

UMFVBT – Facultatea de Medicină  
Departamentul III – Științe Funcționale  
Disciplina de Imunologie, Alergologie și Biologie  
**Olteanu Gheorghe-Emilian**



UNIVERSITATEA  
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
VICTOR BABEȘ | TIMIȘOARA

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**DEZVOLTAREA, ANALIZA ȘI EVOLUȚIA  
LIMFOCITELOR T CU RECEPTORI CHIMERICI  
MULTISPECIFICI DE ANTIGEN ÎN IMUNOTERAPIA  
TUMORALĂ**

## **REZUMAT**

Coordonator științific  
**PROF. UNIV. DR. VIRGIL PĂUNESCU**

# CUPRINS

<b>LISTA LUCRĂRI PROPRII ELABORATE</b>	V
<b>LISTA TABELE ȘI FIGURI</b>	VI
<b>LISTA ABREVIERI ȘI SIMBOLURI</b>	IX
<b>MULȚUMIRI</b>	XIV
<b>INTRODUCERE</b>	XV
<b>I. PARTEA GENERALĂ – REVIZUIRE DE LITERATURĂ</b>	1
<b>I.1. Imunitate anti-tumorală</b>	1
I.1.1. Rolul sistemului imun înăscut în răspunsul anti-tumoral	2
I.1.1.1. Macrofagele	3
I.1.1.2. Celulele dendritice (CD)	3
I.1.1.3. Neutrofile asociate tumorii (NAT)	4
I.1.1.4. Celulele natural killer (CNK)	4
I.1.1.5. Celulele T natural killer (TNK)	5
I.1.2. Răspunsul imun adaptativ în cancer	5
I.1.2.1. Limfocitele B	8
I.1.2.2. Celulele T și răspunsul imun	10
<b>I.2. Abordări terapeutice anti-tumorale moderne</b>	13
I.2.1. Anticorpi monoclonali	15
I.2.2. Tehnologia CAR (celule T, celule NK)	16
I.2.3. Manipularea de limfocite infiltrante tumorale (LIT)	20
I.2.4. Strategii multispecifice țintite anti-tumorale	23
I.2.5. Editare genică	25
<b>II. PARTEA SPECIALĂ – CONTRIBUȚII PERSONALE</b>	27
<b>II.1. Materiale și metode</b>	27
II.1.1. Vectori lentivirali și proiectarea lor	27
II.1.1.1. Producția de vector lentiviral	31

II.1.2. Transfecția celulelor 293T pentru producția de lentivirus	32
II.1.3. Fenotipizarea celulelor mononucleare din sângele periferic	35
II.1.3.1. Selecția negativă a limfocitelor umane T CD3 <sup>+</sup>	35
II.1.3.2. Selecția negativă a limfocitelor umane T CD8 <sup>+</sup>	35
II.1.3.3. Test de imunoabsorbție legat cu enzimă - ELISA	36
II.1.4. Cultura celulelor NK-92	37
II.1.5. Transducția celulelor	38
II.1.6. Analiza eficienței transducției	39
II.1.7. Analiza expresiei CAR	39
II.1.8. Testele de citotoxicitate	40
II.1.8.1. Analiza citometriei de flux	41
II.1.8.1.1. Marcatori lipofilici	41
II.1.8.1.2. Analiza citotoxicității	42
II.1.8.2. xCELLigence - analiză celulară în timp real	43
II.1.8.2.1. Analiza citolitică	44
II.1.8.2.2. Experiment data analysis	46
II.1.8.3. BioStație	46
II.1.8.3.1. Marcare celulară pentru BioStație	46
II.1.8.3.2. Test de citotoxicitate	47
<b>II.2. Rezultate</b>	48
II.2.1. Analiza eficienței transducției	48
II.2.2. Analiza expresiei CAR	52
II.2.3. Identificarea condițiilor optime de cultură pentru PBMC, inclusiv efectori specifici	53
II.2.3.1. Fenotipizarea celulelor mononucleare din sângele periferic	53
II.2.3.2. ELISA	56
II.2.4. Teste de citotoxicitate funcțională	59
II.2.4.1. xCELLigence - analiză celulară în timp real	59
II.2.4.2. Citometria de flux a celulelor țintă, a celulelor efectoare și analiza citotoxicității	69

II.2.4.3. Test funcțional pe BioStație - test de citotoxicitate	89
<b>II.3. Discuții</b>	93
II.3.1. Optimizarea condițiilor de creștere a celulelor efectoare - condiții optime de cultură	94
II.3.2. Testele funcționale - analiza citotoxicității	95
II.3.2.1. xCELLigence - analiză celulară în timp real	95
II.3.2.2. Analiza citotoxicității în citometriei de flux	98
<b>III. CONCLUZII</b>	100
III.1. Contribuții personale	100
III.2. Direcții viitoare de cercetare	101
<b>REFERINȚE</b>	102
<b>ANEXE</b>	112

**CUVINTE CHEIE:** anti-receptor al factorului de creștere epidermică (EGFR), receptor himeric de antigen, citotoxicitate, citometrie de flux, imunoterapie, limfocite, multispecific, celule NK, celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs), analiză celulară în timp real, celule T-în-NK (TiNK), transducție, transfecție.

## **I. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII**

Prezenta teză de doctorat a urmărit să elaboreze dezvoltarea, analiza și monitorizarea evoluției limfocitelor CAR-T multispecifice pentru tratamentul malignității solide umane. Nevoia de imunoterapie celulară în cancere solide este de maximă importanță și necesitate. Mai mult decât atât, limitarea imunoterapiei CAR-T clasice datorită numeroaselor efecte secundare și absența unei soluții adecvate bazate pe celule în tumorile solide, evidențiază necesitatea acestei prezente cercetări.

În acest moment, nu există o imunoterapie viabilă bazată pe celule pentru tratamentul malignității solide. S-au înregistrat progrese în ceea ce privește anticorpii monoclonali, în special cei care vizează punctele de control imun, ca de exemplu inhibitori a proteinei 4 asociată limfocitelor T citotoxice (CTLA-4), proteina morții celulare programate 1 (PD-1) și ligandul PD-1 (PD-L1). Din păcate, aceste tratamente biologice au reușite pleomorfe, cu pacienți care răspund excelent la tratament și sunt declarați vindecați, și pacienți care nu prezintă nici un răspuns la tratament.

Pe scurt, această teză este formulată după cum urmează:

- Transfecția liniei de celule 293T (ATCC® CRL-3216™) cu un vector lentiviral care codifică un CAR al receptorului anti-epidermic al factorului de creștere (EGFR). Celulele 293T reprezintă o derivată a liniei de celule umane renale embrionare, celulele 293 sunt extrem de transfectabile.
- Transducția celulelor efectoare cu anti-EGFR CAR, pentru recunoașterea specifică a tumorilor solide pozitive EGFR.
- Analiza eficienței transducției a celulelor efectoare transduse, pentru evaluarea procentului de celule efectoare pozitive GFP. Evaluarea expresiei CAR anti-EGFR pe celule efectoare transduse cu proteina EGFRvIII umană biotinilată Avitag™, proteină L biotinilată recombinantă.
- Validarea funcțională in vitro a citotoxicității celulelor efectoare transduse anti-EGFR CAR împotriva celulelor țintă tumorale care exprimă EGFR.

Din punct de vedere al cercetării științifice naționale, din cunoștințele noastre, colectivul de cercetare implicat în teză reprezintă singurul care studiază dezvoltarea tehnologiei CAR pentru imunoterapia tumorilor solide. La nivel internațional tema de cercetare a acestei teze este obiectivul continuu a multor colective de cercetare de talie mondială, din Europa, Statele Unite ale Americii și Asia, de ex. echipa de cercetare a lui Khaldoun Almhanna, echipa de cercetare a lui Alexandra Flemming și echipa de cercetare a lui Laurence Cooper etc.

Obiectivele acestei teze sunt:

- Dezvoltarea unor metode eficiente de transfecție pentru producția lentivirală de CAR anti-EGFR.
- Transducția anti-EGFR CAR în celulele efectoare imune, care sunt implicate activ în imunitatea anti-tumorală, cum ar fi limfocitele, celulele natural killer sau derivații.
- Testarea funcțională a capacității antitumorale a celulelor efectoare transduse, adică testarea funcțională a citotoxicității celulelor efectoare transduse anti-EGFR CAR împotriva liniilor celulare de cancer EGFR+, adică MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), SK-BR- 3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™), HT-29 (ATCC® HTB-38™).

## **II. DEZVOLTAREA DE METODE DE TRANSFECȚIE EFICIENTE PENTRU PRODUCȚIA LENTIVIRALĂ DE ANTI-EGFR.**

Pentru partea experimentală, a fost utilizat un sistem lentiviral de a doua generație. Sistemul respectiv conține o plasmidă de ambalare, care codifică genele Gag, Pol, Rev și Tat. Plasmida de transfer conține secvențele virale ale terminalului lung (LTR) și semnalul de ambalare psi. Proteina de înveliș viral Env, reprezentată aici de VSV-G, este codificată de o a treia plasmidă de înveliș.

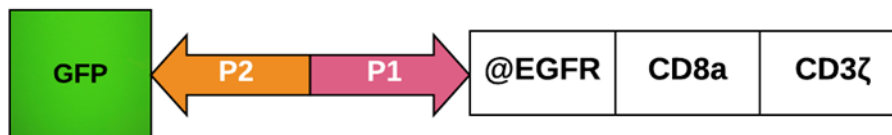


Fig. 1. Proiectare a vectorului de la GEGTech.

### III. TRANSDUCȚIA ANTI-EGFR CAR ÎN CELULELE EFECTOARE IMUNE, CARE SUNT IMPLICATE ACTIV ÎN IMUNITATEA ANTI-TUMORALĂ, CUM AR FI LIMFOCITELE, CELULE NATURAL KILLER SAU DERIVAȚII.

Odată stabilit protocolul pentru transfecție, următoarea etapă a fost transducția PBMC-urilor care anterior au fost stimulate cu Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander (ThermoFisher, nr. Cat. 111.31D), a celulele NK-92 și a celulele T.

PBMC-urile au fost izolate de la donatori sănătoși și stimulate în celulele efectoare cu IL-2, IL-15 și IL-21 (stimulare cu citokine) cu sau fără biluțe de activare a celulelor T CD3/CD28 (ThermoFisher, cat.no. 11456D). După activare, celulele au fost transduse prin spinoculare cu 24 de ore ulterioare de incubarea cu virusul. Particulele LV au fost utilizate pentru generarea de celule efectoare CAR anti-EGFR. După 72 - 96 ore de monitorizare, intensitatea expresiei GFP a fost evaluată prin citometrie de flux.

#### III.1. ANALIZA EFICIENȚEI TRANSDUCȚIEI

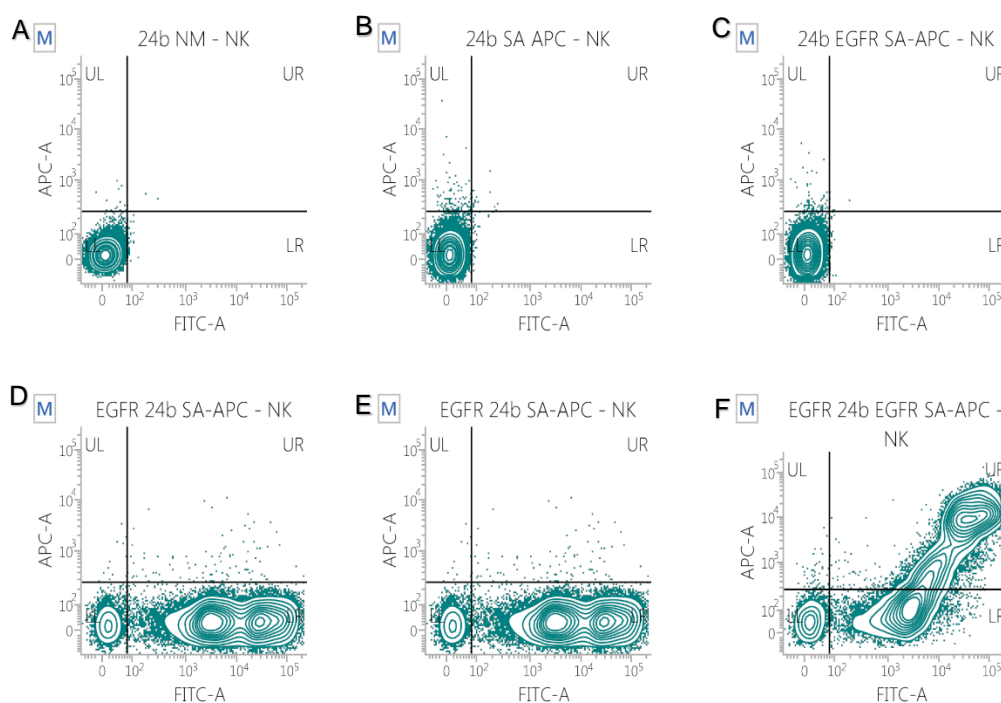
Expresia GFP a celulelor efectoare transduse anti-EGFR CAR, a fost evaluată și analizată folosind citometrul cu flux FACSverse (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, SUA).

Expresia GFP a celulelor transduse rămâne stabilă pe o perioadă lungă, adică zile analizate, aceasta poate fi considerată o transducție de succes a CAR anti-EGFR. Procentul de celule pozitive GFP este > 80% în celulele efectoare TiNK transduse anti-EGFR CAR și >95% în PBMC-urile anti-EGFR CAR transduse care reprezentate de celule T. Celulele TiNK prezintă o rată de transducție mai mică, probabil datorită rezistenței NK specifice liniei la infecția virală, chiar dacă celulele TiNK nu sunt celule NK, ele se comportă ca celulele NK.

Celulele efectoare TiNK prezintă un procent general ridicat de pozitivitate GFP care indică o transducție de succes.

### III.2. ANALIZA EXPRESIEI CAR

După observarea și analiza celulelor efectoare GFP+ și confirmarea cu succes a transducției. Analiza CAR anti-EGFR sau analiza expresiei CAR a fost evaluată cu proteina EGFRvIII biotinitată umană, Avitag™, proteina L biotinitată recombinantă de la ACROBiosystems (Newark, Delaware, SUA). Expresia proteinei L recombinantă biotinitată a fost evaluată prin citometrie de flux utilizând FACSverse (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, SUA).



**Fig. 2. Analiza citometriei de flux a EGFR+ SA-APC biotinitat.** A, B și C. Ploturi de contur de A. celule efectoare NK transduse și neschimbate, B. Celule efectoare NK netransduse marcate cu Streptavidin-APC. C. EGFR Streptavidin-APC, celule efectoare NK transductate marcate. D, E și F. schemă de contur ale D. Celule efectoare NK anti-EGFR CAR transduse și marcate. E. celule efectoare NK transduse anti-EGFR CAR marcate

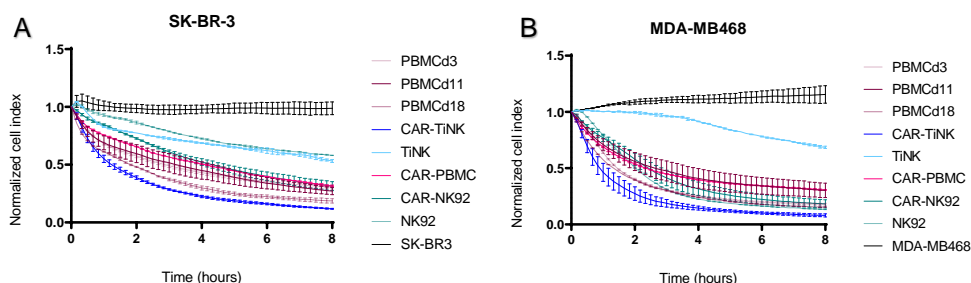


numai cu anticorp secundar, streptavidină-APC. F. celule efectoare NK transduse anti-EGFR CAR marcate complet, cu streptavidină-APC EGFR, prezentând în UR - dreapta sus celule efectoare NK CAR+.

Expresia de suprafață a CAR anti-EGFR specifică pe celulelor efectoare transduse a variat de la 55-75% din toate celulele pozitive GFP analizate (transduse).

#### IV. Testarea funcțională a capacității antitumorale a celulelor efectoare transduse, adică testarea funcțională a citotoxicității celulelor efectoare transduse anti-EGFR CAR împotriva liniilor celulare de cancer EGFR+, respectiv MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™), HT-29 (ATCC® HTB-38™).

Pe baza rezultatelor RTCA utilizând celule NK-92 transduse CAR anti-EGFR și celule NK-92 netransduse, au fost selectate diferite celule efectoare pentru analiza de citoliză RTCA a liniilor celulare tumorale aderente. După izolarea și cultura PBMC și izolarea ulterioară a celulelor T prin metode imunomagnetice, PBMC au fost stimulate cu IL-2, IL-15 și IL-21. După 10 zile de cultură in vitro, rezultatele au evidențiat un fenotip mixt de celule CD3<sup>+</sup> și CD56<sup>+</sup> NKT > 70%, celule CD3<sup>-</sup> și CD56<sup>+</sup> NK. Celulele T izolate imunomagnetice au fost îmbogățite folosind trusa de îmbogățire (STEMCELL Technologies Canada Inc.) descrisă în secțiunea Materiale și metode a tezei. Utilizarea CD3/CD28 Dynabeads (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 pentru expandarea și activarea celulelor T) pentru a induce activarea și expandarea celulelor T, rata de proliferare a celulelor activate a fost crescută de ~10 ori. Mai mult, rata de transducție a fost aproape triplă de la 30% la 90%.



**Fig. 3. Parametri NCI normalizați pentru două experimente RTCA cu NCI pentru un interval de timp de 8 ore după adăugarea de celule efectoare.** A. Parametri NCI normalizați pentru două experimente RTCA care implică SKBR3 ca celule țintă și anti-EGFR CAR transduse celule NK-92, celule PBMC și celule TiNK și celule NK-92 netransduse, celule TiNK, PBMC în ziua 3 a culturii celulare, PBMC în ziua 11 a culturii celulare, și PBMC la ziua 18 a culturii celulare ca celule efectoare. B. Parametrii NCI normalizați pentru două experimente RTCA care implică MDA-MB-468 ca celule țintă și aceleași celule efectoare utilizate pentru testul SKBR3 RTCA. A. și B. Cel mai eficiente celule efectoare citotoxice sunt celulele TiNK transduse anti-EGFR CAR, capacitatea lor de a ucide celulele țintă provine din legarea lor multispecifică de celule țintă, adică receptorii TCR, NKp46, NKp30 și NKp44, NKG2D și cei induși artificial -anti-EGFR CAR (pentru specificitate).

Analiza citometriei în flux a expresiei MICA/B a liniilor de celule tumorale aderente, adică SKBR3, HT-29 și MDA-MB-468, a arătat un nivel de expresie similar în celulele țintă aderente SKBR3 și HT-29, cu cel mai înalt profil de expresie al MICA/B, regăsit în celulele țintă aderente MDA-MB-468. În afară de linia celulară tumorală HT-29, SKBR3 și MDA-MB-468 sunt linii celulare tumorale derivate din situsuri metastatice, adică efuzii pleurale [129, 130], linia celulară HT-29 este derivată dintr-o tumoră primară.

Expresia EGFR pe liniile de celule tumorale aderente a fost cea mai mare în celulele MDA-MB-468, cu profil de expresie ridicat în celulele HT-29 și un profil de expresie moderat în celulele SKBR3. EGFR este o glicoproteină transmembranară care este un membru al superfamiliei protein kinazei și este intens exprimată pe celulele liniei epiteliale [152].

Având în vedere locul de proveniență a celulelor țintă aderente utilizate, expresiile EGFR ridicate ar trebui identificate în linia de celule derivate din tumori primare, iar profiluri de expresie scăzute regăsite în liniile celulare tumorale derivate din situri metastatice, concluzia conceptuală bazată pe dovezi rezultă din tranziția epitelial-mezenchimală (EMT) și tranziția mezenchimal-epitelială (MET) și pierderea sau internalizarea markerilor epiteliali specifici liniei, cum ar fi EGFR [18].

Interesant, cea mai înaltă expresie a EGFR s-a regăsit în celulele MDA-MB-468, o linie de celule tumorale derivate din sit metastatic, deși carcinoamele mamare triplu-negative au niveluri ridicate de expresie EGFR [153].

Pe scurt, liza specifică evaluată prin citometrie în flux a fost cea mai ridicată în celulele efectoare TiNK transduse anti-EGFR CAR, confirmând observațiile experimentale făcute cu testul RTCA, analiza comparativă a celulelor efectoare NK-92 transduse anti-EGFR CAR și celule efectoare TiNK transduse anti-EGFR CAR arată o activitate citolitică îmbunătățită a celulelor țintă indusă de celulele TiNK transduse CAR față de celulele NK-92 transduse CAR.

În cele din urmă, multispecificitatea receptorilor de tip efector și adăugarea unui receptor CAR anti-EGFR fac ca celulele efectoare TiNK să fie un instrument fezabil în imunoterapia cancerului

Analiza comparativă pentru liza spontană și specifică evaluată prin citometrie de flux, arată o activitate citolitică îmbunătățită a celulelor țintă de către celulele efectoare TiNK transduse anti-EGFR CAR. Această activitate efectivă îmbunătățită este în mod constant mai mare și semnificativă statistic decât liza spontană observată în liniile de celule tumorale cu valoarea p a testului lui Welch de  $p = 0,020$ .

## V. TEST FUNCȚIONAL PE BIOSTAȚIE - TEST DE CITOTOXICITATE

Morfologia interacțiunilor microscopice ale celulelor efectoare transduse anti-EGFR CAR adică PBMcs + perle + CK (chemokine - adică IL-2, IL-12, IL-15) reprezentând celule TiNK și PBMcs + CK reprezentând celule T și celulele țintă aderente, (adică MDA-MB-468 și liniile de celule tumorale SKBR3), a fost evaluată folosind testul funcțional BioStation înregistrat analizând activitatea celulară în timp real.

Evaluarea citolizei a fost făcută prin contactul dintre celulele efectoare și celulele țintă și formarea unor structuri mari definite drept grupuri, între mai multe celule efectoare și celulele țintă aderente care sunt moarte sau care mor (cu detașare de fundul puțurilor).

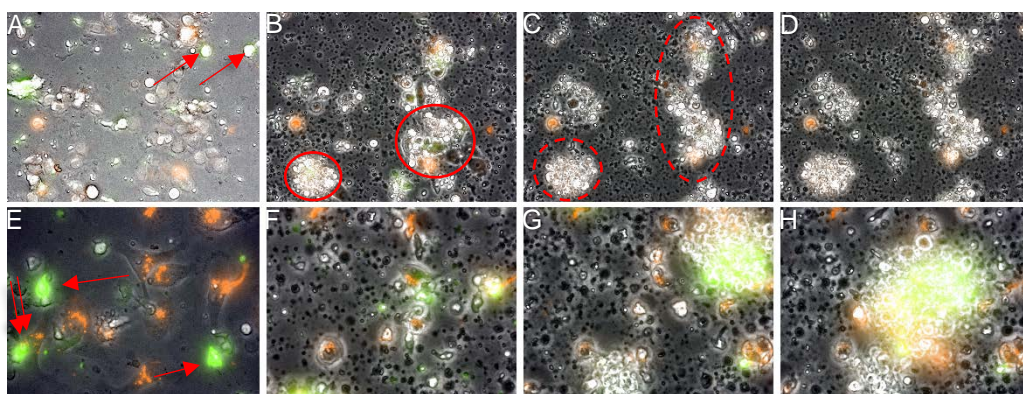


Fig. 4. Colaj de capturi din testul de citotoxicitate BioStation al celulelor țintă MDA-MB-468 și celulelor TiNK transduse anti-EGFR CAR. A, B, C și D. Mărire de x100 a punctelor de timp zero, 3,3 ore, 10 ore și ultimul punct din testare reprezentând 24 de ore. Celulele portocalii reprezintă celulele țintă marcate cu colorant

de urmărire lipofil spDII Filtrul de lungime de undă FITC care prezintă celule efectoare TiNK transduse GFP+ (**săgeți roșii**). Potența citotoxice este observată mai devreme în intervalul de timp al monitorizării testului (**ovale roșii**) și se observă și formarea unor structuri mari de tip clump (**oval roșu întrerupt**). **E, F, G și H**. Reprezintă mărirea de x200 a acelorași puncte de timp ca în **A, B, C și D**. Formarea sinapsei imune se observă cu ușurință la această mărirea (**săgeți roșii duble**). Așa cum a fost cazul celulelor țintă aderente SKBR3, celulele țintă aderente MDA-MB-468 sunt celule sensibile la celule efectoare TiNK transduse anti-EGFR CAR și sunt ucise rapid de celulele efectoare TiNK.

## VI. CONCLUZII

- Utilizarea CD3/CD28 Dynabeads (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 pentru expandarea și activarea celulelor T) pentru a induce activarea și expandarea celulelor T, rata de proliferare a celulelor activate a fost crescută de 10 ori. Mai mult, rata de transducție a fost aproape triplă de la 30% la 90%.
- Analiza comparativă pentru liza spontană și specifică evaluată prin citometrie de flux a arătat o activitate citotoxică îmbunătățită a celulelor țintă de către celulele efectoare TiNK transduse cu CAR anti-EGFR. Această activitate efectivă îmbunătățită este constant mai mare și semnificativă statistic decât liza spontană observată în liniile de celule tumorale - testul lui Welch  $p = 0.020$ .
- Celulele efectoare citotoxice cele mai eficiente sunt celulele TiNK transduse anti-EGFR CAR, capacitatea lor de ucidere a celulelor țintă provine din legarea lor multispecifică de celule țintă, adică receptorii TCR, NKp46, NKp30 și NKp44, NKG2D și CAR-ul anti-EGFR indus artificial (pentru specificitate).
- Celulele țintă utilizate în experimentele tezei au fost linii de celule tumorale aderente MDA-MB-468, SKBR3 și HT-29, acestea au fost analizate pentru expresia EGFR și expresia ligandului NKG2D MICA/B prin citometrie de flux. Comprimarea rezultatelor experimentelor, celulele efectoare transduse anti-EGFR CAR și celulele efectoare TiNK transduse prezintă în mod specific citotoxicitate împotriva tumorilor solide EGFR+.

## **VII. CONTRIBUȚII PERSONALE**

- Dezvoltarea și generarea unui sistem lentiviral funcțional de a doua generație pentru expresia CAR EGFR ScFv.
- Implementarea de succes ale culturilor de celule 293T pentru producția de lentivirus.
- Stabilirea celulelor efectoare TiNK. Populație de celule efector înalt citolitice generată din PBMC izolate de la donatori sănătoși prin stimularea combinată cu IL-2, IL-15 și IL-21 (citokine), și cu biluțe de activare a celulelor T CD3/CD28.
- Dezvoltarea celulelor efectoare TiNK transduse anti-EGFR CAR pentru țintirea specifică a tumorilor solide EGFR+.
- Dezvoltarea fundamentală a CAR-urilor pentru o eventuală translaționare clinică în imunoterapia oncologică.
- Elaborarea unei ipoteze privind calea metastatică bazată pe observația experimentală documentată în timpul cercetării acestei teze. Ipoteza a fost publicată (a se vedea lista lucrărilor publicate) și a fost citată ulterior într-un jurnal științific de mare impact.

## **VIII. DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE**

- Implementarea unui instrument de editare genică precum nucleazele programabile, adică nucleazele asociate ZFN, TALEN și CRISPR /Cas9 pentru editarea precisă a TCR din celulele T, eliminând astfel posibilitatea unei reacții alogene.
- Îmbunătățirea vitezei de transducție pentru celulele efectoare TiNK.
- Implementarea ZFN, TALEN sau CRISPR pentru editare precisă a diferitor receptori de celule T și/sau receptori NK pentru analiza funcțională a rolului lor în citotoxicitate și reglarea răspunsului imun anti-tumoral.

- Dezvoltarea unei CAR multispecific care să fie anti-EGFR și anti-PD-L1 pentru a ținti cu succes și specificitate tumori solide EGFR+ și PD-L1+.

## LISTA LUCRĂRI PROPRII ELABORATE

1. **Olteanu G-E**, Mihai I-M, Bojin F, Gavriluc O, Paunescu V. The natural adaptive evolution of cancer: The metastatic ability of cancer cells. Bosn J of Basic Med Sci [Internet]. 2020Feb.3 [cited 2020Feb.8];. Available from: <https://bjbms.org/ojs/index.php/bjbms/article/view/4565>  
<https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4565>. **Journal Impact Factor®: 2.05**
2. Jurescu A, Văduva A, Tăban S, Gheju A, **Olteanu G**, Mihai I et al. Poorly differentiated clusters: prognostic significance in colorectal carcinomas. Polish Journal of Pathology. 2019;70(4):235-245. doi:10.5114/pjp.2019.93125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32146792/>  
**Journal Impact Factor®: 0.903**
3. Mihai I, Taban S, Cumpanas A, **Olteanu G-E**, Iacob M, Dema A. Clear cell urothelial carcinoma of the urinary bladder-a rare pathological entity. A case report and a systematic review of the literature. Bosnian journal of basic medical sciences. 2019 Nov;19(4):400.  
<https://doi.org/10.17305%2Fbjbms.2019.4182>. **Journal Impact Factor®: 2.05**
4. **Olteanu G-E**, O. Gavriluc, F. Bojin, V. Paunescu. Tumour-associated fibroblasts as generic target of cancer immunotherapy. Oral Free Paper Sessions. Virchows Arch 469, 1–346 (2016).  
<https://doi.org/10.1007/s00428-016-1997-7>  
**Journal Impact Factor®: 2.906**
5. Cioca A, **Olteanu G-E**, Gisca MD, Morosanu CO, Marin I, Florian IS. Expression of EGFR in paired new and recurrent glioblastomas. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2016 Sep 1;17(9):4205-8.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27797218>.  
**Journal Impact Factor®: 1.23**