

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY  
“VICTOR BABEȘ” IN TIMISOARA  
FACULTY OF MEDICINE  
Department III – FUNCTIONAL SCIENCES**

**TÎRZIU ALEXANDRU**



# **PhD THESIS**

**Investigation of anti-tumor cytotoxic mechanisms  
mediated by exosomes derived from T lymphocytes and  
NK cells with chimeric antigen receptors (IntErLiNK)**

## **A B S T R A C T**

**Scientific Coordinator:**

**PROF. DR. VIRGIL PĂUNESCU**

**Timișoara**

**2026**

## 1. Introduction

Cancer immunotherapy has undergone an unprecedented revolution with the development of therapies based on chimeric antigen receptors (CARs), marking a new era in the treatment of malignant diseases. CAR-T cells have demonstrated remarkable results in the treatment of hematologic malignancies, leading to the approval of several therapeutic products by the FDA and significantly altering the prognosis of patients with refractory B-cell leukemias and lymphomas. However, the widespread clinical application of these therapies is limited by major challenges: severe toxicities (cytokine release syndrome—CRS, neurotoxicity—ICANS), reduced efficacy in solid tumors due to barriers posed by the immunosuppressive tumor microenvironment (TME), prohibitive production costs, and the complexity of the manufacturing process.

The physical barriers of the tumor stroma, immunosuppression mediated by MDSCs and CAFs, as well as the functional exhaustion of effector cells in the hypoxic and acidic microenvironment significantly contribute to therapeutic failure in solid tumors. The time required for CAR-T cell production and expansion represents a major logistical limitation, delaying treatment for patients with aggressive forms of cancer. Lymphopenia or lymphocyte dysfunction compromises lentiviral transduction, and the high costs of cell isolation, selection, activation, and expansion limit scalability and global accessibility. These limitations justify exploring the cytotoxic effects of lentiviral-transduced peripheral blood mononuclear cells (CAR-PBMCs)—a heterogeneous cell population including CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B, NK, NKT T cells, and monocytes. The CAR-PBMC strategy involves the direct transduction of this population without prior purification or selection steps.

The simultaneous presence of multiple cell subtypes offers a number of advantages: CD4<sup>+</sup> CAR-T cells secrete proliferative cytokines (IL-2, IL-7, IL-15) and support CD8<sup>+</sup> persistence; CD8<sup>+</sup> CAR-T cells provide cytotoxicity via perforin/granzyme and IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  production; CAR-NK cells offer HLA class I-independent cytotoxicity; and CAR-NKT cells recognize antigens via CD1d, activate dendritic cells, and exhibit reduced risk for graft-versus-host disease (GvHD).

Combining CAR and HLA-mediated mechanisms within a modified PBMC product expands antigenic coverage, enables tumor elimination through complementary pathways, and improves overall therapeutic efficacy.

In parallel, natural killer (NK) cells have attracted increased interest as an alternative platform for CAR therapies, offering significant advantages: MHC-independent cytotoxic capacity, reduced risk of graft-versus-host disease (GvHD), the possibility of allogeneic use, and an improved safety profile. Generating CAR-NK cells from established cell lines (NK-92) or from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) represents promising strategies for developing accessible and scalable off-the-shelf therapies.

The efficacy of CAR cell therapies is limited by the immunosuppressive tumor microenvironment, antigenic heterogeneity, and physical barriers. In this context, exploring the cytotoxic potential of CAR-derived exosomes represents an innovative research direction. CAR exosomes can transport effector molecules such as FasL, granzyme B, perforin, and functional chimeric antigen receptors, and their nanoscale dimensions allow for efficient penetration into the tumor microenvironment and improved systemic distribution. However, the precise mechanisms by which CAR-T

and CAR-NK exosomes exert cytotoxic effects on tumor cells remain incompletely characterized.

Exosomes, nanoscale extracellular vesicles (30–150 nm) secreted by all cell types, have emerged as essential mediators of intercellular communication, transporting bioactive proteins, nucleic acids, and lipids. Recently, exosomes derived from CAR-T and CAR-NK cells (CAR-Exo) have attracted increased scientific interest due to their potential to replicate the cytotoxic effects of their parent cells, while offering significant advantages: an improved safety profile, increased penetrability into the tumor microenvironment, the possibility of off-the-shelf production, and reduced production cost. The use of CAR-T/CAR-NK exosomes could represent an effective therapeutic approach that overcomes the limitations of classical cell therapies.

The tumor-killing effect is mediated by the transfer of the contents to target cells, either through ligand-receptor interactions, fusion of target cell membranes with exosomal membranes, or through endocytosis. Exo-CAR-T encapsulates cytotoxic agents such as perforin, FasL, Apo2L, granzyme A, and granzyme B, conferring direct cytotoxic functions against neoplastic cells.

CAR exosomes exhibit many of the properties of CAR-T/NK cells, the most notable one being their cytotoxic capacity. Evidence suggests that CAR protein levels are comparable between Exo-CAR-T and the parent cells. In addition to increased expression of cytotoxic molecules, the exosomes are simultaneously PD-1-negative. The absence of PD-1 allows them to resist the immunosuppressive influences of the tumor microenvironment better than their cellular counterparts.

Because exosomes are acellular entities, there is no potential for leukemic transformation, and the risk of CRS is lower, as demonstrated in mouse models. The antitumor activity of CAR exosomes is antigen-specific and CAR-mediated, as anti-EGFR and anti-Her2 CAR exosomes effectively eliminate EGFR<sup>+</sup> and Her2<sup>+</sup> tumor cells, and anti-mesothelin (MSLN) CAR-T exosomes suppressed tumor growth in vivo through direct destruction (perforin and granzyme B) of triple-negative, MSLN-positive breast cancer cells without significant side effects.

The IntErLiNK doctoral study (Investigation of Anti-Tumor Cytotoxic Mechanisms Mediated by Exosomes Derived from T Lymphocytes and NK Cells with Chimeric Antigen Receptors) proposes a systematic investigation of the cytotoxic mechanisms of exosomes derived from CAR-PBMC and CAR-NK92 cells, with a focus on antigenic specificity toward EGFR and Her2 receptors, which are frequently overexpressed in breast cancer.

## **2. Objectives of the thesis**

Taking into account the aspects mentioned above, this doctoral study aims to identify new antitumor immunotherapies with high safety profiles, lower production costs, and “off-the-shelf” applicability. Thus, the objectives of this thesis are:

1. To investigate a method for obtaining a heterogeneous CAR-positive population starting from peripheral blood mononuclear cells
2. To evaluate the cytotoxic capacity of CAR-PBMCs in vitro;

3. Isolating exosomes released by CAR-PBMCs and investigating their cytotoxic potential;
4. Investigating non-viral transfection methods for NK cells to obtain a CAR-NK cell population;
5. In vitro evaluation of CAR-mediated cytotoxicity of the CAR-NK transduced cell population;
6. Isolation and proteomic characterization of exosomes released by CAR-NK cells;
7. Comparative analysis of CAR-NK vs. wild-type NK exosomes in terms of exosomal cargo, binding affinity to target antigens, and antitumor cytotoxic capacity.

### **3. Current state of knowledge**

Chimeric antigen receptors (CARs) are synthetic receptors obtained through genetic engineering techniques that recognize and bind specific antigens, activating immune cells independently of the regulatory mechanisms involved in the formation of classical immune synapses. A functional CAR molecule contains: (1) an extracellular antigen-binding domain (typically a single-chain variable fragment—scFv); (2) a transmembrane domain; (3) an intracellular signaling domain (derived from CD3 $\zeta$ ). Generations 2–5 of CARs incorporate co-stimulatory domains (4-1BB, CD28, ICOS, OX40) and cytokine synthesis elements (TRUCK, NFAT-IL12), enhancing cellular persistence and functionality.

CAR signaling involves phosphorylation of ITAM domains by Lck and Fyn kinases, activation of ZAP70, the LAT/SLP-76/PLC $\gamma$ 1 pathway, calcium release, activation of NFAT, NF- $\kappa$ B, and the Ras/MEK/ERK pathway, culminating in the production of cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) and the exocytosis of cytotoxic granules (perforins, granzymes).

CAR-T therapy has received FDA approval due to remarkable results in hematologic malignancies (B-cell acute lymphoblastic leukemia, diffuse large B-cell lymphoma, multiple myeloma), with complete remission rates of 60–90% in selected cohorts. However, severe toxicities (grade 3–4 CRS, ICANS), limited efficacy in solid tumors (tumor microenvironment barriers, cellular exhaustion, antigen loss), prohibitive costs, and the increased complexity associated with cellular transduction and expansion constitute major obstacles. Lymphopenia associated with chemoradiotherapy significantly reduces the number of lymphocytes available for CAR transduction. The widespread applicability of CAR therapy requires “off-the-shelf” production techniques, such as TCR gene knockdown (to obtain universal CAR-T cells), the use of other types of mononuclear cells, or exosomes released by CAR-positive cells.

NK cells offer distinct advantages over T cells: HLA-independent cytotoxicity, reduced risk of graft-versus-host disease, the potential for off-the-shelf allogeneic use, and a superior safety profile. Phase 1/2 clinical trials with anti-CD19 CAR-NK cells derived from umbilical cord blood reported overall response rates of 62.5% and complete remission rates of 50%, with no severe CRS or neurotoxicity. The NK92 cell line, derived from large NK-cell lymphomas, represents an accessible model for generating CAR-NK cells, although it requires irradiation prior to clinical use to reduce the risk of malignant transformation. This process limits the expansion of the effector cell

population and requires repeated administrations to achieve an optimal number of effector cells.

The use of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as starting material for CAR cell generation allows for the simultaneous production of CAR-T, CAR-NK, and CAR-NKT cells from a single apheresis product, simplifying the manufacturing process and leveraging the complementary cytotoxic mechanisms of the three cell subtypes.

EGFR (epidermal growth factor receptor) is overexpressed in 15–30% of breast cancers, particularly in the triple-negative (TNBC) subtype, and represents a validated target for CAR immunotherapy. Her2 (ERBB2) is amplified/overexpressed in 15–20% of breast cancers and is the target of the clinically approved monoclonal antibody trastuzumab. EGFR and Her2 overexpression is associated with aggressive biological behavior, poor prognosis, and resistance to conventional chemotherapy.

Exosomes are extracellular vesicles (30–150 nm) that utilize a unique biogenetic pathway involving two sequential events of plasma membrane invagination. Exosomal biogenesis and cargo sorting involve ESCRT-dependent pathways (TSG101, Alix, CHMP4B proteins) and ESCRT-independent pathways (ceramide, syndecan-syntanin-Alix, CD63/CD81/CD9 tetraspanins). Exosomes transport functional proteins (surface receptors, enzymes, transcription factors), mRNA, miRNA, and bioactive lipids that mediate intercellular communication under physiological and pathological conditions, providing a range of molecules that serve as biomarkers. It has recently been identified that the molecules contained in exosomes can modulate signaling pathways involved in cell proliferation, phenotypic expression, etc. Thus, investigating the content of exosomes produced by CAR-bearing cells could reveal a potential cytotoxic role.

The literature describes that exosomes derived from CAR-T cells (CAR-Exo) express CAR molecules on their surface, conferring antigenic specificity, and exhibit pro-apoptotic effects on tumor cells via perforin/granzyme- and FasL-mediated mechanisms. CAR-T exosomes do not express the PD-L1 molecule, a protein with a detrimental effect on CAR-T cells. Furthermore, due to their nanoscale dimensions, exosomes exhibit superior penetrability into the tumor microenvironment compared to their parent cells. The non-replicative nature of these extracellular vesicles addresses the limitation regarding the risk of systemic toxicity associated with CAR therapy, but requires therapeutic regimens involving repeated administration. To further reduce the risk of graft-versus-host disease, TCR-negative CAR-NK exosomes could produce a cytotoxic effect similar to that of Exo-CAR-T. Only one study has evaluated the cytotoxic effect of CAR-NK exosomes; however, this study used exosomes further modified by fusion with liposomes containing molecules that generate reactive oxygen species. Thus, current studies do not provide precise information on exosomal content or on the cytotoxic potential of CAR-NK exosomes.

## **4. Materials and Methods**

### **4.1. Cell Sources and Cultures**

PBMCs isolated from the peripheral blood of 5 healthy volunteers by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque) were cultured in XVIVO10 medium supplemented with human plasma. Mononuclear cells were subjected to two stimulation regimens: (1) anti-CD3/CD28 magnetic microspheres (Dynabeads™) — producing a TNK-polarized

population (predominantly T and NKT cells) , and (2) a cytokine cocktail (IL-2, IL-15, IL-21) — producing an NK-polarized population (predominantly NK and NKT cells).

The tumor cell lines MDA-MB468 (EGFR-positive, triple-negative breast cancer), SK-BR3 (Her2-positive breast cancer), MCF-7 (Her2-negative, ER-positive breast cancer), and K562 (chronic myeloid leukemia — NK control) were cultured in specific culture media.

The NK92 cell line was cultured in RPMI 1640 medium supplemented with IL-2 (500 IU/mL) and human plasma (5%).

#### **4.2. Plasmid Design, Transduction, and Evaluation of Transduction Efficiency**

In this doctoral study, two CAR constructs were synthesized. The two CARs were transfected into effector cells using two different methods and target two antigens frequently used in antitumor immunotherapy (EGFR, Her2).

The LentiOne™ lentiviral vector with a PGK promoter encodes a second-generation CAR with anti-EGFR scFv, a CD28 transmembrane domain, CD28/4-1BB co-stimulatory domains, and a CD3ζ domain, fused to eGFP via a T2A peptide. Transduction was performed on day 7 of culture at an MOI of 50.

The plasmid encoding a third-generation CAR with anti-Her2 scFv (derived from trastuzumab) contains the 4-1BB and CD28 co-stimulatory domains, the eGFP reporter protein, and the puromycin resistance gene (pac), in the hyperactivated piggyBac transposon system (hyPBBase). Genetic transfer was performed by electroporation (nucleofection, Amaxa Nucleofector™ II).

Transduction efficiency was assessed by flow cytometry (expression of eGFP and the CAR molecule—biotinylated-streptavidin-APC EGFR or anti-G4S linker antibodies, and anti-kappa light chain antibodies, respectively) and fluorescence microscopy.

#### **4.3. Selection of CAR-NK92 cells**

CAR-NK92 cells were selected by treatment with puromycin (4 µg/mL, 7 days), exploiting the expression of the pac gene (puromycin-N-acetyltransferase) encoded by the plasmid based on the puromycin toxicity curve. This curve was determined by titration in the range of 0–10 µg/mL over 7 days.

#### **4.4. Evaluation of CAR Cell Cytotoxicity**

The CAR-mediated cytotoxic effect was evaluated by flow cytometry (staining with calcein violet and propidium iodide, at effector:target [E:T] ratios of 1:1, 5:1, 10:1), RTCA assays, and fluorescence microscopy (visualization of CAR-PBMC interactions with tumor cells).

#### **4.5. Isolation and characterization of exosomes**

Cells ( $4 \times 10^6$ ) were incubated in serum-free medium for 72 hours. The supernatant was processed by serial centrifugation (300×g, 2000×g, 10,000×g) to remove cellular debris, followed by precipitation with polyethylene glycol (PEG) and resuspension in 1X PBS.

Exosomes were quantified by measuring protein concentration (Qubit fluorometry, NanoDrop spectrophotometry) and via fluorometry (standard curve using reference beads). The exosomal protein cargo was characterized by Western blot using

exosomal markers ( , Alix), cytotoxic proteins (CD3 $\zeta$ , granzyme B), CAR marker (G4S linker), and loading control ( $\beta$ -actin for cell lysates and CD63 for exosomal lysates). Analysis of chemiluminescent signal intensity enabled a comparative analysis of cells, specifically wild-type vs. CAR-positive exosomes. In addition, the use of the MACSPlex EV flow cytometry system enabled analysis of the exosomal surface proteome via 37 capture beads (antigens: CD63, CD81, CD9, CD56, CD45, CD2, CD29, CD44, CD25, HLA-A/B/C, etc.).

The assessment of exosome binding capacity to tumor cells was performed using a modified InCellELISA-type experiment, where CAR exosomes targeted tumor antigens on fixed and permeabilized cultured cells (SK-BR3 and MCF-7).

The interaction of exosomes with tumor cells was performed by labeling both tumor cells and exosomes with lipophilic dyes, followed by visualization under a fluorescence microscope.

The cytotoxic potential of the exosomes was investigated using the resazurin reduction assay (AlamarBlue™) by assessing cell viability after 24 hours of incubation with exosomes at different concentrations (1, 5, 10  $\mu$ g exosomal protein), with calculation of the IC<sub>50</sub>. Flow cytometry and staining with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) were used to quantify apoptotic/necrotic cells. Continuous monitoring of the cell index after the addition of the exosomal suspension was performed using RTCA assays.

## **5. Results**

### **5.1. Stimulation with Dynabeads™ produces superior proliferation and alters PBMC composition**

Flow cytometric analysis revealed that stimulation with anti-CD3/CD28 microspheres (Dynabeads™) produced an 8.67-fold increase in cell expansion compared to cytokine stimulation. The resulting populations exhibited distinct cellular compositions: stimulation with Dynabeads favored the proliferation of T and NKT cells (TNK-polarized population), while cytokine stimulation favored the proliferation of NK cells (NK-polarized population). In both populations, a notable increase in NKT cells was observed (TNK: 19 $\pm$ 5% on day 0  $\rightarrow$  46 $\pm$ 7% on day 28,  $p=0.05$ ; NK: 5 $\pm$ 1%  $\rightarrow$  60 $\pm$ 8%,  $p<0.001$ ). Lentiviral transduction did not significantly influence the distribution of cell populations at 72 hours.

### **5.2. Lentiviral transduction efficiency is higher in the TNK-polarized population**

eGFP expression was significantly higher in TNK-polarized cells compared to NK-polarized cells (83 $\pm$ 8% vs. 26 $\pm$ 9%,  $p=0.001$ ). Analysis of CAR expression (biotinylated EGFR-streptavidin-APC) confirmed that 55.78% of TNK-polarized cells were CAR-positive, compared to 13.91% in the NK-polarized population. At 21 days post-transduction, persistent CAR expression was observed in the TNK-polarized population, while the CAR-expressing NK cell population within the NK-polarized cells was significantly reduced. The low CAR expression in NK cells is attributed to intrinsic antiviral mechanisms. Based on these results, the TNK-polarized culture was subsequently used for cytotoxicity experiments.

### **5.3. Immunophenotyping of tumor cell lines**

Flow cytometric analysis of the MDA-MB468 and SK-BR3 cell lines revealed: high EGFR expression in MDA-MB468 and moderate expression in SK-BR3 (86.05% vs.

34.58%,  $p < 0.001$ ); high Fas expression in both lines (63.81% vs. 96.18%); increased MICA/B expression in both lines (89.92% vs. 70.34%) and low CD1d expression in both lines ( $< 0.1\%$ ).

#### **5.4. CAR-PBMCs exhibit EGFR-dependent specific cytotoxicity**

CAR-PBMCs exhibited significantly increased cytotoxic activity against EGFR-positive MDA-MB468 cells at all tested E:T ratios:

- E:T = 10:1:  $34 \pm 4\%$  vs.  $5 \pm 1\%$  ( $p < 0.01$ )
- E:T = 5:1:  $25 \pm 2\%$  vs.  $3 \pm 1\%$  ( $p < 0.05$ )
- E:T = 1:1:  $10 \pm 0.5\%$  vs.  $1 \pm 0.5\%$  ( $p < 0.05$ )

Compared to SK-BR3 cells (moderate EGFR expression), cytotoxicity was lower but still significant at E:T = 10:1 ( $24 \pm 2\%$  vs.  $6 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ). No significant differences were observed in the lysis of K562 cells (EGFR-negative) or allogeneic PBMCs, demonstrating the platform's specificity and safety profile. Analysis of Cohen's  $d$  coefficient confirmed a significant effect against MDA-MB468 ( $d = 1.81 \pm 0.04$ ) and SK-BR3 ( $d = 1.45 \pm 0.25$ ), compared to non-significant values for K562 ( $d = -0.36 \pm 0.48$ ) and allogeneic PBMCs ( $d = -0.21 \pm 0.08$ ). The specificity index (SI) was: MDA-MB468 =  $8.87 \pm 1.21$ , SK-BR3 =  $5.67 \pm 1.42$ , K562 =  $0.95 \pm 0.05$ , allogeneic PBMC =  $0.95 \pm 0.08$ . RTCA analysis confirmed rapid cytolysis of MDA-MB468 cells, with a reduction of over 50% in the cell index within the first 2 hours after CAR-PBMC addition and complete cytolysis within 8 hours. Fluorescence microscopy visualized the aggregation of CAR-PBMCs around MDA-MB468 cells, suggestive of recognition and activation of effector cells in the presence of target tumor cells.

#### **5.5. CAR-PBMC exosomes exhibit increased cytotoxic activity compared to wild-type exosomes**

Exosomes isolated from CAR-PBMCs reduced the MDA-MB468 cell population by  $83.34 \pm 3.61\%$  after 72 hours of incubation, compared to  $56.85 \pm 4.70\%$  for wild-type exosomes and  $12.29 \pm 3.94\%$  for the negative control ( $p < 0.001$  for both comparisons). MACSplex analysis revealed increased expression of HLA class I markers, CD56, CD45, CD44, CD29, CD2, CD81, CD63, CD8, CD4, and CD3, with no significant differences between wild-type and CAR-PBMC exosomes, suggesting that CAR transduction does not influence the exosomal cargo sorting process.

#### **5.6. Electroporation with the piggyBac system generates viable CAR-positive NK92 cells**

Nucleofection of NK92 cells with plasmids encoding hyPBase + anti-Her2 CAR did not significantly affect cell viability compared to the negative control (no DNA). Transfected cells expressed eGFP and CAR molecules, confirmed by fluorescence microscopy and flow cytometry.

#### **5.7. Puromycin selection yields a >99% pure CAR-NK92 population**

The puromycin toxicity curve followed a non-linear, dose-dependent function that could be mathematically modeled. A concentration of  $4 \mu\text{g/mL}$  for 7 days was sufficient to eliminate untransfected NK92 cells and obtain a >99% CAR-positive population, with proliferation restored upon stimulation with IL-2 after selection was complete.

### **5.8. CAR-NK92 exhibits Her2-specific cytotoxicity**

RTCA analysis demonstrated that CAR-NK92 cells exerted a significantly stronger cytotoxic effect against Her2-positive SK-BR3 cells compared to wild-type NK92 cells, at all tested E:T ratios. The cytotoxic effect of CAR-NK92 against Her2-negative MCF-7 cells was present but reduced, attributed to non-specific NK activation mechanisms. Her2 blockade with trastuzumab (10  $\mu$ L/200  $\mu$ L medium) significantly reduced CAR-NK92 cytotoxicity against SK-BR3, confirming Her2-dependent specificity.

### **5.9. Characterization of CAR-NK92 exosomes**

WT NK92 and CAR-NK92 cells produced comparable amounts of exosomes ( $1.12 \times 10^7$  vs.  $1.04 \times 10^7$ ,  $p=0.502$ ) with similar protein content (13.26 vs. 12.17  $\mu$ g/ $\mu$ L,  $p=0.782$ ), demonstrating that CAR expression does not influence the rate of exosome production. Both exosomal populations express the canonical markers CD63 and Alix (demonstrating ESCRT-/Alix-dependent biogenesis). The cytotoxic proteins CD3 $\zeta$  and granzyme B (monomers and dimers) were identified in both exosomal populations. The G4S linker (CAR marker) was detected exclusively in Exo-CAR-NK92 ( $p=0.046$ ), confirming the selective incorporation of the CAR molecule into exosomes.  $\beta$ -actin was absent in the exosomal fractions, indicating minimal contamination with cellular debris. Both exosomal populations expressed high levels of CD63, CD81, CD2, CD29, CD45, and CD56 (NK marker). CAR-NK92 exosomes exhibit increased expression of CD25 (IL-2R $\alpha$ ) compared to NK92 WT, a receptor involved in the activation and proliferation of effector cells.

### **5.10. CAR-NK92 exosomes exhibit increased affinity for Her2-positive cells**

The InCellELISA technique demonstrated that CAR-NK92 exosomes preferentially bind to Her2-positive SK-BR3 cells compared to Her2-negative MCF-7 cells (absorbance  $0.39 \pm 0.02$  vs.  $0.31 \pm 0.02$  RAU,  $p=0.04$ ). Wild-type NK92 exosomes showed no significant differences in binding to the two cell lines ( $p=0.61$ ), confirming that the binding specificity is attributed to the anti-Her2 CAR molecule. Fluorescence microscopy confirmed the internalization of DiO-labeled exosomes by SK-BR3 cells at 24–72 hours of incubation.

### **5.11. CAR-NK92 exosomes exert Her2-specific cytotoxicity**

CAR-NK92 exosomes exhibited an  $IC_{50}$  of 22.361  $\mu$ g/mL against SK-BR3 cells, significantly lower than that of NK92 WT exosomes ( $IC_{50} = 49.919$   $\mu$ g/mL). In the case of Her2-negative MCF-7 cells, the  $IC_{50}$  values were comparable between the two exosomal populations (43.215 vs. 45.894  $\mu$ g/mL), confirming antigen-dependent specificity. CAR-NK92 exosomes induced a significantly higher percentage of apoptotic/necrotic cells in the SK-BR3 line compared to NK92 WT exosomes ( $34.98 \pm 3.14\%$  vs.  $21.60 \pm 2.32\%$ ), with 1.89-fold higher specificity against MCF-7. d NK92 WT exosomes also exerted cytotoxicity against both cell lines (SK-BR3:  $21.60 \pm 2.32\%$  vs. control  $8.97 \pm 2.25\%$ ,  $p=0.04$ ; MCF-7:  $23.56 \pm 4.03\%$  vs. control  $6.03 \pm 1.80\%$ ,  $p=0.03$ ), attributable to intrinsic cytotoxic proteins (granzyme B).

## **6. Discussion**

### **6.1. CAR-PBMC Platform**

The first line of investigation in this thesis demonstrated that PBMCs can serve as a starting point for generating functional CAR cells. The advantages of the CAR-PBMC

platform include: (1) simplification of the manufacturing process by eliminating the step of isolated T-cell selection and expansion; (2) simultaneous production of CAR-T, CAR-NK, and CAR-NKT cells, leveraging complementary cytotoxic mechanisms; (3) reduction of the time from harvest to infusion.

The difference in the magnitude of cytotoxicity against MDA-MB468 (8x) vs. SK-BR3 (3x) underscores the importance of antigenic density for the efficacy of CAR therapy, consistent with the literature demonstrating the need for a minimum threshold of antigenic expression for optimal cellular activation. The absence of cytotoxicity against allogeneic PBMCs suggests a promising safety profile in an allogeneic context, although in vivo validation is required.

CAR-NKT cells within the CAR-PBMC population can contribute to the remodeling of the tumor microenvironment by releasing proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), promoting M1 macrophages, and activating tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes, independent of MHC class I expression.

## **6.2. The CAR-NK92 platform and the piggyBac system**

The use of the piggyBac transposon system has resolved the major limitation of lentiviral transduction in NK cells (due to intrinsic antiviral mechanisms). Puromycin selection has proven to be a cost-effective method for obtaining highly purified (>99%) CAR-NK92 populations with a mathematically modelable pharmacological profile.

The reduction in CAR-NK92 cytotoxicity through trastuzumab administration confirms that the antitumor effect is specifically mediated by Her2 recognition by the CAR molecule.

## **6.3. CAR Exosomes as an Acellular Therapeutic Platform**

The results regarding CAR-NK92 exosomes demonstrate that the CAR molecule is selectively incorporated into exosomes derived from genetically modified NK92 cells. CAR-NK92 exosomes exhibit increased affinity for Her2-positive cells compared to Her2-negative cells and exert 2.2-fold greater anti-Her2 cytotoxicity compared to WT exosomes.

The proposed mechanism involves: specific binding of the CAR molecule to Her2 on the surface of the tumor cell, internalization of the exosomes, intracellular release of granzyme B, and activation of the caspase-dependent apoptotic cascade. Concurrently, exosomal FasL can activate the extrinsic apoptotic pathway by binding to the Fas receptor (CD95) expressed on tumor cells.

The advantages of using exosomes in immunotherapy over classical cell therapy include increased penetrability into the immunosuppressive tumor microenvironment, an improved safety- e profile (absence of the risk of CRS, GvHD), and the possibility of “off-the-shelf” use.

## **7. Conclusions**

Based on the experiments conducted in this doctoral study, the following conclusions can be drawn:

1. PBMCs can serve as a starting point for the development of CAR cells, generating a heterogeneous population of CAR-T, CAR-NK, and CAR-NKT cells with complementary antitumor cytotoxicity.

2. Stimulation with anti-CD3/CD28 microspheres (Dynabeads™) is superior to cytokine stimulation, producing an 8.67-fold greater expansion and a predominantly TNK population, with superior lentiviral transduction efficiency.
3. CAR-PBMCs exert EGFR-dependent, specific antitumor cytotoxic effects against MDA-MB468 cells (SI = 8.87; Cohen's d = 1.81) and SK-BR3 cells (SI = 5.67; Cohen's d = 1.45), without significant cytotoxicity toward allogeneic PBMCs.
4. CAR-PBMC exosomes enhance cytotoxicity against MDA-MB468 cells ( $83.34 \pm 3.61\%$  vs.  $56.85 \pm 4.70\%$  for WT exosomes,  $p < 0.001$ ), suggesting that the CAR molecule increases exosomal cytotoxic specificity and efficacy.
5. Lentiviral transduction is inefficient in NK-polarized cells, attributed to intrinsic antiviral mechanisms. To overcome this limitation, electroporation with the piggyBac system allows for efficient genetic modification of NK cells for CAR expression, without significantly affecting cell viability.
6. Selection with puromycin (4  $\mu\text{g/mL}$ , 7 days) yields a CAR-NK92 population >99% pure, following a mathematically modelable non-linear dose-dependent curve.
7. CAR-NK92 exhibits Her2-specific cytotoxicity against SK-BR3 cells, an effect abolished by Her2 blockade with trastuzumab.
8. NK92 WT and CAR-NK92 exosomes express the canonical markers CD63 and Alix (ESCRT-dependent biogenesis) and the cytotoxic proteins CD3 $\zeta$  and granzyme B.
9. The CAR molecule is selectively incorporated into CAR-NK92 exosomes, confirmed by the detection of the G4S-CAR linker exclusively in Exo-CAR-NK92.
10. CAR-NK92 exosomes exhibit increased affinity for Her2-positive SK-BR3 cells compared to Her2-negative MCF-7 cells, conferred specifically by the CAR molecule.
11. CAR-NK92 exosomes exert Her2-specific cytotoxicity with an  $\text{IC}_{50}$  of 22.361  $\mu\text{g/mL}$  against SK-BR3, which is 2.2 times lower than that of WT exosomes ( $\text{IC}_{50} = 49.919 \mu\text{g/mL}$ ).
12. CAR expression does not influence the exosome production rate ( $p = 0.502$ ) or cytotoxic protein content ( $p = 0.782$ ).

## 8. Original Contributions

This thesis makes the following original contributions to the literature:

1. In vitro demonstration of the efficacy of the CAR-PBMC platform as a simplified immunotherapeutic approach, with the simultaneous production of CAR-T, CAR-NK, and CAR-NKT cells from a single apheresis product.
2. Mathematical modeling of the puromycin toxicity curve for the selection of transfected NK92 cells, with identification of the optimal concentration (4  $\mu\text{g/mL}$ , 7 days) for obtaining cultures >99% pure.
3. Systematic comparison of two genetic modification platforms (lentiviral transduction vs. electroporation with piggyBac transposons) for generating CAR-positive NK cells, demonstrating the superiority of the piggyBac system.
4. Demonstration of the cytotoxic effect of CAR-PBMC and CAR-NK exosomes.

5. Demonstration of the selective incorporation of the anti-Her2 CAR molecule into exosomes derived from NK92 cells, with confirmation of CAR linker expression exclusively in the CAR-NK92 exosomal fraction.
6. Demonstration of the antigen-dependent specificity of CAR-NK92 exosomes toward Her2-positive cells, with a specificity profile 2.2 times higher than that of WT exosomes.
7. Characterization of the exosomal surface proteome (37 antigens via MACSPlex EV) for CAR-PBMC and CAR-NK92 populations.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE**  
**“VICTOR BABEȘ” DIN TIMISOARA**  
**FACULTATEA DE MEDICINĂ**  
**Departamentul III – ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

**TÎRZIU ALEXANDRU**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**INvestigarea mecanismelor citotoxice anti-Tumorale  
mediate de Exozomii proveniți de la Limfocite T și celule  
NK cu receptori chimerici de antigen (IntErLiNK)**

## **R E Z U M A T**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. PĂUNESCU VIRGIL**

**Timișoara**

**2026**

## 1. Introducere

Imunoterapia cancerului a cunoscut o revoluție fără precedent odată cu dezvoltarea terapiilor bazate pe receptori himerici de antigen (CAR), reprezentând o nouă eră în tratamentul afecțiunilor maligne. Celulele CAR-T au demonstrat rezultate remarcabile în tratamentul neoplaziilor hematologice, conducând la aprobarea mai multor produse terapeutice de către FDA și modificând semnificativ prognosticul pacienților cu leucemii și limfoame cu celule B refractare. Cu toate acestea, aplicabilitatea clinică extinsă a acestor terapii este limitată de provocări majore: toxicități severe (sindromul de eliberare citokinică — CRS, neurotoxicitate — ICANS), eficacitate redusă în tumorile solide datorită barierelor micromediului tumoral imunosupresiv (TME), costuri restrictive de producție și complexitatea procesului de producție.

Barierile fizice ale stromei tumorale, imunosupresia mediată de MDSCs și CAFs, precum și epuizarea funcțională a efectorilor în micromediul hipoxic și acid contribuie semnificativ la eșecul terapeutic în tumori solide. Timpul necesar producției și expansiunii celulelor CAR-T reprezintă o limitare logistică majoră, întârziind tratamentul pacienților cu forme agresive de cancer. Limfopenia sau disfuncția limfocitară compromit transducția lentivirală, iar costurile ridicate de izolare, selecție, activare și expansiune celulară limitează scalabilitatea și accesibilitatea globală. Aceste limitări justifică explorarea efectului citotoxic al celulelor mononucleare din sânge periferic transduse lentiviral (CAR-PBMC) — o populație heterogenă incluzând limfocite T CD4+, CD8+, B, NK, NKT și monocite. Strategia CAR-PBMC presupune transducția directă a acestei populații fără pași prealabili de purificare sau selecție.

Prezența simultană a multiple subtipuri celulare oferă o serie de avantaje: celulele CAR-T CD4+ secretă citokine proliferative (IL-2, IL-7, IL-15) și susțin persistența CD8+, CAR-T CD8+ asigură citotoxicitate prin perforine/granzime și producție de IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ , CAR-NK oferă citotoxicitate independentă de HLA clasa I, iar CAR-NKT recunosc antigene prin CD1d, activează celulele dendritice și prezintă potențial redus de boală grefă contra gazdă (GvHD).

Combinarea mecanismelor CAR și HLA-mediate în cadrul unui produs PBMC modificat extinde acoperirea antigenică, permite eliminarea tumorală prin căi complementare și îmbunătățește eficacitatea terapeutică globală.

În paralel, celulele natural killer (NK) au atras un interes crescut ca platformă alternativă pentru terapiile CAR, oferind avantaje semnificative: capacitate citotoxică MHC-independentă, risc redus de boală grefă-contra-gazdă (GvHD), posibilitatea utilizării alogene și profil de siguranță îmbunătățit. Generarea de celule CAR-NK din linii celulare stabilizate (NK-92) sau din celule mononucleare din sânge periferic (PBMC) reprezintă strategii promițătoare pentru dezvoltarea de terapii off-the-shelf accesibile și scalabile.

Eficacitatea terapiilor celulare CAR este limitată de micromediul tumoral imunosupresiv, heterogenitatea antigenică și barierele fizice. În acest context, explorarea potențialului citotoxic al exozomilor derivați din celule CAR reprezintă o direcție de cercetare inovatoare. Exozomii CAR pot transporta molecule efectorii precum FasL, granzime B, perforine și receptori himerici de antigen funcționali, iar dimensiunile lor nanometrice permit o penetrare eficientă în micromediul tumoral și o distribuție sistemică îmbunătățită. Cu toate acestea, mecanismele precise prin care exozomii CAR-T și CAR-NK exercită efecte citotoxice asupra celulelor tumorale rămân incomplet elucidate.

Exozomii, vezicule extracelulare nanometrice (30–150 nm) secretate de toate tipurile celulare, s-au remarcat ca mediatori esențiali ai comunicării intercelulare, transportând proteine, acizi nucleici și lipide bioactive. Recent, exozomii derivați din celulele CAR-T și CAR-NK (CAR-Exo) au atras un interes științific crescut datorită potențialului lor de a reproduce efectele citotoxice ale celulelor de origine, oferind simultan avantaje semnificative: profil de siguranță îmbunătățit, penetrabilitate crescută în micromediul tumoral, posibilitatea producției off-the-shelf și cost redus. Utilizarea exozomilor CAR-T/CAR-NK ar putea reprezenta o abordare terapeutică eficientă ce depășește limitările terapiilor celulare clasice.

Efectul de distrugere tumorală este mediat de transferul conținutului către celulele țintă, fie prin interacțiuni ligand-receptor, fuziunea membranelor celulelor țintă cu membranele exozomale, sau prin endocitoză. Exo-CAR-T încapsulează agenți citotoxici precum perforina, FasL, Apo2L, granzima A și granzima B, conferindu-le funcții citotoxice directe împotriva celulelor neoplazice.

Exozomii CAR prezintă multe dintre proprietățile celulelor CAR-T/NK, cel mai de interes fiind capacitatea citotoxică. Dovezile susțin că nivelurile de proteină CAR sunt comparabile între CAR-T Exo și celulele de origine. Pe lângă expresia crescută de molecule citotoxice, exozomii sunt în același timp negativi pentru PD-1. Absența PD-1 le permite să reziste influențelor imunosupresive ale micromediului tumoral mai bine decât omologii lor celulari.

Deoarece exozomii sunt entități acelulare, nu există potențial de transformare leucemică, iar riscul de CRS este mai mic, demonstrat în modele murine. Activitatea antitumorală a exozomilor CAR este antigen-specifică și mediată prin CAR, întrucât exozomii CAR anti-EGFR și anti-Her2 elimină eficient celulele tumorale EGFR+ și Her2+, iar exozomii CAR-T anti-mezotelină (MSLN) au suprimat creșterea tumorală in vivo prin distrugerea directă (perforină și granzimă B) a celulelor de cancer mamar triplu negativ, MSLN-pozitiv fără efecte secundare semnificative.

Studiul doctoral IntErLiNK (INvestigarea mecanismelor citotoxice anti-Tumorale mediate de Exozomii proveniți de la Limfocite T și celule NK cu receptori chimerici de antigen) propune investigarea sistematică a mecanismelor citotoxice ale exozomilor derivați din celulele CAR-PBMC și CAR-NK92, cu accent pe specificitatea antigenică față de receptorii EGFR și Her2, frecvent supraexprimați în cancerul mamar.

## **2. Obiectivele tezei**

Ținând cont de aspectele menționate anterior, acest studiu doctoral își propune identificarea de noi imunoterapii antitumorale cu profiluri de siguranță ridicate, costuri de producție mai reduse și cu aplicabilitate de tip „off-the-shelf”. Astfel, obiectivele acestei teze sunt:

1. Investigarea unei metode de obținere a unei populații heterogene CAR-pozitive pornind de la celule mononucleare periferice
2. Evaluarea in vitro a capacității citotoxice a celulelor CAR-PBMC;
3. Izolarea exozomilor eliberați de celulele CAR-PBMC și investigarea potențialului citotoxic;

4. Investigarea metodelor de transfecție non-virale a celulelor NK în vederea obținerii unei populații celulare CAR-NK;
5. Evaluarea in vitro a citotoxicității mediate de CAR a populației de celule transduse CAR-NK;
6. Izolarea și caracterizarea proteomică a exozomilor eliberați de celulele CAR-NK;
7. Analiza comparativă a exozomilor CAR-NK vs NK wild-type din punct de vedere al cargo-ului exozomal, al afinității de legare de antigene țintă precum și al capacității citotoxice antitumorale.

### **3. Stadiul actual al cunoașterii**

Receptorii himerici de antigen (CAR) sunt receptori sintetici obținuți prin tehnici de inginerie genetică, care recunosc și leagă antigene specifice, activând celulele imune independent de mecanismele de reglare implicate în formarea sinapselor imunologice clasice. O moleculă CAR funcțională conține: (1) un domeniu extracelular de legare a antigenului (de regulă un fragment variabil cu lanț unic — scFv); (2) un domeniu transmembrantar; (3) un domeniu de semnalizare intracelulară (derivat din CD3ζ). Generațiile 2–5 de CAR adaugă domenii co-stimulatoare (4-1BB, CD28, ICOS, OX40) și elemente de sinteză a citokinelor (TRUCK, NFAT-IL12), amplificând persistența și funcționalitatea celulară.

Semnalizarea CAR implică fosforilarea domeniilor ITAM de către kinazele Lck și Fyn, activarea ZAP70, a căii LAT/SLP-76/PLCγ1, eliberarea de calciu, activarea NFAT, NFκB și a căii Ras/MEK/ERK, culminând cu producția de citokine (IL-2, IFN-γ, TNF-α) și exocitoza granulelor citotoxice (perforine, granzime).

Terapia CAR-T a obținut aprobarea FDA datorită rezultatelor remarcabile în neoplaziile hematologice (leucemie acută limfoblastică cu celule B, limfom difuz cu celule B mari, mielom multiplu), cu rate de remisiune completă de 60–90% în cohorte selectate. Cu toate acestea, toxicitățile severe (CRS grad 3–4, ICANS), eficacitatea limitată în tumorile solide (barierele micromediului tumoral, epuizarea celulară, pierderea antigenică), costurile prohibitive și complexitatea crescută asociată transducției și expansiunii celulare constituie obstacole majore. Limfopenia asociată chimio-radioterapiei reduce semnificativ numărul de limfocite utilizate pentru transducția CAR. Aplicabilitatea terapiei CAR la scară largă necesită tehnici de producție „off-the-shelf”, precum knock-down-ul genei TCR (în vederea obținerii de CAR-T universale), utilizarea altor tipuri de celule mononucleare sau a exozomilor eliberați de celule CAR-pozitive.

Celulele NK prezintă avantaje distincte față de celulele T: citotoxicitate HLA-independentă, risc redus de boală grefă-contra-gazdă, posibilitate de utilizare alogenică off-the-shelf și profil de siguranță superior. Studii clinice de fază 1/2 cu celule CAR-NK anti-CD19 din sânge din cordonul ombilical au raportat rate de răspuns global de 62,5% și remisiune completă de 50%, fără CRS sever sau neurotoxicitate. Linia celulară NK92, obținută din limfoame NK cu celule mari, reprezintă un model accesibil pentru generarea de celule CAR-NK, deși necesită iradiere prealabilă utilizării clinice pentru reducerea riscului de transformare malignă. Acest procedeu limitează expansiunea populației de celule efectorii și presupune administrări repetate în vederea atingerii unui număr optim de celule efectorii.

Utilizarea celulelor mononucleare din sânge periferic (PBMC) ca material de pornire pentru generarea de celule CAR permite producerea simultană de CAR-T, CAR-NK și CAR-NKT dintr-un singur produs de afereză, simplificând procesul de fabricație și valorificând mecanismele citotoxice complementare ale celor trei subtipuri celulare.

EGFR (receptorul factorului de creștere epidermal) este supraexprimat în 15–30% din cancerele mamare, în special în subtipul triplu-negativ (TNBC), și reprezintă o țintă validată pentru imunoterapia CAR. Her2 (ERBB2) este amplificat/supraexprimat în 15–20% din cancerele mamare și constituie ținta anticorpului monoclonal aprobat clinic trastuzumab. Supraexpresia EGFR și Her2 se asociază cu un comportament biologic agresiv, prognostic nefavorabil și rezistență la chimioterapia convențională.

Exozomii sunt vezicule extracelulare (30–150 nm) care utilizează o cale biogenetică unică, implicând două evenimente secvențiale de invaginare a plasmalemei. Biogeneza exozomală și sortarea cargo-ului implică căi ESCRT-dependente (proteinele TSG101, Alix, CHMP4B) și ESCRT-independente (ceramidă, sindecansintenin-Alix, tetraspaninele CD63/CD81/CD9). Exozomii transportă proteine funcționale (receptori de suprafață, enzime, factori de transcripție), ARNm, miARN și lipide bioactive ce mediază comunicarea intercelulară în condiții fiziologice și patologice, oferind o serie de molecule cu rol de biomarker. Recent s-a identificat că moleculele conținute în exozomi pot modula căile de semnalizare implicate în proliferarea celulară, expresia fenotipică etc. Astfel, investigarea conținutului exozomilor produși de celulele purtătoare de CAR ar putea evidenția un potențial rol citotoxic.

Literatura de specialitate descrie că exozomii derivați din celulele CAR-T (CAR-Exo) exprimă molecule CAR pe suprafață, conferindu-le specificitatea antigenică, și prezintă efecte pro-apoptotice asupra celulelor tumorale prin mecanisme mediate de perforină/granzimă și FasL. Exozomii CAR-T nu exprimă molecula PD-L1, proteină cu efect detrimental asupra celulelor CAR-T. În plus, datorită dimensiunilor nanometrice, exozomii prezintă penetrabilitate superioară în micromediul tumoral comparativ cu celulele de proveniență. Natura non-replicativă a acestor vezicule extracelulare adresează limitarea privind riscul de toxicitate sistemică asociată terapiei CAR, însă necesită regimuri terapeutice de administrare repetată. Pentru a reduce suplimentar riscul de boală grefă-contra-gazdă, exozomii CAR-NK, TCR-negativi, ar putea produce un efect citotoxic similar cu Exo-CAR-T. Un singur studiu evaluează efectul citotoxic al exozomilor CAR-NK, însă acest studiu a utilizat exozomi modificați suplimentar prin fuziunea cu lipozomi ce conțin molecule generatoare de specii reactive ale oxigenului. Astfel, studiile curente nu oferă informații precise asupra conținutului exozomal, respectiv asupra potențialului citotoxic al exozomilor CAR-NK.

## **4. Materiale și Metode**

### **4.1. Surse celulare și culturi**

PBMC izolate din sângele periferic de la 5 voluntari sănătoși prin centrifugare în gradient de densitate (Ficoll-Paque) au fost cultivate în mediul XIVO10, suplimentat cu plasmă umană. Celulele mononucleare au fost supuse la două regimuri de stimulare: (1) microsferă magnetice anti-CD3/CD28 (Dynabeads™) — producând o populație TNK-polarizată (predominant celule T și NKT) și (2) cocktail citokinic (IL-2, IL-15, IL-21) — producând o populație NK-polarizată (predominant celule NK și NKT).

Linii celulare tumorale MDA-MB468 (cancer mamar EGFR-pozitiv, triplu-negativ), SK-BR3 (cancer mamar Her2-pozitiv), MCF-7 (cancer mamar Her2-negativ, ER-pozitiv) și K562 (leucemie mieloidă cronică — control NK) au fost cultivate în mediile de cultură specifice.

Linia celulară NK92 a fost cultivată în mediu RPMI 1640 suplimentat cu IL-2 (500 UI/mL) și plasmă umană (5%).

#### **4.2. Design-ul plasmidelor, transducția și evaluarea eficienței transducției**

În cadrul acestui studiu doctoral, două constructe CAR au fost sintetizate. Cele două CAR au fost transfectate în celulele efectorii prin două metode diferite și țintesc două antigene frecvent utilizate în imunoterapia antitumorală (EGFR, Her2).

Vectorul lentiviral LentiOne™ cu promotor PGK, codifică un CAR de generația a 2-a cu scFv anti-EGFR, domeniu transmembranar CD28, domenii co-stimulatoare CD28/4-1BB și domeniu CD3ζ, cuplat cu eGFP prin peptid T2A. Transducția s-a realizat în ziua 7 de cultură, la un MOI de 50.

Plasmidul codant pentru un CAR de generația a 3-a cu scFv anti-Her2 (derivat din trastuzumab) conține domeniile co-stimulatoare 4-1BB și CD28, proteina reporter eGFP și gena de rezistență la puromicină (pac), în sistemul de transpozoni piggyBac hiperactivat (hyPBBase). Transferul genetic s-a realizat prin electroporare (nucleofecție, Amaxa Nucleofector™ II).

Eficiența transducției a fost evaluată prin citometrie de flux (expresia eGFP și a moleculei CAR - EGFR biotinitat-streptavidină-APC sau anticorpi anti-G4S linker, respectiv anti-lanțuri ușoare kappa) și microscopie cu fluorescență.

#### **4.3. Selecția celulelor CAR-NK92**

Celulele CAR-NK92 au fost selectate prin tratament cu puromicină (4 μg/mL, 7 zile), exploatând expresia genei pac (puromicin-N-acetiltransferaza) codificată de plasmid pe baza curbei de toxicitate la puromicină. Această curbă a fost determinată prin titrare în intervalul 0–10 μg/mL, timp de 7 zile.

#### **4.4. Evaluarea citotoxicității celulelor CAR**

Efectul citotoxic mediat de CAR a fost evaluat prin citometrie de flux (marcare cu calceină violet și iodură de propidiu, la rapoarte efectori:țintă [E:T] de 1:1, 5:1, 10:1), experimente RTCA și microscopie cu fluorescență (vizualizarea interacțiunilor CAR-PBMC cu celulele tumorale).

#### **4.5. Izolarea și caracterizarea exozomilor**

Celulele ( $4 \times 10^6$ ) au fost incubate în mediu fără ser timp de 72 de ore. Supernatantul a fost procesat prin centrifugări seriate (300×g, 2000×g, 10.000×g) pentru eliminarea resturilor celulare, precipitare cu polietilenglicol (PEG) și resuspendare în PBS 1X.

Cuantificarea exozomilor s-a realizat prin determinarea concentrației de proteine (fluorimetrie Qubit, spectrofotometrie NanoDrop) și fluorimetrie (curba standard cu microsfere bead de referință). Cargo-ul proteic exozomal a fost caracterizat prin Western blot utilizând markeri exozomali (CD63, Alix), proteine citotoxice (CD3ζ, granzimă B), marker CAR (linker G4S), și control de încărcare (β-actină pentru lizate celulare și CD63 pentru lizate exozomale). Analiza intensității semnalului chemiluminescent a permis analiza comparativă a celulelor, respectiv a exozomilor

wild-type vs. CAR-pozitivi. În plus, folosirea sistemului flux citometric MACSPlex EV a permis analiza proteomului de suprafață exozomal prin intermediul a 37 de microsfere de captură (antigene: CD63, CD81, CD9, CD56, CD45, CD2, CD29, CD44, CD25, HLA-A/B/C etc.).

Evaluarea capacității de legare a exozomilor de celulele tumorale s-a realizat folosind un experiment de tip InCellELISA modificat, unde exozomii CAR au ținut antigenele tumorale ale celulelor din cultură fixate și permeabilizate (SK-BR3 și MCF-7).

Interacțiunea exozomilor cu celulele tumorale s-a realizat prin marcarea cu coloranți lipofilici atât a celulelor tumorale, cât și a exozomilor, urmată de vizualizarea în microscopie cu fluorescență.

Potențialul citotoxic al exozomilor a fost investigat folosind testul de reducere al resazurinei (AlamarBlue™) prin evaluarea viabilității celulare după 24 ore de incubare cu exozomi în concentrații diferite (1, 5, 10 μg proteină exozomală), cu calculul IC<sub>50</sub>. Citometria de flux și marcarea cu 7-aminoactinomicină D (7-AAD) a fost utilizată pentru cuantificarea celulelor apoptotice/necrotice. Monitorizarea continuă a indicelui celular după adăugarea suspensiei exozomale a fost realizată cu ajutorul experimentelor RTCA.

## **5. Rezultate**

### **5.1. Stimularea cu Dynabeads™ produce o proliferare superioară și modifică compoziția PBMC**

Analiza flow-citometrică a evidențiat că stimularea cu microsfere anti-CD3/CD28 (Dynabeads™) a produs o expansiune celulară de 8,67 ori față de stimularea citokinică. Populațiile rezultate au prezentat compoziții celulare distincte: stimularea cu Dynabeads a favorizat proliferarea celulelor T și NKT (populație TNK-polarizată), în timp ce stimularea citokinică a favorizat proliferarea celulelor NK (populație NK-polarizată). În ambele populații s-a observat o creștere notabilă a celulelor NKT (TNK: 19±5% ziua 0 → 46±7% ziua 28, p=0,05; NK: 5±1% → 60±8%, p<0,001). Transducția lentivirală nu a influențat semnificativ distribuția populațiilor celulare la 72 ore.

### **5.2. Eficiența transducției lentivirale este superioară în populația TNK-polarizată**

Expresia eGFP a fost semnificativ mai mare în celulele TNK-polarizate față de cele NK-polarizate (83±8% vs. 26±9%, p=0,001). Analiza expresiei CAR (EGFR biotinitat-streptavidină-APC) a confirmat că 55,78% din celulele TNK-polarizate au fost CAR-pozitive, față de 13,91% în populația NK-polarizată. La 21 de zile post-transducție s-a evidențiat o expresie persistentă a CAR în populația TNK-polarizată, în timp ce populația CAR-NK din cadrul celulelor NK-polarizate a fost semnificativ diminuată. Expresia scăzută a CAR în celulele NK este atribuită mecanismelor antivirale intrinseci. Pe baza acestor rezultate, cultura TNK-polarizată a fost utilizată ulterior pentru experimentele de citotoxicitate.

### **5.3. Imunofenotiparea liniilor celulare tumorale**

Analiza flux citometrică a liniilor celulare MDA-MB468 și SK-BR3 a evidențiat: expresie EGFR ridicată în MDA-MB468 și moderată în SK-BR3 (86,05% vs. 34,58%, p<0,001); expresie Fas ridicată în ambele linii (63,81% vs. 96,18%); expresie MICA/B crescută în ambele linii (89,92% vs. 70,34%) și expresie CD1d scăzută în ambele linii (<0,1%).

#### **5.4. CAR-PBMC exercită citotoxicitate specifică EGFR-dependentă**

Celulele CAR-PBMC au prezentat o activitate citotoxică semnificativ crescută față de celulele MDA-MB468 EGFR-pozitive la toate rapoartele E:T testate:

- E:T = 10:1:  $34 \pm 4\%$  vs.  $5 \pm 1\%$  ( $p < 0,01$ )
- E:T = 5:1:  $25 \pm 2\%$  vs.  $3 \pm 1\%$  ( $p < 0,05$ )
- E:T = 1:1:  $10 \pm 0,5\%$  vs.  $1 \pm 0,5\%$  ( $p < 0,05$ )

Față de celulele SK-BR3 (expresie EGFR moderată), citotoxicitatea a fost mai redusă dar semnificativă la E:T = 10:1 ( $24 \pm 2\%$  vs.  $6 \pm 1\%$ ,  $p < 0,05$ ). Nu s-au observat diferențe semnificative în cazul lizei celulelor K562 (EGFR-negative) sau a PBMC allogene, demonstrând specificitatea și profilul de siguranță al platformei. Analiza coeficientului d al lui Cohen a confirmat un efect semnificativ față de MDA-MB468 ( $d = 1,81 \pm 0,04$ ) și SK-BR3 ( $d = 1,45 \pm 0,25$ ), față de valorile nesemnificative pentru K562 ( $d = -0,36 \pm 0,48$ ) și PBMC alogene ( $d = -0,21 \pm 0,08$ ). Indicele de specificitate (SI) a fost: MDA-MB468 =  $8,87 \pm 1,21$ , SK-BR3 =  $5,67 \pm 1,42$ , K562 =  $0,95 \pm 0,05$ , PBMC alogene =  $0,95 \pm 0,08$ . Analiza RTCA a confirmat o citoliză rapidă a celulelor MDA-MB468, cu o reducere cu peste 50% a indicelui celular în primele 2 ore de la adăugarea CAR-PBMC și citoliza completă în 8 ore. Microscopia cu fluorescență a vizualizat agregarea celulelor CAR-PBMC în jurul celulelor MDA-MB468, sugestivă pentru recunoașterea și activarea celulelor efectoare în prezența celulelor tumorale țintă.

#### **5.5. Exozomii CAR-PBMC prezintă o activitate citotoxică crescută față de exozomii wild-type**

Exozomii izolați de la CAR-PBMC au redus populația celulară MDA-MB468 cu  $83,34 \pm 3,61\%$  după 72 ore de incubare, față de  $56,85 \pm 4,70\%$  pentru exozomii wild-type și  $12,29 \pm 3,94\%$  pentru controlul negativ ( $p < 0,001$  pentru ambele comparații). Analiza MACSplex a relevat o expresie crescută a markerilor HLA clasa I, CD56, CD45, CD44, CD29, CD2, CD81, CD63, CD8, CD4 și CD3, fără diferențe semnificative între exozomii wild-type și CAR-PBMC, sugerând că transducția CAR nu influențează procesul de sortare a cargo-ului exozomal.

#### **5.6. Electroporarea cu sistemul piggyBac generează celule NK92 CAR-pozitive viabile**

Nucleofecția celulelor NK92 cu plasmidele codante pentru hyPBase + CAR anti-Her2 nu a afectat semnificativ viabilitatea celulară față de controlul negativ (fără ADN). Celulele transfectate au exprimat molecule eGFP și CAR, confirmate prin microscopie cu fluorescență și citometrie de flux.

#### **5.7. Selecția cu puromicină produce o populație CAR-NK92 >99% pură**

Curba de toxicitate la puromicină a urmat o funcție non-liniară dependentă de doză, modelabilă matematic. O concentrație de  $4 \mu\text{g/mL}$  timp de 7 zile a fost suficientă pentru eliminarea celulelor NK92 netransfectate și obținerea unei populații >99% CAR-pozitive, cu restaurarea proliferării prin stimulare cu IL-2 după finalizarea selecției.

### **5.8. CAR-NK92 exercită citotoxicitate Her2-specifică**

Analiza RTCA a demonstrat că celulele CAR-NK92 au exercitat un efect citotoxic semnificativ mai puternic față de celulele SK-BR3 Her2-pozitive comparativ cu NK92 wild-type, la toate rapoartele E:T testate. Efectul citotoxic al CAR-NK92 față de celulele MCF-7 Her2-negative a fost prezent dar mai redus, atribuit mecanismelor de activare nespecifică NK. Blocarea Her2 cu trastuzumab (10  $\mu$ L/200  $\mu$ L mediu) a redus semnificativ citotoxicitatea CAR-NK92 față de SK-BR3, confirmând specificitatea Her2-dependentă.

### **5.9. Caracterizarea exozomilor CAR-NK92**

Celulele NK92 WT și CAR-NK92 au produs cantități comparabile de exozomi ( $1,12 \times 10^7$  vs.  $1,04 \times 10^7$ ,  $p=0,502$ ) cu conținut proteic similar (13,26 vs. 12,17  $\mu$ g/ $\mu$ L,  $p=0,782$ ), demonstrând că expresia CAR nu influențează rata de producție exozomală. Ambele populații exozomale exprimă markerii canonici CD63 și Alix (demonstrând biogeneza ESCRT-/Alix-dependentă). Proteinele citotoxice CD3 $\zeta$  și granzima B (monomeri și dimeri) au fost identificate în ambele populații exozomale. Linkerul G4S (marker CAR) a fost detectat exclusiv în Exo-CAR-NK92 ( $p=0,046$ ), confirmând incorporarea selectivă a moleculei CAR în exozomi.  $\beta$ -actina a fost absentă în fracțiunile exozomale, indicând contaminare minimă cu resturi celulare. Ambele populații exozomale au exprimat niveluri ridicate de CD63, CD81, CD2, CD29, CD45, și CD56 (marker NK). Exozomii CAR-NK92 prezintă o expresie crescută de CD25 (IL-2R $\alpha$ ) față de NK92 WT, receptor implicat în activarea și proliferarea celulelor efectoare.

### **5.10. Exozomii CAR-NK92 prezintă afinitate crescută pentru celulele Her2-pozitive**

Tehnica InCellELISA a demonstrat că exozomii CAR-NK92 se leagă preferențial de celulele SK-BR3 Her2-pozitive față de celulele MCF-7 Her2-negative (absorbanță  $0,39 \pm 0,02$  vs.  $0,31 \pm 0,02$  RAU,  $p=0,04$ ). Exozomii NK92 wild-type nu au prezentat diferențe semnificative în legarea de cele două linii celulare ( $p=0,61$ ), confirmând că specificitatea de legare este atribuită moleculei CAR anti-Her2. Microscopia cu fluorescență a confirmat internalizarea exozomilor marcați cu DiO de către celulele SK-BR3 la 24–72 ore de incubare.

### **5.11. Exozomii CAR-NK92 exercită citotoxicitate Her2-specifică**

Exozomii CAR-NK92 au prezentat un  $IC_{50}$  de 22,361  $\mu$ g/mL față de celulele SK-BR3, semnificativ mai mic față de exozomii NK92 WT ( $IC_{50} = 49,919$   $\mu$ g/mL). În cazul celulelor MCF-7 Her2-negative, valorile  $IC_{50}$  au fost comparabile între cele două populații exozomale (43,215 vs. 45,894  $\mu$ g/mL), confirmând specificitatea antigen-dependentă. Exozomii CAR-NK92 au indus un procent semnificativ crescut de celule apoptotice/necrotice din linia SK-BR3 față de exozomii NK92 WT ( $34,98 \pm 3,14\%$  vs.  $21,60 \pm 2,32\%$ ), cu o specificitate de 1,89 ori mai mare față de MCF-7. Exozomii NK92 WT au exercitat de asemenea citotoxicitate față de ambele linii celulare (SK-BR3:  $21,60 \pm 2,32\%$  vs. control  $8,97 \pm 2,25\%$ ,  $p=0,04$ ; MCF-7:  $23,56 \pm 4,03\%$  vs. control  $6,03 \pm 1,80\%$ ,  $p=0,03$ ), atribuibilă proteinelor citotoxice intrinseci (granzimă B).

## **6. Discuții**

### **6.1. Platforma CAR-PBMC**

Prima direcție investigată în cadrul tezei a demonstrat că PBMC-urile pot servi drept punct de pornire pentru generarea de celule CAR funcționale. Avantajele platformei CAR-PBMC includ: (1) simplificarea procesului de fabricație prin eliminarea etapei de selecție și expansiune izolată a celulelor T; (2) producerea simultană de CAR-T, CAR-NK și CAR-NKT, valorificând mecanismele citotoxice complementare; (3) reducerea timpului de la recoltare la infuzie.

Diferența de magnitudine a citotoxicității față de MDA-MB468 (8x) vs. SK-BR3 (3x) subliniază importanța densității antigenice pentru eficacitatea terapiei CAR, în concordanță cu literatura care demonstrează necesitatea unui prag minim de expresie antigenică pentru activarea celulară optimă. Absența citotoxicității față de PBMC alogene sugerează un profil de siguranță promițător în context alogenic, deși validarea in vivo este necesară.

Celulele CAR-NKT din cadrul populației CAR-PBMC pot contribui la remodelarea micromediului tumoral prin eliberarea de citokine proinflamatorii (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), promovând macrofagele M1 și activând limfocitele CD8+ infiltrante tumorale, independent de expresia MHC clasa I.

### **6.2. Platforma CAR-NK92 și sistemul piggyBac**

Utilizarea sistemului de transpozoni piggyBac a rezolvat limitarea majoră a transducției lentivirale în celulele NK (datorată mecanismelor antivirale intrinseci). Selecția cu puromicină s-a dovedit o metodă cost-eficientă pentru obținerea de populații CAR-NK92 înalt purificate (>99%), cu un profil farmacologic modelabil matematic.

Reducerea citotoxicității CAR-NK92 prin administrare de trastuzumab confirmă că efectul antitumoral este mediat specific prin recunoașterea Her2 de către molecula CAR.

### **6.3. Exozomii CAR ca platformă terapeutică acelulară**

Rezultatele privind exozomii CAR-NK92 demonstrează că molecula CAR este incorporată selectiv în exozomii derivați din celulele NK92 modificate genetic. Exozomii CAR-NK92 prezintă afinitate crescută pentru celulele Her2-pozitive față de cele Her2-negative și exercită citotoxicitate anti-Her2 de 2,2 ori mai mare comparativ cu exozomii WT.

Mecanismul propus implică: legarea specifică a moleculei CAR de Her2 pe suprafața celulei tumorale, internalizarea exozomilor, eliberarea intracitoplasmatică a granzimei B și activarea cascadei apoptotice dependentă de caspaze. Concomitent, FasL exozomal poate activa calea apoptotică extrinsecă prin legarea receptorului Fas (CD95) exprimat pe celulele tumorale.

Avantajele utilizării exozomilor în imunoterapie față de terapia celulară clasică includ o penetrabilitate crescută în micromediul tumoral imunosupresiv, un profil de siguranță îmbunătățit (absența riscului de CRS, GvHD) și posibilitatea utilizării „off-the-shelf”.

## 7. Concluzii

În urma experimentelor efectuate în cadrul acestui studiu doctoral, se pot formula următoarele concluzii:

1. PBMC pot servi drept punct de plecare pentru dezvoltarea de celule CAR, generând o populație heterogenă de celule CAR-T, CAR-NK și CAR-NKT cu citotoxicitate antitumorală complementară.
2. Stimularea cu microsfele anti-CD3/CD28 (Dynabeads™) este superioară stimulării citokinice, producând o expansiune de 8,67 ori mai mare și o populație predominant TNK, cu eficiență de transducție lentivirală superioară.
3. CAR-PBMC exercită efecte citotoxice anti-tumorale specifice EGFR-dependente față de celulele MDA-MB468 (SI = 8,87; Cohen's d = 1,81) și SK-BR3 (SI = 5,67; Cohen's d = 1,45), fără citotoxicitate semnificativă asupra PBMC alogene.
4. Exozomii CAR-PBMC augmentează citotoxicitatea față de celulele MDA-MB468 ( $83,34 \pm 3,61\%$  vs.  $56,85 \pm 4,70\%$  pentru exozomii WT,  $p < 0,001$ ), sugerând că molecula CAR crește specificitatea și eficacitatea citotoxică exozomală.
5. Transducția lentivirală este inefficientă în celulele NK-polarizate, atribuită mecanismelor antivirale intrinseci. Pentru a depăși această limitare, electroporarea cu sistemul piggyBac permite modificarea genetică eficientă a celulelor NK pentru expresia moleculei CAR, fără afectarea semnificativă a viabilității celulare.
6. Selecția cu puromicină ( $4 \mu\text{g/mL}$ , 7 zile) produce o populație CAR-NK92 >99% pură, respectând o curbă non-liniară dependentă de doză modelabilă matematic.
7. CAR-NK92 exercită citotoxicitate Her2-specifică față de celulele SK-BR3, efect abolit de blocarea Her2 cu trastuzumab.
8. Exozomii NK92 WT și CAR-NK92 exprimă markerii canonici CD63 și Alix (biogeneză ESCRT-dependantă) și proteinele citotoxice CD3ζ și granzimă B.
9. Molecula CAR este incorporată selectiv în exozomii CAR-NK92, confirmată prin detectarea linkerului G4S-CAR exclusiv în Exo-CAR-NK92.
10. Exozomii CAR-NK92 prezintă afinitate crescută pentru celulele SK-BR3 Her2- pozitive față de MCF-7 Her2-negative, conferită specific de molecula CAR.
11. Exozomii CAR-NK92 exercită citotoxicitate Her2-specifică cu  $\text{IC}_{50} = 22,361 \mu\text{g/mL}$  față de SK-BR3, de 2,2 ori mai mic față de exozomii WT ( $\text{IC}_{50} = 49,919 \mu\text{g/mL}$ ).
12. Expresia CAR nu influențează rata de producție exozomală ( $p = 0,502$ ) sau conținutul proteic citotoxic ( $p = 0,782$ ).

## 8. Contribuții Originale

Prezenta teză aduce următoarele contribuții originale la literatura de specialitate:

1. Demonstrarea in vitro a eficacității platformei CAR-PBMC ca abordare imunoterapeutică simplificată, cu producerea simultană de CAR-T, CAR-NK și CAR-NKT dintr-un singur produs de afereză.

2. Modelarea matematică a curbei de toxicitate la puromicină pentru selecția celulelor NK92 transfectate, cu identificarea concentrației optime (4  $\mu\text{g/mL}$ , 7 zile) pentru obținerea de culturi >99% pure.
3. Compararea sistematică a două platforme de modificare genetică (transducție lentivirală vs. electroporare cu transpozoni piggyBac) pentru generarea de celule NK CAR-pozitive, cu demonstrarea superiorității sistemului piggyBac.
4. Demonstrarea efectului citotoxic al exozomilor CAR-PBMC și CAR-NK.
5. Demonstrarea incorporării selective a moleculei CAR anti-Her2 în exozomii derivați din celulele NK92, cu confirmarea expresiei linkerului CAR exclusiv în fracțiunea exozomală CAR-NK92.
6. Demonstrarea specificității antigen-dependente a exozomilor CAR-NK92 față de celulele Her2-pozitive, cu un profil de specificitate de 2,2 ori mai mare față de exozomii WT.
7. Caracterizarea proteomului de suprafață exozomal (37 antigene prin MACSPlex EV) pentru populațiile CAR-PBMC și CAR-NK92.