

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG LI GIẢI CÁC DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ CD19⁺ CỦA CÁC TẾ BÀO CAR-T

Ngô Thu Hằng¹, Đặng Thùy Linh¹
Nguyễn Thị Hiền Hạnh², Cấn Văn Mão^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Đánh giá khả năng li giải các dòng tế bào ung thư CD19⁺ của các tế bào CAR-T. **Phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm, mô tả cắt ngang có đối chứng. Các dòng tế bào ung thư Daudi, 1D2 (CD19⁺) và K562 (CD19⁻) được đánh dấu bằng CFSE. Tế bào CAR-T hoặc PBMC (effector) được bổ sung vào các giếng nuôi chứa tế bào ung thư CD19⁺ hoặc K562 (target) theo tỷ lệ target:effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10. Hỗn hợp tế bào được nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂ trong 6 giờ, sau đó phân tích bằng flow cytometry. **Kết quả:** Tế bào CAR-T có khả năng li giải tế bào ung thư CD19⁺ và khả năng li giải tăng tỷ lệ thuận với tỷ lệ CAR-T nuôi cấy đồng thời với tế bào CD19⁺, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC và CD19⁻ ($p < 0,05$). **Kết luận:** Tế bào CAR-T có khả năng li giải các dòng tế bào ung thư CD19⁺.

Từ khóa: CAR-T, CD19⁺.

EVALUATION OF THE LYTIC EFFECTS OF CAR-T CELLS ON CD19⁺ CANCER CELL LINES

Abstract

Objectives: To evaluate lytic effects of CAR-T on CD19⁺ cancer cell lines. **Methods:** Experimental, descriptive, cross-sectional study with control groups. Daudi, 1D2 (CD19⁺) and K562 (CD19⁻) cancer cell lines were labelled with CFSE. CAR-T or PBMC cells (effector) were added to the culture wells containing CD19⁺ or K562 cancer cells (target) with the target:effector ratio (T:E) of 1:2, 1:5, 1:10.

¹Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y

²Bộ môn, Trung tâm Huyết học - Truyền máu, Học viện Quân y

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

Ngày nhận bài: 19/5/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 30/6/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i6.376>

The cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 6 hours, then analyzed by flow cytometry. **Results:** CAR-T had the ability to lyse CD19⁺ cancer cells, and the lysis ability increased according to the ratio of CAR-T co-cultured with CD19⁺ cells. The difference was statistically significant when compared to control groups (PBMC and CD19⁻) ($p < 0.05$). **Conclusion:** CAR-T cells exhibit the ability to lyse CD19⁺ cancer cell lines.

Keywords: CAR-T, CD19⁺.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới, mỗi năm trên toàn thế giới có khoảng trên 18 triệu trường hợp mới mắc và 9,5 triệu người chết vì bệnh ung thư [1]. Bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL - Acute Lymphoblastic Leukemia) hoặc bệnh bạch cầu cấp dòng lympho, Lơ-xê-mi cấp dòng lympho là một trong những bệnh ung thư phổ biến nhất ở trẻ em trên thế giới, chiếm khoảng 75% tất cả các loại ung thư máu [2, 3].

Liệu pháp điều trị chủ yếu hiện được sử dụng cho ALL là hóa trị liệu, tuy nhiên, hiệu quả của phương pháp điều trị này chỉ đạt tối đa 20% ở người trưởng thành [4]. Liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào T mang thụ thể nhân tạo CAR (Chimeric antigen receptors) có khả năng nhận biết các kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt tế bào ung

thư, từ đó kích hoạt khả năng phân giải tế bào ung thư đang là vấn đề được nhiều nhà khoa học quan tâm [5, 6]. Sử dụng thụ thể CAR-T đang ngày càng phổ biến trong nghiên cứu và điều trị ung thư do khả năng tăng sinh và khả năng giết của tế bào T gây độc (T_c), đồng thời có tính đặc hiệu liên kết thông qua thụ thể kháng nguyên CAR [6, 7].

Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa ứng dụng liệu pháp tế bào CAR-T để điều trị ung thư nói chung và ALL nói riêng. Trước khi áp dụng trong điều trị lâm sàng thì cần đánh giá hiệu quả khả năng li giải các tế bào ung thư của khối tế bào CAR-T *in vitro* và tác dụng điều trị trên mô hình động vật mang khối ung thư ở người. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm: *Đánh giá khả năng li giải của CAR-T khi nuôi cấy cùng với các dòng tế bào ung thư có và không có CD19⁺.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu

- Tế bào Daudi (ATCC CCL-213) dòng tế bào ung thư hạch lympho CD19⁺ Burkitt (ATCC, Hoa Kỳ).

- Tế bào K562 (ATCC CCL-243) dòng tế bào ung thư bạch cầu mạn tính dòng tủy CD19(-).

- Tế bào CAR-T CD19RCD137/pSB (CAR-T2) là sản phẩm của đề tài nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia. Mã số KC 10.39/16-20.

- Tế bào CAR-T CD19RCD137-iCasp9-IL15/pSB (CAR-T4) là sản phẩm của đề tài nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia. Mã số KC 10.39/16-20.

- Tế bào PBMC làm nhóm chứng.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu thực nghiệm, mô tả cắt ngang có đối chứng.

* *Phương pháp, kỹ thuật, tiêu chuẩn sử dụng trong nghiên cứu:*

- Kỹ thuật nuôi cấy tế bào:

Lấy tít tế bào ung thư bạch cầu Daudi, 1D2 (tế bào K562 được chuyển nạp có CD19⁺) và chứng âm K562 CD19 (-) (mật độ tế bào 10⁶

tế bào/1 mL/tít) đang bảo quản ở -80°C trong FBS (10% DMSO) được làm ấm nhanh ở 37°C trong khoảng 1 phút. Sau đó, 20 mL môi trường RPMI 1640 (10% FBS) được bổ sung từ từ vào ống tế bào trước khi ly tâm ở 200 vòng trong 10 phút. Sau khi loại bỏ toàn bộ dịch nổi, cấy tế bào được hòa tan bằng môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (10% FBS, 37°C) nhằm đưa mật độ tế bào về 10⁵ tế bào/mL. Tế bào được nuôi trong chai T25 ở 37°C, 5% CO₂, độ ẩm > 90%, không lắc đến khi mật độ đạt 10⁶ tế bào/mL thì tiến hành cấy chuyển về 5×10⁵ tế bào/mL. Thay môi trường nuôi cấy 2 ngày/lần. Khi số lượng tế bào đủ lớn, thu hoạch tế bào và đếm số lượng tế bào thu được, điều chỉnh mật độ tế bào đạt các mật độ 10⁷ tế bào/mL.

- Phương pháp tách PBMC:

Máu tươi (đã xử lý chống đông) được pha loãng với PBS 1X (pH 7,2). Sau đó, máu được pha loãng 2 lần bằng PBS 1X trước khi được đặt lên trên Ficoll-Paque PREMIUM (ρ = 1,077g/mL) trong các ống falcon 50 mL (tránh trộn lẫn Ficoll với hỗn hợp máu - PBS). Mỗi ống falcon chứa 15 mL Ficoll và 30 - 33 mL máu đã pha loãng. Các ống falcon được ly tâm

tại 400g trong 35 phút (không sử dụng chế độ phanh). Sau khi ly tâm, lớp PBMC (nằm giữa plasma và Ficoll) được hút ra và hòa vào 40 mL PBS 1X (0,5% BSA; pH 7,2). Hỗn hợp trên được ly tâm lạnh và loại bỏ dịch 3 lần tại các chương trình ly tâm 350g, 10 phút; 160g, 15 phút và 300g, 10 phút. Dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn và sinh khối tế bào được hòa tan bằng 4 mL môi trường nuôi cấy RPMI, 10% FBS.

- Đánh dấu CFSE và đồng nuôi cấy CAR-T với các tế bào CD19⁺:

Một ngày trước khi thực hiện thí nghiệm, tế bào CAR-T được rẽ đông nhanh trong bể ổn định nhiệt 37°C, hòa tan trong 10 mL RPMI đã được làm ấm và ly tâm thu tế bào (300 vòng/phút trong 10 phút). Sau khi rửa hai lần với PBS 1X (ly tâm 300g trong 10 phút và loại bỏ dịch nổi), tế bào được hòa tan trong RPMI, 10% FBS về mật độ 10⁶/mL và được nuôi qua đêm trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂, độ ẩm > 90%.

Các dòng tế bào ung thư Daudi, 1D2 (CD19⁺) và K562 (chứng âm CD19⁻) được đánh dấu bằng CFSE thông qua sử dụng bộ kit Cayman 7-AAD CFSE cytotoxicity assay. Chuyển 10⁵ tế bào/mL vào giếng của đĩa 24-well.

Sau 30 phút bổ sung tế bào CAR-T hoặc PBMC (effector) được thu bằng

ly tâm và được bổ sung vào các giếng nuôi chứa tế bào ung thư CD19⁺ hoặc K562 (target) theo tỷ lệ target:effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10 với cỡ mẫu mỗi tỷ lệ n = 6. Hỗn hợp tế bào được nuôi trong tủ ấm 37°C, 5% CO₂, độ ẩm > 90% trước khi được phân tích bằng flow cytometry.

- Đánh giá khả năng li giải *in vitro* tế bào CD19⁺ của CAR-T:

Sau 6 giờ đồng nuôi cấy, thu tế bào và rửa 2 lần bằng PBS 1X, sau đó được nhuộm với 7-AAD 1X trong 100 μL PBS 1X, 0,1% BSA trong 30 phút ở 4°C. Sau khi ủ, tế bào được rửa bằng PBS 1X và hòa tan bằng 300 μL FACS Buffer và phân tích bằng máy BD FACS Lyric. Quần thể CFSE⁺ được chọn để đếm tỷ lệ tế bào sống chết, từ đó đánh giá khả năng li giải tế bào CD19⁺ của khối tế bào CAR-T ở các liều khác nhau.

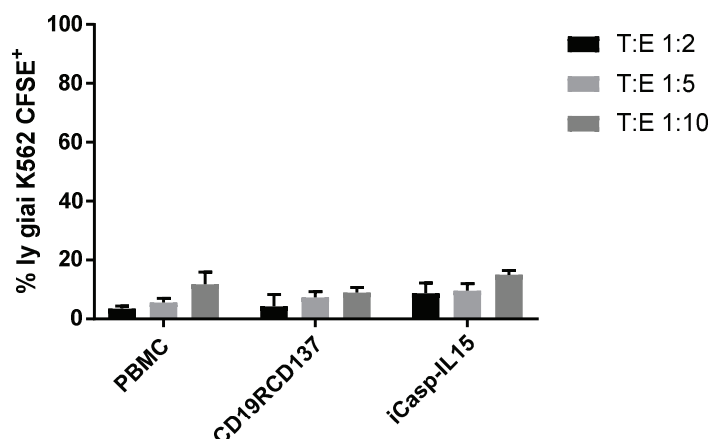
* *Xử lý số liệu*: So sánh trung bình của 2 nhóm độc lập bằng T-test, so sánh trung bình của 3 nhóm bằng phân tích phương sai ANOVA. Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS 20.0 và GraphPad Prism 6. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi p < 0,05.

3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được chấp thuận của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Bệnh viện Quân y 103 số 180/2021/CNChT-HĐĐĐ.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Đánh giá khả năng li giải tế bào K562 của tế bào CAR-T bằng đánh dấu CFSE



Hình 1. Tỷ lệ tế bào K562 CFSE⁺ bị li giải sau 6 giờ đồng nuôi cấy với PBMC hoặc CAR-T tại các tỷ lệ khác nhau.

Kết quả hình 1 cho thấy, tỷ lệ điều trị CAR-T/PBMC tăng thì tỷ lệ tế bào K562 chết cũng tăng lên. Ở tỷ lệ K562:CAR-T cao nhất là 1:10 thì tỷ lệ tế bào K562 CFSE⁺ chết sau 6 giờ đồng nuôi cấy nằm trong khoảng 8 - 15%, trong khi tỷ lệ này ở nhóm đồng nuôi cấy PBMC là chết 6 - 12%. Hiệu quả li giải giữa nhóm đồng nuôi cấy CAR-T và PBMC với tế bào K562 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Như vậy, CAR-T CD19RCD137 và iCasp9-IL15 không có khả năng li giải dòng tế bào K562 nguyên bản, không biểu hiện CD19 khác biệt so với nhóm chứng PBMC.

2. Đánh giá khả năng li giải tế bào CD19⁺ của tế bào CAR-T bằng đánh dấu CFSE

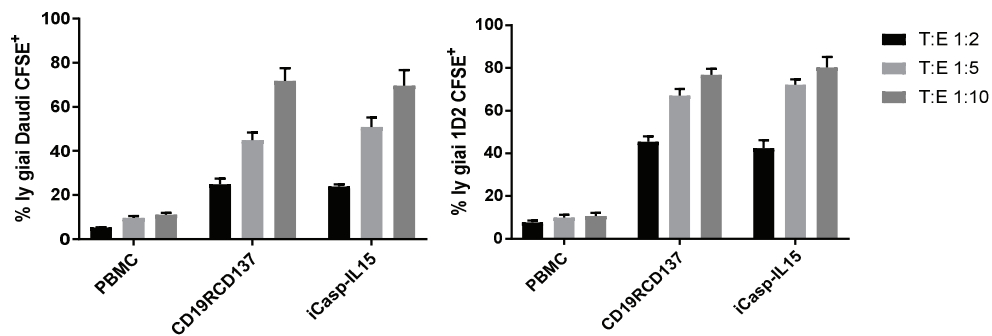
Hai dòng tế bào Daudi (CD19⁺) và 1D2 (CD19⁺) được sử dụng cho đánh giá khả năng li giải của tế bào CAR-T với tế bào ung thư CD19⁺.

Kết quả cho thấy: Ở cả 2 nhóm nuôi cấy đồng thời hai thể hệ CAR-T CD19RCD137/iCasp9-IL15 với tế bào Daudi/1D2 đều có tỷ lệ tế bào Daudi/1D2 chết (bị li giải) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm nuôi đồng thời PBMC và các tế bào trên ($p < 0,05$) (Hình 2, Hình 3).

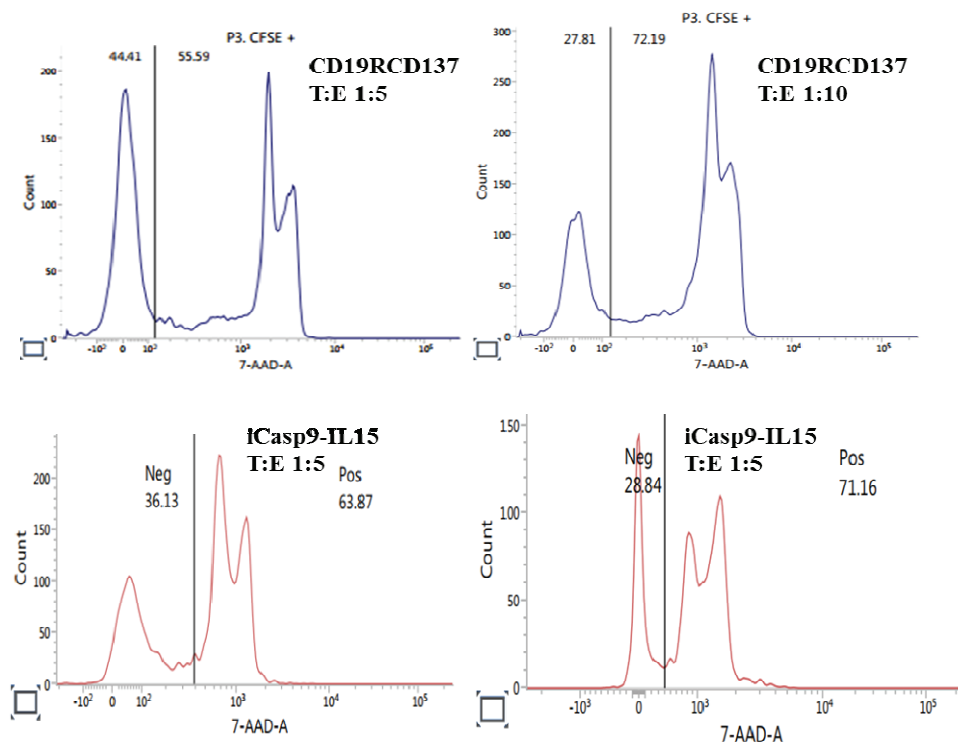
Mặt khác, tỷ lệ tế bào ung thư bị li giải tăng lên tương ứng với tỷ lệ đồng nuôi cấy CAR-T và tế bào CD19⁺ ($p < 0,05$).

Kết quả cũng cho thấy khả năng li giải tế bào CD19⁺ tương đương nhau giữa hai thể hệ tế bào CAR-T ($p > 0,05$).

Như vậy, hai thể hệ CAR-T CD19RCD137 và iCasp9-IL15 đều có khả năng li giải tế bào ung thư CD19⁺ và khả năng li giải tăng theo sự tăng của tỷ lệ CAR-T được đồng nuôi cấy với tế bào CD19⁺.



Hình 2. Tỷ lệ tế bào Daudi, 1D2 CFSE⁺ bị li giải sau 6 giờ đồng nuôi cấy với PBMC kích hoạt hoặc CAR-T tại các tỷ lệ khác nhau.



Hình 3. Hình ảnh đại diện khả năng li giải tế bào CD19⁺ (Daudi) của CAR-T.

BÀN LUẬN

Liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào T được biến đổi với thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) đã được chứng minh hiệu quả trong điều trị bệnh bạch cầu và u lympho kháng với hóa trị liệu. Các nghiên cứu lâm sàng gần đây đã cho thấy phản ứng tuyệt vời của tế bào CAR-T trong nhiều loại khối u tế bào B⁸⁻¹⁰.

Ung thư tế bào B đại diện cho một nhóm bệnh huyết học không đồng nhất, hầu hết đều đáp ứng với hóa trị liệu. Tuy nhiên, có rất nhiều bệnh nhân đã bị tái phát bệnh. Do đó, trước những khó khăn gặp phải trong điều trị bệnh nhân ung thư ác tính tế bào B tái phát, cần có những nỗ lực để phát triển các liệu pháp điều trị đặc hiệu hơn và ít độc hơn [11].

Sự biểu hiện CD19 bị hạn chế trong tất cả các giai đoạn phát triển của tế bào B và nó không được biểu hiện trong tế bào gốc tạo máu. CD19 là kháng nguyên lý tưởng do nó biểu hiện mạnh trên bề mặt tất cả các tế bào B nhưng lại không biểu hiện trong tế bào gốc tạo máu [12]. Hơn nữa, việc các tế bào B khỏe mạnh bị tiêu diệt do hiện tượng “nhắm đích ngoài khối u” có thể được xử lý bằng cách tiêm bổ sung kháng thể cho người bệnh. Đến nay, hầu hết các thử nghiệm lâm sàng tế

bào CAR-T điều trị ALL đều tập trung nhắm đích là thụ thể CD19.

Tế bào CAR-T trong nghiên cứu của chúng tôi có khả năng nhắm đích kháng nguyên CD19, liên kết với tế bào thông qua thụ thể này và gây li giải tế bào ung thư có biểu hiện CD19⁺.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi rất phù hợp với cơ chế này: Cả hai thể hệ CAR-T CD19RC137 và iCasp9-IL15 đều ít gây li giải tế bào CD19- nhưng đều có khả năng li giải rõ rệt tế bào ung thư CD19⁺. Mặt khác, khả năng li giải tăng theo sự tăng của tỷ lệ CAR-T được đồng nuôi cấy với tế bào CD19⁺.

Kết quả này là tiền đề quan trọng để tiếp tục thực hiện những nghiên cứu tiếp theo *in vitro* và *in vivo* để khẳng định tác dụng li giải và gây chết tế bào ung thư của khối tế bào CAR-T.

KẾT LUẬN

Tế bào CAR-T có khả năng li giải các dòng tế bào ung thư có CD19⁺ như tế bào Daudi và 1D2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: *GLOBOCAN sources and methods*. Oct 23 2018.

2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* Sep-Oct 2010;60(5):277-300.
3. Judith F, Steuber C, Poplack D. Acute lymphoblastic leukemia. *Principle and Practice of Pediatric Oncology.* 2005.
4. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal.* Jun 30 2017;7(6):e577. DOI:10.1038/bcj.2017.53
5. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol.* Oct 2018;53:164-181.
6. Mock U, Nickolay L, Philip B, et al. Automated manufacturing of chimeric antigen receptor T cells for adoptive immunotherapy using CliniMACS prodigy. *Cytotherapy.* Aug 2016;18(8):1002-1011. DOI:10.1016/j.jcyt.2016.05.009
7. Poorebrahim M, Sadeghi S, Fakhr E, et al. Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* Sep 2019;56(6):393-419. DOI:10.1080/10408363.2019.1633512
8. Casati A, Varghaei-Nahvi A, Feldman SA, et al. Clinical-scale selection and viral transduction of human naïve and central memory CD8+ T cells for adoptive cell therapy of cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* Oct 2013;62(10):1563-73. DOI:10.1007/s00262-013-1459-x
9. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest.* Sep 1 2016;126(9):3363-76. DOI:10.1172/jci86721
10. Wang L, Gong W, Wang S, et al. Improvement of in vitro potency assays by a resting step for clinical-grade chimeric antigen receptor engineered T cells. *Cytotherapy.* May 2019;21(5):566-578. DOI:10.1016/j.jcyt.2019.02.013
11. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* Oct 16 2014;371(16):1507-17. DOI:10.1056/NEJMoa1407222
12. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* Apr 18 2013;368(16):1509-1518.