

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA TẠO KHỐI TẾ BÀO CAR-T

Ngô Thu Hằng¹, Cần Văn Mão^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Tối ưu hóa quá trình đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2 nhằm thu được số lượng và chất lượng tế bào CAR-T cao nhất. **Phương pháp nghiên cứu:** Tách tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) từ mẫu máu tươi. Sau đó phân tích PBMC bằng máy flow cytometer BD Facslyric. Chuyển nạp cấu trúc CAR vào PBMC bằng máy Amaxa Nucleofector 2b với chương trình T-020. Đồng nuôi cấy CAR-T và aAPC 1D2 theo tỷ lệ 1:2 tế bào CAR-T sống. Phân tích biểu hiện CAR bằng real-time PCR. **Kết quả:** Ở ngày 7 và ngày 14, số lượng tế bào CAR-T đã tăng sinh lên rất nhiều lần so với ngày thứ 3. Khả năng tăng sinh của hai thể hệ tế bào CAR-T là tương đương nhau ở 14 ngày và có sự khác biệt từ ngày 21. Sau 28 ngày, lượng tế bào CAR-T iCasp9-IL15 (78,62%) thu được nhiều hơn so với CAR-T CD19RCD137 (66,23%), với $p > 0,05$. Kết quả ở ngày 28 cho thấy $\approx 97\%$ số tế bào CAR-T của cả hai thể hệ biểu hiện CAR trên bề mặt sau tăng sinh. **Kết luận:** Tế bào CAR-T tăng sinh hiệu quả trong 28 ngày đồng nuôi cấy cùng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo và IL-2 với 4 lần bổ sung aAPC (ngày 1, 7, 14, 21). 97% tế bào thu nhận được biểu hiện phân tử CAR trên bề mặt.

Từ khóa: Tế bào CAR-T; Tế bào đơn nhân máu ngoại vi; Chuyển nạp.

STUDY ON OPTIMIZING THE PRODUCTION OF CAR-T CELL MASS

Abstract

Objectives: To optimize the co-culture process of CAR-T cells and aAPC 1D2 to obtain the highest quantity and quality of CAR-T cells. **Methods:** Separating peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from fresh blood samples. Then, PBMC was analyzed by a BD Facslyric flow cytometer. Transpositing CAR into PBMC using Amaxa Nucleofector 2b with T-020 program. Co-culture CAR-T and

¹Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Cần Văn Mão (canvanmao@vmmu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 10/3/2025

Ngày được chấp nhận đăng: 11/4/2025

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v50i5.1248>

aAPC 1D2 at a ratio of 1:2X viable CAR-T cells. CAR expression was analyzed by real-time PCR. **Results:** On the 7th and 14th day, the number of CAR-T cells proliferated many times more than that on the 3rd day. The proliferative capacity of the two CAR-T cell generations was similar on the 14th day, and there was a difference from day 21. After 28 days, the number of iCasp9-IL15 CAR-T cells (78.62%) was higher than that of CD19CD137 CAR-T cells (66.23%) with $p > 0.05$. The results on day 28 showed that approximately 97% of CAR-T cells of both cell generations expressed CAR on the surface after proliferation. **Conclusion:** CAR-T cells proliferated effectively from the 28th day on co-culture with artificial antigen-presenting cells and IL-2, with aAPC supplementation of 4 times (1st, 7th, 14th, 21st day). The obtained cells expressed CAR molecules of 97% on the surface.

Keywords: CAR-T cell; Peripheral blood mononuclear cell; Transposition.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong cơ thể sống, các tế bào T được kích thích để tăng sinh và biệt hóa bởi các tế bào trình diện kháng nguyên như tế bào đuôi gai (DC). Tế bào T được kích hoạt bởi sự tương tác giữa các thụ thể tế bào T (TCR) và phức hợp hòa hợp mô chính nằm trên bề mặt tế bào DC và thông qua các phân tử đồng kích thích như CD28, 4-1BB và OX40 [1]. Để không phải nuôi cấy cùng với tế bào DC, một số phương pháp đã tạo ra các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo để kích thích tự nhiên của tế bào T đã được phát triển và thực hiện [2].

Phương pháp chủ yếu được sử dụng để kích hoạt tế bào T cho các sản phẩm đang thử nghiệm lâm sàng là kích hoạt bằng các hạt thuận từ phủ kháng thể kháng CD3/CD28. Anti-CD3/CD28 mAbs và IL-2 đã được sử dụng đánh giá nhiều sản phẩm trong đó có KTE-019

của KITE Pharma (hiện nay được chấp thuận như Yescarta). Các nhóm đầu tiên báo cáo sử dụng các hạt từ tính trong các nghiên cứu được đánh giá là nghiên cứu của Deeks và CS về tế bào CAR-T chống gp120 trong điều trị HIV [3]. Nhiều nghiên cứu sử dụng phương pháp này có liên quan với các sản phẩm của Novartis và Juno Therapeutics CTL019 (hiện nay được phê duyệt là Kymriah) và JCAR014, JCAR015, JCAR017 và JCAR018. Tuy nhiên, để giảm chi phí sản phẩm, hiện tại nhiều nghiên cứu đã phát triển các phương thức khác như dùng kháng thể đơn dòng, dùng các Interleukin hoặc dùng tế bào nhân tạo trình diện kháng nguyên [4].

Nhằm hỗ trợ quá trình tăng sinh tế bào T ở quy mô lớn một cách hiệu quả, chúng tôi đã tạo và chọn được một dòng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPC 1D2) biểu hiện mạnh cả 4 phân

từ CD19, CD64, CD86 và CD137, nghiên cứu được thực hiện nhằm: *Tối ưu hóa quá trình đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và aAPC 1D2 theo các yếu tố tỷ lệ CAR-T:aAPC 1D2, số lần bổ sung aAPC và thời gian nuôi cấy nhằm thu nhận được số lượng và chất lượng tế bào CAR-T cao nhất có thể.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

Tế bào K562 được nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 (Biowest), Fetal Bovine Serum (Hyclone), CTS Optimizer T cell Expansion (Thermo Fisher). Sử dụng bộ kit SF Cell Line (Lonza), bộ kit Cell Line Nucleofector V (Lonza), bộ kit Ingenio Electroporation (Mirus Bio) làm chất chuyển nạp và mRNA SB (mã hóa sleeping beauty transposase) được phiên mã *in vitro* tại Phòng Thí nghiệm Kỹ thuật Gen, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Phương pháp tách PBMC*: Mẫu máu tươi được xử lý với 3mL Ficoll-Paque PREMIUM ($\rho = 1,077 \text{ g/mL}$) để loại bỏ hoàn toàn dịch nổi và tạo sinh khối tế bào. Sau đó, khối tế bào được hòa tan bằng 4mL môi trường nuôi cấy CTS Optimizer complete.

* *Phân tích PBMC*: Khối PBMC được quan sát dưới kính hiển vi soi ngược, đếm số lượng và tỷ lệ tế bào sống/chết bằng nhuộm trypan blue 0,4%. Sau đó, nhuộm tế bào với các kháng thể ở nồng độ cuối 1 - 10 $\mu\text{g/mL}$ trước khi ủ tế bào ở 4°C trong bóng tối. Tế bào sau đó được rửa sạch, hòa tan trong 300 μL FACS buffer và phân tích bằng máy flow cytometer BD Facslyric.

* *Chuyển nạp vào PBMC*: Nhuộm trypan blue 0,4%, đếm số lượng tế bào và tỷ lệ tế bào PBMC sống. Sau đó, 10^7 tế bào sống được rửa, loại bỏ hoàn toàn dịch nổi và hòa vào 5mL môi trường nuôi cấy có bổ sung bi từ Dynabeads CD3/CD28 (số lượng tế bào bằng với số bi từ). Sau 60 giờ nuôi cấy, bi từ được loại bỏ bằng nam châm. Sinh khối 2×10^7 tế bào được hòa tan bằng 100 μL dung dịch chuyển nạp P3 Primary Cells (Lonza) và 1 μg plasmid SB100X và 10 μg plasmid CD19RCD137/pSB. Hỗn hợp trên được chuyển vào cuvette chuyên dụng (Lonza) và chuyển nạp bằng máy Amaxa Nucleofector 2b với chương trình T-020.

* *Đồng nuôi cấy CAR-T và aAPC*: Hòa tan aAPC 1D2 về mật độ 10^7 tế bào/mL bằng môi trường CTS Optimizer T cell expansion. aAPC sau đó được bổ sung vào môi trường nuôi cấy CAR-T theo tỷ lệ 2X tế bào CAR-T sống.

* *Phân tích biểu hiện CAR bằng real-time PCR*: 10^6 tế bào sống được rửa sạch và tách mRNA bằng kit QIAamp RNA Blood Mini (Qiagen). Lượng RNA sau tách được định lượng bằng máy Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher) và Qubit RNA assay kit (Thermo Fisher). RNA thu được được chuyển cDNA với Invitrogen™ SuperScript™ III Reverse Transcriptase. Sau đó, 10ng cDNA được sử dụng cho phản ứng phát hiện mức độ biểu hiện mRNA CAR với cặp mồi đặc hiệu [1, 2, 3, 4].

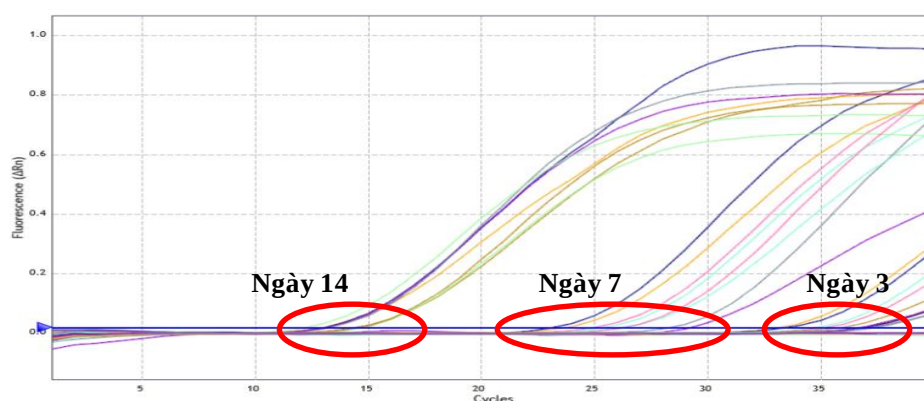
Các bước được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức tại Bệnh viện Quân y 103 (số 180/2021/CNChT-HĐĐĐ ngày 10/8/2021). Số liệu nghiên cứu được Ban chủ nhiệm đề tài Mã số: KC10.39/16-20 và Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y cho phép sử dụng và công bố. Nhóm tác giả cam kết không có xung đột lợi ích trong nghiên cứu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

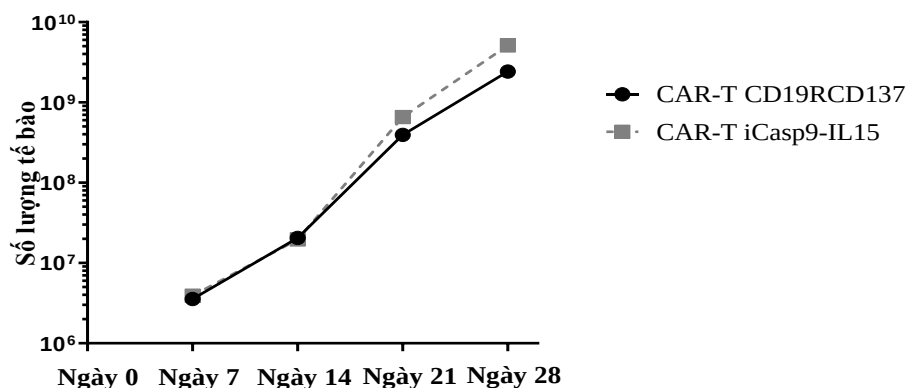
1. Phân tích biểu hiện CAR bằng real-time PCR



Hình 1. Phân tích biểu hiện CAR sau 3, 7 và 14 ngày đồng nuôi cấy CAR-T và aAPC bằng real-time PCR.

Kết quả cho thấy có sự tăng biểu hiện CAR khi đồng nuôi cấy CAR-T với tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo có CD19⁺. Ở ngày 3, sau 35 chu kỳ thì tín hiệu mới bắt đầu tách ra khỏi đường chuẩn. Ở ngày 7, chỉ cần sau 15 chu kỳ và ở ngày 14 thì chỉ cần < 15 chu kỳ đã thấy tín hiệu đạt tương tự như ngày 3 sau 35 chu kỳ. Điều này cho thấy ở các ngày 7 và ngày 14, số lượng tế bào CAR-T đã được tăng sinh lên rất nhiều lần so với ngày 3 và ngày càng nhiều tế bào có biểu hiện CAR trong quần thể môi trường nuôi cấy (Hình 1).

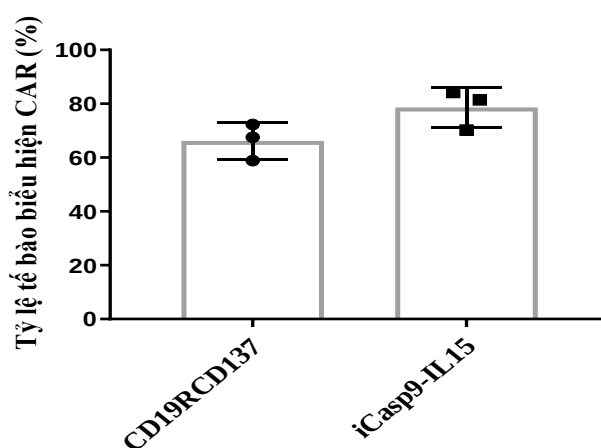
2. Tăng sinh CAR-T trong thời gian dài



Hình 2. Số tế bào CAR-T trong quá trình tăng sinh.

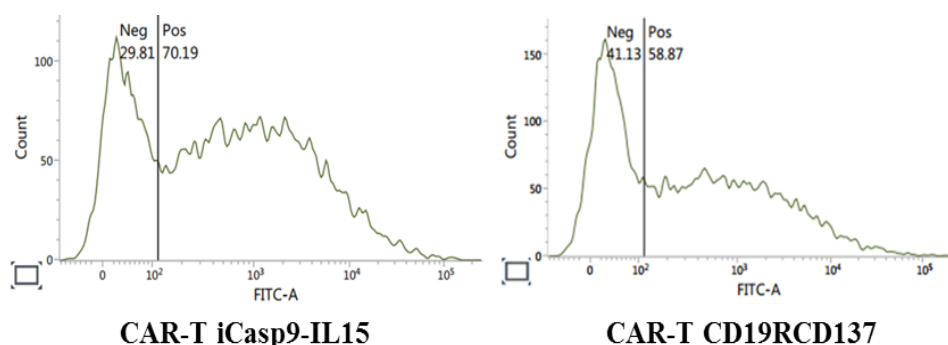
Kết quả cho thấy hai thể hệ tế bào CAR-T tăng sinh hiệu quả khi đồng nuôi cấy với aAPC 1D2 và IL-2, đạt $\approx 2,5 - 5 \times 10^9$ sau 28 ngày. Ngoài ra, khả năng tăng sinh của hai thể hệ tế bào CAR-T là tương đương nhau (trong 14 ngày đầu) và bắt đầu có sự khác biệt từ ngày 21. Sau 28 ngày, tuy lượng tế bào CAR-T iCasp9-IL15 thu được nhiều hơn so với CAR-T CD19RCD137, khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi sử dụng kiểm định T-test ($n = 3$) (Hình 2).

3. Phân tích biểu hiện CAR bằng flow cytometry



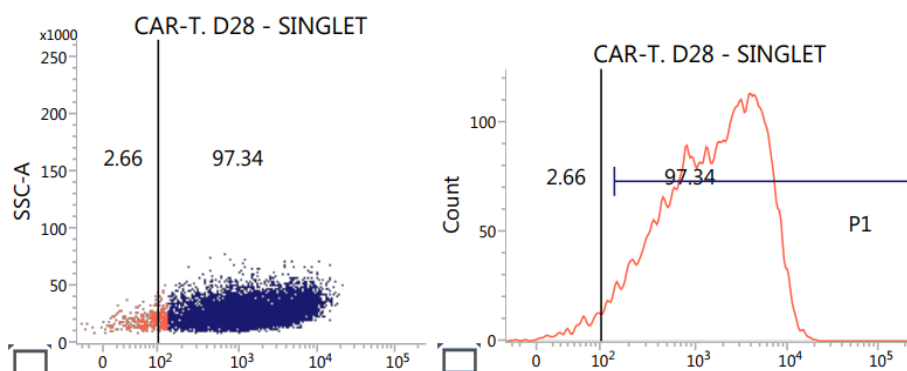
Hình 3. Tỷ lệ tế bào biểu hiện thụ thể CAR sau 21 ngày tăng sinh.

Kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào biểu hiện CAR đạt $\approx 66,23\%$ đối với CAR-T CD19RCD137 và xấp xỉ $78,62\%$ đối với CAR-T iCasp9-IL15 (Hình 3).



Hình 4. Kết quả đại diện phân tích biểu hiện CAR bằng flow cytometry.

Kết quả flow cytometry cho thấy tỷ lệ biểu hiện CAR đối với dòng tế bào CAR-T CD19RCD137 là 58,87% và CAR-T iCasp9-IL15 là 70,10% (Hình 4).



Hình 5. Phân tích biểu hiện CAR trên bề mặt tế bào CAR-T thu nhận được 28 ngày tăng sinh.

Kết quả ở ngày 28 cho thấy $\approx 97\%$ số tế bào CAR-T của cả hai thể hệ thu nhận được biểu hiện CAR trên bề mặt sau tăng sinh (Hình 5).

BÀN LUẬN

1. Phân tích biểu hiện CAR bằng real-time PCR

Nhằm khẳng định tế bào CAR-T có khả năng tăng sinh khi nuôi cùng tế bào CD19⁺, chúng tôi đồng nuôi cấy PBMC không chuyển nạp (PBMC), CAR-T CD19RCD137, hoặc CAR-T iCasp9-IL15

(CAR-T) với tế bào CD19⁺ là aAPC 1D2 và tế bào Daudi. Sau 3, 7 và 14 ngày thu thập 10^6 tế bào sống, tách mRNA và phân tích real-time PCR với cặp mồi đặc hiệu cho vùng gene biểu hiện phân tử CAR [5]. Kết quả ở hình 1 cho thấy có sự tăng biểu hiện mRNA của CAR khi đồng nuôi cấy CAR-T với tế bào CD19⁺. Khi sử dụng cùng lượng

tế bào sống tách RNA, chuyển cDNA và cùng lượng cDNA đầu vào cho phản ứng real-time PCR. Ở ngày 3, sau 35 chu kỳ thì tín hiệu mới bắt đầu tách ra khỏi đường chuẩn. Trong khi đó ở ngày 7, chỉ cần sau 15 chu kỳ và ở ngày 14 thì chỉ cần < 15 chu kỳ đã thấy tín hiệu đạt tương tự như ngày 3 sau 35 chu kỳ. Điều này cho thấy ở các ngày 7 và ngày 14, số lượng tế bào CAR-T đã được tăng sinh mạnh mẽ so với ngày 3.

2. Tăng sinh CAR-T trong thời gian dài

Chúng tôi tăng sinh lượng lớn tế bào CAR-T thể hệ 2 và thể hệ 4 với tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (tỷ lệ 1 CAR-T : 2 aAPC) và IL-2 (50 U/mL). Lượng tế bào sau mỗi chu kỳ bổ sung aAPC (7 ngày) được xác định bằng đếm tế bào sống và xác định tỷ lệ tế bào biểu hiện CAR bằng flow cytometry. Kết quả (Hình 2) cho thấy hai thể hệ tế bào CAR-T tăng sinh hiệu quả khi đồng nuôi cấy với aAPC 1D2 và IL-2, đạt $\approx 2,5 - 5 \times 10^9$ sau 28 ngày. Ngoài ra, không thấy sự khác biệt về khả năng tăng sinh của hai thể hệ tế bào CAR-T trong 14 ngày đầu. Ở ngày 21 và 28, số lượng tế bào CAR-T iCasp9-IL15 thu được nhiều hơn so với CAR-T CD19RCD137, tuy nhiên, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả thử nghiệm với nhiều lần đánh giá cho thấy

tốc độ tăng sinh của tế bào CAR-T ở cả hai thể hệ là tương đương trong thời gian hai tuần đầu của quá trình nuôi cấy. Nhưng sau hai tuần, tế bào CAR-T iCasp9-15 có tốc độ tăng sinh có xu hướng nhanh hơn so với tế bào CAR-T CD19RCD137. Điều này có thể do ở các ngày sau, khi lượng IL-15 tiết ra đủ lớn nó sẽ kích thích tế bào CAR-T tăng sinh mạnh hơn. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự như trong một số nghiên cứu khác, các tác giả thấy khi nuôi cấy tế bào CAR-T cùng với các hạt tự có chứa kháng thể kháng CD3 hoặc CD28 hoặc IL-2, tế bào CAR-T sẽ có tốc độ tăng sinh mạnh hơn [6, 7].

3. Phân tích biểu hiện CAR bằng flow cytometry

Sau 21 ngày tăng sinh, biểu hiện CAR của tế bào CAR-T CD19RCD137 và iCasp9-IL15 được đánh giá bằng sử dụng kháng thể kháng CD19 gắn FITC và phân tích bằng hệ thống máy đếm tế bào dòng chảy flow cytometry. Kết quả (Hình 3) cho thấy biểu hiện CAR đạt $\approx 66,23\%$ đối với CAR-T CD19RCD137 và xấp xỉ $78,62\%$ đối CAR-T iCasp9-IL15. Ở ngày 28, biểu hiện CAR trên bề mặt tế bào CAR-T sau tăng sinh được phân tích bằng flow cytometry cho thấy $\approx 97\%$ số tế bào CAR-T của cả hai thể hệ thu nhận được biểu hiện CAR trên bề mặt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tế bào CAR-T khi nuôi cấy cùng tế bào aAPC có khả năng tăng sinh với số lượng lớn và theo thời gian, các tế bào aAPC bị tế bào CAR-T tiêu diệt có tỷ lệ còn lại rất thấp (< 3% tại thời điểm ngày 28), trong môi trường nuôi cấy chỉ chủ yếu còn lại là tế bào CAR-T. Kết quả này cũng được nhận thấy trong các nghiên cứu trước đây khi sử dụng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo để tăng sinh tế bào CAR-T [8].

KẾT LUẬN

Tế bào CAR-T tăng sinh hiệu quả trong 28 ngày đồng nuôi cấy với tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo có CD19⁺ và IL-2. Sau 28 ngày nuôi cấy với 4 lần bổ sung aAPC (ngày 1, 7, 14, 21), 97% tế bào thu nhận được biểu hiện phân tử CAR trên bề mặt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen L, Flies DBJNri. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. 2013; 13(4):227-242.
2. Levine BJCgt. (2015). Performance-enhancing drugs: Design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. 2015; 22(2):79-84.
3. Deeks SG, Wagner B, Anton PA, et al. A phase II randomized study of

HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. 2002; 5(6):788-797.

4. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell Therapies. 2018; 53:164-181.

5. Wang H, Du X, Chen WH, et al. Establishment of a quantitative polymerase chain reaction assay for monitoring chimeric antigen receptor T cells in peripheral blood. *Transplantation Proceedings*. 2018; 50(1):104-109.

6. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Phase 1 results of ZUMA-1: A multicenter study of KTE-C19 anti-CD19 CAR T cell therapy in refractory aggressive lymphoma. 2017; 25(1):285-295.

7. Gargett T, Brown MPJC. Different cytokine and stimulation conditions influence the expansion and immune phenotype of third-generation chimeric antigen receptor T cells specific for tumor antigen GD2. 2015; 17(4):487-495.

8. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, et al. Manufacture of clinical-grade CD19-specific T cells stably expressing chimeric antigen receptor using Sleeping Beauty system and artificial antigen presenting cells. 2013; 8(5):e64138.