ORIGINAL ARTICLE

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

Alireza Rajabzadeh[1],
Fatemeh Rahbarizadeh[2],
Amir Ali Hamidieh[3]

[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/C28 Dynadeads, 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)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و دوم شماره 207 فروردین سال 1401 (12-1)

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

علیرضا رجب زاده[1]
فاطمه رهبری زاده[2]
امیرعلی حمیدیه[3]

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر ایمونوتراپی با استفاده از سلول‌های T مهندسی شده دارای گیرنده کایمریک (CAR T cells)، به عنوان درمانی نوین و امیدبخش برای برخی بیماری‌ها بویژه سرطان مورد توجه قرار گرفته است. فرایند تولید سلول CAR T یک فرآیند چند مرحله‌ای، پیچیده، زمانبر و هزینه‌بر می‌باشد. یکی از مراحل مهم در تولید سلول CAR T تکثیر این سلول‌ها به میزان مناسب برای تزریق می‌باشد. از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی روش‌های تکثیر سلول‌های CAR T انسانی در شرایط برون‌تنی (ex vivo) بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از تهیه سلول‌های مهندسی شده CAR T اختصاصی علیه آنتی‌ژن تومووری MUC1، این سلول‌ها با استفاده از rIL-2، anti-CD3/C28 Dynadeads و allogeneic PBMC (روش تکثیر سریع: REP) در مدت 14 روز تکثیر شده و با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد استفاده از آنتی‌بادی‌های anti-CD3/CD28 در نسبت‌های موثر 1:1 و 1:3 (بید:سلول) به همراه rIL-2 (100IU) منجر به افزایش 27/5 برابری در تعداد سلول‌ها شد، ولی استفاده از rIL-2 به تنهایی و یا allogeneic PBMC نهایتا منجر به افزایش (به‌ترتیب) حدود 4/5 و 9 برابری شدند.

استنتاج: استفاده از anti-CD3/CD28 به همراه rIL-2 می‌تواند هر سه سیگنال مورد نیاز برای فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های T را فراهم آورد، که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های تکثیر پرهزینه و نیازمند تجهیزات گران سلول‌های CAR T برای مطالعات حیوانی و انسانی باشد.

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

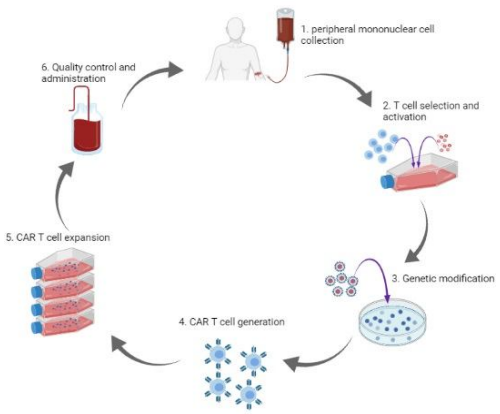
مقدمه

در دو دهه اخیر ایمونوتراپی سرطان چشم‌انداز امیدبخشی در درمان بدخیمی‌های مقاوم به درمان‌های رایج بوجود آورده است. اگرچه ایمونوتراپی با کمک checkpoint inhibitor ها در درمان برخی سرطان‌ها و سرطان ریه نتایج چشمگیری به‌همراه داشته است، اما هنوز بخش زیادی از انواع بیماران سرطانی با وجود استفاده از چنین درمان‌هایی دچار مرگ و میر می‌شوند(1). سلول درمانی با استفاده از سلول‌های T

مولف مسئول: فاطمه رهبری زاده - تهران: دانشگاه تربیت مدرس، ، دانشکده علوم پزشکی E-mail: rahbarif@modares.ac.ir
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

مهندسی شده علیه یک آنتی‌ژن یا chimeric antigen receptor (CAR) T cells یک نوع ایمونوتراپی جایگزین است که می‌تواند 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 نابالغین مبتلا به B-Cell ALL(Acute Lymphoblastic Lukemia) (که به درمان‌های رایج مقاومند) و با هزینه 475 هزار دلار دریافت کرد. کم‌تر 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) و توسط شرکت Kite pharma برای درمان بالغین مبتلا به DLBCL (Diffuse Larg B-cell lymphoma) (که به درمان‌های 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 سرطان‌های خون توسط FDA تاییدیه دریافت کرده‌اند(2،3). در این نوع درمان سلول‌های T به نحوی مهندسی می‌شوند که یک گیرنده کایمریک شناسایی‌کننده یک آنتی‌ژن سرطانی خاص را بیان کنند. در واقع این گیرنده کایمریک بخشی از گیرنده طبیعی سلول T (TCR) بوده که به یک دومین (domain) شناسایی‌کننده آنتی‌ژن متصل شده است. این قطعه شناسایی‌کننده آنتی‌ژن معمولا یک قطعه تک رشته‌ای (scFv) از یک‌آنتی‌بادی مونوکلونال و یا یک نانوبادی (VHH) می‌باشد(4). بنابراین سلول‌های CAR T علی‌رغم وجود TCR طبیعی می‌توانند آنتی‌ژن‌های 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 سرطان‌های اپیتلیومی به‌ویژه سرطان پستان، سرطان لوزالمعده، کارسینوم ریه، مولتیپل میلوما و سرطان تخمدان بیان افزایش یافته‌ای دارد(5). بیان نابجا و بیش ازحد MUC1 و همچنین ارتباط آن با تومورهای پیشرفته و با پیش‌آگهی ضعیف، این آنتی‌ژن را به عنوان انتخابی جذاب برای هدف‌گیری ایمنوتراپی‌ها معرفی کرده است. لنفوسیت‌های T مهندسی شده علیه سلول‌های سرطان پستان بیان‌کننده MUC1 به‌وسیله فناوری CAR برای اولین بار توسط Scott Wilkie و همکاران ساخته شد(6). اخیراً، یک CAR جدید براساس یک آنتی‌بادی انسانی (E5)، که به‌طور خاص گلیکوفرم Tn(GalNAca1-O-Ser/Thr) مولکول MUC1 را شناسایی می‌کند، ساخته شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های CAR T مبتنی بر E5 به طور قابل‌توجهی انواع سلول‌های سرطانی Tn-MUC1 را بیان می‌کنند، از جمله سلول‌های سرطان پستان، سلول‌های لوسمی و سلول‌های سرطان پانکراس مورد هدف قرار می‌دهند(6).

تهیه، آماده‌سازی و تزریق این سلول‌ها شامل چند مرحله می‌باشد. 1) سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) از بیمار تهیه شده سپس این سلول‌ها می‌توانند به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفته و یا جهت استفاده بعدی ذخیره شوند. 2) در مرحله بعد لنفوسیت‌های T معمولا با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD3 و CD28 فعال می‌شوند. 3) سلول‌ها مهندسی ژنتیک شده تا ژن CAR موردنظر را بیان کنند. 4) در نهایت جهت دستیابی به تعداد مناسب، سلول‌های مهندسی شده مورد تکثیر قرار گرفته و پس از فرمولاسیون به بیمارتزریق می‌شوند (تصویر شماره1).



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

فرآیند شامل این مراحل است: 1. استحصال و جمع‌آوری سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از بیمار 2. جداسازی و فعال سازی سلول‌های T 3. مهندسی ژنتیک سلول‌ها و انتقال گیرنده کایمریک CAR (معمولا 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(8،7). 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 لیگاندهای 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 عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen presenting cells: APCs) می‌باشند(9).

از طرفی بیماران هدف سلول‌درمانی با واسطه سلول‌های CAR T معمولا افرادی هستند که مقاوم به درمان‌های رایج بوده و در مرحله انتهایی بیماری قرار دارند، بنابراین دستیابی به مقدار مناسب سلول مهندسی شده درکوتاه‌ترین 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(12،11) و سلول‌های رده K562 (14،13) نیز از دیگر روش‌های فعال‌سازی سلول‌های T جهت ایجاد سینگنال‌های 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 سیلیکونی که همچون یک APC عمل می‌کرد تا حدود 4 هزار برابر تکثیر پیدا کردند. آن‌ها هر سه سینگال مورد نیاز فعال‌سازی را بر روی داربست قرار داده بودند(9). درمطالعه دیگری Steenblock و همکاران، ریز-ذراتی از جنس یک پلیمر زیست تخریب‌پذیر 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).

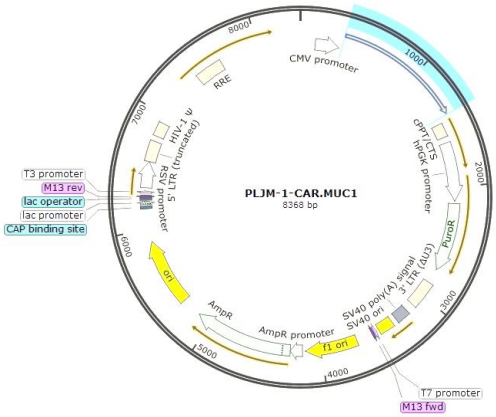
از این رو در مطالعه حاضر جهت بررسی، بهینه‌سازی و مقایسه دو روش رایج در تکثیر سلول‌های CAR T که در پروتکل‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند، سلول‌های T انسانی از خون محیطی جداسازی شده و پس از فعال‌سازی، با استفاده از وکتور لنتی‌ویرسی حاوی ترانسژن CAR-MUC1 ترانسدیوس شدند. سپس برای تعیین روش مناسب تکثیر،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

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 روش ها

ساخت وکتور ویروسی حاوی ترانسژن CAR

برای تولید وکتورهای لنتی‌ویروس، سلول‌های رده Lenti-X 293T (خریداری شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران) توسط پلاسمید حاوی ترانسژن CAR VHH-anti-MUC1 که قبلا تهیه شده بود (تصویر شماره 2) (4) به همراه پلاسمیدهای بسته‌بندی شامل pMDLg/pRRE، pMD.G 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 $10^6 \times 10$ سلول Lenti-X 293T در یک پلیت 10 سانتی‌متری کشت داده شده و پس از انکوباسیون سلول‌های در دمای 37 درجه و CO_2 5% 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 CO_2 قرار گرفتند. سپس محیط رویی سلول‌ها برداشته شده و 10 میلی‌لیتر محیط کشت کامل (DMEM 10% FBS) به سلول‌ها اضافه شد.

ویروس‌های تولید شده 24، 48 و 72 ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شده و جهت حذف ذرات سلولی توسط غشای um0/45 فیلتر شدند (Milipore). سپس ویروس‌ها با اولتراسانتریفیوژ محیط‌های فیلتر شده در شرایط g× 2000 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 فالکون 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 g400 سانتریفیوژ گردید تا لایه‌های مختلف پلاسما، سلول، فایکول و گلبول‌های قرمز تشکیل شوند. در مرحله بعدی پس از آسپیره کردن لایه بالایی (پلاسما)، لایه توده ابری‌شکل (buffy coat) که حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای و لنفوسیت‌ها هستند، جدا گردیده و به یک فالکون 15 جدید انتقال داده شدند. جهت حذف پلاکت‌ها و فایکول باقیمانده به سلول‌ها PBS اضافه شده (تا فالکون پر شود) و در دور g300 به مدت 10 دقیقه دوباره سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ محیط رویی کاملا 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 فعال سازی لنفوسیت‌های T مقدار مورد نیاز از بیدهای حاوی آنتی‌بادی CD3/CD28 (Dynabeads™ T-Activator CD3/CD28, Miltiney Biotech) برداشته شده و به

یک میکروتیوپ 1/5 استریل منتقل شدند. پس از شستشو بیدها به‌وسیله 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 100IU 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 رترونکتین کوت شده و پس از اضافه کردن مقدار $0/5\times10^5$ سلول فعال شده، ویروس‌های حاوی قطعه ژنی anti-CAR-MUC1 که قبلا 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 کایمریک 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، anti-CD3/CD28 Dynabeads و allogenic PBMCs 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 10IU، 30IU، 50IU و 100IU بودند.

Anti-CD3/CD28 Dynabeads

در این روش سلول‌های T مهندس شده با anti-CD3/CD28 Dynadeads 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 غنی‌شده با 10 درصد FBS و 100 IU rIL-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 غیرفعال سازیِ سلول‌های PBMC، سلول‌های T جدا شده با نسبت‌های مختلفِ 1:1، 1:3، 1:5 و 1:10 (T cell:allogenic PBMC) هم‌کشتی شدند.

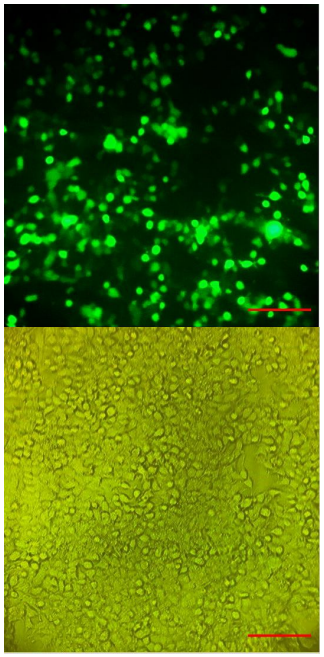
آنالیز آماری

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

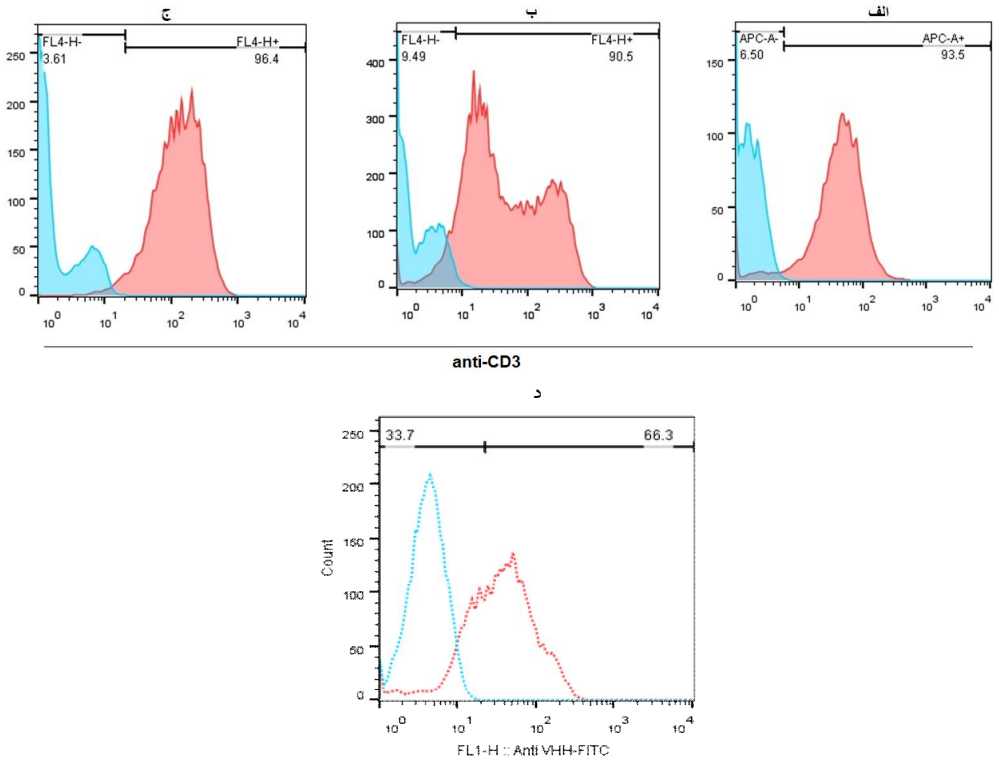
یافته ها

تهیه و آماده‌سازی سلول‌های مهندسی شده CAR T

جهت بهینه‌سازی و بررسی روش‌های تکثیر سلول‌های T مهندسی شده در همه گروه‌ها پس از ترانسفکشن وکتورهای ویروسی(تصویر شماره 3) و تیمار لنفوسیت‌های ترانسداکت شده، در روزهای 3، 7 و 14 از نظر زنده‌مانی، مورفولوژی و بیان مارکر سطحی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از بیان مارکر سطحیِ CD3 نشان داد که در هر سه روز مورد مطالعه بیش از 90 درصد سلول‌ها CD3 مثبت بوده، بنابراین صحت لنفوسیت‌های T را تایید می‌کرد. همچنین بیان مارکر سطحی VHH به عنوان ناحیه شناسایی‌کننده آنتی‌ژن گیرنده کایمریک CAR-MUC1 در روز 14 نشان داد حدود 66 درصد سلول‌ها، سلول‌های مهندسی شده CAR T می‌باشند (نمودار شماره 1).



تصویر شماره 3: تصویر فلوئورسنت سلول‌های Lenti-X 293T ترانسفکت شده با PEI



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

بررسی میزان تکثیر با rIL-2

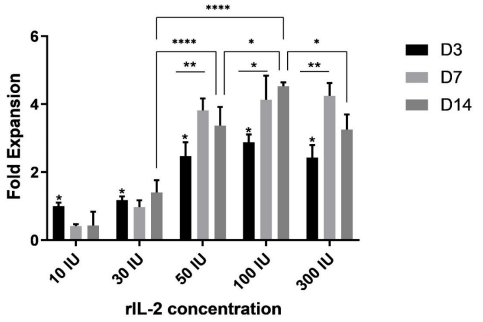
نتایج حاصل از تیمار سلول‌های T با دوزهای مختلف IL-2 نشان داد که استفاده از دوزهای پایین تاثیری در افزایش تکثیر سلول‌ها بویژه در روزهای 7 و 14 ندارند. در صورتی که استفاده از دوزهای بالاتر باعث افزایش رشد و تکثیر این سلول‌ها می‌شوند. همان‌طور که در تصویر شماره 3 مشخص است تفاوت معنی‌داری بین دوزهای IU 50، IU 100 و IU 300 در افزایش رشد و تکثیر سلول‌های T وجود ندارد. در روز سوم پس از تیمار بین گروه‌های IU 10 و IU 30 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما افزایش معناداری در میزان رشد سلول‌ها در گروه‌های IU 50 ، IU 100 و IU 300 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 IU 50 ، IU 100 و IU 300 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 Dynadeads

نتایج حاصل از هم‌کشتیِ سلول‌های T با نسبت‌های مختلف بیدهای anti-CD3/CD28 نشان داد که افزایش نسبت‌های بید به سلول تاثیری 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 معنی‌دارِ 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)

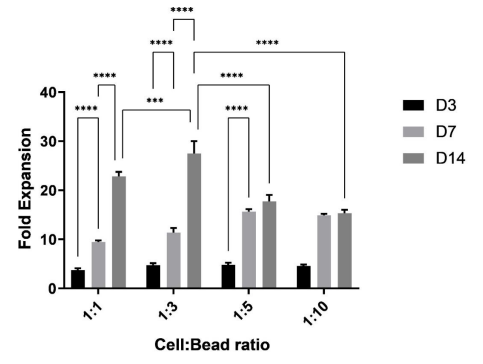
دوز	روز (انحراف معیار ± میانگین)		
	3	7	14
10 IU	1 ± 0/10	0/413 ± 0/055	0/433 ± 0/404
30 IU	1/18 ± 0/106	0/967 ± 0/20	1/40 ± 0/361
50 IU	2/47 ± 0/403	3/81 ± 0/351	3/36 ± 0/551
100 IU	2/88 ± 0/225	4/13 ± 0/702	4/52 ± 0/114
300 IU	2/42 ± 0/371	4/24 ± 0/380	3/25 ± 0/448



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 Dynadeads و روزهای مختلف (Mean± S.D., P<0/05)

Cell:Beads	روز (انحراف معیار ± میانگین)		
	3	7	14
1:1	3/76 ± 0/351	9/43 ± 0/351	22/80 ± 0/944
1:3	4/73 ± 0/404	11/38 ± 0/935	27/51 ± 2/505
1:5	4/80 ± 0/458	15/66 ± 0/475	17/74 ± 1/291
1:10	4/56 ± 0/317	14/91 ± 0/303	15/66 ± 0/475



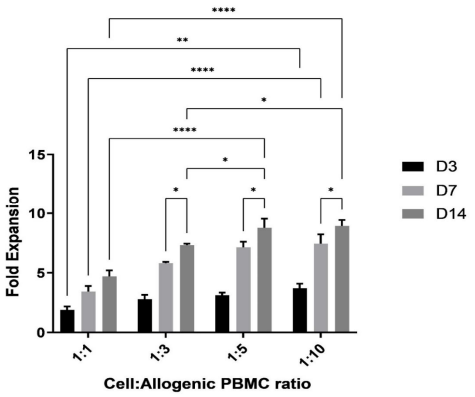
نمودار شماره 3: میزان افزایش تکثیر سلول های T مهندسی شده پس از تیمار با نسبت های مختلف anti-CD3/CD28 Dynadeads

بررسی میزان تکثیر پس از هم‌کشتی با سلول‌های PBMC آلوژنیک یا rapid expansion protocol (REP)

نتایج حاصل از هم‌کشتی سلول‌های T با نسبت‌های مختلف PBMCهای آلوژنیک نشان داد که در روز سوم گروه 1:10 نسبت به گروه 1:1 افزایش معنی‌داری در میزان تکثیر و رشد سلول‌ها دارد، ولی نسبت به گروه‌های 1:3 و 1:5 این افزایش معنی‌دار نبود. در روز هفتم در گروه‌های 1:10 و 1:5 نسبت به گروه 1:1 افزایش معنی‌دار در میزان رشد و تکثیر سلول‌ها مشاهده شد. این در حالی بود که بین گروه‌های 1:5 و 1:10 و 1:3 تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. همچنین در روز چهاردهم نیز میزان افزایش تکثیر و رشد سلول‌ها نسبت به روز هفتم به جز در گروه 1:1 معنی‌دار بود. همچنین در گروه‌های 1:5 و 1:10 نسبت به گروه‌های 1:3 و 1:1 در روز چهاردهم افزایش میزان تکثیر معنی‌دار بود، در صورتی که بین خود گروه‌های 1:5 و 1:10 تفاوت معنی‌داری 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 آلوژنیک در نسبت ها و روزهای مختلف (Mean± S.D., P<0/05)

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



نمودار شماره 4: میزان افزایش تکثیر سلول‌های T مهندسی شده پس از هم‌کشتی با سلول‌های PBMC آلوژنیک در نسبت‌های مختلف

بحث

در طی فرآیند تولید سلول CAR T دو مرحله کلی مهم حائز اهمیت است: 1) تهیه و تکثیر وکتورها، تولید ویروس‌ها و انتقال ژن CAR به سلول‌های T، 2) رشد و تکثیر سلول‌های T به‌منظور دستیابی به مقدار قابل تزریق.

در مطالعه حاضر ما به بررسی شرایط کشت و تکثیر سلول‌های T مهندسی و ارزیابی سه روش رایج در این خصوص و مقایسه آن‌ها با یکدیگر پرداختیم. در بررسی نتایج مشاهده شد هنگامی که از IL-2 به تنهایی (بدون توجه به مقدار دوز آن) استفاده شد. سلول‌ها از روز هفتم به بعد ازنظر رشد وتکثیر متوقف شده و رشد خاصی نداشتند. به نظر می‌رسد این نتیجه ناشی از این موضوع باشد که برای فعالیت و تکثیر مداوم سلول‌های T وجود سه سیگنال طبیعی ناشی از تحریک گیرنده TCR (سیگنال 1)، کمک‌تحریکی (سیگنال 2) و سایتوکاین (سیگنال 3) ضروری باشد. عدم وجود دو سیگنال اول برای فعالیت و تکثیر سلول‌ها به نظر می‌رسد دلیل توقف رشد سلول‌ها در روز چهاردهم شده باشد. مطابق با یافته‌های ما در مطالعه‌ای که توسط Besser وهمکاران انجام شد استفاده از دوزهای IU 10 و IU 20 منجر به تغییر خاصی در تعداد سلول‌های T نشد، ولی در دوزهای IU 120 و IU 600 سلول‌های T افزایش معنی‌داری در رشد و تکثیر نشان دادند. همچنین مطابق این مطالعه استفاده از IL-2 در دوز IU 120 و پایین‌تر 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 IU 600 تا روز چهاردم افزایش تکثیر و رشد مشاهده شد(16). به نظر می‌رسد این تضاد در نتایج مربوط به نوع سلول انتخابی، شرایط کشت و scale شرایط کشت برای تکثیر باشد. در مطالعه ذکر شده از سلول‌های TILs (tumor infiltrated lymphocytes) به منظور تکثیر استفاده شد. این سلول‌ها در واقع سلول‌های عمل‌کننده در بافت توموری هستند که از قبل توسط سیستم ایمنی تحریک شده و هر سه سیگنال لازم را

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 به 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 همان‌طورکه قبلا 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 آلوژنیک به عنوان feeder به همراه IL-2 نشان داد که تکثیر سلول‌های T فارغ از استفاده نسبت‌های مختلف سلولی در روز چهاردهم افزایش معنی‌دارِ 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 طبیعیِ 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 عرضه کننده 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 نتایجی مشابه نشان دادند هنگامی که سلول‌های T به همراه PBMCهای آلوژنیک به عنوان feeder کشت داده می‌شوند تا روز هفتم سلول‌های T تقریبا 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 آلوژن 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 آلوژن 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

کاهش زمان و هزینه تولید این سلول‌ها می‌شود. استفاده از Dynabead anti-CD3/CD28 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 سینگال‌های مورد نیاز برای فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های T همچنان مورد نیاز است. از طرفی روش‌های مذکور بسیار پر هزینه و گران هستند. استفاده از روش بهینه شده در مطالعه حاضر به همراه سیستم‌های نوین تکثیر سلولی می‌تواند کارایی دستیابی به مقادیر بیش‌ترِ 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.

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.