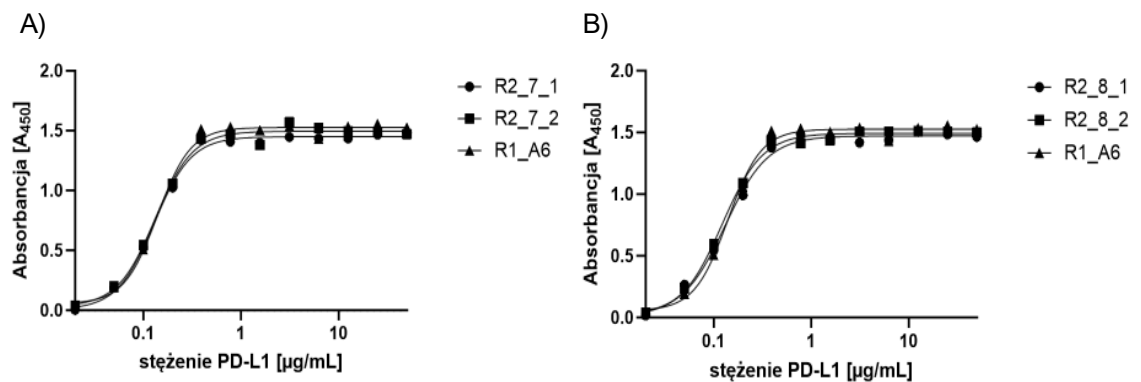
R2_7_1 EC₅₀ = 0,22 µg/mL; R2_7_2 EC₅₀ = 0,21 µg/mL; R1_A7 EC₅₀ = 0,14 µg/mL

Rycina 28. Wiązanie Mezoteliny do przeciwciał bispecyficznych Mezotelina x PD-L1 i przeciwciała aty-Mezotelina.



R2_8_1 EC₅₀ = 0,24 µg/mL; R2_8_2 EC₅₀ = 0,26 µg/mL; R1_A8 EC₅₀ = 0,23 µg/mL

Rycina 29. Wiązanie PD-L1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1, Mezotelina x PD-L1 oraz przeciwciała anty-PD-L1.

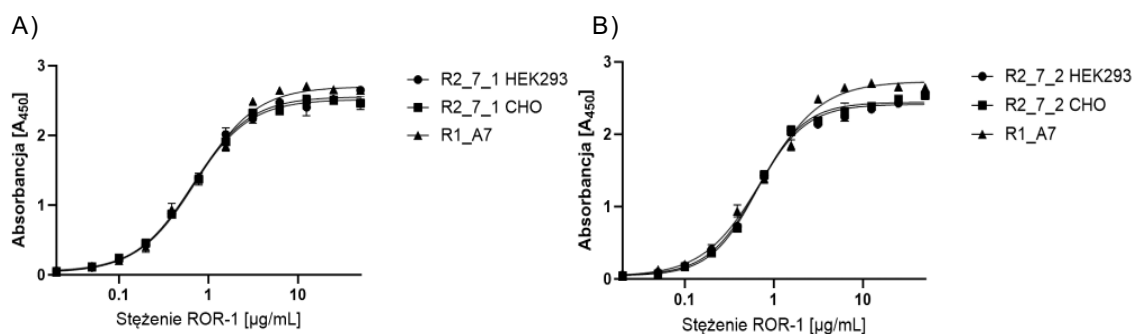


R2_7_1 EC₅₀ = 0,1291 µg/mL; R2_7_2 EC₅₀ = 0,1319 µg/mL; R2_8_1 EC₅₀ = 0,1308 µg/mL; R2_8_2 EC₅₀ = 0,1215 µg/mL; R1_A6 EC₅₀ = 0,1393 µg/mL

Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne wiążą swoje cele molekularne w podobny sposób jak referencyjne przeciwciała monospecyficzne. Zarówno wartości EC_{50} jak i charakterystyka krzywych wiązania są do siebie bardzo zbliżone. Informacja ta jest istotna w szczególności w kontekście wiązania PD-L1. Co prawda zastosowany format przeciwciał sprawia, że mają dwa miejsca wiązania tego białka, podobnie jak referencyjne przeciwciała monospecyficzne, jednakże fakt że elementem odpowiadającym za tą interakcję jest fragment ScFv a nie pełne ramię Fab, mógł wzbudzać obawy o różnice w kinetyce wiązania. Nie występują istotne różnice w wiązaniu celów molekularnych pomiędzy tymi samymi przeciwciałami różnych klas (IgG1 i IgG4).

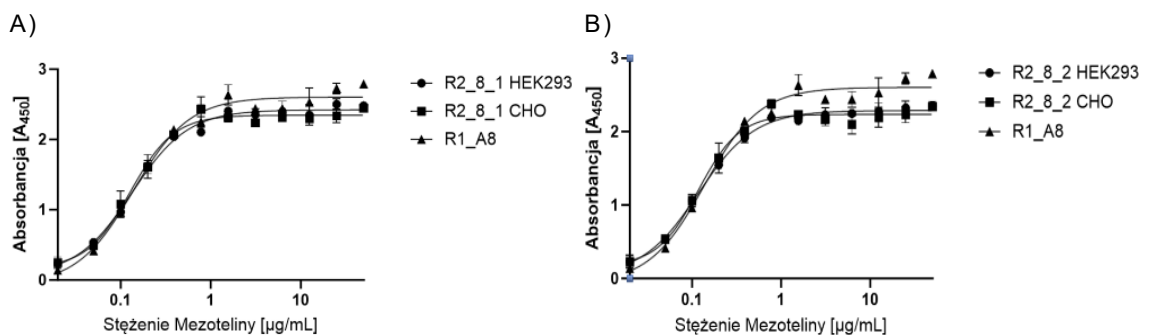
Po wyprodukowaniu przeciwciał bispecyficznych w stabilnych liniach komórkowych postanowiono zweryfikować czy nie występują różnice w zdolności wiązania celów molekularnych względem przeciwciał wyprodukowanych w systemie przejściowym.

Rycina 30. Wiązanie ROR-1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych (CHO) oraz w systemie przejściowym (HEK293) i przeciwciała anty-ROR-1.



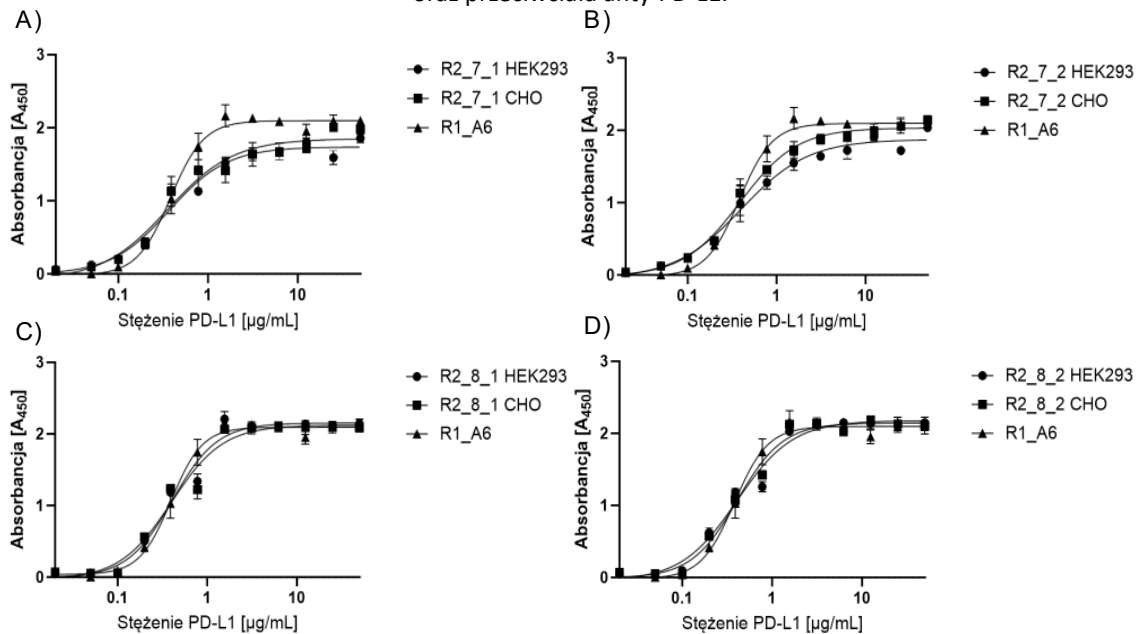
A) R2_7_1 HEK293 $EC_{50} = 0,67 \mu\text{g/mL}$; R2_7_1 CHO $EC_{50} = 0,67 \mu\text{g/mL}$; B) R2_7_2 HEK293 $EC_{50} = 0,64 \mu\text{g/mL}$; R2_7_2 CHO $EC_{50} = 0,65 \mu\text{g/mL}$; R1_A7 $EC_{50} = 0,75 \mu\text{g/mL}$

Rycina 31. Wiązanie Mezeteliny do przeciwciał bispecyficznych Mezetelina x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych (CHO) oraz w systemie przejściowym (HEK293) i przeciwciała aty-Mezetelina.



A) R2_8_1 HEK293 $EC_{50} = 0,13 \mu\text{g/mL}$; R2_8_1 CHO $EC_{50} = 0,12 \mu\text{g/mL}$; B) R2_8_2 HEK293 $EC_{50} = 0,11 \mu\text{g/mL}$; R2_8_2 CHO $EC_{50} = 0,11 \mu\text{g/mL}$; R1_A8 $EC_{50} = 0,13 \mu\text{g/mL}$

Rycina 32. Wiązanie PD-L1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezotelina x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych (CHO) oraz w systemie przejściowym (HEK293) oraz przeciwciała anty-PD-L1.



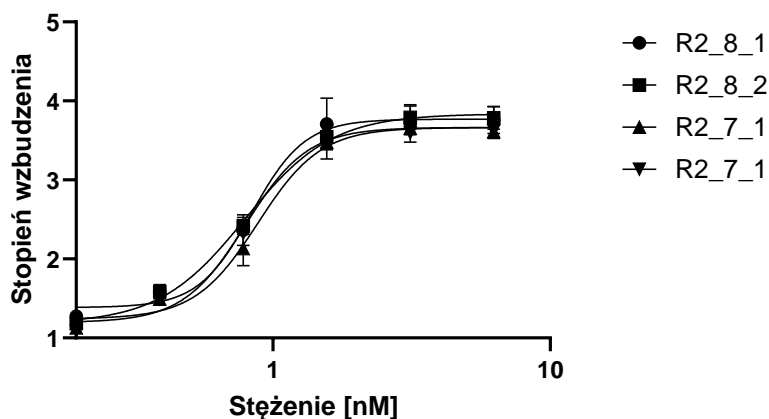
A) R2_7_1 HEK293 EC₅₀ = 0,36 µg/mL; R2_7_1 CHO EC₅₀ = 0,35 µg/mL; B) R2_7_2 HEK293 EC₅₀ = 0,40 µg/mL; R2_7_2 CHO EC₅₀ = 0,38 µg/mL; A) R2_8_1 HEK293 EC₅₀ = 0,40 µg/mL; R2_8_1 CHO EC₅₀ = 0,39 µg/mL; B) R2_8_2 HEK293 EC₅₀ = 0,40 µg/mL; R2_8_2 CHO EC₅₀ = 0,40 µg/mL; R1_A6 EC₅₀ = 0,38 µg/mL

Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy przeciwciałami wyprodukowanymi w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych. Ponownie charakterystyka krzywych wiązania, jak i wyliczone wartości EC₅₀ są bardzo zbliżone do przeciwciał referencyjnych. Nie występują istotne różnice pomiędzy tymi samymi przeciwciałami różnych klas (IgG1 i IgG4).

8.4. Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne skutecznie blokują ścieżkę sygnalizacyjną PD-1/PD-L1.

Analiza zdolności do inhibicji ścieżki sygnalizacyjnej PD-1/PD-L1 została przeprowadzona z wykorzystaniem testu biologicznego: *PD-1/PD-L1 blockade bioassay* (Promega). Oparty jest on o pomiar bioluminescencji w ko-kulturze komórek adherentnych CHO-K1 i zawiesinowych Jurkat (podrozdział 6.2.16). Po wyprodukowaniu przeciwciał bispecyficznych w systemie przejściowym sprawdzono ich zdolność do blokowania tej interakcji.

Rycina 33. Inhibicja interakcji PD-1/PD-L1 przez przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym.

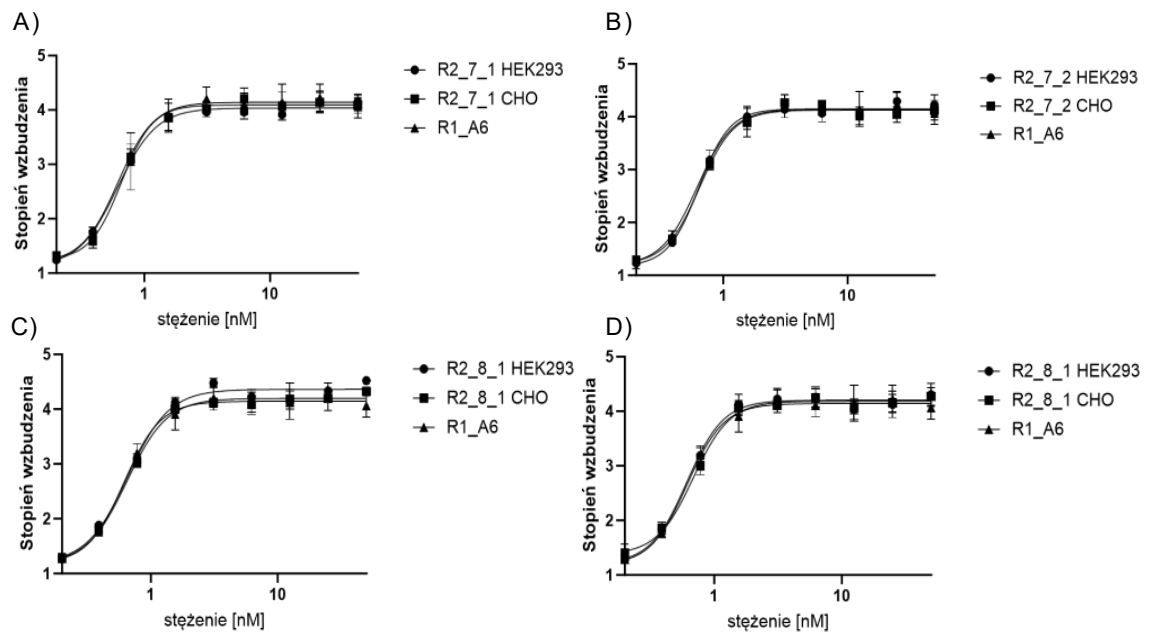


R2_7_1 $EC_{50} = 0,83$ nM; R2_7_2 $EC_{50} = 0,79$ nM; R2_8_1 $EC_{50} = 0,88$ nM; R2_8_2 $EC_{50} = 0,79$ nM.

W eksperymencie tym zostało potwierdzone, że badane przeciwciała bispecyficzne mają ten sam potencjał blokowania ścieżki sygnalizacyjnej PD-1/PD-L1. Zarówno charakterystyka krzywej inhibicji, jak i wyliczone wartości EC_{50} we wszystkich przypadkach są do siebie bardzo zbliżone. Jest to spodziewany efekt, ponieważ wszystkie z badanych przeciwciał bispecyficznych mają takie same fragmenty blokujące wiązanie PD-1/PD-L1.

Następnie, podobnie jak w przypadku testów ELISA, postanowiono zweryfikować, czy występują różnice w tych właściwościach pomiędzy przeciwciałami wyprodukowanymi w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych. Ponadto, sprawdzono również czy siła tej inhibicji jest różna od przeciwciała monospecyficznego anty-PD-L1 (Atezolizumab).

Rycina 34. Inhibicja interakcji PD-1/PD-L1 przez przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych, w odniesieniu do przeciwciała monospecyficznego anty-PD-L1.



A) R2_7_1 HEK293 EC_{50} = 0,61 nM; R2_7_1 CHO EC_{50} = 0,65 nM; B) R2_7_2 HEK293 EC_{50} = 0,63 nM; R2_7_2 CHO EC_{50} = 0,64 nM; C) R2_8_1 HEK293 EC_{50} = 0,65 nM; R2_8_1 CHO EC_{50} = 0,64 nM; D) R2_8_2 HEK293 EC_{50} = 0,61 nM; R2_8_2 CHO EC_{50} = 0,68 nM; R1_A6 EC_{50} = 0,61 nM

Powyższe wyniki wskazują na brak istotnych różnic w zdolności do inhibicji interakcji PD-1/PD-L1 pomiędzy przeciwciałami bispecyficznymi wyprodukowanymi w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych. Co istotne, zdolność do inhibicji tego szlaku nie odbiega od wyników uzyskanych dla referencyjnego przeciwciała anty-PD-L1. Podobnie jak w przypadku testów ELISA, inny charakter fragmentu wiążącego cel molekularny (pełne ramię Fab i fragment scFv), mógł wzbudzać obawy o gorszy profil inhibicji.

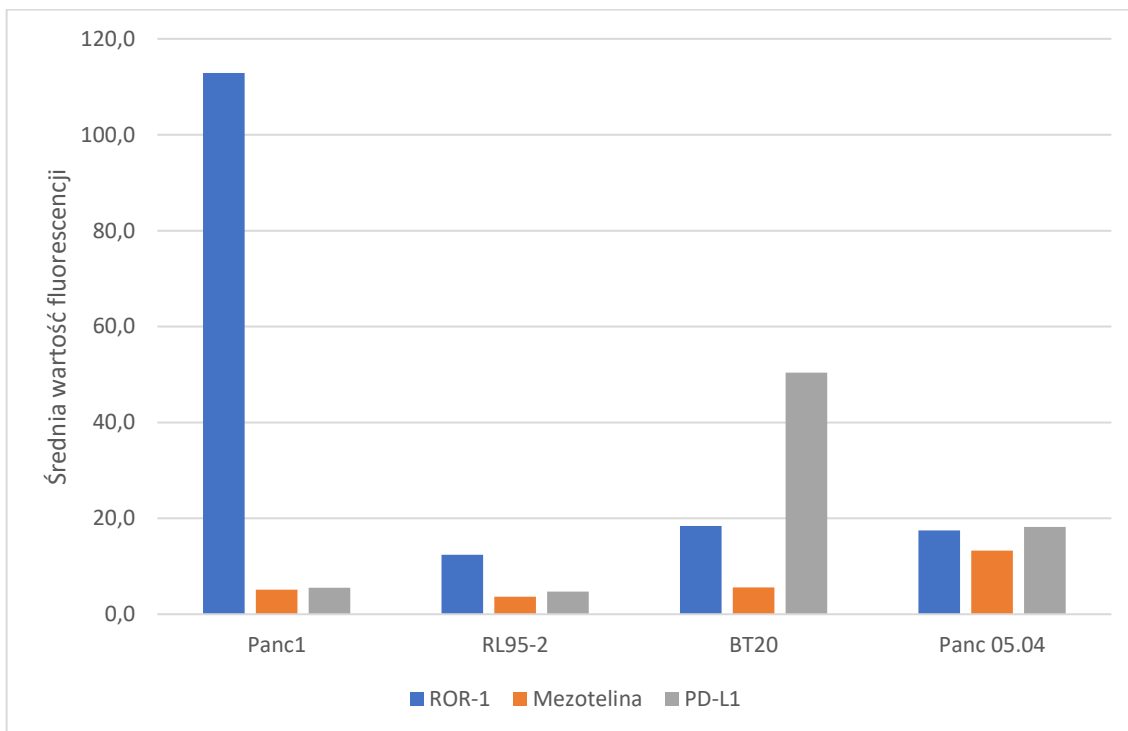
Na podstawie rezultatów otrzymanych w analizie fizyko-chemicznej, badaniu zdolności wiązania celów molekularnych i inhibicji szlaku PD-1/PD-L1, stwierdzić można, że przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych są sobie równoważne.

8.5. Testowane nowotworowe linie komórkowe mają różny poziom ekspresji celów molekularnych (ROR-1, Mezotelina, PD-L1)

W celu zbadania poziomu ekspresji receptorów (ROR-1, Mezotelina i PD-L1) na powierzchni komórek nowotworowych wykorzystano metody cytometrii przepływowej. Do analiz użyto hodowli komórkowych (Panc1, RL95-2, BT20 i Panc 05.04) będących na etapie 8 pasażu od czasu

rozrożnienia komórek. Dane przedstawione są jako średnia wartość fluorescencji uzyskanej po inkubacji z odpowiednimi przeciwciałami I- i II-rzędowymi, po odcięciu wartości tła (sygnał fluorescencji uzyskany z komórek barwionych tylko przeciwciałami II-rzędowymi).

Rycina 35. Poziom ekspresji celów molekularnych na wykorzystywanych nowotworowych liniach komórkowych.

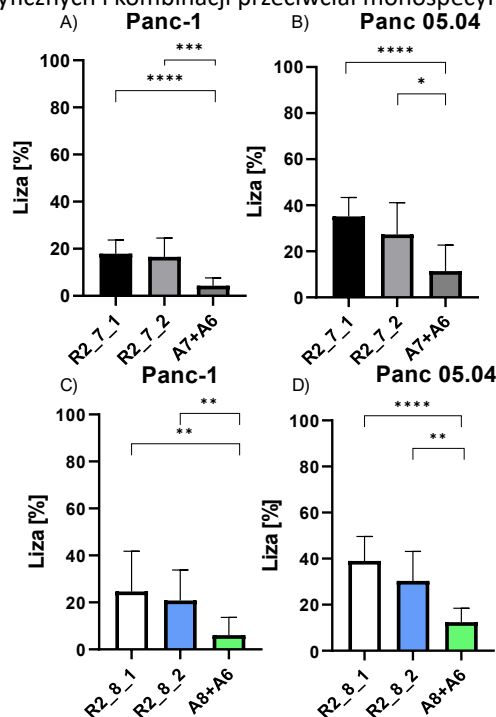


Jak widać na powyższym wykresie wszystkie wytypowane cele molekularne są obecne na powierzchni wykorzystywanych linii nowotworowych. Szczególnie uwagę zwraca bardzo wysoki poziom ROR-1 na powierzchni komórek linii Panc1 – dla pozostałych linii wartość ta jest na podobnie niskim poziomie. Mezetelina jest obecna w niewielkiej ilości na wszystkich liniach – najwyższą wartość obserwuje się dla linii Panc 05.04. PD-L1 występuje w największej ilości na linii BT20, w średniej na linii Panc 05.04 i jest go bardzo mało na liniach RL95-2 i Panc1. Należy pamiętać że wynik ten jest raczej orientacyjny, można spodziewać się zmian w ilości badanych receptorów na powierzchni komórek nowotworowych w zależności od warunków hodowli (np. ko-kultury z komórkami PBMC) czy dodatku badanych przeciwciał bispecyficznych lub referencyjnych.

8.6. Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne istotnie zwiększają lizę komórek nowotworowych w porównaniu do kombinacji przeciwciał monospecyficznych.

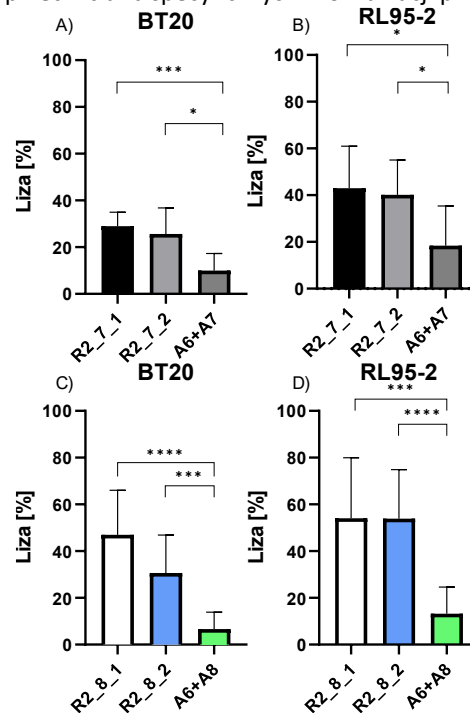
Dla oceny potencjału przeciwnowotworowego wyprodukowanych przeciwciał bispecyficznych przygotowano ko-kultury (w stosunku E:T – 10:1) ludzkich jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) z komórkami linii nowotworowych (RL95-2, BT20, Panc1, Panc 05.04). Przeciwciała bispecyficzne dodawane były do takich ko-kultur w stężeniu 10 nM. Aby utrzymać ten sam stechiometryczny stosunek miejsc wiązania celów molekularnych stężenie referencyjnych przeciwciał monospecyficznych również ustalono na 10 nM. Hodowle utrzymywane były przez 120 godzin, a następnie po usunięciu komórek PBMC, ilość żywych komórek nowotworowych oznaczana była za pomocą odczynnika MTT. Liza komórek określana jest jako procent obniżonego sygnału absorbancji względem ko-kultury bez dodatku przeciwciał (PBMC + komórki nowotworowe). Ze względu na wysoką zmienność w aktywności komórek PBMC pomiędzy dawcami krwi (Appleby et al., 2013), każdy z wyników jest średnią z co najmniej 3 powtórzeń i zastosowaniu co najmniej 3 donorów komórek.

Rycina 36. Poziom liza komórek nowotworowych trzustki w obecności komórek PBMC, przeciwciał bispecyficznych i kombinacji przeciwciał monospecyficznych.



A) R2_7_1 vs A7+A6 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A7+A6 $p = 0,0006$; B) R2_7_1 vs A7+A6 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A7+A6 = 0,0169; C) R2_8_1 vs A8+A6 $p = 0,069$, R2_8_2 vs A8+A6 = 0,0068; D) R2_8_1 vs A8+A6 $p < 0,0001$. R2_8_2 vs A8+A6 $p = 0,0016$

Rycina 37. Poziom liza komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i piersi (BT20) w obecności komórek PBMC, przeciwciał bispecyficznych i kombinacji przeciwciał monospecyficznych.



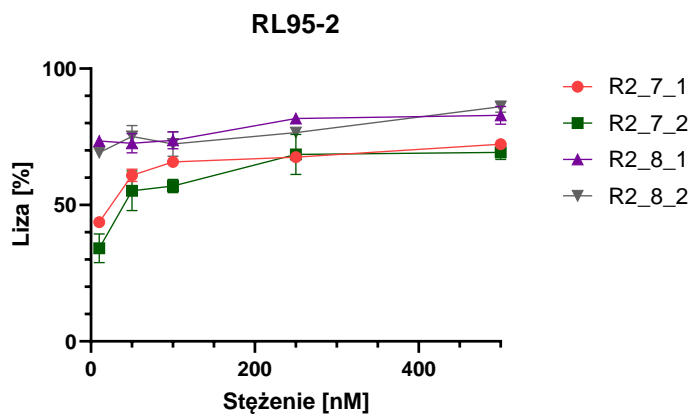
A) R2_7_1 vs A7+A6 $p=0,0002$, R2_7_2 vs A7+A6 $p=0,0163$; B) R2_7_1 vs A7+A6 $p=0,0199$, R2_7_2 vs A7+A6 = 0,0186; C) R2_8_1 vs A8+A6 $p<0,0001$, R2_8_2 vs A8+A6 = 0,0006; D) R2_8_1 vs A8+A6 $p=0,0003$. R2_8_2 vs A8+A6 $p<0,0001$

Na podstawie powyżej zaprezentowanych wykresów wywnioskować można że badane przeciwciała bispecyficzne promują lizę testowanych komórek nowotworowych (Panc1, Panc 05.04, BT20, RL95-2) w obecności ludzkich komórek PBMC. We wszystkich wypadkach wynik uzyskiwany dla przeciwciał bispecyficznych był istotnie wyższy niż dla analogicznych terapii kombinowanych przeciwciałami monospecyficznymi. Siłę efektu pośród linii komórkowych można uszeregować według następującego schematu: RL95-2 > BT20 ≥ Panc 05.04 > Panc1. Ponadto, zgodnie z oczekiwaniami, przeciwciała klasy IgG1 wykazują wyższy poziom promocji lizy komórek nowotworowych, jednakże należy podkreślić, że różnica ta jest istotna statystycznie jedynie dla przeciwciał Mezotelina x PD-L1 w linii komórkowej BT20. Jednocześnie, w przypadku linii RL95-2 różnice w uzyskiwanych wynikach pomiędzy klasami przeciwciał są nieznaczne. Analizując powyższe wykresy całościowo warto zauważyć, że przeciwciała Mezotelina x PD-L1 skuteczniej promują lizę komórek nowotworowych niż przeciwciała ROR-1 x PD-L1.

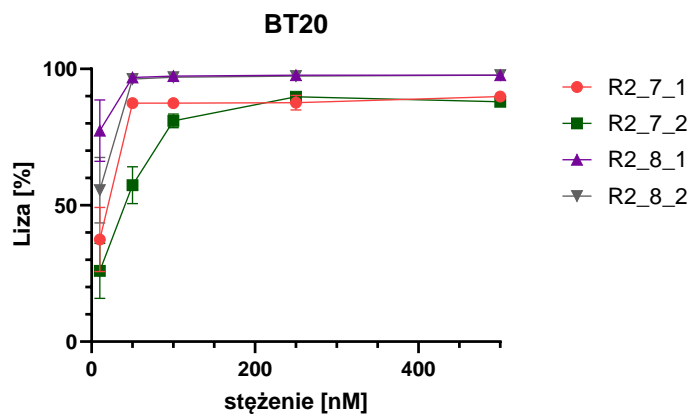
8.7. Skuteczność przeciwciał bispecyficznych zależy od zastosowanego stężenia.

Następnym etapem projektu było zbadanie wpływu stężenia przeciwciał bispecyficznych na poziom lizy komórek nowotworowych w obecności ludzkich komórek PBMC. Do tego celu zastosowano 3 linie komórkowe (Panc1, BT20 i RL95-2) i badano następujące stężenia przeciwciał: 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM i 10 nM. Każdy punkt pomiarowy jest średnią z 3 niezależnych powtórzeń z wykorzystaniem jednego donora komórek PBMC.

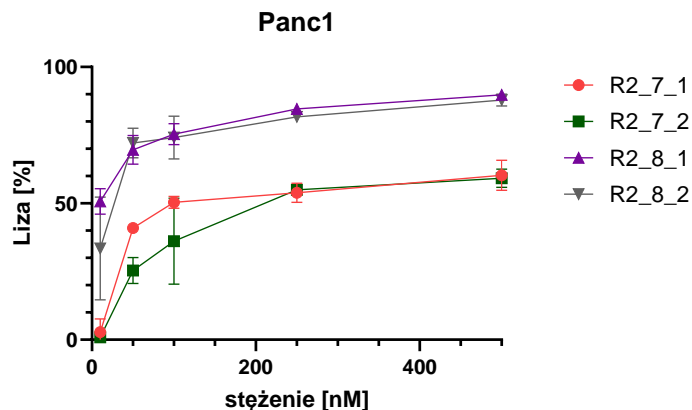
Rycina 38. Poziom liza komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) w obecności komórek PBMC i różnych stężeń przeciwciał bispecyficznych.



Rycina 39. Poziom liza komórek nowotworowych piersi (BT20) w obecności komórek PBMC i różnych stężeń przeciwciał bispecyficznych.



Rycina 40. Poziom lizy komórek nowotworowych trzustki (Panc1) w obecności komórek PBMC i różnych stężeń przeciwciał bispecyficznych.



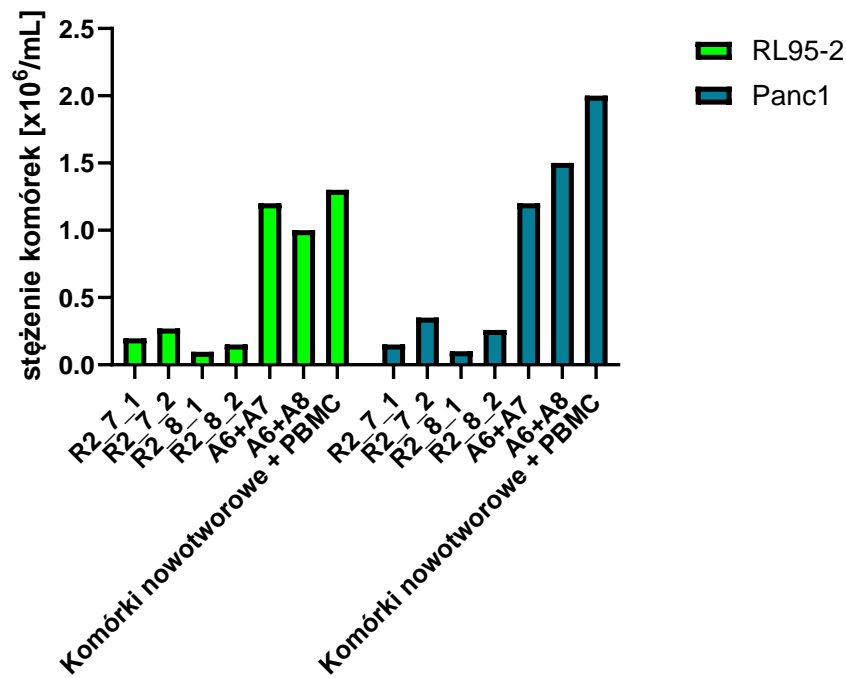
Dla linii komórkowej RL-95-2 zastosowanie przeciwciał w stężeniu 10 nM skutkowało lizą na poziomie około 70% dla układu Mezetelina x PD-L1 i około 40% dla ROR-1 x PD-L1. Podniesienie stężeń prowadziło do zwiększonej eliminacji komórek nowotworowych, przy czym efekt ten był bardziej widoczny dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1. W przypadku linii BT20 można zauważyć maksymalny efekt działania już w stężeniu 50 nM dla przeciwciał R2_7_1, R2_8_1 i R2_8_2, natomiast dla przeciwciała R2_7_2 w stężeniu 100 nM. Skuteczność eliminacji komórek linii BT20 jest bardzo wysoka, powyżej 90% lizy dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1 i blisko 80% dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach linia Panc1 wydaje się być najbardziej odporna na terapię badanymi przeciwciałami bispecyficznymi. Przeciwciała ROR-1 x PD-L1 w stężeniu 10 nM nie wykazują praktycznie żadnej promocji lizy komórek nowotworowych, a ich efektywność rośnie wraz ze stężeniem skutkując lizą na poziomie 50% w stężeniach 250 i 500 nM. Różnica w efektywności w stężeniu 10 nM w porównaniu do poprzednich eksperymentów wynika najprawdopodobniej z zastosowanych komórek PBMC, a konkretniej ich donora. Ponownie, przeciwciała Mezetelina x PD-L1 wykazują wyższą aktywność w promocji lizy komórek Panc1, prowadząc do lizy na poziomie około 50% (R2_8_1) i 30% (R2_8_2) w stężeniu 10 nM aż do około 80% w stężeniu 500 nM. We wszystkich przypadkach utrzymany został trend wyższej wydajności przeciwciał klasy IgG1 niż IgG4.

8.8. Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne prowadzą do wzrostu produkcji cytokin prozapalnych w komórkach PBMC.

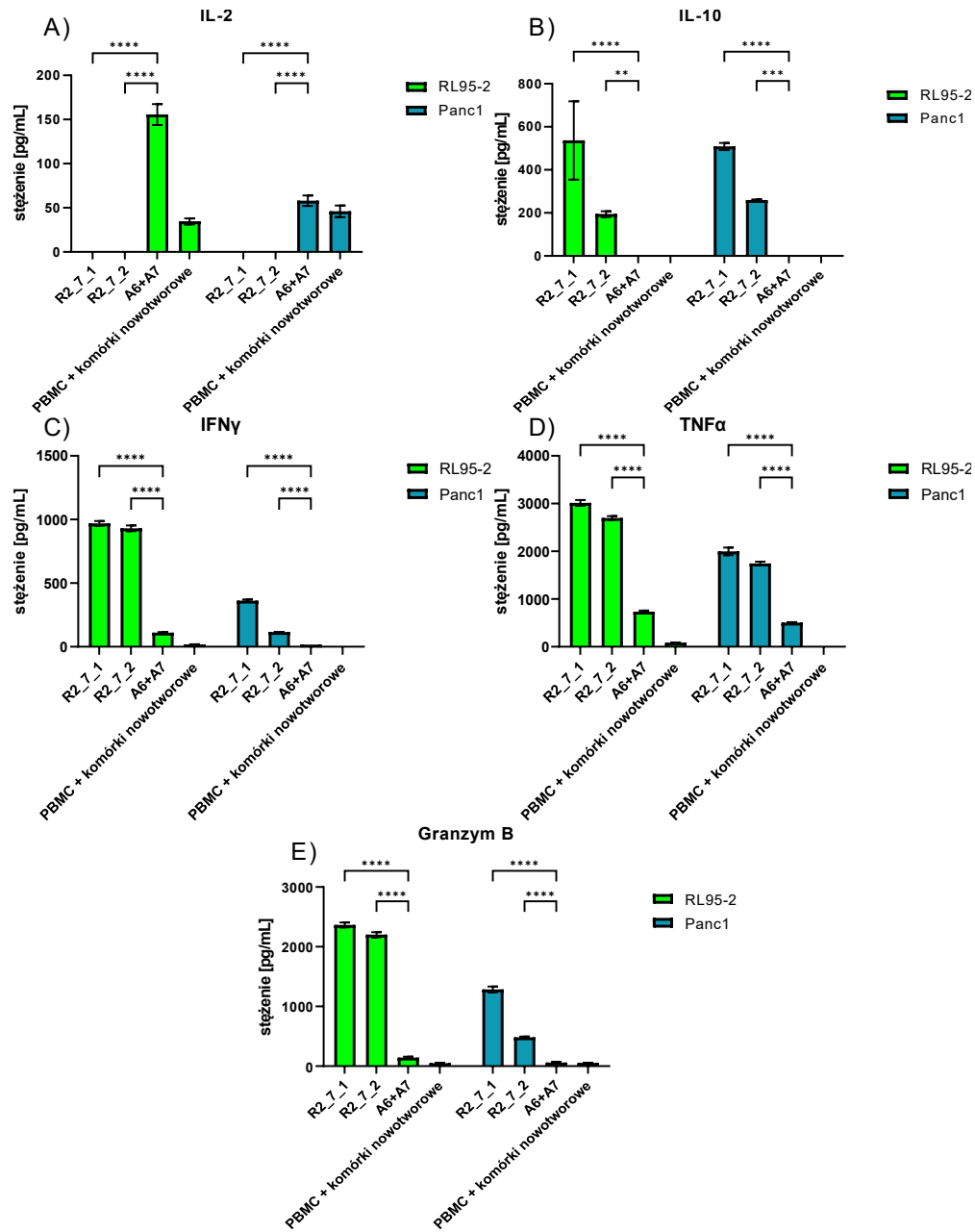
Oznaczanie poziomu cytokin (IL-2, IL-10, IFN γ , TNF α i Granzym B) produkowanych przez komórki PBMC w ko-kulturze z komórkami nowotworowymi przeprowadzone zostało za pomocą testów ELISA. Do analiz wybrano 2 linie komórkowe – RL95-2 (niska odporność na badaną terapię) i Panc1 (wysoka odporność na badaną terapię). Przeciwciała bispecyficzne stosowane

były w stężeniu 50 nM, przeciwciała monospecyficzne w terapii kombinowanej w stężeniu 50 nM + 50 nM, natomiast w próbkach nietraktowanych (PBMC + komórki nowotworowe) nie dodawano żadnych związków. Ko-kultury komórek PBMC i komórek nowotworowych prowadzone były przez 120 godzin. Równoległe, przez ten sam czas, utrzymywano hodowlę samych komórek PBMC, jednakże we wszystkich przypadkach ilość cytokin w takiej hodowli była poniżej granicy detekcji testów. Każdy wynik jest średnią z 3 niezależnych powtórzeń z wykorzystaniem jednego donora komórek PBMC. Po zakończonej ko-kulturze pozostałe komórki nowotworowe zostały zebrane i policzone celem zobrazowania skuteczności promocji lizy komórkowej przez przeciwciała:

Rycina 41. Stężenie żywych komórek nowotworowych po 5 dniowej ko-kulturze z komórkami PBMC, dodatkiem przeciwciał bispecyficznych lub kombinacji przeciwciał monospecyficznych.

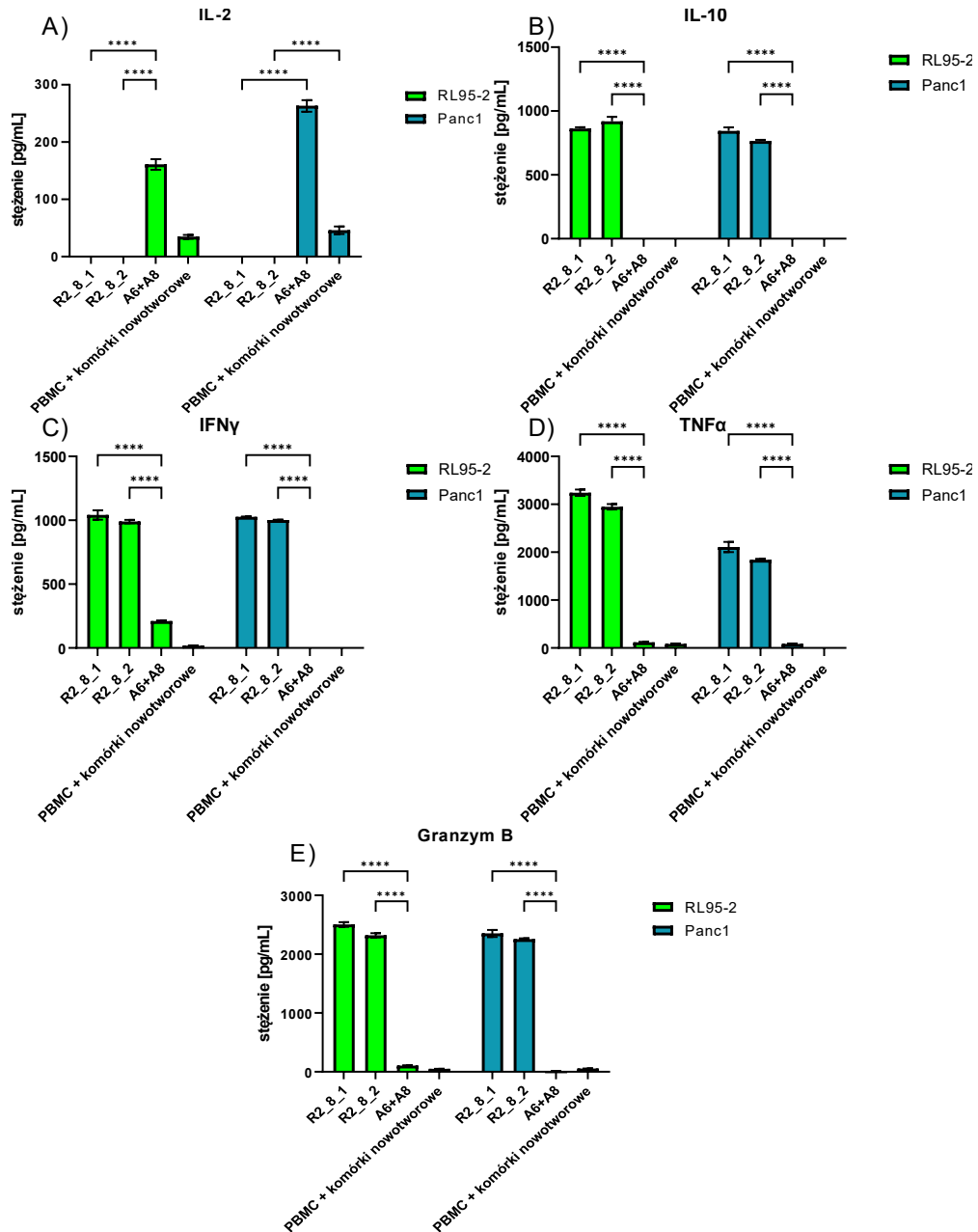


Rycina 42. Stężenie cytokin w ko-kulturach komórek PBMC i komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i trzustki (Panc1) z dodatkiem przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i kombinacji przeciwciał monospecyficznych anti-ROR-1 i anti-PD-L1.



A) RL95-2: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$; Panc1: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$. **B)** RL95-2: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p = 0,01$; Panc1: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p = 0,008$. **C)** RL95-2: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$; Panc1: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$. **D)** RL95-2: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$; Panc1: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$. **E)** RL95-2: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$; Panc1: R2_7_1 vs A6+A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$.

Rycina 43. Stężenie cytokin w ko-kulturach komórek PBMC i komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i trzustki (Panc1) z dodatkiem przeciwciał bispecyficznych Mezotelina x PD-L1 i kombinacji przeciwciał monospecyficznych anty-Mezotelina i anty-PD-L1.



A) RL95-2: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$. **B)** RL95-2: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$. **C)** RL95-2: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$. **D)** RL95-2: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$. **E)** RL95-2: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6+A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6+A8 $p < 0,0001$.

Powyższe wyniki wskazują że zastosowanie przeciwciał bispecyficznych, zarówno ROR-1 x PD-L1 jak i Mezetelina x PD-L1 skutkuje istotnie zwiększoną produkcją cytokin: IL-10, IFN γ , TNF α i Granzymu B w porównaniu do kombinacji przeciwciał monospecyficznych, przy jednoczesnym obniżeniu produkcji IL-2. Efekt ten obserwowany jest zarówno dla linii nowotworowej RL95-2 jak i Panc1. Stężenie cytokin w próbkach pochodzących z ko-kultury PBMC i komórek nowotworowych RL95-2 jest większości przypadków wyższe niż dla komórek Panc1. Wyjątkiem jest produkcja IL-2 w terapii anty-Mezetelina/anty-PD-L1. Dla linii komórkowej RL95-2 różnica w stężeniu cytokin pomiędzy przeciwciałami ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1 jest znacząca jedynie w przypadku IL-10. Z kolei dla linii Panc1 zauważyć można znacznie większą produkcję cytokin w przypadku stosowania przeciwciał Mezetelina x PD-L1. Równocześnie, w większości przypadków zauważyć można istotnie wyższą produkcję cytokin przy zastosowaniu przeciwciał klasy IgG1 w porównaniu do IgG4. Brak takiego stanu rzeczy obserwuje się jedynie w przypadku produkcji IFN γ w ko-kulturze PBMC/Panc1 traktowanej przeciwciałami Mezetelina x PD-L1 (IFN γ ; Panc1; R2_8_1 vs R2_8_2 – p=0,1755). Podsumowując, dla cytokin IL-10, IFN γ , TNF α i Granzym B zaobserwować można korelację pomiędzy skutecznością terapii (RL95-2 vs Panc1 i IgG1 vs IgG4) a ich zwiększoną produkcją. W przypadku IL-2 zależność ta nie występuje – podwyższona produkcja tej cytokiny obserwowana jest dla nisko skutecznych terapii (A6+A7 i A6+A8) i w mniejszym stopniu dla ko-kultur nietraktowanych (Komórki nowotworowe + PBMC).

8.9. Badane przeciwciała bispecyficzne wpływają na zmiany w subpopulacjach limfocytów T CD4+.

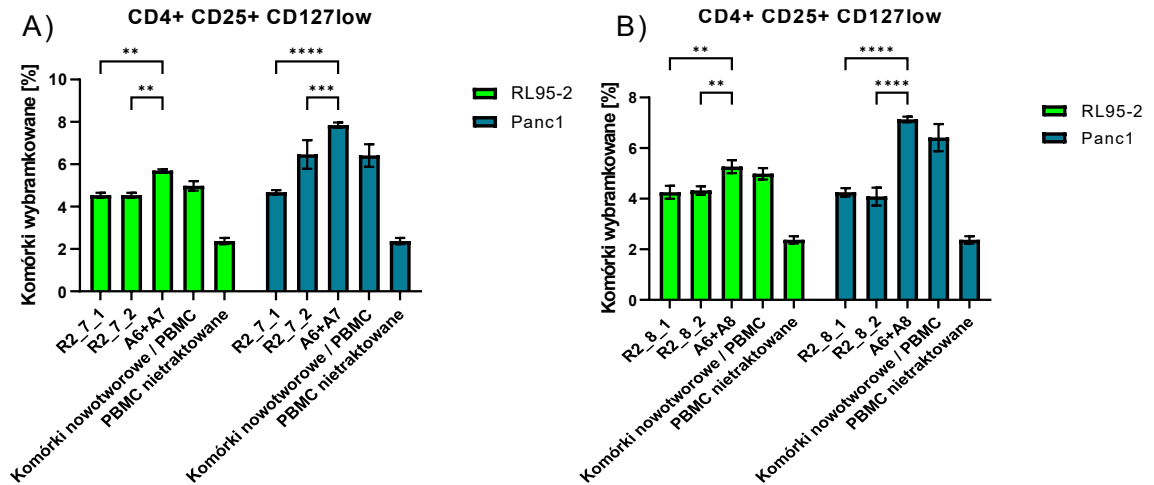
W celu określenia zmian w subpopulacjach limfocytów T CD4+ wykorzystano panel przeciwciał sprzężonych z fluorochromami i dalszą analizę z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Oznaczanymi markerami limfocytów były CD4, CD25, CD127 i FoxP3. Ko-kultury komórek PBMC i komórek nowotworowych prowadzone były przez 120 godzin. Równoległe, przez ten sam czas, utrzymywano hodowlę samych komórek PBMC w celu określenia początkowych udziałów poszczególnych subpopulacji. Każdy wynik jest średnią z 3 niezależnych powtórzeń z wykorzystaniem jednego donora komórek PBMC. Dane przedstawione zostały jako procent komórek pozytywnych względem określonych markerów w ustalonej bramce odczytu.

8.9.1. Zastosowanie przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1 prowadzi do zmniejszenia populacji limfocytów T regulatorowych.

Pierwszym etapem badań było sprawdzenie zmian w subpopulacji limfocytów T regulatorowych. Limfocyty takie charakteryzują się następującym profilem markerów:

CD4+CD25+CD127low, a wśród tej populacji szczególnie dużą zdolność do immunosupresji mają te o wysokiej ekspresji czynnika transkrypcyjnego FoxP3.

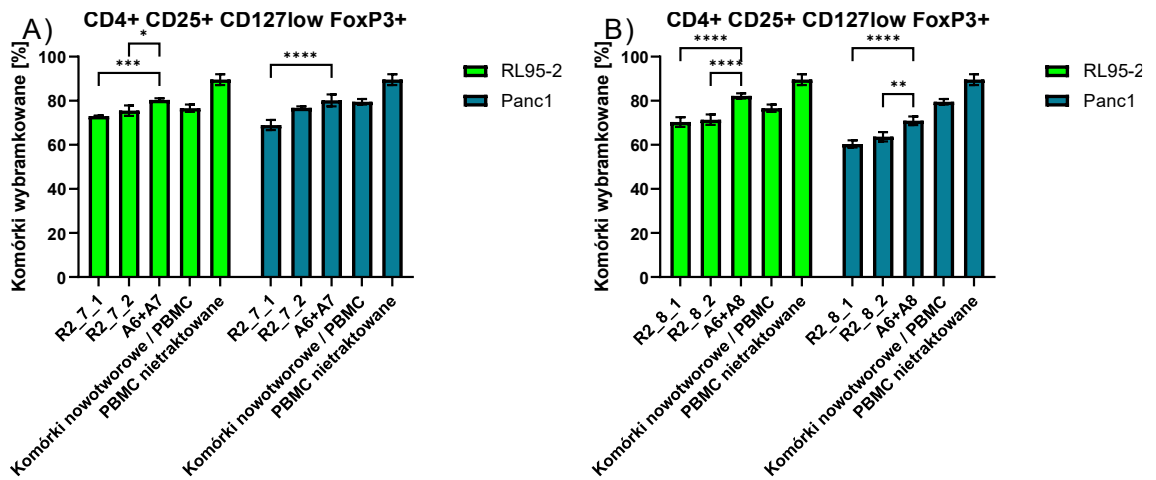
Rycina 44. Procentowa ilość limfocytów T CD4+ CD25+ CD127low.



A) RL95-2: R2_7_1 vs A6 + A7 $p=0,0011$, R2_7_2 vs A6 + A7 $p=0,015$; Panc1: R2_7_1 vs A6 + A7 $p<0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p=0,0001$. B) RL95-2: R2_8_1 vs A6 + A8 $p=0,0012$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p=0,0025$; Panc1: R2_8_1 vs A6 + A8 $p<0,0001$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p<0,0001$.

Powyższe wykresy wskazują że, wielkość subpopulacji limfocytów T regulatorowych maleje po zastosowaniu badanych przeciwciał bispecyficznych. Dla linii komórkowej RL95-2 procentowy udział tych limfocytów jest podobny zarówno dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1 jak i Mezetelina x PD-L1 i wynosi około 4% wszystkich komórek PBMC w bramce odczytu – istotnie mniej niż w próbach z kombinacją analogicznych przeciwciał monospecyficznych. W przypadku linii Panc1 sytuacja jest podobna z wyjątkiem przeciwciała R2_7_2 które w mniejszym stopniu ogranicza tę subpopulację limfocytów. Dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1 brak jest istotnych różnic pomiędzy klasami przeciwciał, podczas gdy dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1 istotna różnica występuje w przypadku linii Panc1 ($p<0,0001$). Można również zauważyć, że wielkość tej subpopulacji jest znacznie mniejsza w próbie PBMC nietraktowane, co wskazuje, że ko-kultura z komórkami nowotworowymi prowadzi do zwiększenia ilości limfocytów T regulatorowych.

Rycina 45. Procentowa ilość limfocytów T CD4+ CD25+ CD127low FoxP3+.

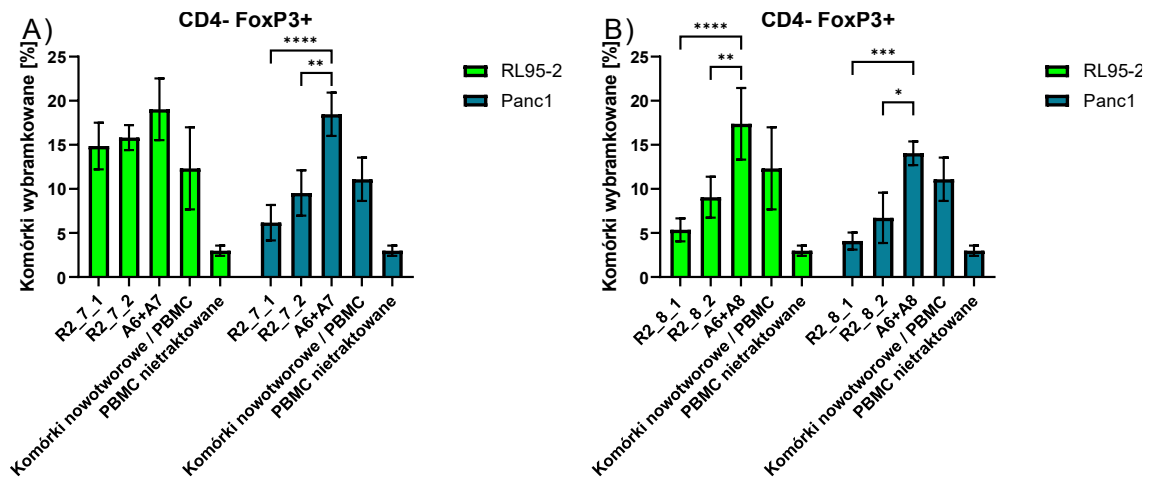


A) RL95-2: R2_7_1 vs A6 + A7 $p=0,0009$, R2_7_2 vs A6 + A7 $p=0,0344$; Panc1: R2_7_1 vs A6 + A7 $p<0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p=0,2146$. B) RL95-2: R2_8_1 vs A6 + A8 $p<0,0001$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p<0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6 + A8 $p<0,0001$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p=0,018$.

Zastosowanie badanych przeciwciał bispecyficznych prowadzi również do obniżenia limfocytów T regulatorowych z wysoką ekspresją czynnika transkrypcyjnego FoxP3. W przypadku linii RL95-2 brak jest istotnych różnic pomiędzy przeciwciałami ROR-1 x PD-L1 i Mezotelina x PD-L1. Różnice uwidaczniają się dla bardziej odpornej na terapię linii Panc1, gdzie przeciwciała Mezotelina x PD-L1 w większym stopniu ograniczają wielkość tej subpopulacji. Ponownie, przeciwciało R2_7_2 w ko-kulturze komórek PBMC z linią Panc1 w mniejszym stopniu ogranicza ilość limfocytów CD4+CD25+CD127lowFoxP3+ niż przeciwciało R2_7_1 ($p=0,0005$). W pozostałych przypadkach brak jest istotnych różnic pomiędzy klasami przeciwciał. Co ciekawe, pomimo że dla PBMC nietraktowanych ilość limfocytów T regulatorowych jest dość niska (około 2%) to wśród nich znaczną część stanowią te o wysokiej ekspresji FoxP3, a ich ilość jest ograniczana w ko-kulturze z komórkami nowotworowymi.

Innym rodzajem immunosupresyjnych limfocytów T regulatorowych są limfocyty o markerach CD4-FoxP3+.

Rycina 46. Procentowa ilość limfocytów T CD4- FoxP3+.



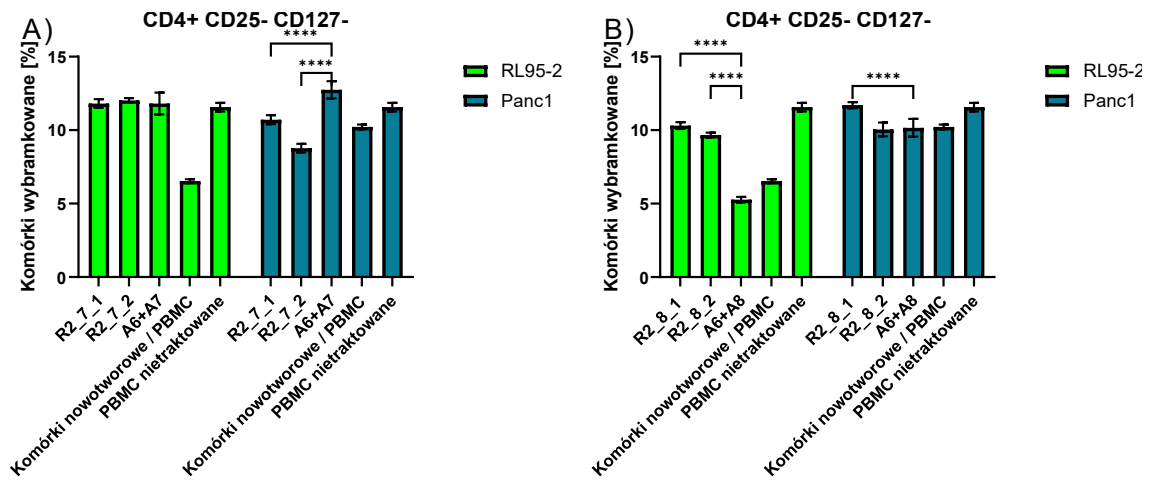
A) RL95-2: R2_7_1 vs A6 + A7 $p=0,3079$, R2_7_2 vs A6 + A7 $p=0,5592$; Panc1: R2_7_1 vs A6 + A7 $p<0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p=0,0033$. B) RL95-2: R2_8_1 vs A6 + A8 $p<0,0001$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p=0,0049$; Panc1: R2_8_1 vs A6 + A8 $p=0,0008$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p=0,0143$.

W ograniczaniu tej populacji limfocytów znacznie efektywniejsze wydają się być przeciwciała Mezotelina x PD-L1, które zarówno dla linii RL95-2 jak i Panc 1 obniżają ich ilość do poniżej 10%. W podobny sposób działają przeciwciała ROR-1 x PD-L1, jednakże jedynie dla linii Panc1, w przypadku linii RL95-2 brak jest istotnych różnic względem kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Brak jest również istotnych różnic pomiędzy klasami przeciwciał. Warto zwrócić uwagę na fakt, że w próbie PBMC nietraktowane ilość limfocytów tej subpopulacji jest bardzo niska i rośnie znacząco po ko-kulturze z komórkami nowotworowymi.

8.9.2. Przeciwciała Mezotelina x PD-L1 zwiększają subpopulację limfocytów CD4+CD25-CD127-

Limfocyty T CD4+CD25-CD127- określane są jako efektorowa subpopulacja limfocytów T CD4+ o potencjalnie istotnym znaczeniu w odpowiedzi przeciwnowotworowej (Péguillet et al., 2014).

Rycina 47. Procentowa ilość limfocytów T CD4+ CD25- CD127-.



A) RL95-2: R2_7_1 vs A6 + A7 $p > 0,9999$, R2_7_2 vs A6 + A7 $p = 0,9607$; Panc1: R2_7_1 vs A6 + A7 $p < 0,0001$, R2_7_2 vs A6+A7 $p < 0,0001$. B) RL95-2: R2_8_1 vs A6 + A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p < 0,0001$; Panc1: R2_8_1 vs A6 + A8 $p < 0,0001$, R2_8_2 vs A6 + A8 $p = 0,9915$.

Przeciwciała ROR-1 x PD-L1 nie promują zwiększania subpopulacji limfocytów CD4+CD25-CD127- w porównaniu do kombinacji analogicznych przeciwciał monospecyficznych. Dla linii RL95-2 wielkość tej subpopulacji jest podobna zarówno dla przeciwciał bispecyficznych, kombinacji przeciwciał monospecyficznych jak i komórek PBMC nietraktowanych. W przypadku linii Panc1 zastosowanie przeciwciał bispecyficznych skutkuje mniejszą ilością tego rodzaju limfocytów niż użycie kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Jednocześnie efekt jest ten wyraźniejszy dla przeciwciał klasy IgG4 niż IgG1 (Panc1, R2_7_1 vs R2_7_2 $p < 0,0001$). Z drugiej strony przeciwciała Mezotelina x PD-L1 prowadzą do istotnego zwiększenia subpopulacji limfocytów CD4+CD25-CD127- względem kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Przeciwciało klasy IgG1 (R2_8_1) wywołuje taki efekt zarówno dla linii RL95-2 jak i Panc1, podczas gdy klasy IgG4 (R2_8_2) jedynie dla linii RL95-2. Również w tym przypadku, dla linii Panc1 przeciwciało klasy IgG1 istotnie zwiększa wielkość tej subpopulacji limfocytów względem klasy IgG4 (Panc1, R2_8_1 vs R2_8_2 $p < 0,0001$).

9. DYSKUSJA

Przeciwciała bispecyficzne stanowią innowacyjną klasę biologicznych cząsteczek terapeutycznych budzących coraz większe zainteresowanie szczególnie na polu walki z nowotworami. Specyfika ich funkcjonowania, a więc zdolność do wiązania dwóch antygenów jednocześnie, w połączeniu z mnogością możliwych do wyboru formatów budowy daje nadzieję na przezwycięzenie trudności napotykanych szczególnie w immunoterapii nowotworów (Brinkmann & Kontermann, 2017). Dotychczasowo znaczna część zaakceptowanych do użycia u ludzi przeciwciał bispecyficznych opiera się o schemat CD3 x TAA (ang. *Tumor-associated antigen*), zakładający przede wszystkim aktywację i fizyczne zbliżanie limfocytów T do komórek nowotworowych (Wei et al., 2022). Ponadto, na różnych etapach badań klinicznych znajdują się przeciwciała o innych mechanizmach działania: celujące w dwa różne antygeny nowotworowe, celujące w dwa różne punkty kontroli układu odpornościowego lub celujące jednocześnie w punkt kontroli układu immunologicznego i antygen nowotworowy. ROR-1 i Mezetelina to dwa białka błonowe występujące w bardzo niewielkich ilościach w zdrowych tkankach (Baskar et al., 2008; Hilliard et al., 2021). Jednocześnie obserwuje się ich znaczną nadekspresję w różnych rodzajach nowotworów, która nierzadko skorelowana jest z gorszymi prognozami choroby (Faust et al., 2022; S. Zhang et al., 2012). PD-L1 z kolei jest jednym z głównych punktów kontroli układu odpornościowego o bardzo istotnej roli w utrzymywaniu prawidłowej homeostazy immunologicznej (C. Sun et al., 2018). Receptor ten jest często wykorzystywane przez nowotwory do ucieczki z pod kontroli układu immunologicznego (Escors et al., 2018). W niniejszej pracy zastosowano podejście celowania jednocześnie w antygen nowotworowy i punkt kontroli układu odpornościowego. Wyprodukowane zostały 4 przeciwciała bispecyficzne: ROR-1 x PD-L1 IgG1 (R2_7_1), ROR-1 x PD-L1 IgG4 (R2_7_2), Mezetelina x PD-L1 IgG1 (R2_8_1) i Mezetelina x PD-L1 IgG4 (R2_8_2) – w symetrycznym formacie IgG(ScFv)₂, gdzie pełne przeciwciało skierowane jest przeciwko antygenom nowotworowym (ROR-1 lub Mezetelina) a do jego fragmentu Fc dołączone są dwa fragmenty ScFv anty-PD-L1.

Przeciwciała zostały wyprodukowane w dwóch systemach ekspresji w komórkach ssaczych – na początku w systemie przejściowym w komórkach HEK293 i następnie w stabilnych liniach komórkowych CHO. W produkcji przejściowej uzyskiwane ilości przeciwciał to około 5-6 mg/L w 7 dniowej hodowli. Dostępne dane literaturowe wskazują że przeciwciała bispecyficzne produkowane w systemie przejściowym są w granicach 30-100 mg/L (Q. Wang et al., 2019). Inne badania, w których analizowano symetryczne przeciwciała bispecyficzne HER2 x PD-L1 dowodzą

wydajności na poziomie 10-70 mg/L w zależności od zastosowanego formatu (Madsen et al., 2024). Należy jednak pamiętać, że wydajność produkcji w systemie przejściowym zależy m.in. od: 1) linii używanych komórek HEK, 2) medium hodowlanego, 3) wektora do ekspresji czy też 4) odczynnika do transfekcji. Biorąc pod uwagę fakt, że hodowle produkcyjne opisywane w tej pracy trwały tylko 7 dni (brak danych dla produkcji w referowanej literaturze), a komórki nie były suplementowane w trakcie hodowli specjalnymi pożywkami – spodziewać się można że wydajność jest zbliżona do dolnych granic opisywanych w literaturze. Przeniesienie produkcji do stabilnych linii CHO podyktowane było po części stosunkowo niską produktywnością w systemie przejściowym, ale przede wszystkim możliwością większej kontroli nad produkcją przeciwciał i szybszym procesem (po generacji stabilnych linii) uzyskiwania białek. W opisywanym projekcie, wydajność produkcji w stabilnych liniach wynosiła około 10-12 mg/L. W porównaniu do raportowanych wydajności – w granicy 0,3-1,2 g/L (Q. Wang et al., 2019) – wydaje się być to bardzo niską wartością. Należy jednak pamiętać, że w tym wypadku produkcja wykonywana była z puli komórek po selekcji antybiotykowej. Zwykle, produkcję w stabilnych liniach wykonuje się z wykorzystaniem linii komórkowej po dwóch rundach klonowania (izolacji najlepszych producentów z pojedynczych komórek), często również po pierwszej rundzie klonowania dokonuje się dodatkowej transfekcji. Ponadto produkcja najczęściej zachodzi w bioreaktorach, z kontrolowanymi warunkami pH, stężenia tlenu i dwutlenku węgla czy temperatury, suplementacją hodowli specjalnymi pożywkami, czy też obniżeniem temperatury w procesie po zakończeniu fazy logarytmicznego wzrostu. Wszystkie te czynniki znacząco przyczyniają się do podniesienia produktywności stabilnej linii komórkowej. Analiza parametrów fizykochemicznych wskazuje na właściwą masę i prawidłowe złożenie przeciwciał. Nie stwierdzono różnic w obrazie żeli poliakrylamidowych (w warunkach redukujących i nieredukujących) pomiędzy tymi samymi przeciwciałami różnych klas, jak również pomiędzy tymi samymi przeciwciałami pochodzącymi z produkcji przejściowej i ze stabilnych linii komórkowych. Podobne wnioski wyciągnąć można analizując chromatogramy będące rezultatem analizy chromatografii wykluczenia. Jedyne co zwraca uwagę to pojawienie się sygnałów za głównym pikiem odpowiadającym właściwym przeciwciałom – świadczących najprawdopodobniej o występowaniu niespecyficznego degradacji białek. Wskazuje to na konieczność optymalizacji buforu do przechowywania przeciwciał.

Badane przeciwciała bispecyficzne wiążą swoje cele molekularne (ROR-1, Mezoelinę, PD-L1) z podobną charakterystyką jak referencyjne przeciwciała monoklonalne. Siła wiązania – określana przez parametr EC50 - przeciwciał ROR-1 x PD-L1 do białka ROR-1 w początkowych eksperymentach obliczona została na 0,20 µg/mL w porównaniu do 0,14 µg/mL dla przeciwciała anty-ROR-1. Natomiast podczas weryfikacji potencjalnych różnic pomiędzy przeciwciałami

pochodzącymi z różnych systemów produkcji wartości wynosiły średnio 0,65 µg/mL dla przeciwciał bispecyficznych i 0,75 µg/mL dla przeciwciała anty-ROR-1. Rozbieżności wystąpiły również dla przeciwciał Mezotelina x PD-L1 w teście wiązania do białka Mezoteliny - średnio 0,25 µg/mL dla przeciwciał bispecyficznych i 0,23 µg/mL dla przeciwciała anty-Mezotelina w pierwszym eksperymencie i odpowiednio 0,12 µg/mL i 0,13 µg/mL w porównaniu przeciwciał z różnych systemów ekspresji. Zmiana w wartościach EC_{50} nastąpiła też w teście wiązania wszystkich przeciwciał bispecyficznych do PD-L1 w porównaniu do przeciwciała anty-PD-L1 (Atezolizumab). Pierwsze eksperymenty wykazały wiązanie przeciwciał bispecyficznych do PD-L1 ze średnią wartością EC_{50} 0,13 µg/mL i przeciwciała anty-PD-L1 0,14 µg/mL, podczas gdy w następnym teście wyniki te zwiększyły się do, odpowiednio 0,40 µg/mL i 0,38 µg/mL. Należy zauważyć, że wykonywane testy ELISA nie są metodami analitycznymi po walidacji, tym samym nie został ustalony przedział ufności w którym wyniki testu uznaje się za równoważne. Co istotne zmiany te występują również dla referencyjnych przeciwciał monospecyficznych, dlatego też wyniki te należy oceniać dla każdego eksperymentu oddzielnie. Na tej podstawie można stwierdzić, że nie występują różnice w wiązaniu celów molekularnych: pomiędzy tymi samymi przeciwciałami różnych klas, pomiędzy przeciwciałami bispecyficznymi wyprodukowanymi w różnych systemach ekspresji oraz pomiędzy przeciwciałami bispecyficznymi i referencyjnymi przeciwciałami monospecyficznymi. Zależność taka występuje dla ROR-1, Mezoteliny i PD-L1 i dotyczy zarówno wartości EC_{50} jak i charakterystyk krzywych wiązania. Podobne rezultaty otrzymane zostały w przypadku zdolności blokowania interakcji PD-1/PD-L1 – brak istotnych różnic w obliczonych wartościach EC_{50} pomiędzy przeciwciałami różnych klas i różnych systemów ekspresji w odniesieniu do referencyjnego przeciwciała anty-PD-L1. Uzyskane wyniki są również zbliżone, choć wyższe, do danych literaturowych – 0,79 nM i 0,61 nM dla przeciwciała anty-PD-L1 (Atezolizumab) w porównaniu do 0,42 nM (Skalniak et al., 2017). Test blokady ścieżki sygnalizacyjnej jest testem komórkowym, tym samym drobne różnice takie jak liczba pasaży, używany licznik komórek, wykorzystywane odczynniki i materiały zużywalne itp. mogą wpływać na rozbieżności pomiędzy dwoma niezależnymi eksperymentami, a tym bardziej pomiędzy dwoma laboratoriami. Niemniej jednak, opisane wyżej rezultaty są bardzo istotne z punktu widzenia dalszych badań. Dzięki tej weryfikacji można mieć przekonanie, że wszelkie różnice w dalszych eksperymentach wynikają z charakterystyki przeciwciał lub ich klasy, a nie różnic w jakości preparatów białek.

Immunoterapia, choć niewątpliwie skuteczna w leczeniu wielu nowotworów, w niektórych przypadkach okazuje się bardzo mało wydajna. Jednym z koronnych tego przykładów są nowotwory trzustki (Laface et al., 2023), które jednocześnie stanowią ogromne wyzwanie ze

względu na wysoką śmiertelność – 5-letnie prognozowane przeżycie dla chorych wynosi zaledwie 8% (Banerjee et al., 2018). Z tego powodu dwie z czterech badanych linii komórkowych stanowią właśnie linie nowotworów trzustki – Panc1 i Panc 05.04. Dwie pozostałe to linia nowotworu endometrium macicy (RL95-2) i nowotworu piersi (BT20). Wszystkie z tych czterech linii komórkowych posiadają na swojej powierzchni cele molekularne dla badanych przeciwciał. Badane przeciwciała bispecyficzne, w stężeniu 10 nM, w obecności ludzkich komórek PBMC, promują lizę wszystkich testowanych komórek nowotworowych. Najbardziej wrażliwą na proponowane terapie linią komórkową wydaje się być linia RL95-2. Zastosowanie przeciwciał ROR-1 x PD-L1 prowadzi do lizy komórek tej linii na średnim poziomie bliskim 40% zarówno dla klasy IgG1 jak i IgG4, co jest istotnie lepszym rezultatem niż kombinacja przeciwciał anty-ROR-1 i anty-PD-L1 (18%). Również w przypadku przeciwciał Mezetelina x PD-L1 nie można stwierdzić istotnych różnic w efektach wywoływanych przez przeciwciało klasy IgG1 (54%) i IgG4 (53%), jednakże przewaga względem kombinacji przeciwciał monospecyficznych jest jeszcze większa (13%). W przypadku linii BT20 i Panc 05.04 efekt cytotoksyczny jest podobny. Przeciwciała ROR-1 x PD-L1 promują lizę na następującym poziomie: BT20 – R2_7_1 (28%), R2_7_2 (25%); Panc 05.04 – R2_7_1 (35%), R2_7_2 (27%), co jest we wszystkich wypadkach istotnie lepszym rezultatem niż kombinacja anty-ROR-1/anty-PD-L1 (BT20 – 10%, Panc 05.04 – 11%). Ponownie, siła efektu cytotoksycznego jest większa dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1: BT20: R2_8_1 (47%), R2_8_2 (31%), Panc 05.04: R2_8_1 (39%), R2_8_2 (30%). Są to istotnie lepsze rezultaty niż te otrzymywane w wyniku zastosowania kombinacji przeciwciał anty-Mezetelina i anty-PD-L1 (BT20-6%, Panc 05.04 – 12%). Zdecydowanie najbardziej odporną na proponowane formy terapii jest linia Panc1. Przeciwciała ROR-1 x PD-L1 indukują lizę komórek tej linii na poziomie: R2_7_1 (18%) i R2_7_2 (16%), podczas gdy zastosowanie przeciwciał Mezetelina x PD-L1 skutkuje lepszymi rezultatami: R2_8_1 (25%) i R2_8_2 (20%). Skuteczność kombinacji przeciwciał monospecyficznych, zarówno anty-ROR-1/anty-PD-L1 (A6+A7 – 4%) jak i anty-Mezetelina/anty-PD-L1 (A6+A8 – 6%) jest bardzo niska i istotnie gorsza niż analogiczne przeciwciała bispecyficzne.

Powyższe wyniki dowodzą istotnej przewagi jednoczesnej blokady ROR-1 i PD-L1 oraz Mezeteliny i PD-L1 poprzez zastosowanie przeciwciał bispecyficznych nad kombinacją przeciwciał monospecyficznych. Trudno jednakże znaleźć korelację pomiędzy poziomem ekspresji wykorzystywanych celów molekularnych a siłą efektu cytotoksycznego komórek PBMC w obecności przeciwciał. Dla przykładu, pomimo wysokiej ekspresji ROR-1 na powierzchni komórek Panc1 liza tych komórek była na dość niskim poziomie, jednocześnie efekt cytotoksyczny dla linii RL95-2 był stosunkowo silny, pomimo niewielkiej ilości zarówno ROR-1 jak i Mezeteliny. Należy jednak pamiętać, że określenie poziomu ekspresji celów molekularnych

zostało przeprowadzone na hodowlach z określonego momentu, bez dodatku komórek PBMC czy badanych przeciwciał. Można spodziewać się że profil ekspresji tych receptorów zmienia się w zależności od cyklu komórkowego, czasu trwania hodowli, a w szczególności w obecności komórek układu immunologicznego (Abbasov et al., 2021; Rostagno et al., 1996). Tak więc dla próby lepszego zobrazowania zależności pomiędzy dostępnością celów molekularnych a skutecznością terapii należałoby przebadać komórki nowotworowe z różnych etapów hodowli i ko-kultur z komórkami PBMC. Niemniej jednak, faktem pozostaje znacząca przewaga w promocji lizy uzyskiwanej po zastosowaniu przeciwciał bispecyficznych względem kombinacji analogicznych przeciwciał monospecyficznych. Mechanizm opisywanych przeciwciał bispecyficznych można określić jako in-cis, czyli wiązanie receptorów znajdujących się na tych samych komórkach. Jednakże w sytuacji, gdzie w otoczeniu znajduje się wiele komórek nowotworowych, przeciwciało takie może funkcjonować również in-trans, pomiędzy dwoma różnymi komórkami nowotworowymi. Siła wiązania antygenów przez przeciwciała bispecyficzne oraz monospecyficzne powinna być taka sama, ze względu na tą samą sekwencję aminokwasową rejonów warunkujących dopasowanie. Pewne obawy mogłoby budzić dostosowanie sekwencji do formatu symetrycznych przeciwciał bispecyficznych, a w szczególności przekształcenie części anty-PD-L1 z pełnego przeciwciała do fragmentu ScFv, jednakże testy ELISA oraz blokady interakcji PD-1/PD-L1 nie wykazały różnic względem przeciwciał monospecyficznych. Niewątpliwie, dla pełnego potwierdzenia tych samych właściwości, warto byłoby przeprowadzić analizy kinetyki wiązania metodami SPR lub BLI. Mało jednak prawdopodobne jest by tak znaczące różnice wynikały z niewielkich zmian w zdolności wiązania celów molekularnych. Przeciwciała bispecyficzne mają zdolność wiązania dwóch antygenów jednocześnie, co oczywiście nie zachodzi w przypadku kombinacji przeciwciał monospecyficznych. Mechanizm ten może prowadzić sieciowania receptorów na powierzchni komórek nowotworowych i tworzenia niefizjologicznych kompleksów (Michaelson et al., 2009), a przez to prowadzić do zaburzonej transdukcji wewnątrzkomórkowych sygnałów (Chu et al., 2015; Li et al., 2020) lub też zwiększać immunogenność komórek nowotworowych (Y. Wang et al., 2010). Wiązanie takie może również prowadzić do zaburzenia kinetyki internalizacji receptorów i relokacji w obrębie błony komórkowej (Gajate & Mollinedo, 2007). W środowisku nowotworów zidentyfikowane zostały limfocyty T cytotoksyczne posiadające na powierzchni PD-L1 (CD8+PD-L1+) (Zheng et al., 2022) których funkcje jednoznacznie promują oporność nowotworów na efektorowe działanie układu immunologicznego (Diskin et al., 2020). Inną populacją z ekspresją PD-L1 są limfocyty regulatorowe (CD4+CD25+PD-L1hi), których współobecność z limfocytami efektorowymi CD8+PD-1hi koreluje z lepszą odpowiedzią na terapię PD-1/PD-L1 (S. P. Wu et al., 2018). W

światle tych informacji można założyć dodatkowy mechanizm warunkujący przewagę skuteczności przeciwciał bispecyficznych. Przeciwciała monospecyficzne anty-PD-L1 również oddziałują z tymi limfocytami, z tą różnicą, że zdolność jednoczesnego wiązania dwóch antygenów przeciwnowotworowych może prowadzić do fizycznego zbliżenia komórek układu odpornościowego i komórek nowotworowych, a tym samym do większej ekspozycji na komórki nowotworowe i ostatecznie silniejszej aktywacji limfocytów efektorowych.

Zgodnie z oczekiwaniami całkowite wartości lizy komórek nowotworowych otrzymywane dla przeciwciał klasy IgG1 są wyższe niż te dla klasy IgG4. Jednakże, z powodu wysokich odchyień standardowych wynikających z dużej zmienności w aktywności komórek PBMC w zależności od ich donora – istotność statystyczna osiągnięta została jedynie w przypadku przeciwciał Mezetelina x PD-L1 testowanych na linii nowotworowej BT20 (BT20: R2_8_1 vs R2_8_2 p=0.034). Analizując wykresy poziomu lizy komórkowej w zależności od stężenia przeciwciał faktycznie można stwierdzić że w niskich stężeniach (10 nM), w większości wypadków, przeciwciała klasy IgG1 dają lepsze wyniki niż IgG4. Jednakże, różnice te zacierają się w wyższych stężeniach, dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1 50 nM we wszystkich testowanych liniach, podczas gdy dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1 100 nM w linii BT20 i 250 nM w liniach RL95-2 i Panc1. Wskazuje to na fakt, że funkcje efektorowe związane z fragmentem Fc tracą na znaczeniu w wyższych stężeniach przeciwciał, a osiągnane wyniki związane są raczej z mechanizmem interakcji z celami molekularnymi. Niemniej jednak, nawet w niższych stężeniach różnice pomiędzy klasami nie są bardzo duże, co może mieć istotne znaczenie w dalszych rozważaniach, szczególnie pod kątem minimalizacji potencjalnych skutków ubocznych. Przeciwciała klasy IgG1 ze względu na funkcje efektorowe (ADCC, CDC) a także dłuższy czas półtrwania w surowicy uznane są za bardziej immunogenne (Goulet & Atkins, 2020). W związku z tym, nawet jeżeli skuteczność przeciwciał klasy IgG4 jest niższa, ale wciąż zadowalająca, bardziej racjonalne może być wybranie ich do dalszych badań, minimalizując tym samym ryzyko poważnych skutków ubocznych.

Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie przeciwciał bispecyficznych Mezetelina x PD-L1 skutkuje wyższym poziomem eliminacji komórek nowotworowych niż ROR-1 x PD-L1. Jednakże, w przypadku eksperymentów przeprowadzonych na wielu donorach komórek PBMC w stężeniach przeciwciał 10 nM różnica ta jest istotna statystycznie jedynie dla przeciwciał klasy IgG1 w linii BT20 (BT20: R2_7_1 vs R2_8_1 p=0,0135). Podobnie jak w przypadku różnic pomiędzy klasami przeciwciał, średnie wartości lizy są większe dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1, natomiast stosunkowo duże odchylenia standardowe powodują, że przewaga ta nie jest istotna statystycznie. Porównanie to prezentuje się inaczej w eksperymencie w którym testowano zakres stężeń z wykorzystaniem jednego donora komórek PBMC. W tej sytuacji przeciwciała Mezetelina

x PD-L1 skutkują istotnie lepszą promocją lizy komórek nowotworowych we wszystkich testowanych stężeniach i na wszystkich testowanych liniach – porównując przeciwciała tej samej klasy (R2_7_1 vs R2_8_1 i R2_7_2 vs R2_8_2). Znaczącą przewagę można zauważyć szczególnie w przypadku linii Panc1, którą określić można jako najodporniejszą na testowane przeciwciała. Wynik taki sugerować może, że istotnie przeciwciała Mezotelina x PD-L1 skuteczniej prowadzą do eliminacji komórek nowotworowych niż ROR-1 x PD-L1, jednakże siła tego efektu zależy od charakterystyki limfocytów.

Obecność badanych przeciwciał bispecyficznych, zarówno ROR-1 x PD-L1 jak i Mezotelina x PD-L1, prowadzi do znacznego zwiększenia produkcji cytokin prozapalnych. Analizie poddane zostały próbki pochodzące z 5-dniowej ko-kultury komórek nowotworowych (RL95-2 i Panc1) i komórek PBMC. We wszystkich przypadkach dodatek przeciwciał bispecyficznych (IgG1 i IgG4) prowadził do istotnego zwiększenia stężenia TNF α , IFN γ , Granzymu B i IL-10 zarówno względem kombinacji przeciwciał monospecyficznych jak i kontroli nietraktowanych (PBMC + komórki nowotworowe). IFN γ , Granzym B i IL-2 to cytokiny których produkcja łączona jest z aktywacją komórek układu immunologicznego, prowadząca do efektów antyproliferacyjnych, apoptotycznych i nekrotycznych w komórkach nowotworowych (Lan et al., 2021). TNF α choć pierwotnie zidentyfikowany jako cząsteczka anty-nowotworowa, może również pełnić role promujące wzrost i przeżycie nowotworów, szczególnie w przypadku przedłużonej ekspozycji (Montfort et al., 2019). IL-10 z kolei przez długi czas wiązana była z promowaniem oporności nowotworów na działanie układu immunologicznego, jednakże, podobnie jak w przypadku TNF α , odkryto jej dualistyczne działanie. Obecnie spekuluje się że w początkowych fazach wzrostu nowotworu IL-10 działa anty-nowotworowo, m.in. poprzez stymulację limfocytów cytotoksycznych czy promowanie produkcji IFN γ , natomiast jeżeli nowotwór rozwinie się i zacznie produkować IL-10R sygnalizacja IL-10 ma działanie immunosupresyjne (Mannino et al., 2015). W świetle tych informacji można spodziewać się, że zwiększona liza komórek nowotworowych w obecności badanych przeciwciał bispecyficznych jest skorelowana z podniesieniem produkcji TNF α , IFN γ , IL-10 i Granzymu B. Co więcej wyniki te są spójne z poprzednimi obserwacjami: 1) wyższa produkcja tych cytokin obserwowana jest dla bardziej wrażliwej na terapię linii RL95-2 w porównaniu do Panc 1 (z wyjątkiem IFN γ i przeciwciał Mezotelina x PD-L1), 2) przeciwciała klasy IgG1 zwykle prowadzą do wyższej produkcji tych cytokin niż te klasy IgG4 (poza kilkoma przypadkami gdzie stężenie jest na bardzo zbliżonym poziomie), 3) zastosowanie przeciwciał Mezotelina x PD-L1 skutkuje wyższymi poziomami omawianych cytokin, szczególnie w przypadku linii Panc1. Szczególnie interesujący i jednocześnie nie wpisujący się w opisywany trend jest poziom IL-2. Jak wspomniano wcześniej zwiększenie

produkcji tej cytokiny zwykle łączy się z podniesioną odpowiedzią immunologiczną i większą wydajnością eliminacji komórek nowotworowych. W przypadku badanych przeciwciał jest zgoła inaczej, IL-2 w stosunkowo niewielkiej ilości obecna jest w próbkach w których zastosowano kombinacje przeciwciał monospecyficznych i w jeszcze mniejszej w kontroli nietraktowanej. Warto jednak zaznaczyć że IL-2 pełni raczej rolę wspierającą promując przeżycie, proliferację i aktywację limfocytów cytotoksycznych a nie ma bezpośredniej funkcji efektorowej (Pol et al., 2020). Ponadto obniżenie produkcji IL-2 przez limfocyty cytotoksyczne związane jest z ich postępującym „wyczerpaniem”, przy jednoczesnym zwiększaniu jej produkcji przez limfocyty regulatorowe (Kwon, 2021). W związku z tym spekulować można, że brak detekcji IL-2 w próbkach traktowanych badanymi przeciwciałami bispecyficznymi wynika z albo przerzucenia całej aktywności limfocytów na funkcje efektorowe lub też uchwycenia stanu hodowli w którym limfocyty cytotoksyczne przestają produkować IL-2 ale limfocyty regulatorowe jeszcze nie hamują ich aktywności. Analogicznie, podwyższony poziom IL-2 w próbkach z kombinacją przeciwciał monospecyficznych może wynikać z ciągłej próby ekspansji limfocytów lub też rozpoczętego procesu hamowania odpowiedzi immunologicznej przez limfocyty regulatorowe.

Limfocyty regulatorowe charakteryzują się występowaniem markerów powierzchniowych CD4 i CD25 przy jednocześnie niskim poziomie receptora CD127 (CD4+CD25+CD127low) (N. Yu et al., 2012). Duża część z nich posiada konstytutywną, wysoką ekspresję czynnika transkrypcyjnego FoxP3. Zostały one zidentyfikowane jako limfocyty regulatorowe o dużym potencjale w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej na nowotwory (Tanaka & Sakaguchi, 2017), a redukcja wielkości tej subpopulacji jest wiązana z lepszą odpowiedzią pacjentów na immunoterapie (Iglesias-Escudero et al., 2023). Zastosowanie badanych przeciwciał bispecyficznych prowadzi do obniżenia wielkości subpopulacji CD4+CD25+CD127low w porównaniu do kombinacji przeciwciał monospecyficznych jak i ko-kultur nietraktowanych. Jednocześnie przyrost tego rodzaju limfocytów jest większy w ko-kulturze komórek PBMC z komórkami Panc1 niż RL95-2, co koreluje z wydajnością lizy komórek nowotworowych. Skuteczność ograniczania tej subpopulacji jest większa przy zastosowaniu przeciwciał Mezetelina x PD-L1 niż ROR-1 x PD-L1, choć efekt ten jest znacznie wyraźniejszy w przypadku linii Panc1. Warto zwrócić uwagę na znaczące zwiększenie wielkości tej subpopulacji w ko-kulturach PBMC/komórki nowotworowe w porównaniu do hodowli samych komórek PBMC – świadczy to o aktywności komórek nowotworowych w wygaszaniu odpowiedzi immunologicznej. Podobne wyniki obserwuje się w bardziej specyficznej subpopulacji – CD4+CD25+CD127lowFoxP3+, przy czym w tym wypadku widać znacznie większą przewagę przeciwciał Mezetelina x PD-L1, w szczególności dla linii Panc1. Co interesujące, zauważyć można, że wielkość tych subpopulacji dla

kombinacji przeciwciał monospecyficznych jest większa niż dla ko-kultur nietraktowanych, co pokrywa się z obserwacją dotyczącą produkcji IL-2 i pozwala skłaniać się ku hipotezie, że w hodowlach tych rozpoczął się proces „wyczerpania” limfocytów cytotoksycznych sterowany przez limfocyty regulatorowe. Zastosowany układ badawczy pozwolił na analizę innej subpopulacji limfocytów regulatorowych – CD4-FoxP3+. Są to w znacznej mierze limfocyty CD8+FoxP3+ które zostały zidentyfikowane jako wysoce immunosupresyjne w różnych rodzajach nowotworów (Hao et al., 2020; Kiniwa et al., 2007). Podobnie jak dla limfocytów regulatorowych CD4+, również w tym przypadku zastosowanie opisywanych przeciwciał bispecyficznych prowadzi do obniżenia wielkości subpopulacji. Podczas dodatkowych analiz zidentyfikowano jedno z potencjalnych źródeł lepszych wyników uzyskiwanych przy zastosowaniu przeciwciał Mezotelina x PD-L1 względem ROR-1 x PD-L1. Odpowiadać za to może zwiększona obecność limfocytów CD4+CD25-CD127-. Ich występowanie zostało skorelowane z lepszą odpowiedzią na terapię nowotworu piersi (Péguillet et al., 2014), i można wnioskować o ich aktywności przeciwnowotworowej.

Podsumowując, w niniejszej pracy zaproponowano wykorzystanie przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezotelina x PD-L1 do zwalczania nowotworów. Jest to pierwsze zareportowane wykorzystanie takiej kombinacji celów molekularnych dla przeciwciał bispecyficznych. Opisywane przeciwciała zostały zaprojektowane w formie symetrycznym, podobnym do IgG, zarówno w klasie IgG1 jak i IgG4. Do produkcji przeciwciał wykorzystano system przejściowy i stabilne linie komórkowe, w obu przypadkach osiągając właściwe parametry fizyko-chemiczne, a także zdolność do wiązania celów molekularnych i blokowania interakcji PD-1/PD-L1 na podobnym poziomie jak referencyjne przeciwciała monospecyficzne. Dodanie ich do ko-kultur komórek nowotworowych i komórek PBMC prowadziło do efektywnej lizy komórek nowotworowych, zależnej od zastosowanego stężenia przeciwciał. Eliminacja komórek nowotworowych przebiegała na drodze aktywacji limfocytów T o czym świadczą podniesione stężenia cytokin prozapalnych oraz obniżone wielkości subpopulacji limfocytów T regulatorowych. Wstępne wyniki sugerują większy potencjał przeciwciał Mezotelina x PD-L1. Jednocześnie w obu przypadkach udało się osiągnąć zadowalające rezultaty zarówno dla przeciwciał klasy IgG1 jak i IgG4, co może pozwolić w przyszłości na zredukowanie potencjalnych skutków ubocznych terapii. Uzyskane wyniki, choć niewątpliwie obiecujące, nie pozwalają jednak w pełni stwierdzić czy takie przeciwciała mogłyby stanowić nową formę terapii nowotworów. Z całą pewnością należałoby zweryfikować ich potencjał w bardziej zaawansowanych modelach nowotworów, przede wszystkim w modelach zwierzęcych. Wysoce immunosupresyjne mikrośrodowisko nowotworów a także bardziej złożona konstrukcja jakim jest guz mogą znacząco ostudzić nadzieje. Jednakże, sam fakt, że jednoczesne celowanie w ROR-1 i PD-L1 lub

Mezotelinę i PD-L1 skutkuje znaczącym ograniczeniem wzrostu komórek nowotworowych jest obiecującym punktem wyjścia. Technologia przeciwciał bispecyficznych jest bardzo wszechstronnym podejściem, a mnogość dostępnych formatów pozwala na przewyciężenie wielu problemów. Tak więc, dalsza weryfikacja potencjału opisywanych przeciwciał może doprowadzić do zmiany stosowanych formatów, tak aby osiągnąć wyższą wydajność, większą penetrację guza lub też lepszy profil farmakokinetyczny i farmakodynamiczny. Innym podejściem może być próba zwiększenia efektywności przeciwciał poprzez dodanie kolejnych miejsc wiązania, lub też zwiększenie specyficzności np. poprzez dodanie fragmentu anty-CD3 celem większej aktywacji limfocytów T.

10. WNIOSKI

1. Otrzymane przeciwciała bispecyficzne posiadały zgodne z oczekiwaniami parametry fizykochemiczne i zdolności wiązania celów molekularnych z siłą zbliżoną jak referencyjne przeciwciała monospecyficzne.
2. Siła blokady interakcji PD-1/PD-L1 jest podobna jak dla przeciwciała anty-PD-L1 (Atezolizumab).
3. Zastosowanie badanych przeciwciał bispecyficznych prowadziło do istotnie większej lizy komórek nowotworowych niż kombinacja przeciwciał monospecyficznych, a siła tego efektu zależała od stężenia przeciwciał.
4. Dodanie przeciwciał bispecyficznych do ko-kultury komórek nowotworowych z komórkami PBMC prowadzi do istotnie wyższej produkcji cytokin (TNF α , IFN γ , Granzym B, IL-10) w porównaniu do kombinacji przeciwciał monospecyficznych i istotnie niższej produkcji IL-2.
5. W takim samym układzie badawczym obserwuje się istotne zmniejszenie wielkości subpopulacji immunosupresyjnych limfocytów T-regulatorowych – zarówno CD4+CD25+CD127lowFoxP3+ jak i CD4-FoxP3+.
6. Wykorzystanie przeciwciał Mezetelina x PD-L1 prowadzi do zwiększenia potencjalnie silnie antynowotworowej subpopulacji limfocytów T CD4+CD25-CD127-.
7. Przeciwciała bispecyficzne klasy IgG1 wykazują nieznacznie wyższą aktywność niż klasy IgG4.
8. Zastosowanie przeciwciał Mezetelina x PD-L1 prowadzi do wyższej lizy komórek nowotworowych, produkcji cytokin i większego zmniejszenia subpopulacji limfocytów T regulatorowych w porównaniu do przeciwciał ROR-1 x PD-L1.
9. Jednoczesna blokada ROR-1 i PD-L1 lub Mezeteliny i PD-L1 jest nowatorskim i interesującym podejściem do zwalczania komórek nowotworowych.
10. Obiecujące wyniki badań *in-vitro* stanowią podstawę do dalszych badań *in-vivo*, które pozwolą w bardziej precyzyjny sposób określić potencjał przeciwnowotworowych badanych przeciwciał bispecyficznych.

11. BIBLIOGRAFIA

- Abbasov, A., Cetin, E. A., Cabioglu, N., Mollavelioglu, B., Onder, S., Emiroglu, S., Tükenmez, M., Muslumanoglu, M., Igci, A., Deniz, G., & Ozmen, V. (2021). Differential expression of novel immune checkpoint receptors on tumor-infiltrating lymphocytes in patients with locally advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Neoplasma*, *68*(05), 1079–1090. https://doi.org/10.4149/neo_2021_210127N141
- Aghebati-Maleki, L., Shabani, M., Baradaran, B., Motallebnezhad, M., Majidi, J., & Yousefi, M. (2017). Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR-1): An emerging target for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *88*, 814–822. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.070>
- Akinleye, A., & Rasool, Z. (2019). Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *Journal of Hematology and Oncology*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0779-5>
- Alturki, N. A. (2023). Review of the Immune Checkpoint Inhibitors in the Context of Cancer Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, *12*(13), 4301. <https://doi.org/10.3390/jcm12134301>
- AntibodySociety. (2024). *Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US*. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>
- Antonios, J. P., Soto, H., Everson, R. G., Moughon, D., Orpilla, J. R., Shin, N. P., Sedighim, S., Treger, J., Odesa, S., Tucker, A., Yong, W. H., Li, G., Cloughesy, T. F., Liau, L. M., & Prins, R. M. (2017). Immunosuppressive tumor-infiltrating myeloid cells mediate adaptive immune resistance via a PD-1/PD-L1 mechanism in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, *19*(6), now287. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now287>
- Appleby, L. J., Nausch, N., Midzi, N., Mduluza, T., Allen, J. E., & Mutapi, F. (2013). Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunology Letters*, *152*(1), 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.03.004>
- Azuma, K., Ota, K., Kawahara, A., Hattori, S., Iwama, E., Harada, T., Matsumoto, K., Takayama, K., Takamori, S., Kage, M., Hoshino, T., Nakanishi, Y., & Okamoto, I. (2014). Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, *25*(10), 1935–1940. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu242>
- Bai, J., Gao, Z., Li, X., Dong, L., Han, W., & Nie, J. (2017). Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and

- resistance to PD-1/PDL1 blockade. *Oncotarget*, 8(66), 110693–110707. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22690>
- Bainbridge, T. W., DeAlmeida, V. I., Izrael-Tomasevic, A., Chalouni, C., Pan, B., Goldsmith, J., Schoen, A. P., Quiñones, G. A., Kelly, R., Lill, J. R., Sandoval, W., Costa, M., Polakis, P., Arnott, D., Rubinfeld, B., & Ernst, J. A. (2014). Evolutionary divergence in the catalytic activity of the CAM-1, ROR1 and ROR2 kinase domains. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102695>
- Banerjee, K., Kumar, S., Ross, K. A., Gautam, S., Poelaert, B., Nasser, M. W., Aithal, A., Bhatia, R., Wannemuehler, M. J., Narasimhan, B., Solheim, J. C., Batra, S. K., & Jain, M. (2018). Emerging trends in the immunotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 417, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.012>
- Barrueto, L., Caminero, F., Cash, L., Makris, C., Lamichhane, P., & Deshmukh, R. R. (2020). Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy. *Translational Oncology*, 13(3), 100738. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.12.010>
- Baskar, S., Ka, Y. K., Hofer, T., Levy, J. M., Kennedy, M. G., Lee, E., Staudt, L. M., Wilson, W. H., Wiestner, A., & Rader, C. (2008). Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research*, 14(2), 396–404. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1823>
- Baxevanis, C. N., & Perez, S. A. (2016). Cancer vaccines: limited success but the research should remain viable. *Expert Review of Vaccines*, 15(6), 677–680. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1145057>
- Beenen, A. C., Sauerer, T., Schaft, N., & Dörrie, J. (2022). Beyond Cancer: Regulation and Function of PD-L1 in Health and Immune-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8599. <https://doi.org/10.3390/ijms23158599>
- Beer, T. M., Kwon, E. D., Drake, C. G., Fizazi, K., Logothetis, C., Gravis, G., Ganju, V., Polikoff, J., Saad, F., Humanski, P., Piulats, J. M., Gonzalez Mella, P., Ng, S. S., Jaeger, D., Parnis, F. X., Franke, F. A., Puente, J., Carvajal, R., Sengeløv, L., ... Gerritsen, W. (2017). Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35(1), 40–47. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.1584>
- Bera, T. K., & Pastan, I. (2000). Mesothelin Is Not Required for Normal Mouse Development or Reproduction. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8), 2902–2906. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.8.2902-2906.2000>

- Bertrand, P. (2023). Aptamers Targeting the PD-1/PD-L1 Axis: A Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(16), 10878–10888. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00551>
- Bharadwaj, U., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2008). Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via activation of signal transducer and activator of transcription protein 3. *Molecular Cancer Research*, 6(11), 1755–1765. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0095>
- Bharadwaj, U., Marin-Muller, C., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2011). Mesothelin overexpression promotes autocrine IL-6/sIL-6R trans-signaling to stimulate pancreatic cancer cell proliferation. *Carcinogenesis*, 32(7), 1013–1024. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr075>
- Bohn, J.-P., Gastl, G., & Steurer, M. (2016). Long-term treatment of hairy cell leukemia with interferon- α : still a viable therapeutic option. *Memo - Magazine of European Medical Oncology*, 9(2), 63–65. <https://doi.org/10.1007/s12254-016-0269-1>
- Bonati, L., & Tang, L. (2021). Cytokine engineering for targeted cancer immunotherapy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 62, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.01.007>
- Borcherding, N., Kusner, D., Liu, G. H., & Zhang, W. (2014). ROR1, an embryonic protein with an emerging role in cancer biology. *Protein and Cell*, 5(7), 496–502. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0059-7>
- Boutros, C., Tarhini, A., Routier, E., Lambotte, O., Ladurie, F. L., Carbonnel, F., Izzeddine, H., Marabelle, A., Champiat, S., Berdelou, A., Lanoy, E., Texier, M., Libenciuc, C., Eggermont, A. M. M., Soria, J. C., Mateus, C., & Robert, C. (2016). Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(8), 473–486. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.58>
- Brinkmann, U., & Kontermann, R. E. (2017). The making of bispecific antibodies. *MAbs*, 9(2), 182–212. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
- Bulgarelli, J., Piccinini, C., Petracci, E., Pancisi, E., Granato, A. M., de Rosa, F., Guidoboni, M., Petrini, M., Ancarani, V., Foschi, G., Romeo, A., Tontini, L., De Giorgi, U., Lolli, C., Gentili, G., Valmorri, L., Rossi, A., Ferroni, F., Casadei, C., ... Ridolfi, L. (2021). Radiotherapy and High-Dose Interleukin-2: Clinical and Immunological Results of a Proof of Principle Study in Metastatic Melanoma and Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Immunology*, 12(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.778459>
- Buonaguro, L., & Tagliamonte, M. (2020). Selecting Target Antigens for Cancer Vaccine Development. *Vaccines*, 8(4), 615. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040615>
- Chames, P., & Baty, D. (2009). Bispecific antibodies for cancer therapy: The light at the end of the tunnel? *MAbs*, 1(6), 539–547. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.6.10015>

- Chang, E., Pelosof, L., Lemery, S., Gong, Y., Goldberg, K. B., Farrell, A. T., Keegan, P., Veeraraghavan, J., Wei, G., Blumenthal, G. M., Amiri-Kordestani, L., Singh, H., Fashoyin-Aje, L., Gormley, N., Kluetz, P. G., Pazdur, R., Beaver, J. A., & Theoret, M. R. (2021). Systematic Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Oncology: From Personalized Medicine to Public Health. *Oncologist*, *26*(10), e1786–e1799. <https://doi.org/10.1002/onco.13887>
- Chang, M. C., Chen, C. A., Chen, P. J., Chiang, Y. C., Chen, Y. L., Mao, T. L., Lin, H. W., Lin Chiang, W. H., & Cheng, W. F. (2012). Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *Biochemical Journal*, *442*(2), 293–302. <https://doi.org/10.1042/BJ20110282>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, *39*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, L., Deng, H., Lu, M., Xu, B., Wang, Q., Jiang, J., & Wu, C. (2014). B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *7*(9), 6015–6023.
- Choi, M. Y., Widhopf, G. F., Ghia, E. M., Kidwell, R. L., Hasan, M. K., Yu, J., Rassenti, L. Z., Chen, L., Chen, Y., Pittman, E., Pu, M., Messer, K., Prussak, C. E., Castro, J. E., Jamieson, C., & Kipps, T. J. (2018). Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell Stem Cell*, *22*(6), 951-959.e3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.018>
- Chu, T. W., Zhang, R., Yang, J., Chao, M. P., Shami, P. J., & Kopeček, J. (2015). A two-step pretargeted nanotherapy for CD20 crosslinking may achieve superior anti-lymphoma efficacy to rituximab. *Theranostics*, *5*(8), 834–846. <https://doi.org/10.7150/thno.12040>
- Coelho, M. A., de Carné Trécesson, S., Rana, S., Zecchin, D., Moore, C., Molina-Arcas, M., East, P., Spencer-Dene, B., Nye, E., Barnouin, K., Sniijders, A. P., Lai, W. S., Blackshear, P. J., & Downward, J. (2017). Oncogenic RAS Signaling Promotes Tumor Immuno-resistance by Stabilizing PD-L1 mRNA. *Immunity*, *47*(6), 1083-1099.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.016>
- Cook, M., & Chauhan, A. (2020). Clinical Application of Oncolytic Viruses: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(20), 7505. <https://doi.org/10.3390/ijms21207505>
- Couzin-Frankel, J. (2013). Cancer Immunotherapy. *Science*, *342*(6165), 1432–1433. <https://doi.org/10.1126/science.342.6165.1432>
- Crescioli, S., Kaplon, H., Chenoweth, A., Wang, L., Visweswaraiyah, J., & Reichert, J. M. (2024). Antibodies to watch in 2024. *MAbs*, *16*(1).

- <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2297450>
- Cui, B., Widhopf, G. F., Prussak, C. E., Wu, C. C. N., Sadarangani, A., Zhang, S., Lao, F., Jamieson, C. H., Carson, D. A., & Kipps, T. J. (2013). Cirmtuzumab Vedotin (UC-961ADC3), An Anti-ROR1-Monomethyl Auristatin E Antibody-Drug Conjugate, Is a Potential Treatment For ROR1-Positive Leukemia and Solid Tumors. *Blood*, *122*(21), 1637–1637. <https://doi.org/10.1182/blood.v122.21.1637.1637>
- Cui, B., Zhang, S., Chen, L., Yu, J., Widhopf, G. F., Fecteau, J.-F., Rassenti, L. Z., & Kipps, T. J. (2013). Targeting ROR1 Inhibits Epithelial–Mesenchymal Transition and Metastasis. *Cancer Research*, *73*(12), 3649–3660. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3832>
- Damelang, T., Brinkhaus, M., van Osch, T. L. J., Schuurman, J., Labrijn, A. F., Rispens, T., & Vidarsson, G. (2023). Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. *Frontiers in Immunology*, *14*(January). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1304365>
- Daneshmanesh, A. H., Hojjat-Farsangi, M., Ghaderi, A., Moshfegh, A., Hansson, L., Schultz, J., Vågberg, J., Byström, S., Olsson, E., Olin, T., Osterborg, A., & Mellstedt, H. (2018). A receptor tyrosine kinase ROR1 inhibitor (KAN0439834) induced significant apoptosis of pancreatic cells which was enhanced by erlotinib and ibrutinib. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198038>
- Daneshmanesh, A. H., Porwit, A., Hojjat-Farsangi, M., Jeddi-Tehrani, M., Tamm, K. P., Grandér, D., Lehmann, S., Norin, S., Shokri, F., Rabbani, H., Mellstedt, H., & Österborg, A. (2013). Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies. *Leukemia and Lymphoma*, *54*(4), 843–850. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.731599>
- Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & Molecular Medicine*, *50*(12), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>
- Diskin, B., Adam, S., Cassini, M. F., Sanchez, G., Liria, M., Aykut, B., Buttar, C., Li, E., Sundberg, B., Salas, R. D., Chen, R., Wang, J., Kim, M., Farooq, M. S., Nguy, S., Fedele, C., Tang, K. H., Chen, T., Wang, W., ... Miller, G. (2020). PD-L1 engagement on T cells promotes self-tolerance and suppression of neighboring macrophages and effector T cells in cancer. *Nature Immunology*, *21*(4), 442–454. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0620-x>
- Dutta, S., Ganguly, A., Chatterjee, K., Spada, S., & Mukherjee, S. (2023). Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors. *Biology*, *12*(2), 218. <https://doi.org/10.3390/biology12020218>

- Ehlers, A. M., den Hartog Jager, C. F., Kardol-Hoefnagel, T., Katsburg, M. M. D., Knulst, A. C., & Otten, H. G. (2021). Comparison of Two Strategies to Generate Antigen-Specific Human Monoclonal Antibodies: Which Method to Choose for Which Purpose? *Frontiers in Immunology*, *12*(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660037>
- Escors, D., Gato-Cañas, M., Zuazo, M., Arasanz, H., García-Granda, M. J., Vera, R., & Kochan, G. (2018). The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *3*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0022-9>
- Fan, G., Wang, Z., Hao, M., & Li, J. (2015). Bispecific antibodies and their applications. *Journal of Hematology and Oncology*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0227-0>
- Fan, T., Zhang, M., Yang, J., Zhu, Z., Cao, W., & Dong, C. (2023). Therapeutic cancer vaccines: advancements, challenges and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 450. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01674-3>
- Faust, J. R., Hamill, D., Kolb, E. A., Gopalakrishnapillai, A., & Barwe, S. P. (2022). Mesothelin: An Immunotherapeutic Target beyond Solid Tumors. *Cancers*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/cancers14061550>
- FDA. (2020). *1 INDICATIONS AND USAGE 1 . 1 Urothelial Carcinoma IMFINZI is indicated for the treatment of adult patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma who :*
- have disease progression during or following platinum-containing chemotherapy . ca.
- Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015>
- Fragkiadakis, G. F., & Spiliotopoulou, M. (2022). Investigating the Quality of Life for Cancer Patients and Estimating the Cost of Immunotherapy in Selected Cases. *Cureus*, *14*(12). <https://doi.org/10.7759/cureus.32390>
- Frampton, J. E. (2012). Catumaxomab: In malignant ascites. *Drugs*, *72*(10), 1399–1410. <https://doi.org/10.2165/11209040-000000000-00000>
- Fukuhara, H., Ino, Y., & Todo, T. (2016). Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Science*, *107*(10), 1373–1379. <https://doi.org/10.1111/cas.13027>
- Gainor, J. F., Shaw, A. T., Sequist, L. V., Fu, X., Azzoli, C. G., Piotrowska, Z., Huynh, T. G., Zhao, L., Fulton, L., Schultz, K. R., Howe, E., Farago, A. F., Sullivan, R. J., Stone, J. R., Digumarthy, S., Moran, T., Hata, A. N., Yagi, Y., Yeap, B. Y., ... Mino-Kenudson, M. (2016). EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clinical Cancer Research*, *22*(18), 4585–4593. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-3101>

- Gajate, C., & Mollinedo, F. (2007). Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood*, *109*(2), 711–719. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-016824>
- Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, *19*(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
- Geng, L., Huang, D., Liu, J., Qian, Y., Deng, J., Li, D., Hu, Z., Zhang, J., Jiang, G., & Zheng, S. (2008). B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *134*(9), 1021–1027. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0364-8>
- Gohil, S. H., Paredes-Moscossa, S. R., Harrasser, M., Vezzalini, M., Scarpa, A., Morris, E., Davidoff, A. M., Sorio, C., Nathwani, A. C., & Della Peruta, M. (2017). An ROR1 bi-specific T-cell engager provides effective targeting and cytotoxicity against a range of solid tumors. *Oncot Immunology*, e1326437. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1326437>
- Golfier, S., Kopitz, C., Kahnert, A., Heisler, I., Schatz, C. A., Stelte-Ludwig, B., Mayer-Bartschmid, A., Unterschemmann, K., Bruder, S., Linden, L., Harrenga, A., Hauff, P., Scholle, F. D., Müller-Tiemann, B., Kreft, B., & Ziegelbauer, K. (2014). Anetumab ravtansine: A novel mesothelin-targeting antibody-drug conjugate cures tumors with heterogeneous target expression favored by bystander effect. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(6), 1537–1548. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0926>
- Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2020). Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(1), 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>
- Grasso, L., Jiang, Q., Hassan, R., Nicolaidis, N. C., & Kline, J. B. (2023). NAV-003, a bispecific antibody targeting a unique mesothelin epitope and CD3ε with improved cytotoxicity against humoral immunosuppressed tumors. *European Journal of Immunology*, *53*(8), 1–23. <https://doi.org/10.1002/eji.202250309>
- Green, J. L., Kuntz, S. G., & Sternberg, P. W. (2008). Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends in Cell Biology*, *18*(11), 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.08.006>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guo, Z., Zhang, R., Yang, A. G., & Zheng, G. (2023). Diversity of immune checkpoints in cancer

- immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 14(March), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1121285>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Handlogten, M. W., Peng, L., Christian, E. A., Xu, W., Lin, S., Venkat, R., Dall'Acqua, W., & Ahuja, S. (2020). Prevention of Fab-arm exchange and antibody reduction via stabilization of the IgG4 hinge region. *MAbs*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1779974>
- Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & George, A. J. T. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
- Hao, J., Wang, H., Song, L., Li, S., Che, N., Zhang, S., Zhang, H., & Wang, J. (2020). Infiltration of CD8+ FOXP3+ T cells, CD8+ T cells, and FOXP3+ T cells in non-small cell lung cancer microenvironment. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(5), 880–888.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32509058>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7270696>
- Hassan, R., Cohen, S. J., Phillips, M., Pastan, I., Sharon, E., Kelly, R. J., Schweizer, C., Weil, S., & Laheru, D. (2010). Phase I Clinical Trial of the Chimeric Anti-Mesothelin Monoclonal Antibody MORAb-009 in Patients with Mesothelin-Expressing Cancers. *Clinical Cancer Research*, 16(24), 6132–6138. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2275>
- Hassan, R., Ebel, W., Routhier, E. L., Patel, R., Kline, J. B., Zhang, J., Chao, Q., Jacob, S., Turchin, H., Gibbs, L., Phillips, M. D., Mudali, S., Iacobuzio-Donahue, C., Jaffee, E. M., Moreno, M., Pastan, I., Sass, P. M., Nicolaidis, N. C., & Grasso, L. (2007). Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin. *Cancer Immunity*, 7(October), 1–10.
- He, X., Wang, L., Riedel, H., Wang, K., Yang, Y., Dinu, C. Z., & Rojanasakul, Y. (2017). Mesothelin promotes epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenicity of human lung cancer and mesothelioma cells. *Molecular Cancer*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0633-8>
- Hec-Gałązka, A., Tyrcha, U., Barczyński, J., Bielski, P., Mikitiuk, M., Gudź, G. P., Kitel, R., Musielak, B., Plewka, J., Sitar, T., & Holak, T. A. (2024). Nonsymmetrically Substituted 1,1'-Biphenyl-Based Small Molecule Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Interaction. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 15(6), 828–836. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.4c00042>
- Hemminki, O., dos Santos, J. M., & Hemminki, A. (2020). Oncolytic viruses for cancer

- immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 84.
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00922-1>
- Henricks, L. M., Schellens, J. H. M., Huitema, A. D. R., & Beijnen, J. H. (2015). The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology. *Cancer Treatment Reviews*, 41(10), 859–867. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.10.008>
- Hilliard, T. S., Kowalski, B., Iwamoto, K., Agadi, E. A., Liu, Y., Yang, J., Asem, M., Klymenko, Y., Johnson, J., Shi, Z., Marfowaa, G., Yemc, M. G., Petrasko, P., & Sharon Stack, M. (2021). Host mesothelin expression increases ovarian cancer metastasis in the peritoneal microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22).
<https://doi.org/10.3390/ijms222212443>
- Hojjat-Farsangi, M., Ghaemimanesh, F., Daneshmanesh, A. H., Bayat, A. A., Mahmoudian, J., Jeedi-Tehrani, M., Rabbani, H., & Mellstedt, H. (2013). Inhibition of the Receptor Tyrosine Kinase ROR1 by Anti-ROR1 Monoclonal Antibodies and siRNA Induced Apoptosis of Melanoma Cells. *PLoS ONE*, 8(4), 19–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061167>
- Hojjat-Farsangi, M., Moshfegh, A., Daneshmanesh, A. H., Khan, A. S., Mikaelsson, E., Österborg, A., & Mellstedt, H. (2014). The receptor tyrosine kinase ROR1 - An oncofetal antigen for targeted cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 29(C), 21–31.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.07.005>
- Huang, A. C., Postow, M. A., Orlowski, R. J., Mick, R., Bengsch, B., Manne, S., Xu, W., Harmon, S., Giles, J. R., Wenz, B., Adamow, M., Kuk, D., Panageas, K. S., Carrera, C., Wong, P., Quagliarello, F., Wubbenhorst, B., D'Andrea, K., Pauken, K. E., ... Wherry, E. J. (2017). T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 545(7652), 60–65. <https://doi.org/10.1038/nature22079>
- Hudecek, M., Lupo-Stanghellini, M.-T., Kosasih, P. L., Sommermeyer, D., Jensen, M. C., Rader, C., & Riddell, S. R. (2013). Receptor Affinity and Extracellular Domain Modifications Affect Tumor Recognition by ROR1-Specific Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Clinical Cancer Research*, 19(12), 3153–3164. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0330>
- Huo, Q., Xu, C., Shao, Y., Yu, Q., Huang, L., Liu, Y., & Bao, H. (2021). Free CA125 promotes ovarian cancer cell migration and tumor metastasis by binding mesothelin to reduce DKK1 expression and activate the SGK3/FOXO3 pathway. *International Journal of Biological Sciences*, 17(2), 574–588. <https://doi.org/10.7150/ijbs.52097>
- Iglesias-Escudero, M., Arias-González, N., & Martínez-Cáceres, E. (2023). Regulatory cells and the effect of cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 22(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1186/s12943-023-01714-0>

- Jenkins, R. W., Barbie, D. A., & Flaherty, K. T. (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *British Journal of Cancer*, *118*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.434>
- Jin, S., Sun, Y., Liang, X., Gu, X., Ning, J., Xu, Y., Chen, S., & Pan, L. (2022). Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00868-x>
- Kabolizadeh, P., Kubicek, G. J., Heron, D. E., Ferris, R. L., & Gibson, M. K. (2012). The role of cetuximab in the management of head and neck cancers. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *12*(4), 517–528. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.667397>
- Kamrani, A., Mehdizadeh, A., Ahmadi, M., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2019). Therapeutic approaches for targeting receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1 in cancer cells. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *23*(5), 447–456. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1602608>
- Kaseb, A. O., Hasanov, E., Cao, H. S. T., Xiao, L., Vauthey, J.-N., Lee, S. S., Yavuz, B. G., Mohamed, Y. I., Qayyum, A., Jindal, S., Duan, F., Basu, S., Yadav, S. S., Nicholas, C., Sun, J. J., Singh Raghav, K. P., Rashid, A., Carter, K., Chun, Y. S., ... Sharma, P. (2022). Perioperative nivolumab monotherapy versus nivolumab plus ipilimumab in resectable hepatocellular carcinoma: a randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, *7*(3), 208–218. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(21\)00427-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(21)00427-1)
- Kawakami, Y., Ohta, S., Sayem, M. A., Tsukamoto, N., & Yaguchi, T. (2020). Immune-resistant mechanisms in cancer immunotherapy. *International Journal of Clinical Oncology*, *25*(5), 810–817. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01611-x>
- Kim, H., Kim, D. W., Kim, M., Lee, Y., Ahn, H. K., Cho, J. H., Kim, I. H., Lee, Y. G., Shin, S. H., Park, S. E., Jung, J., Kang, E. J., & Ahn, M. J. (2022). Long-term outcomes in patients with advanced and/or metastatic non-small cell lung cancer who completed 2 years of immune checkpoint inhibitors or achieved a durable response after discontinuation without disease progression: Multicenter, real-world data. *Cancer*, *128*(4), 778–787. <https://doi.org/10.1002/cncr.33984>
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *93*(3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Kimiz-Gebologlu, I., Gulce-Iz, S., & Biray-Avci, C. (2018). Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Molecular Biology Reports*, *45*(6), 2935–2940. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4427-x>

- Kiniwa, Y., Miyahara, Y., Wang, H. Y., Peng, W., Peng, G., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., Old, L. J., & Wang, R. F. (2007). CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, *13*(23), 6947–6958. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0842>
- Klein, C., Schaefer, W., Regula, J. T., Dumontet, C., Brinkmann, U., Bacac, M., & Umaña, P. (2019). Engineering therapeutic bispecific antibodies using CrossMab technology. *Methods*, *154*(2018), 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.11.008>
- Kolfschoten, M. V. D. N., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W. K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., Den Bleker, T. H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L. A., De Baets, M. H., Van De Winkel, J. G. J., Aalberse, R. C., & Parren, P. W. H. I. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*, *317*(5844), 1554–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1144603>
- Kontermann, R. E., & Brinkmann, U. (2015). Bispecific antibodies. *Drug Discovery Today*, *20*(7), 838–847. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.008>
- Kopp, A., Kwon, H., Johnston, C., Vance, S., Legg, J., Galson-Holt, L., & Thurber, G. M. (2024). Impact of tissue penetration and albumin binding on design of T cell targeted bispecific agents. *Neoplasia (United States)*, *48*(December 2023), 100962. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2023.100962>
- Koyama, S., Akbay, E. A., Li, Y. Y., Herter-Sprie, G. S., Buczkowski, K. A., Richards, W. G., Gandhi, L., Redig, A. J., Rodig, S. J., Asahina, H., Jones, R. E., Kulkarni, M. M., Kuraguchi, M., Palakurthi, S., Fecci, P. E., Johnson, B. E., Janne, P. A., Engelman, J. A., Gangadharan, S. P., ... Hammerman, P. S. (2016). Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nature Communications*, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms10501>
- Kraehenbuehl, L., Weng, C.-H., Eghbali, S., Wolchok, J. D., & Merghoub, T. (2022). Enhancing immunotherapy in cancer by targeting emerging immunomodulatory pathways. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *19*(1), 37–50. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00552-7>
- Kwon, B. (2021). The two faces of IL-2: a key driver of CD8+ T-cell exhaustion. *Cellular and Molecular Immunology*, *18*(7), 1641–1643. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00712-w>
- Kyi, C., & Postow, M. A. (2016). Immune Checkpoint Inhibitor Combinations in Solid Tumors: Opportunities and Challenges. *Immunotherapy*, *8*(7), 821–837. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0002>
- Labrijn, A. F., Janmaat, M. L., Reichert, J. M., & Parren, P. W. H. I. (2019). Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(8), 585–608.

- <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0028-1>
- Laface, C., Memeo, R., Maselli, F., Santoro, A., Iaia, M., Ambrogio, F., Laterza, M., Cazzato, G., Guarini, C., De Santis, P., Perrone, M., & Fedele, P. (2023). Immunotherapy and Pancreatic Cancer: A Lost Challenge? *Life*, *13*(7), 1482. <https://doi.org/10.3390/life13071482>
- Lan, T., Chen, L., & Wei, X. (2021). Inflammatory cytokines in cancer: Comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells10010100>
- Lastwika, K. J., Wilson, W., Li, Q. K., Norris, J., Xu, H., Ghazarian, S. R., Kitagawa, H., Kawabata, S., Taube, J. M., Yao, S., Liu, L. N., Gills, J. J., & Dennis, P. A. (2016). Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT-mTOR pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, *76*(2), 227–238. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3362>
- Laustsen, A. H., Greiff, V., Karatt-Vellatt, A., Muyltermans, S., & Jenkins, T. P. (2021). Animal Immunization, in Vitro Display Technologies, and Machine Learning for Antibody Discovery. *Trends in Biotechnology*, *39*(12), 1263–1273. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.03.003>
- Lawler, S. E., Speranza, M.-C., Cho, C.-F., & Chiocca, E. A. (2017). Oncolytic Viruses in Cancer Treatment. *JAMA Oncology*, *3*(6), 841. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064>
- Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J., & Laustsen, A. H. (2018). Basics of antibody phage display technology. *Toxins*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060236>
- Lee, H. J., Choi, M. Y., Siddiqi, T., Barrientos, J. C., Wierda, W. G., Isufi, I., Tuscano, J. M., Lamanna, N., Subbiah, S., Koff, J. L., Leslie, L. A., Goldenberg, A., Chung, G. G., Breitmeyer, J. B., Hsu, F. J., Wang, M., Jamieson, C., & Kipps, T. J. (2021). Phase 1/2 study of cirmtuzumab and ibrutinib in mantle cell lymphoma (MCL) or chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Journal of Clinical Oncology*, *39*(15_suppl), 7556–7556. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.7556
- Li, L., Li, Y., Yang, C. H., Radford, D. C., Wang, J., Janát-Amsbury, M., Kopeček, J., & Yang, J. (2020). Inhibition of Immunosuppressive Tumors by Polymer-Assisted Inductions of Immunogenic Cell Death and Multivalent PD-L1 Crosslinking. *Advanced Functional Materials*, *30*(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/adfm.201908961>
- Liao, H. Y., Da, C. M., Liao, B., & Zhang, H. H. (2021). Roles of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) in cancer. *Clinical Biochemistry*, *92*(March), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.03.003>
- Lipson, E. J., Vincent, J. G., Loyo, M., Kagohara, L. T., Lubber, B. S., Wang, H., Xu, H., Nayar, S. K., Wang, T. S., Sidransky, D., Anders, R. A., Topalian, S. L., & Taube, J. M. (2013). PD-L1

- expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunology Research*, 1(1), 54–63. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0034>
- Liu, H., & May, K. (2012). Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function. *MAbs*, 4(1), 17–23. <https://doi.org/10.4161/mabs.4.1.18347>
- Liu, J., Chen, Z., Li, Y., Zhao, W., Wu, J. B., & Zhang, Z. (2021). PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, 12(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.731798>
- Liu, X., Chan, A., Tai, C. H., Andresson, T., & Pastan, I. (2020). Multiple proteases are involved in mesothelin shedding by cancer cells. *Communications Biology*, 3(1), 2–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01464-5>
- Long, K. B., Young, R. M., Boesteanu, A. C., Davis, M. M., Melenhorst, J. J., Lacey, S. F., DeGarmo, D. A., Levine, B. L., & Fraietta, J. A. (2018). CAR T Cell Therapy of Non-hematopoietic Malignancies: Detours on the Road to Clinical Success. *Frontiers in Immunology*, 9(December). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02740>
- Luke, J. J., Barlesi, F., Chung, K., Tolcher, A. W., Kelly, K., Hollebecque, A., Le Tourneau, C., Subbiah, V., Tsai, F., Kao, S., Cassier, P. A., Khasraw, M., Kindler, H. L., Fang, H., Fan, F., Allaire, K., Patel, M., Ye, S., Chao, D. T., ... Fong, L. (2021). Phase i study of ABBV-428, a mesothelin-CD40 bispecific, in patients with advanced solid tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(2), 1–10. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002015>
- M. Bordeau, B., & P. Balthasar, J. (2021). Strategies to enhance monoclonal antibody uptake and distribution in solid tumors. *Cancer Biology and Medicine*, 18(3), 649–664. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0704>
- Ma, J., Mo, Y., Tang, M., Shen, J., Qi, Y., Zhao, W., Huang, Y., Xu, Y., & Qian, C. (2021). Bispecific Antibodies: From Research to Clinical Application. *Frontiers in Immunology*, 12(May). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626616>
- Madden, K., & Kasler, M. K. (2019). Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer and Melanoma. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(5), 150932. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.011>
- Madsen, A. V., Pedersen, L. E., Kristensen, P., & Goletz, S. (2024). Design and engineering of bispecific antibodies: insights and practical considerations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1352014>
- Mahoney, K. M., Rennert, P. D., & Freeman, G. J. (2015). Combination cancer immunotherapy

- and new immunomodulatory targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(8), 561–584.
<https://doi.org/10.1038/nrd4591>
- Majidpoor, J., & Mortezaee, K. (2021). The efficacy of PD-1/PD-L1 blockade in cold cancers and future perspectives. *Clinical Immunology*, 226(March), 108707.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108707>
- Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Tumor Antigen Escape from CAR T-cell Therapy. *Cancer Discovery*, 8(10), 1219–1226. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0442>
- Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R., & Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*, 367(2), 103–107.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.009>
- Mariathasan, S., Turley, S. J., Nickles, D., Castiglioni, A., Yuen, K., Wang, Y., Kadel III, E. E., Koepfen, H., Astarita, J. L., Cubas, R., Jhunjunwala, S., Banchereau, R., Yang, Y., Guan, Y., Chalouni, C., Ziai, J., Şenbabaoğlu, Y., Santoro, S., Sheinson, D., ... Powles, T. (2018). TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*, 554(7693), 544–548. <https://doi.org/10.1038/nature25501>
- Matsuda, T., Nomi, M., Ikeya, M., Kani, S., Oishi, I., Terashima, T., Takada, S., & Minami, Y. (2001). Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mechanisms of Development*, 105(1–2), 153–156.
[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00383-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00383-5)
- Michaelson, J. S., Demarest, S. J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W. B., Wu, X., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., Farrington, G. K., Lugovskoy, A., Joseph, I., Bailly, V., Wang, X., Garber, E., Browning, J., & Glaser, S. M. (2009). Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTβR. *MAbs*, 1(2), 128–141.
<https://doi.org/10.4161/mabs.1.2.7631>
- Mikitiuk, M., Barczyński, J., Bielski, P., Arciniega, M., Tyrcha, U., Hec, A., Lipińska, A. D., Rychłowski, M., Holak, T. A., & Sitar, T. (2023). IGF2 Peptide-Based LYTACs for Targeted Degradation of Extracellular and Transmembrane Proteins. *Molecules*, 28(22), 7519.
<https://doi.org/10.3390/molecules28227519>
- Montfort, A., Colacios, C., Levade, T., Andrieu-Abadie, N., Meyer, N., & Ségui, B. (2019). The TNF paradox in cancer progression and immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01818>
- Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., Tykodi, S. S., Sosman, J. A., Procopio, G., Plimack, E. R., Castellano, D., Choueiri, T. K., Gurney, H., Donskov, F., Bono, P., Wagstaff, J., Gauler, T. C., Ueda, T., Tomita, Y., ... Sharma, P. (2015).

- Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 373(19), 1803–1813. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510665>
- Motzer, R. J., Penkov, K., Haanen, J., Rini, B., Albiges, L., Campbell, M. T., Venugopal, B., Kollmannsberger, C., Negrier, S., Uemura, M., Lee, J. L., Vasiliev, A., Miller, W. H., Gurney, H., Schmidinger, M., Larkin, J., Atkins, M. B., Bedke, J., Alekseev, B., ... Choueiri, T. K. (2019). Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 380(12), 1103–1115. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1816047>
- Mu, C. Y., Huang, J. A., Chen, Y., Chen, C., & Zhang, X. G. (2011). High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Medical Oncology*, 28(3), 682–688. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9515-2>
- Neri, D. (2019). Antibody–Cytokine Fusions: Versatile Products for the Modulation of Anticancer Immunity. *Cancer Immunology Research*, 7(3), 348–354. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0622>
- Neves, H., & Kwok, H. F. (2015). Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clinical*, 3, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.04.001>
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Oishi, I., Takeuchi, S., Hashimoto, R., Nagabukuro, A., Ueda, T., Liu, Z. J., Hatta, T., Akira, S., Matsuda, Y., Yamamura, H., Otani, H., & Minami, Y. (1999). Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: Implications in development and function of the nervous system. *Genes to Cells*, 4(1), 41–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00234.x>
- Ota, K., Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Iwama, E., Tanizaki, J., Harada, T., Matsumoto, K., Takayama, K., Takamori, S., Kage, M., Hoshino, T., Nakanishi, Y., & Okamoto, I. (2015). Induction of PD-L1 expression by the EML4-ALK oncoprotein and down stream signaling pathways in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(17), 4014–4021. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0016>
- Paladino, S., Lebreton, S., & Zurzolo, C. (2015). Trafficking and Membrane Organization of GPI-Anchored Proteins in Health and Diseases. In *Current Topics in Membranes* (Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.03.006>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

- Pardridge, W. M. (2016). Re-engineering therapeutic antibodies for Alzheimer's disease as blood-brain barrier penetrating bi-specific antibodies. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *16*(12), 1455–1468. <https://doi.org/10.1080/14712598.2016.1230195>
- Parvez, A., Choudhary, F., Mudgal, P., Khan, R., Qureshi, K. A., Farooqi, H., & Aspatwar, A. (2023). PD-1 and PD-L1: architects of immune symphony and immunotherapy breakthroughs in cancer treatment. *Frontiers in Immunology*, *14*(December), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1296341>
- Patsoukis, N., Wang, Q., Strauss, L., & Boussiotis, V. A. (2020). Revisiting the PD-1 pathway. *Science Advances*, *6*(38). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd2712>
- Péguillet, I., Milder, M., Louis, D., Vincent-Salomon, A., Dorval, T., Piperno-Neumann, S., Scholl, S. M., & Lantz, O. (2014). High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Research*, *74*(8), 2204–2216. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2269>
- Pol, J. G., Caudana, P., Paillet, J., Piaggio, E., & Kroemer, G. (2020). Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1084/jem.20191247>
- Posner, J., Barrington, P., Brier, T., & Datta-Mannan, A. (2019). Monoclonal antibodies: Past, present and future. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *260*, 81–141. https://doi.org/10.1007/164_2019_323
- Qing, Y., Li, Q., Ren, T., Xia, W., Peng, Y., Liu, G. L., Luo, H., Yang, Y. X., Dai, X. Y., Zhou, S. F., & Wang, D. (2015). Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, *9*, 901–909. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S75152>
- Rallis, K. S., CORRIGAN, A. E., DADAH, H., GEORGE, A. M., KESHWARA, S. M., SIDERIS, M., & SZABADOS, B. (2021). Cytokine-based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. *Anticancer Research*, *41*(7), 3247–3252. <https://doi.org/10.21873/anticancer.15110>
- Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csósz, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M. A., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Rangwala, R., & Brahmer, J. R. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small–Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *375*(19), 1823–1833. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>
- Reddy, U. R., Phatak, S., Allen, C., Nycum, L. M., Sulman, E. P., White, P. S., & Biegel, J. A. (1997).

- Localization of the human Ror1 gene (NTRKR1) to chromosome 1p31-p32 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid analysis. *Genomics*, 41(2), 283–285. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4653>
- Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), 1350–1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>
- Rostagno, P., Moll, J. L., Birtwisle-Peyrottes, I., Ettore, F., & Caldani, C. (1996). Cell cycle expression of estrogen receptors determined by image analysis on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, 39(2), 147–154. <https://doi.org/10.1007/BF01806181>
- Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological Reviews*, 229(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x>
- Santin, A. D., Vergote, I., González-Martín, A., Moore, K., Oaknin, A., Romero, I., Diab, S., Copeland, L. J., Monk, B. J., Coleman, R. L., Herzog, T. J., Siegel, J., Kasten, L., Schlicker, A., Schulz, A., Köchert, K., Walter, A. O., Childs, B. H., Elbi, C., & Bulat, I. (2023). Safety and activity of anti-mesothelin antibody-drug conjugate anetumab ravtansine in combination with pegylated-liposomal doxorubicin in platinum-resistant ovarian cancer: Multicenter, phase Ib dose escalation and expansion study. *International Journal of Gynecological Cancer*, 33(4), 562–570. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2022-003927>
- Sasikumar, P. G., & Ramachandra, M. (2020). Peptide and peptide-inspired checkpoint inhibitors: Protein fragments to cancer immunotherapy. *Medicine in Drug Discovery*, 8, 100073. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100073>
- Saxena, M., van der Burg, S. H., Melief, C. J. M., & Bhardwaj, N. (2021). Therapeutic cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer*, 21(6), 360–378. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00346-0>
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Šedý, J. R., & Ramezani-Rad, P. (2019). HVEM network signaling in cancer. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 142, pp. 145–186). <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.01.004>
- Shah, N. N., & Fry, T. J. (2019). Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(6), 372–385. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0184-6>
- Si, Y., Melkonian, A. L., Curry, K. C., Xu, Y., Tidwell, M., Liu, M., Zaky, A. F., & Liu, X. (Margaret). (2021). Monoclonal antibody-based cancer therapies. *Chinese Journal of Chemical*

- Engineering*, 30, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.11.009>
- Simpson, A., & Caballero, O. (2014). Monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *BMC Proceedings*, 8(S4), 6–8. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-o6>
- Skalniak, L., Zak, K. M., Guzik, K., Magiera, K., Musielak, B., Pachota, M., Szelazek, B., Kocik, J., Grudnik, P., Tomala, M., Krzanik, S., Pyrc, K., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget*, 8(42), 72167–72181. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20050>
- Spiess, C., Zhai, Q., & Carter, P. J. (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular Immunology*, 67(2), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>
- Sun, C., Mezzadra, R., & Schumacher, T. N. (2018). Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*, 48(3), 434–452. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
- Sun, Q., Hong, Z., Zhang, C., Wang, L., Han, Z., & Ma, D. (2023). Immune checkpoint therapy for solid tumours: clinical dilemmas and future trends. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 320. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01522-4>
- Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(2), 101–126. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research*, 27(1), 109–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.151>
- Tang, Q., Chen, Y., Li, X., Long, S., Shi, Y., Yu, Y., Wu, W., Han, L., & Wang, S. (2022). The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.964442>
- Tang, Z., Qian, M., & Ho, M. (2013). The Role of Mesothelin in Tumor Progression and Targeted Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13(2), 276–280. <https://doi.org/10.2174/1871520611313020014>
- Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., Chen, S., Klein, A. P., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Chen, L. (2012). Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Science Translational Medicine*, 4(127). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689>
- Teo, E. C., Chew, Y., & Phipps, C. (2016). A review of monoclonal antibody therapies in lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97(August), 72–84.

- <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.014>
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
- Valenzuela, N. M., & Schaub, S. (2018). The biology of IgG subclasses and their clinical relevance to transplantation. *Transplantation*, 102(1S), S7–S13. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001816>
- van der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T., & Melief, C. J. M. (2016). Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nature Reviews Cancer*, 16(4), 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>
- Velcheti, V., Schalper, K. A., Carvajal, D. E., Anagnostou, V. K., Syrigos, K. N., Sznol, M., Herbst, R. S., Gettinger, S. N., Chen, L., & Rimm, D. L. (2014). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation*, 94(1), 107–116. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.130>
- Veldman, J., Visser, L., Berg, A. van den, & Diepstra, A. (2020). Primary and acquired resistance mechanisms to immune checkpoint inhibition in Hodgkin lymphoma. *Cancer Treatment Reviews*, 82(July 2019), 101931. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101931>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 20(11), 651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Waldmann, T. A. (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12), a028472. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028472>
- Wang, C., Vemulapalli, B., Cao, M., Gadre, D., Wang, J., Hunter, A., Wang, X., & Liu, D. (2018). A systematic approach for analysis and characterization of mispairing in bispecific antibodies with asymmetric architecture. *MAbs*, 10(8), 1226–1235. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1511198>
- Wang, D., Bauersachs, J., & Berliner, D. (2023). Immune Checkpoint Inhibitor Associated Myocarditis and Cardiomyopathy: A Translational Review. *Biology*, 12(3), 472. <https://doi.org/10.3390/biology12030472>
- Wang, Q., Chen, Y., Park, J., Liu, X., Hu, Y., Wang, T., McFarland, K., & Betenbaugh, M. J. (2019). Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies*, 8(3), 43.

- <https://doi.org/10.3390/antib8030043>
- Wang, Y., Wang, X. Y., Subjeck, J. R., & Kim, H. L. (2010). Covalent crosslinking of tumor antigens stimulates an antitumor immune response. *Vaccine*, 28(40), 6613–6620. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.060>
- Wei, J., Yang, Y., Wang, G., & Liu, M. (2022). Current landscape and future directions of bispecific antibodies in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 13(October), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1035276>
- Weidemann, S., Gagelmann, P., Gorbokon, N., Lennartz, M., Menz, A., Luebke, A. M., Kluth, M., Hube-Magg, C., Blessin, N. C., Fraune, C., Möller, K., Bernreuther, C., Lebok, P., Clauditz, T. S., Jacobsen, F., Izbicki, J. R., Jansen, K., Sauter, G., Uhlig, R., ... Simon, R. (2021). Mesothelin Expression in Human Tumors: A Tissue Microarray Study on 12,679 Tumors. *Biomedicines*, 9(4), 397. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040397>
- Westin, S. N., Moore, K., Chon, H. S., Lee, J., Thomes Pepin, J., Sundborg, M., Shai, A., de la Garza, J., Nishio, S., Gold, M. A., Wang, K., McIntyre, K., Tillmanns, T. D., Blank, S. V., Liu, J.-H., McCollum, M., Contreras Mejia, F., Nishikawa, T., Pennington, K., ... Woliver, T. (2024). Durvalumab Plus Carboplatin/Paclitaxel Followed by Maintenance Durvalumab With or Without Olaparib as First-Line Treatment for Advanced Endometrial Cancer: The Phase III DUO-E Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 42(3), 283–299. <https://doi.org/10.1200/JCO.23.02132>
- Wolchok, J. D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Dummer, R., Hill, A., Hogg, D., Haanen, J., Carlino, M. S., Bechter, O., Maio, M., Marquez-Rodas, I., ... Larkin, J. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 377(14), 1345–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709684>
- Wu, C., Ying, H., Bose, S., Miller, R., Medina, L., Santora, L., & Ghayur, T. (2009). Molecular construction and optimization of anti-human IL-1 α / β dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecules. *MAbs*, 1(4), 339–347. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.4.8755>
- Wu, S. P., Liao, R. Q., Tu, H. Y., Wang, W. J., Dong, Z. Y., Huang, S. M., Guo, W. B., Gou, L. Y., Sun, H. W., Zhang, Q., Xie, Z., Yan, L. X., Su, J., Yang, J. J., Zhong, W. Z., Zhang, X. C., & Wu, Y. L. (2018). Stromal PD-L1–Positive Regulatory T cells and PD-1–Positive CD8–Positive T cells Define the Response of Different Subsets of Non–Small Cell Lung Cancer to PD-1/PD-L1 Blockade Immunotherapy. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(4), 521–532.

- <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.11.132>
- Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., & Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- Xu, H., Cheng, M., Guo, H., Chen, Y., Huse, M., & Cheung, N.-K. V. (2015). Retargeting T Cells to GD2 Pentasaccharide on Human Tumors Using Bispecific Humanized Antibody. *Cancer Immunology Research*, 3(3), 266–277. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0230-T>
- Xu, W. J., Lin, Y., Mi, C. L., Pang, J. Y., & Wang, T. Y. (2023). Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in CHO cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(4), 1063–1075. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12342-x>
- Yamaguchi, T., Yanagisawa, K., Sugiyama, R., Hosono, Y., Shimada, Y., Arima, C., Kato, S., Tomida, S., Suzuki, M., Osada, H., & Takahashi, T. (2012). NKX2-1/TTF1/TTF-1-Induced ROR1 Is Required to Sustain EGFR Survival Signaling in Lung Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.008>
- Yang, C. Y., Lin, M. W., Chang, Y. L., Wu, C. T., & Yang, P. C. (2014). Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *European Journal of Cancer*, 50(7), 1361–1369. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.018>
- Ye, S., Cohen, D., Belmar, N. A., Choi, D., Tan, S. S., Sho, M., Akamatsu, Y., Kim, H., Iyer, R., Cabel, J., Lake, M., Song, D., Harlan, J., Zhang, C., Fang, Y., Wahl, A. F., Culp, P., Hollenbaugh, D., & Chao, D. T. (2019). A bispecific molecule targeting CD40 and tumor antigen mesothelin enhances tumor-specific immunity. *Cancer Immunology Research*, 7(11), 1864–1875. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0805>
- Yu, J., Chen, L., Cui, B., Widhopf, G. F., Shen, Z., Wu, R., Zhang, L., Zhang, S., Briggs, S. P., & Kipps, T. J. (2016). Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 585–598. <https://doi.org/10.1172/JCI83535>
- Yu, N., Li, X., Song, W., Li, D., Yu, D., Zeng, X., Li, M., Leng, X., & Li, X. (2012). CD4+CD25+CD127low/- T cells: A more specific treg population in human peripheral blood. *Inflammation*, 35(6), 1773–1780. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9496-8>
- Zahavi, D., & Weiner, L. (2020). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies*, 9(3), 34. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>
- Zak, K. M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2015). Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and

- Its Ligand PD-L1. *Structure*, 23(12), 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.010>
- Zhang, S., Chen, L., Wang-Rodriguez, J., Zhang, L., Cui, B., Frankel, W., Wu, R., & Kipps, T. J. (2012). The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *American Journal of Pathology*, 181(6), 1903–1910. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.024>
- Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(8), 807–821. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhao, Y., Lee, C. K., Lin, C. H., Gassen, R. B., Xu, X., Huang, Z., Xiao, C., Bonorino, C., Lu, L. F., Bui, J. D., & Hui, E. (2019). PD-L1:CD80 Cis-Heterodimer Triggers the Co-stimulatory Receptor CD28 While Repressing the Inhibitory PD-1 and CTLA-4 Pathways. *Immunity*, 51(6), 1059-1073.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.003>
- Zheng, Y., Han, L., Chen, Z., Li, Y., Zhou, B., Hu, R., Chen, S., Xiao, H., Ma, Y., Xie, G., Yang, J., Ding, X., & Shen, L. (2022). PD-L1+CD8+ T cells enrichment in lung cancer exerted regulatory function and tumor-promoting tolerance. *IScience*, 25(2), 103785. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103785>
- Zhou, Y.-J., Li, G., Wang, J., Liu, M., Wang, Z., Song, Y., Zhang, X., & Wang, X. (2023). PD-L1: expression regulation. *Blood Science*, 5(2), 77–91. <https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000149>

12. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie przeciwciała klasy IgG.....	19
Rycina 2. Przykładowe formaty symetrycznych przeciwciał bispecyficznych. Zaadaptowane z (Labrijn et al., 2019).	23
Rycina 3. Przykładowe formaty asymetrycznych przeciwciał bispecyficznych. Zaadaptowane z (Brinkmann & Kontermann, 2017).	24
Rycina 4. Przykładowe formaty przeciwciał bispecyficznych nie podobnych do IgG. Zaadaptowane z (G. Fan et al., 2015).	25
Rycina 5. Schematyczne przedstawienie zaprojektowanych przeciwciał bispecyficznych.	51
Rycina 6. Obraz żelu SDS-Page dla białka ROR-1 i przeciwciała anti-ROR-1.	70
Rycina 7 Obraz żelu SDS-Page dla białka Mezeteliny i przeciwciała anti-Mezetelina.....	70
Rycina 8. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla białka ROR-1.....	71
Rycina 9. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla białka Mezeteliny.	71
Rycina 10. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciała anti-ROR-1.	72
Rycina 11. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciała anti-Mezetelina.	72
Rycina 12. Obraz żelu SDS-Page dla białka PD-L1 i przeciwciała anti-PD-L1.....	73
Rycina 13. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla białka PD-L1.	74
Rycina 14. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciała anti-PD-L1.....	74
Rycina 15. Obraz żelu SDS-Page dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1.....	75
Rycina 16. Obraz żelu SDS-Page dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1.....	76
Rycina 17. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1.	76
Rycina 18. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1. .	77
Rycina 19. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_7_1 na drodze chromatografii powinowactwa.	78
Rycina 20. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_7_2 na drodze chromatografii powinowactwa.	79
Rycina 21. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_8_1 na drodze chromatografii powinowactwa.	79
Rycina 22. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_8_2 na drodze chromatografii powinowactwa.	80
Rycina 23. Obraz żelu SDS-Page w warunkach redukujących dla przeciwciał bispecyficznych wyprodukowanych w systemie przejściowym i w stabilnych liniach.	80

Rycina 24. Obraz żelu SDS-Page w warunkach nieredukujących dla przeciwciał bispecyficznych wyprodukowanych w systemie przejściowym (HEK293) i w stabilnych liniach (CHO).....	81
Rycina 25. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał ROR-1 x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych.	81
Rycina 26. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał Mezetelina x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych.	82
Rycina 27. Wiązanie ROR-1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i przeciwciała anti-ROR-1.	83
Rycina 28. Wiązanie Mezeteliny do przeciwciał bispecyficznych Mezetelina x PD-L1 i przeciwciała aty-Mezetelina.....	83
Rycina 29. Wiązanie PD-L1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1, Mezetelina x PD-L1 oraz przeciwciała anti-PD-L1.	83
Rycina 30. Wiązanie ROR-1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych (CHO) oraz w systemie przejściowym (HEK293) i przeciwciała anti-ROR-1.	84
Rycina 31. Wiązanie Mezeteliny do przeciwciał bispecyficznych Mezetelina x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych (CHO) oraz w systemie przejściowym (HEK293) i przeciwciała aty-Mezetelina.	84
Rycina 32. Wiązanie PD-L1 do przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1 wyprodukowanych w stabilnych liniach komórkowych (CHO) oraz w systemie przejściowym (HEK293) oraz przeciwciała anti-PD-L1.....	85
Rycina 33. Inhibicja interakcji PD-1/PD-L1 przez przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym.....	86
Rycina 34. Inhibicja interakcji PD-1/PD-L1 przez przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym i w stabilnych liniach komórkowych, w odniesieniu do przeciwciała monospecyficznego anti-PD-L1.	87
Rycina 35. Poziom ekspresji celów molekularnych na wykorzystywanych nowotworowych liniach komórkowych.....	88
Rycina 36. Poziom lizy komórek nowotworowych trzustki w obecności komórek PBMC, przeciwciał bispecyficznych i kombinacji przeciwciał monospecyficznych.	89
Rycina 37. Poziom lizy komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i piersi (BT20) w obecności komórek PBMC, przeciwciał bispecyficznych i kombinacji przeciwciał monospecyficznych.	90

Rycina 38. Poziom lizy komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) w obecności komórek PBMC i różnych stężeń przeciwciał bispecyficznych.....	91
Rycina 39. Poziom lizy komórek nowotworowych piersi (BT20) w obecności komórek PBMC i różnych stężeń przeciwciał bispecyficznych.....	91
Rycina 40. Poziom lizy komórek nowotworowych trzustki (Panc1) w obecności komórek PBMC i różnych stężeń przeciwciał bispecyficznych.	92
Rycina 41. Stężenie żywych komórek nowotworowych po 5 dniowej ko-kulturze z komórkami PBMC, dodatkiem przeciwciał bispecyficznych lub kombinacji przeciwciał monospecyficznych.	93
Rycina 42. Stężenie cytokin w ko-kulturach komórek PBMC i komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i trzustki (Panc1) z dodatkiem przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i kombinacji przeciwciał monospecyficznych anty-ROR-1 i anty-PD-L1.	94
Rycina 43. Stężenie cytokin w ko-kulturach komórek PBMC i komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i trzustki (Panc1) z dodatkiem przeciwciał bispecyficznych Mezetelina x PD-L1 i kombinacji przeciwciał monospecyficznych anty-Mezetelina i anty-PD-L1.	95
Rycina 44. Procentowa ilość limfocytów T CD4+ CD25+ CD127low.....	97
Rycina 45. Procentowa ilość limfocytów T CD4+ CD25+ CD127low FoxP3+.....	98
Rycina 46. Procentowa ilość limfocytów T CD4- FoxP3+.....	99
Rycina 47. Procentowa ilość limfocytów T CD4+ CD25- CD127-.....	100

13. SPIS TABEL

Tabela 1. Zestawienie przykładowych przeciwciał monoklonalnych stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych (AntibodySociety, 2024).....	21
Tabela 2. Przeciwciała bispecyficzne zarejestrowane do użycia w terapiach przeciwnowotworowych (AntibodySociety, 2024).....	26
Tabela 3 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach bakteryjnych.....	35
Tabela 4 Odczynniki wykorzystywane do prac związanych z inżynierią genetyczną.....	35
Tabela 5 Odczynniki wykorzystywane do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz analizy Western blot.....	36
Tabela 6 Materiały zużywalne wykorzystywane do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym oraz analizy Western blot.....	37
Tabela 7 Odczynniki wykorzystywane do chromatografii analitycznej.....	37
Tabela 8 Materiały zużywalne wykorzystywane do chromatografii analitycznej.....	38
Tabela 9 Odczynniki wykorzystywane do chromatografii preparatywnej.....	38
Tabela 10 Materiały zużywalne wykorzystywane do chromatografii preparatywnej.....	39
Tabela 11 Odczynniki wykorzystywane do testów ELISA.....	39
Tabela 12 Materiały zużywalne wykorzystywane do testów ELISA.....	39
Tabela 13 Linie komórkowe wykorzystywane w projekcie.....	40
Tabela 14 Odczynniki wykorzystywane przy hodowlach komórek zawieszinowych.....	40
Tabela 15 Materiały zużywalne wykorzystywane przy hodowlach komórek zawieszinowych.....	40
Tabela 16 Odczynniki wykorzystywane do hodowli komórek adherentnych.....	41
Tabela 17 Materiały zużywalne wykorzystywane do hodowli komórek adherentnych.....	42
Tabela 18 Odczynniki do analizy zdolności blokowania ścieżki PD-1/PD-L1.....	42
Tabela 19 Materiały zużywalne do analizy zdolności blokowania ścieżki PD-1/PD-L1.....	42
Tabela 20 Odczynniki wykorzystywane do izolacji komórek PBMC.....	43
Tabela 21 Odczynniki wykorzystywane w cytometrii przepływowej.....	43
Tabela 22 Materiały zużywalne wykorzystywane w cytometrii przepływowej.....	44
Tabela 23 Odczynniki wykorzystywane w testach cytotoksyczności.....	44
Tabela 24 Materiały zużywalne wykorzystywane w testach cytotoksyczności.....	45
Tabela 25 Odczynniki wykorzystywane do analizy poziomu cytokin.....	45
Tabela 26 Materiały zużywalne wykorzystywane do analizy poziomu cytokin.....	45
Tabela 27 Lista aparatury wykorzystanej przy realizacji projektu.....	46

Tabela 28. Źródłowe sekwencje aminokwasowe z których projektowane były konstrukty genetyczne.	48
Tabela 29. Schematyczne przedstawienie zaprojektowanych konstruktów genetycznych....	50
Tabela 30 Warunki transformacji komórek kompetentnych	52
Tabela 31 Warunki przykładowej reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi.....	53
Tabela 32 Przykładowe warunki ligacji fragmentu DNA do wektora.	54
Tabela 33 Przykładowy skład mieszaniny do reakcji PCR	54
Tabela 34 Przykładowy profil temperaturowy reakcji PCR.....	54
Tabela 35 Składniki buforu do elektroforezy SDS-PAGE	55
Tabela 36 Skład 10% i 12% poliakrylamidowych żeli rozdzielających.	55
Tabela 37 Skład 5% poliakrylamidowego żelu zagęszczającego.....	55
Tabela 38 Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli ssaczych komórek zawieszinowych.	57
Tabela 39 Szczegółowe informacje dotyczące warunków hodowli ludzkich, nowotworowych komórek adherentnych.	57
Tabela 40 Parametry elektroporacji komórek CHO K1.....	60
Tabela 41. Szczegółowe informacje dotyczące produkcji przejściowej i oczyszczania białek i przeciwciał referencyjnych.....	69
Tabela 42. Szczegółowe informacje dotyczące produkcji przejściowej i oczyszczania przeciwciał bispecyficznych.....	75
Tabela 43. Szczegółowe informacje dotyczące produkcji przeciwciał bispecyficznych w stabilnych liniach komórkowych.	78