

Effect of Anti-CD3/CD28 Dynabeads and Allogeneic PBMCs on Expansion of Anti-MUC1 Chimeric Receptor T Cells

Alireza Rajabzadeh¹,
Fatemeh Rahbarizadeh²,
Amir Ali Hamidieh³

¹ Assistant Professor, Department of Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

² Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Professor, Pediatric Stem Cell and Gene Therapy Research Center, Gene, Cell and Tissue Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received July 26 2021 ; Accepted February 9, 2022)

Abstract

Background and purpose: In recent years, immunotherapy using chimeric antigen receptor T cells (CAR T cells) has been considered as a novel and promising treatment for some diseases, especially cancer. The CAR T cell production is a multi-step, complex, time-consuming, and costly process. One of the most important steps in production of CAR T cells is expansion of these cells at appropriate numbers for injection. Therefore, the aim of this study was to investigate the methods of expansion for human CAR T cells in ex vivo.

Materials and methods: In this study, specifically engineered CAR T cells against the MUC1 tumor antigen were prepared. The cells were then treated with rIL-2, anti-CD3/CD28 Dynabeads, and allogeneic PBMC (Rapid expansion protocol (REP)) for 14 days.

Results: The results showed that using anti-CD3/CD28 antibodies in effective ratios; 1: 1 and 1: 3 (bead: cell) along with (IU100) rIL-2 resulted in a 27.5-fold increase in the number of cells. However, the use of rIL-2 alone or allogeneic PBMC eventually resulted in 4.5-fold increase and 9-fold increase, respectively.

Conclusion: Anti-CD3/CD28 in combination with rIL-2 can provide all three signals required for T cell activation and proliferation which can be a suitable alternative to costly and expensive cell proliferation techniques for animal or human CAR T cell studies.

Keywords: immunotherapy, CAR T cell, cell proliferation, cancer

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (207): 1-12 (Persian).

* **Corresponding Author: Fatemeh Rahbarizadeh-** Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
(E-mail: rahbarif@modares.ac.ir)

بررسی اثر anti-CD3/CD28 Dynabeads و allogeneic PBMCs بر میزان تکثیر سلول های T حاوی گیرنده کایمیریک علیه MUC1

علیرضا رجب زاده¹

فاطمه رهبری زاده²

امیرعلی حمیدیه³

چکیده

سابقه و هدف: در سال های اخیر ایمونوتراپی با استفاده از سلول های T مهندسی شده دارای گیرنده کایمیریک (CAR T cells)، به عنوان درمانی نوین و امیدبخش برای برخی بیماری ها بویژه سرطان مورد توجه قرار گرفته است. فرایند تولید سلول CAR T یک فرآیند چند مرحله ای، پیچیده، زمانبر و هزینه بر می باشد. یکی از مراحل مهم در تولید سلول CAR T تکثیر این سلول ها به میزان مناسب برای تزریق می باشد. از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی روش های تکثیر سلول های CAR T انسانی در شرایط برون تنی (ex vivo) بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه پس از تهیه سلول های مهندسی شده CAR T اختصاصی علیه آنتی ژن توموری MUC1، این سلول ها با استفاده از anti-CD3/CD28 Dynabeads و allogeneic PBMC (روش تکثیر سریع: REP) در مدت 14 روز تکثیر شده و با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد استفاده از آنتی بادی های anti-CD3/CD28 در نسبت های موثر 1:1 و 1:3 (بید:سلول) به همراه rIL-2 (100IU) منجر به افزایش 27/5 برابری در تعداد سلول ها شد، ولی استفاده از rIL-2 به تنهایی و یا allogeneic PBMC نهایتاً منجر به افزایش (به ترتیب) حدود 4/5 و 9 برابری شدند.

استنتاج: استفاده از anti-CD3/CD28 به همراه rIL-2 می تواند هر سه سیگنال مورد نیاز برای فعال سازی و تکثیر سلول های T را فراهم آورد، که می تواند جایگزین مناسبی برای روش های تکثیر پرهزینه و نیازمند تجهیزات گران سلول های CAR T برای مطالعات حیوانی و انسانی باشد.

واژه های کلیدی: ایمونوتراپی، CAR T cell، تکثیر سلولی، سرطان

مقدمه

سرطان ریه نتایج چشمگیری به همراه داشته است، اما هنوز بخش زیادی از انواع بیماران سرطانی با وجود استفاده از چنین درمان هایی دچار مرگ و میر می شوند (1). سلول درمانی با استفاده از سلول های T

در دو دهه اخیر ایمونوتراپی سرطان چشم انداز امیدبخشی در درمان بدخیمی های مقاوم به درمان های رایج بوجود آورده است. اگرچه ایمونوتراپی با کمک checkpoint inhibitor ها در درمان برخی سرطان ها و

E-mail: rahbarif@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: فاطمه رهبری زاده - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی

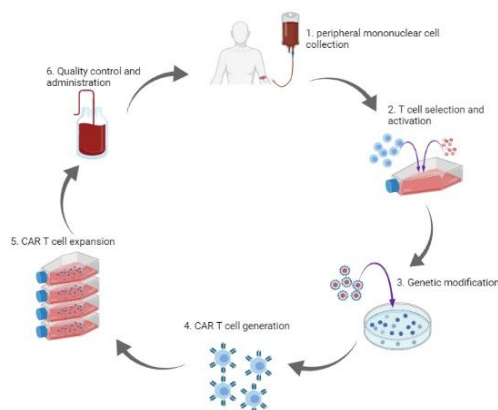
1. استادیار، گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

2. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3. استاد، مرکز تحقیقات سلول و ژن درمانی کودکان، پژوهشکده ژن، سلول و بافت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1400/5/4 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/6/20 تاریخ تصویب: 1400/11/20

دارد (5). بیان نابجا و بیش از حد MUC1 و همچنین ارتباط آن با تومورهای پیشرفته و با پیش آگهی ضعیف، این آنتی ژن را به عنوان انتخابی جذاب برای هدف گیری ایمنوترایی ها معرفی کرده است. لنفوسیت های T مهندسی شده علیه سلول های سرطان پستان بیان کننده MUC1 به وسیله فناوری CAR برای اولین بار توسط Scott Wilkie و همکاران ساخته شد (6). اخیراً، یک CAR جدید براساس یک آنتی بادی انسانی (E55)، که به طور خاص گلیکوفرم Tn(GalNAc1-O-Ser/Thr) مولکول MUC1 را شناسایی می کند، ساخته شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول های CAR T مبتنی بر E55 به طور قابل توجهی انواع سلول های سرطانی Tn-MUC1 را بیان می کنند، از جمله سلول های سرطان پستان، سلول های لوسمی و سلول های سرطان پانکراس مورد هدف قرار می دهند (6). تهیه، آماده سازی و تزریق این سلول ها شامل چند مرحله می باشد. 1) سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) از بیمار تهیه شده سپس این سلول ها می تواند به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفته و یا جهت استفاده بعدی ذخیره شوند. 2) در مرحله بعد لنفوسیت های T معمولاً با استفاده از آنتی بادی های CD3 و CD28 فعال می شوند. 3) سلول ها مهندسی ژنتیک شده تا ژن CAR مورد نظر را بیان کنند. 4) در نهایت جهت دستیابی به تعداد مناسب، سلول های مهندسی شده مورد تکثیر قرار گرفته و پس از فرمولاسیون به بیمار تزریق می شوند (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: تصویر شماتیک فرآیند CAR T cell therapy. کل

مهندسی شده علیه یک آنتی ژن یا chimeric antigen receptor (CAR) T cells ایمنوترایی جایگزین است که می تواند در درمان سرطان موثر باشد. اولین محصول مبتنی CAR T cell therapy در آگوست 2017 با عنوان تجاری Kymriah™ (tisagenlecleucel, CTL019) توسط شرکت Novartis مجوز FDA آمریکا را برای درمان کودکان و نبالغین مبتلا به B-Cell ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) (که به درمان های رایج مقاومند) و با هزینه 475 هزار دلار دریافت کرد. کم تر از دو ماه بعد در اکتبر سال 2017 دومین محصول مبتنی بر تکنولوژی CAR T cell نیز توسط FDA آمریکا مورد تأیید قرار گرفت. این محصول با نام تجاری Yescarta (axicabtagene ciloleucel) توسط شرکت Kite pharma برای درمان بالغین مبتلا به DLBCL (Diffuse Large B-cell lymphoma) (که به درمان های رایج مقاومند) معرفی گردید. هزینه درمان با این محصول 373 هزار دلار اعلام شده است. تا جولای سال 2021 نیز سه محصول دیگر برای درمان سرطان های خون توسط FDA تاییدیه دریافت کرده اند (2,3). در این نوع درمان سلول های T به نحوی مهندسی می شوند که یک گیرنده کایمریک شناسایی کننده یک آنتی ژن سرطانی خاص را بیان کنند. در واقع این گیرنده کایمریک بخشی از گیرنده طبیعی سلول T (TCR) بوده که به یک دومین (domain) شناسایی کننده آنتی ژن متصل شده است. این قطعه شناسایی کننده آنتی ژن معمولاً یک قطعه تک رشته ای (scFv) از یک آنتی بادی مونوکلونال و یا یک نانوبادی (VHH) می باشد (4). بنابراین سلول های CAR T علی رغم وجود TCR طبیعی می توانند آنتی ژن های سرطانی را توسط گیرنده کایمریک CAR خود بدون نیاز به اتصال MHC شناسایی کرده و مورد هدف قرار بدهند. Mucin-1 یا MUC1 یک گلیکوپروتئین بزرگ متصل به غشاء است که در اکثر سرطان های اپیتلیومی به ویژه سرطان پستان، سرطان لوزالمعده، کارسینوم ریه، مولتیپل میلوما و سرطان تخمدان بیان افزایش یافته ای

فرآیند شامل این مراحل است: 1. استحصال و جمع‌آوری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از بیمار. 2. جداسازی و فعال‌سازی سلول‌های T. 3. مهندسی ژنتیک سلول‌ها و انتقال گیرنده کایمیریک CAR (معمولاً از طریق وکتورهای ویروسی). 4. تولید سلول‌های CAR T cell. 5. افزایش و تکثیر سلول‌های مهندسی شده. 5. کنترل کیفیت و تزریق سلول‌های مهندسی شده به بیمار

این فرآیندها ممکن است از چند هفته تا چندماه به زمان نیاز داشته باشند. به‌ویژه مرحله تکثیر و فرمولاسیون سلول‌ها تا رسیدن به مقدار مناسب که آخرین و طولانی‌ترین مرحله است (7،8). میزان تکثیر سلولی، دوام فاز رشد سلولی و حتی ویژگی‌های محصول سلول T به‌دست آمده تا حد زیادی در طی فعال‌سازی سلول‌های T تعیین می‌شوند. در واقع در طی فعال‌سازی، سیگنال‌های تکثیر و تمایز به سلول‌های T القا می‌شوند (9). سلول‌های T برای فعال شدن به انتقال 3 سیگنال نیاز دارند: الف) تحریک ناشی از مجموعه گیرنده TCR که با اتصال به آنتی‌ژن منجر به انتقال سیگنال اول به داخل سلول می‌شود، ب) اتصال مولکول‌های کمک تحریکی مانند CD28 و CD137 به لیگندهای خود در سطح سلول‌های APC دارد و در صورت عدم وجود این سیگنال سلول‌های T آنرژیک خواهند شد و ج) سیگنال دریافت شده از اتصال سایتوکاین‌های تحریکی به‌ویژه IL-2 به گیرنده‌های خود در سطح سلول T. در بدن، مسئول ایجاد چنین سیگنال‌هایی برای لنفوسیت‌های T، سلول‌های حرفه‌ای تحت عنوان سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (Antigen presenting cells: APCs) می‌باشند (9).

از طرفی بیماران هدف سلول‌درمانی با واسطه سلول‌های CAR T معمولاً افرادی هستند که مقاوم به درمان‌های رایج بوده و در مرحله انتهایی بیماری قرار دارند، بنابراین دستیابی به مقدار مناسب سلول مهندسی شده در کوتاه‌ترین زمان ممکن یک ضرورت اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. از این رو در مطالعات مختلف از روش‌های مختلفی جهت افزایش نرخ تکثیر این سلول‌ها استفاده شده است. یکی از روش‌های رایج در سطح بالینی

استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونالی است که بتواند هم گیرنده TCR (سیگنال 1) و هم گیرنده مولکول‌های کمک تحریکی همچون CD28 (سیگنال 2) را فعال کنند. در این خصوص استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد CD3 و CD28 می‌تواند تا حدود 200 برابر تکثیر سلول‌های T را افزایش دهد (10). همچنین بکارگیری سلول‌های APC طبیعی و مصنوعی به صورت هم‌کشتی با سلول‌های T یکی دیگر از روش‌هایی است که جهت ایجاد سیگنال‌های تحریکی و تکثیر سلول‌های T مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از سلول‌های PBMC افراد هتروژن (11،12) و سلول‌های رده K562 (13،14) نیز از دیگر روش‌های فعال‌سازی سلول‌های T جهت ایجاد سیگنال‌های مورد نیاز می‌باشد که در پروتکل‌های تولید سلول CAR T مورد استفاده قرار می‌گیرد. از دیگر روش‌های نوین در این زمینه مطالعه‌ای است که توسط Zhang و همکاران انجام شد، در این مطالعه سلول‌های T توسط یک داربست سلیکونی که همچون یک APC عمل می‌کرد تا حدود 4 هزار برابر تکثیر پیدا کردند. آن‌ها هر سه سیگنال مورد نیاز فعال‌سازی را بر روی داربست قرار داده بودند (9). در مطالعه دیگری Steenblock و همکاران، ریز-ذراتی از جنس یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر ساختند که علاوه بر آزادسازی IL-2، آنتی‌بادی‌های ضد CD3 و CD28 را نیز در سطح خود داشتند و توانستند به عنوان یک APC مصنوعی موجب افزایش 45 برابری در تکثیر سلول‌های T شوند (15).

از این رو در مطالعه حاضر جهت بررسی، بهینه‌سازی و مقایسه دو روش رایج در تکثیر سلول‌های CAR T که در پروتکل‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند، سلول‌های T انسانی از خون محیطی جداسازی شده و پس از فعال‌سازی، با استفاده از وکتور لنتی‌ویروسی حاوی ترانژن CAR-MUC1 ترانسیدوس شدند. سپس برای تعیین روش مناسب تکثیر، سلول‌های مهندسی ژنتیک شده حاوی گیرنده کایمیریک CAR-MUC1 در معرض شرایط مختلف، شامل IL-2 یا بیدهای حاوی آنتی‌بادی

ویروس‌های تولید شده 24، 48 و 72 ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شده و جهت حذف ذرات سلولی توسط غشای 0.45 μm فیلتر شدند (Milipore). سپس ویروس‌ها با اولتراسانتریفیوژ محیط‌های فیلتر شده در شرایط $2000 \times g$ و به مدت 120 دقیقه (دمای 4 درجه سانتی‌گراد) تغلیظ شده و پس از حل مجدد آن‌ها در محیط کشت در دمای 80- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

جداسازی سلول‌های PBMC با فایکول

ابتدا 5 تا 10 میلی‌لیتر خون دریافت شده از داوطلب سالم در لوله‌های هپارینه جمع‌آوری شد. در یک فالتکون استریل خون جمع‌آوری شده با نسبت 2 تا 3 برابر حجم آن توسط PBS رقیق شد. در مرحله بعد مقدار 5 تا 15 میلی‌لیتر (بسته به میزان خون جمع‌آوری شده) فایکول خنک شده در یک فایکول استریل ریخته شد و خون رقیق شده به مقدار 2 برابر حجم آن (10 تا 30 میلی‌لیتر) از خون رقیق شده به آرامی به روی فایکول اضافه شد. سپس به مدت 30 تا 40 دقیقه در دور 400g سانتریفیوژ گردید تا لایه‌های مختلف پلاسما، سلول، فایکول و گلبول‌های قرمز تشکیل شوند. در مرحله بعدی پس از اسپره کردن لایه بالایی (پلاسما)، لایه توده ابری شکل (buffy coat) که حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای و لنفوسیت‌ها هستند، جدا گردیده و به یک فالتکون 15 جدید انتقال داده شدند. جهت حذف پلاکت‌ها و فایکول باقیمانده به سلول‌ها PBS اضافه شده (تا فالتکون پر شود) و در دور 300g به مدت 10 دقیقه دوباره سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ محیط رویی کاملاً دور ریخته شد و به پلت سلولی محیط RPMI 1640 اضافه گردیده و پیپتاژ شدند.

خالص‌سازی و فعال‌سازی سلول‌های T

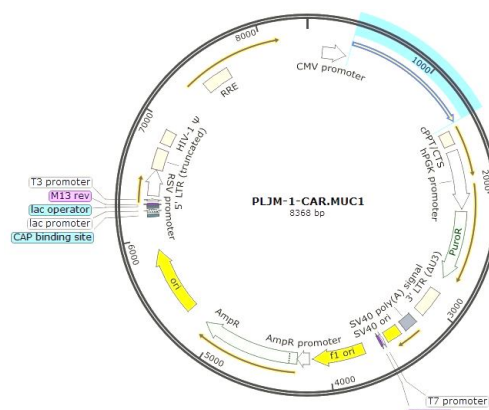
پس از شمارش سلول‌ها، جهت فعال‌سازی لنفوسیت‌های T مقدار مورد نیاز از بیدهای حاوی آنتی‌بادی CD3/CD28 (Dynabeads™ T-Activator) (CD3/CD28, Miltiney Biotech) برداشته شده و به

علیه CD3/CD28 و یا هم‌کشتی با allogeneic PBMC قرار گرفتند و در نهایت میزان افزایش تکثیر سلول‌ها طی مدت 14 روز مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

ساخت وکتور ویروسی حاوی ترانسژن CAR

برای تولید وکتورهای لنتی ویروس، سلول‌های رده 293T Lenti-X (خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران) توسط پلاسمید حاوی ترانسژن CAR VHH-anti-MUC1 که قبلاً تهیه شده بود (تصویر شماره 2) (4) به همراه پلاسمیدهای بسته‌بندی شامل pMD.G، pMDLg/pRRE و pRSV-Rev با استفاده از polyethyleneimine (PEI) ترانسفکت شدند.



تصویر شماره 2: نقشه وکتور PLJM-1. قسمت مشخص شده قطعه ژنی CAR-MUC1

بدین منظور، تعداد 10×10^6 سلول 293T Lenti-X در یک پلیت 10 سانتی‌متری کشت داده شده و پس از انکوباسیون سلول‌های در دمای 37 درجه و 5% CO₂ به مدت یک شب، مخلوط PEI:DNA با نسبت 1:1 و مقدار کلی DNA پلاسمیدی 15 میکروگرم جایگزین محیط کشت سلولی شده و به مدت 6 ساعت در انکوباتور CO₂ قرار گرفتند. سپس محیط رویی سلول‌ها برداشته شده و 10 میلی‌لیتر محیط کشت کامل (DMEM 10% FBS) به سلول‌ها اضافه شد.

یک میکروتیوپ 1/5 استریل منتقل شدند. پس از شستشو بیدها به وسیله PBS، سلول‌ها و بیدها در حجم‌های مورد نیاز برای مقدار نهایی یک میلیون سلول و با نسبت 1:1 یا 3:1 از bead:PBMC در پلیت 24 خانه کشت داده شدند. همچنین به محیط کشت مقدار 100 IU IL-2 اضافه گردید. 48 تا 72 ساعت بعد درصد سلول‌های T (CD3⁺) با فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ترانسداکشن سلول‌های T

ابتدا پلیت‌های 24 خانه با رتروکتین کوت شده و پس از اضافه کردن مقدار 0.5×10^5 سلول فعال شده، ویروس‌های حاوی قطعه ژنی anti-CAR-MUC1 که قبلاً تهیه و در دمای منفی 80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند با $MOI=10$ به آن‌ها اضافه گردید. پس از 30 دقیقه انکوباسیون در انکوباتور 37 درجه و 5 درصد CO₂، پلیت به روش spinoculation سانتریفیوژ شدند (در دور 800g و دمای 32 درجه به مدت 90 دقیقه). سپس سلول‌ها به آرامی پیپتاژ شده و به انکوباتور منتقل شدند. 72 ساعت بعد سلول‌ها برای تعیین میزان بیان سطحی رسپتور anti-CAR-MUC1 در سطح سلول‌های T با فلوسایتومتری بررسی شدند.

فلوسایتومتری

جهت تعیین بیان گیرنده کایمیریک حاوی ناحیه شناسایی کننده آنتی‌ژن VHH در سطح سلول‌های مهندسی شده از آنتی‌بادی goat anti-rabbit IgG کونژوگه شده با FITC و اختصاصی علیه VHH استفاده شد (Abcam). همچنین درصد سلول‌های T با استفاده از آنتی‌بادی mouse anti-human کونژوگه شده با APC و اختصاصی علیه CD3 تعیین شد (BD Pharmingen). همه نمونه‌ها توسط دستگاه BD FACSCanto II و نرم‌افزار FlowJo (v10) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تکثیر سلول‌های CAR T

جهت بررسی و مقایسه روش‌های تکثیر سلول‌های

T ما از سه روش رایج شامل استفاده از IL-2، allogenic PBMCs و anti-CD3/CD28 Dynabeads استفاده کردیم. ابتدا هر کدام از روش‌ها را با شرایط متفاوت بهینه کرده و در نهایت میزان افزایش تکثیر سلول‌ها در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم بوسیله تریپان بلو و dye exclusion انجام شد.

IL-2

در ابتدا به منظور بهینه‌سازی و بررسی تاثیر IL-2 در رشد و تکثیر سلول‌های T مهندسی شده، این سلول‌ها در معرض دوزهای متفاوتی از این اینترلوکین قرار گرفتند. دوزهای مورد استفاده 10 IU، 30 IU، 50 IU و 100 IU بودند.

Anti-CD3/CD28 Dynabeads

در این روش سلول‌های T مهندس شده با anti-CD3/CD28 Dynabeads به نسبت‌های مختلف و در گروه‌های (T cell:Bead) 1:1، 1:3، 1:5 و 1:10 مخلوط شده و در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با 10 درصد FBS و 100 IU IL-2 در پلیت 96 خانه کشت داده شدند.

Allogenic PBMCs

در این روش که به REP (Rapid expansion protocol) معروف است، سلول‌های T مهندسی شده در معرض 3 منبع PBMC متفاوت که از نظر تقسیم سلولی غیر فعال شده بودند، قرار گرفتند. غیرفعال‌سازی سلول‌ها با اشعه گاما (100 Gy) و در سازمان انرژی اتمی ایران انجام شد. پس از غیرفعال‌سازی سلول‌های PBMC، سلول‌های T جدا شده با نسبت‌های مختلف 1:1، 1:3، 1:5 و 1:10 (T cell:allogenic PBMC) هم‌کشتی شدند.

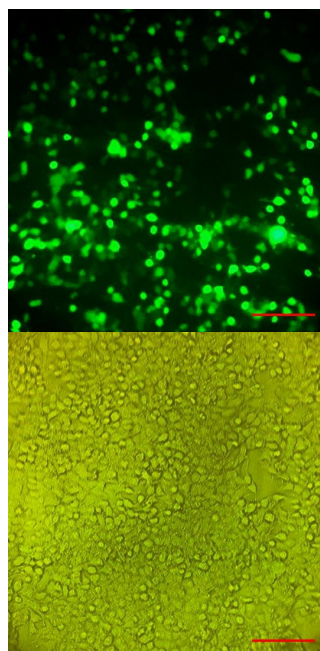
آنالیز آماری

داده‌های حاصل توسط ANOVA و Tukey's post hoc test و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism مورد آنالیز قرار گرفتند.

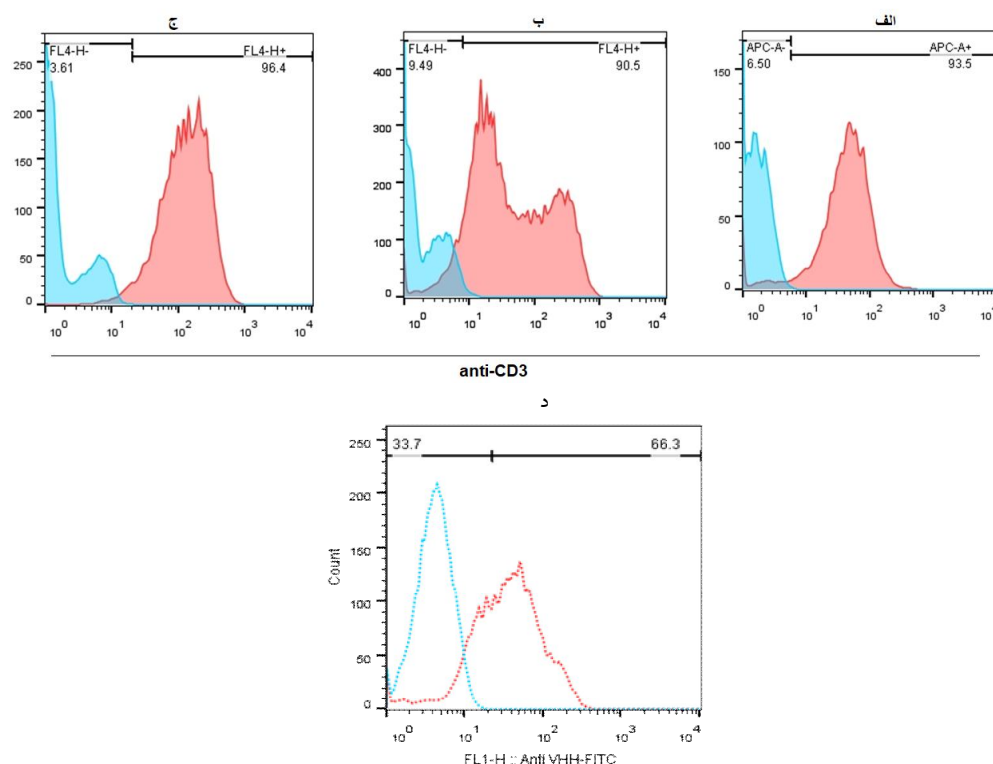
یافته ها

تهیه و آماده سازی سلول های مهندسی شده CAR T

جهت بهینه سازی و بررسی روش های تکثیر سلول های مهندسی شده در همه گروه ها پس از ترانسفکشن وکتورهای ویروسی (تصویر شماره 3) و تیمار لنفوسیت های ترانسداکت شده، در روزهای 3، 7 و 14 از نظر زنده ماندن، مورفولوژی و بیان مارکر سطحی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از بیان مارکر سطحی CD3 نشان داد که در هر سه روز مورد مطالعه بیش از 90 درصد سلول ها CD3 مثبت بوده، بنابراین صحت لنفوسیت های T را تایید می کرد. همچنین بیان مارکر سطحی VHH به عنوان ناحیه شناسایی کننده آنتی ژن گیرنده کایمریک CAR-MUC1 در روز 14 نشان داد حدود 66 درصد سلول ها، سلول های مهندسی شده CAR T می باشند (نمودار شماره 1).



تصویر شماره 3: تصویر فلوروسنت سلول های Lenti-X 293T ترانسفکت شده با PEI



نمودار شماره 1: فلوسایتمتری مارکر CD3 در روزهای سوم، هفتم و چهاردهم پس از تکثیر (الف، ب و ج) و تایید حضور سلول های مهندسی شده CAR T 14 روز پس از تکثیر (د)

بررسی میزان تکثیر با rIL-2

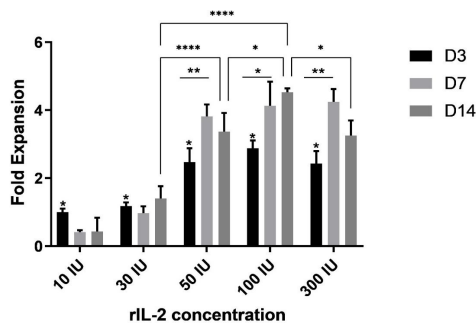
نتایج حاصل از تیمار سلول‌های T با دوزهای مختلف rIL-2 نشان داد که استفاده از دوزهای پایین تاثیر در افزایش تکثیر سلول‌ها بویژه در روزهای 7 و 14 ندارند. در صورتی که استفاده از دوزهای بالاتر باعث افزایش رشد و تکثیر این سلول‌ها می‌شوند. همان‌طور که در تصویر شماره 3 مشخص است تفاوت معنی‌داری بین دوزهای 100 IU، 50 IU و 300 IU در افزایش رشد و تکثیر سلول‌های T وجود ندارد. در روز سوم پس از تیمار بین گروه‌های 10 IU و 30 IU تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما افزایش معناداری در میزان رشد سلول‌ها در گروه‌های 50 IU، 100 IU و 300 IU با دو گروه ذکر شده مشاهده گردید. این در حالی بود که بین خود این سه گروه اخیر در روز سوم هیچ تفاوت معنی‌داری در خصوص میزان رشد و تکثیر سلول‌ها مشاهده نشد. برای روزهای هفتم و چهاردهم نیز نتایج مشابه مشاهده گردید. در روز هفتم هر یک از گروه‌های 50 IU، 100 IU و 300 IU افزایش معنی‌داری در میزان رشد و تکثیر نسبت به روز سوم همان گروه مشاهده شد، این در حالی بود که در همه گروه‌ها بین روز هفتم و چهاردهم افزایش معنی‌داری در رشد و تکثیر سلول‌ها مشاهده نشد (جدول شماره 1 و نمودار شماره 2).

بررسی میزان تکثیر با anti-CD3/CD28 Dynabeads

نتایج حاصل از هم‌کشتی سلول‌های T با نسبت‌های مختلف بیدهای anti-CD3/CD28 نشان داد که افزایش نسبت‌های بید به سلول تاثیر در افزایش رشد و تکثیر سلول‌ها در روز سوم نداشت. همچنین در همه گروه‌ها افزایش رشد و تکثیر سلولی در هفتم نسبت به روز سوم معنی‌دار بود. اما افزایش معنی‌دار میزان تکثیر در روزهای چهاردهم نسبت به روز هفتم فقط در گروه‌های 1:1 و 1:3 مشاهده گردید. در صورتی که گروه‌های 1:5 و 1:10 افزایش معنی‌داری را در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم نشان ندادند (جدول شماره 2 و نمودار شماره 3).

جدول شماره 1: میانگین نرخ افزایش تکثیر (fold expansion) در دوزهای مختلف rIL-2 و روزهای مختلف (Mean± S.D., P<0/05)

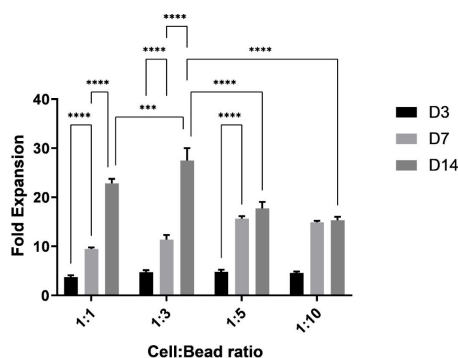
دوز	روز (انحراف معیار ± میانگین)		
	14	7	3
10 IU	0/433 ± 0/404	0/413 ± 0/055	1 ± 0/10
30 IU	1/40 ± 0/361	0/967 ± 0/20	1/18 ± 0/106
50 IU	3/36 ± 0/551	3/81 ± 0/351	2/47 ± 0/403
100 IU	4/52 ± 0/114	4/13 ± 0/702	2/88 ± 0/225
300 IU	3/25 ± 0/448	4/24 ± 0/380	2/42 ± 0/371



نمودار شماره 2: میزان افزایش تکثیر سلول‌های T مهندسی شده پس از تیمار با دوزهای مختلف rIL-2

جدول شماره 2: میانگین نرخ افزایش تکثیر (fold expansion) در نسبت‌های مختلف سلول‌های CAR T به anti-CD3/CD28 Dynabeads (Mean± S.D., P<0/05)

Cell:Beads	روز (انحراف معیار ± میانگین)		
	14	7	3
11	22/80 ± 0/944	9/43 ± 0/351	3/76 ± 0/351
13	27/51 ± 2/505	11/38 ± 0/935	4/73 ± 0/404
15	17/74 ± 1/291	15/66 ± 0/475	4/80 ± 0/458
110	15/66 ± 0/475	14/91 ± 0/303	4/56 ± 0/317



نمودار شماره 3: میزان افزایش تکثیر سلول‌های T مهندسی شده پس از تیمار با نسبت‌های مختلف anti-CD3/CD28 Dynabeads

بحث

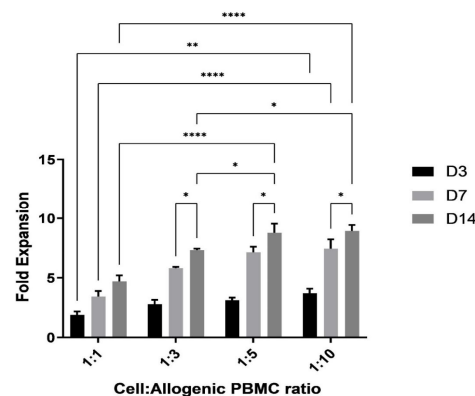
در طی فرآیند تولید سلول CAR T دو مرحله کلی مهم حائز اهمیت است: 1) تهیه و تکثیر وکتورها، تولید ویروس ها و انتقال ژن CAR به سلول های T، 2) رشد و تکثیر سلول های T به منظور دستیابی به مقدار قابل تزریق. در مطالعه حاضر ما به بررسی شرایط کشت و تکثیر سلول های T مهندسی و ارزیابی سه روش رایج در این خصوص و مقایسه آن ها با یکدیگر پرداختیم. در بررسی نتایج مشاهده شد هنگامی که از IL-2 به تنهایی (بدون توجه به مقدار دوز آن) استفاده شد. سلول ها از روز هفتم به بعد از نظر رشد و تکثیر متوقف شده و رشد خاصی نداشتند. به نظر می رسد این نتیجه ناشی از این موضوع باشد که برای فعالیت و تکثیر مداوم سلول های T وجود سه سیگنال طبیعی ناشی از تحریک گیرنده TCR (سیگنال 1)، کمک تحریکی (سیگنال 2) و سایتوکاین (سیگنال 3) ضروری باشد. عدم وجود دو سیگنال اول برای فعالیت و تکثیر سلول ها به نظر می رسد دلیل توقف رشد سلول ها در روز چهاردهم شده باشد. مطابق با یافته های ما در مطالعه ای که توسط Besser و همکاران انجام شد استفاده از دوزهای 10 IU و 20 IU منجر به تغییر خاصی در تعداد سلول های T نشد، ولی در دوزهای 120 IU و 600 IU سلول های T افزایش معنی داری در رشد و تکثیر نشان دادند. همچنین مطابق این مطالعه استفاده از IL-2 در دوز 120 IU و پایین تر منجر به توقف رشد در روزهای دهم تا دوازدهم شد که با نتایج حاصل از مطالعه ما سازگاری داشت. این در حالی بود که در دوز 600 IU تا روز چهاردهم افزایش تکثیر و رشد مشاهده شد (16). به نظر می رسد این تضاد در نتایج مربوط به نوع سلول انتخابی، شرایط کشت و scale شرایط کشت برای تکثیر باشد. در مطالعه ذکر شده از سلول های TILs (tumor infiltrated lymphocytes) به منظور تکثیر استفاده شد. این سلول ها در واقع سلول های عمل کننده در بافت توموری هستند که از قبل توسط سیستم ایمنی تحریک شده و هر سه سیگنال لازم را

بررسی میزان تکثیر پس از هم کشتی با سلول های PBMC آلورژنیک یا rapid expansion protocol (REP)

نتایج حاصل از هم کشتی سلول های T با نسبت های مختلف PBMC های آلورژنیک نشان داد که در روز سوم گروه 1:10 نسبت به گروه 1:1 افزایش معنی داری در میزان تکثیر و رشد سلول ها دارد، ولی نسبت به گروه های 1:3 و 1:5 این افزایش معنی دار نبود. در روز هفتم در گروه های 1:10 و 1:5 نسبت به گروه 1:1 افزایش معنی دار در میزان رشد و تکثیر سلول ها مشاهده شد. این در حالی بود که بین گروه های 1:5 و 1:10 و 1:3 تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. همچنین در روز چهاردهم نیز میزان افزایش تکثیر و رشد سلول ها نسبت به روز هفتم به جز در گروه 1:1 معنی دار بود. همچنین در گروه های 1:5 و 1:10 نسبت به گروه های 1:3 و 1:1 در روز چهاردهم افزایش میزان تکثیر معنی دار بود، در صورتی که بین خود گروه های 1:5 و 1:10 تفاوت معنی داری مشاهده نشد (جدول شماره 3 و نمودار شماره 4).

جدول شماره 3: میانگین نرخ افزایش تکثیر (fold expansion) در هم کشتی سلول های CAR T با PBMCs آلورژنیک در نسبت ها و روزهای مختلف (Mean $\pm$ S.D., P<0/05)

Cell:PBMCs	روز (انحراف معیار $\pm$ میانگین)		
	14	7	3
1:1	4/58 $\pm$ 0/554	3/60 $\pm$ 0/456	3/70 $\pm$ 0/382
1:3	7/32 $\pm$ 0/503	6/25 $\pm$ 0/468	2/79 $\pm$ 0/364
1:5	8/77 $\pm$ 0/480	7/60 $\pm$ 0/668	3/12 $\pm$ 0/215
1:10	8/92 $\pm$ 0/550	7/44 $\pm$ 0/790	3/81 $\pm$ 0/342



نمودار شماره 4: میزان افزایش تکثیر سلول های T مهندسی شده پس از هم کشتی با سلول های PBMC آلورژنیک در نسبت های مختلف

دریافت کرده‌اند. بنابراین احتمال دارد در صورتی که در مطالعه ما سلول‌های جدا شده از افراد سالم و بدون تحریک قبلی بودند. به علاوه در این مطالعه با افزایش دوز IL-2 تا 6000 IU تکثیر سلولی اتفاق افتاد، ولی در مطالعه ما افزایش دوز IL-2 از 100 IU به بالا منجر به تغییر خاصی در رشد و تکثیر سلول‌ها نداشت. در موافقت با نتایج ما در مطالعه دیگری که توسط Huang و همکاران انجام شد دوزهای بالای IL-2 (3000 IU) منجر به اثرات منفی بر سلول‌های T و تکثیر آن‌ها دارد (17).

ولی هنگامی که از بیدهای anti-CD3/CD28 همراه 100 IU IL-2 برای تکثیر سلولی استفاده شد، در نسبت‌های 1:1 و 1:3 سلول‌ها در روز چهاردهم نسبت به روز هفتم افزایش معنی‌داری داشتند که با توجه به مطالب گفته شده به نظر می‌رسد به دلیل حضور هر سه سیگنال (anti-CD3 سیگنال مجموعه TCR را راه می‌اندازد، anti-CD28 سیگنال کمک تحریکی را باعث می‌شود و IL-2 سیگنال سوم را ایجاد می‌کند) باعث رشد مداوم و پایدار سلول‌ها گردیده باشد. اما در نسبت‌های بالای بید به سلول این افزایش تکثیر در روز چهاردهم متوقف شده است. یک توضیح برای این پدیده ممکن است به دلیل تحریک بیش از حد سلول‌ها و خستگی آن‌ها رخ داده باشد. خستگی سلول‌های T همان‌طور که قبلاً ذکر شد هنگام در معرض مداوم قرار گرفتن سلول‌های T با آنتی‌ژن و در نتیجه تحریک‌های ممتد رخ می‌دهد. این وضعیت که خستگی می‌تواند مانع از تکثیر سلول‌ها شود در مطالعات متعددی مشاهده شده است (18، 19). توضیح دیگر درباره این توقف و یا کاهش تکثیر سلول‌های T این است که ممکن است بعضی از سلول‌ها تحت شرایطی به نام "مرگ سلولی القا شده توسط فعال شدن (Activation-induced cell death: AICD)" تحت شرایط طبیعی سلول‌های T ممکن است به محض شناسایی آنتی‌ژن به‌طور مکرر و طولانی از طریق مسیر Fas-FasL آپوپتوز شوند (20).

بررسی نتایج استفاده از سلول‌های آلورژنیک به

عنوان feeder به همراه IL-2 نشان داد که تکثیر سلول‌های T فارغ از استفاده نسبت‌های مختلف سلولی در روز چهاردهم افزایش معنی‌دار تعداد سلول نداشته است که این موضوع بیان‌گر غیرفعال شدن سلول‌ها در طولانی مدت می‌باشد. فرضیه‌ای که اینجا برای این نتیجه مطرح است به عدم وجود سیگنال دوم مربوط می‌شود. همان‌گونه که در بالا ذکر شد برای فعالیت طبیعی سلول T حضور سه سیگنال ضروری است. در شرایط طبیعی سیگنال دوم که از اتصال مولکول‌های کمک تحریکی به گیرنده‌های خود در سطح سلول‌های T منشا می‌گیرد، توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن (APCs) تامین می‌شود به نظر می‌رسد این سیگنال در این روش مورد مطالعه وجود نداشته و یا ناکارآمد بوده است. در مطالعه‌ای که توسط Foster و همکاران (21) انجام شد در نتایج مشابه نشان دادند هنگامی که سلول‌های T به همراه PBMC‌های آلورژنیک به عنوان feeder کشت داده می‌شوند تا روز هفتم سلول‌های T تقریباً 3 برابر نسبت به مقدار اولیه افزایش تعداد دارند ولی در روز چهاردهم این افزایش تکثیر نه تنها متوقف شده که تعدادی از سلول‌ها از بین رفته بودند.

نکته دیگری که در اینجا مطرح است عدم تاثیر افزایش نسبت سلول‌های feeder آلورژن به سلول‌های T است، بر خلاف روش قبلی که افزایش نسبت بید به سلول باعث توقف رشد سلول‌ها گردید. این نکته از این منظر اهمیت دارد که با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد سلول‌های feeder توانایی تحریک بیش از حد و در نتیجه خستگی سلول‌های T را ندارند و این مزیتی است که برای درمان‌های وابسته CAR T cell therapy اهمیت بالایی دارد. اما با این حال توانایی تحریک به رشد و تکثیر سلول‌های T توسط بیدها بسیار بیش‌تر از سلول‌های feeder آلورژن بود.

تهیه مقدار مناسب سلول در پروتکل‌های سلول درمانی همچون CAR T cell therapy یک ضرورت در دستیابی به نتایج مطلوب می‌باشد که خود موجب

مطالعه حاضر به همراه سیستم‌های نوین تکثیر سلولی می‌تواند کارایی دستیابی به مقادیر بیش‌تر سلول‌های CAR T و در مدت زمان کوتاه‌تر را افزایش دهد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی با شناسه اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1395.538 می‌باشد که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران مصوب شده است. همچنین این پژوهش توسط ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی با شناسه طرح Rep393 مورد حمایت قرار گرفت. بدین وسیله از زحمات سازمان‌های مربوطه تشکر و قدردانی می‌گردد.

کاهش زمان و هزینه تولید این سلول‌ها می‌شود. استفاده از anti-CD3/CD28 Dynabead به همراه دوز موثر IL-2 می‌تواند هر سه سیگنال مورد نیاز برای فعال‌شدن و تکثیر سلول‌های T را فراهم کند در نتیجه می‌تواند موجب افزایش تکثیر موثر در سلول‌های T مهندسی شده شود. اگرچه در سال‌های اخیر روش‌های پیشرفته‌تری همچون استفاده از بیوراکتورها، ظروف کشت با قابلیت کنترل گازهای ورودی و نیز سیستم CliniMACS® Prodigy جهت تکثیر سلولی معرفی شده‌اند، ولی فراهم کردن سیگنال‌های مورد نیاز برای فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های T همچنان مورد نیاز است. از طرفی روش‌های مذکور بسیار پرهزینه و گران هستند. استفاده از روش بهینه شده در

References

1. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JB. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Archiv* 2019; 474(4): 449-461.
2. Fiorenza S, Ritchie DS, Ramsey SD, Turtle CJ, Roth JA. Value and affordability of CAR T-cell therapy in the United States. *Bone marrow Transplant* 2020; 55(9): 1706-1715.
3. Guerrouahen B, Elnaggar M, Al-Mohannadi A, Kizhakayil D, Bonini C, Benjamin R, et al. Proceedings From the First International Workshop at Sidra Medicine: "Engineered Immune Cells in Cancer Immunotherapy (EICCI): From Discovery to Off-the-Shelf Development", 15th-16th February 2019, Doha, Qatar. *Front Immunol* 2020; 11: 589381.
4. Rajabzadeh A, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Salmani MK, Hamidieh AA. A VHH-Based anti-MUC1 chimeric antigen receptor for specific retargeting of human primary T cells to MUC1-positive cancer cells. *Cell Journal (Yakhteh)* 2021; 22(4): 502-513.
5. Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM, Graham R, Beatson R. Latest developments in MUC1 immunotherapy. *Biochem Soc Trans* 2018; 46(3): 659-668.
6. Wilkie S, Picco G, Foster J, Davies DM, Julien S, Cooper L, et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. *J Immuno* 2008; 180(7): 4901-4909.
7. Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global manufacturing of CAR T cell therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017; 4: 92-101.
8. Iyer RK, Bowles PA, Kim H, Dulgar-Tulloch A. Industrializing autologous adoptive immunotherapies: manufacturing advances and challenges. *Front Med* 2018; 5: 150.
9. Zhang DK, Cheung AS, Mooney DJ. Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds. *Nat Protoc* 2020; 15(3): 773-798.
10. Smith C, Økern G, Rehan S, Beagley L, Lee SK, Aarvak T, et al. Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS immune cell serum replacement. *Clin Transl Immunology*

- 2015; 4(1): e31.
11. Butler MO, Imataki O, Yamashita Y, Tanaka M, Ansén S, Berezovskaya A, et al. Ex vivo expansion of human CD8⁺ T cells using autologous CD4⁺T cell help. *PloS One* 2012; 7(1): e30229.
 12. Sadeghi A, Ullenhag G, Wagenius G, Tötterman TH, Eriksson F. Rapid expansion of T cells: Effects of culture and cryopreservation and importance of short-term cell recovery. *Acta Oncol* 2013; 52(5): 978-986.
 13. Zhang H, Snyder KM, Suhoski MM, Maus MV, Kapoor V, June CH, et al. 4-1BB is superior to CD28 costimulation for generating CD8⁺ cytotoxic lymphocytes for adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2007; 179(7): 4910-4918.
 14. Schmidts A, Marsh LC, Srivastava AA, Bouffard AA, Boroughs AC, Scarfò I, et al. Cell-based artificial APC resistant to lentiviral transduction for efficient generation of CAR-T cells from various cell sources. *J Immunother Cancer* 2020; 8(2): e000990.
 15. Steenblock ER, Fahmy TM. A comprehensive platform for ex vivo T-cell expansion based on biodegradable polymeric artificial antigen-presenting cells. *Mol Ther* 2008; 16(4): 765-772.
 16. Besser MJ, Schallmach E, Oved K, Treves A, Markel G, Reiter Y, et al. Modifying interleukin-2 concentrations during culture improves function of T cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2009; 11(2): 206-217.
 17. Huang J, Kerstann KW, Ahmadzadeh M, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA, et al. Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8⁺ T cells: importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer immunotherapy. *J Immunol* 2006; 176(12): 7726-7735.
 18. Long AH, Haso WM, Shern JF, Wanhainen KM, Murgai M, Ingaramo M, et al. 4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors. *Nat Med* 2015; 21(6): 581-590.
 19. Frigault MJ, Lee J, Basil MC, Carpenito C, Motohashi S, Scholler J, et al. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(4): 356-367.
 20. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003; 193(1): 70-81.
 21. Foster AE, Forrester K, Gottlieb DJ, Barton GW, Romagnoli JA, Bradstock KF. Lasrg-scale expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells in suspension culture. *Biotechnol. Bioeng* 2004; 85(2): 138-146.