

Biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khảm đặc hiệu CD20 (CD20-CAR) trên bề mặt tế bào Jurkat T và đánh giá hoạt tính sinh học của nó

Võ Nguyễn Thanh Thảo, Chu Đào Xuân Trúc, Huỳnh Đàm Kim Tuyền, Phùng Thị Việt Anh, Nguyễn Đăng Quân*

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/11/2021; ngày chuyển phân biên 4/11/2021; ngày nhận phân biên 15/11/2021; ngày chấp nhận đăng 22/11/2021

Tóm tắt:

CD20 hiện đang là kháng nguyên mục tiêu được chú ý trong các hướng nghiên cứu điều trị ung thư máu liên quan tế bào B bằng liệu pháp miễn dịch. Nhiều kháng thể đơn dòng kháng CD20 như Rituximab, Ibritumomab, Tositumomab... đã được phát triển và ứng dụng trong điều trị. Những năm gần đây, liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào T biểu hiện thụ thể kháng nguyên dạng khảm (Chimeric antigen receptor - CAR) cho thấy nhiều tiềm năng trong điều trị và hiện đang được quan tâm nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, các tác giả tạo dòng và biểu hiện 2 phiên bản CAR đặc hiệu CD20 (CD20-CAR), bao gồm phiên bản tham khảo trình tự từ patent (SEQ01) và phiên bản nghiên cứu do nhóm tự thiết kế (SEQ02) trên bề mặt tế bào Jurkat T. Sau khi được chuyển nạp 24 giờ, các vector mang gen mã hoá CD20-CAR, tế bào Jurkat T có thể biểu hiện CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 ở mức độ mRNA và protein. Kết quả phân tích tế bào theo dòng chảy (FACS) cho thấy, CD20-CAR được biểu hiện trên bề mặt tế bào Jurkat T. Trong điều kiện đồng nuôi cấy với tế bào ung thư Raji B biểu hiện kháng nguyên CD20, tế bào Jurkat T biểu hiện CAR SEQ01 và SEQ02 được kích hoạt tăng tiết Interleukin 2 (IL-2). Kết quả cho thấy, nghiên cứu đã biểu hiện thành công đặc hiệu CD20-CAR trên tế bào Jurkat T và bước đầu ghi nhận có hoạt tính sinh học. Đây là cơ sở cho nghiên cứu tiếp theo tạo tế bào lympho T CD4⁺ và CD8⁺ biểu hiện CD20-CAR.

Từ khóa: CD20, liệu pháp miễn dịch, thụ thể kháng nguyên dạng khảm.

Chỉ số phân loại: 3.2

1. Đặt vấn đề

Ung thư là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong trên toàn thế giới, tại Việt Nam số mắc mới ung thư tăng khoảng 200.000 trường hợp mỗi năm. Trong những năm gần đây, CAR-T-cell là liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư mới nhiều triển vọng với ưu điểm vượt trội là sử dụng chính hệ thống miễn dịch của người bệnh để tiêu diệt các tế bào ung thư, đem đến hiệu quả điều trị đặc hiệu, an toàn cho người bệnh. Ở liệu pháp này, các tế bào T của bệnh nhân được thu nhận và can thiệp bằng công nghệ gen nhằm biểu hiện CAR đặc hiệu kháng nguyên ung thư trên bề mặt tế bào (CAR-T). Tế bào CAR-T được truyền trở lại cơ thể bệnh nhân, chúng có thể nhận biết chính xác và tiêu diệt tế bào ung thư thông qua các kháng nguyên ung thư [1, 2].

CAR là thụ thể tái tổ hợp có khả năng nhận diện đặc hiệu các kháng nguyên mục tiêu dựa trên nguyên tắc tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên. Thông qua CAR, tế bào T nhận diện trực tiếp tế bào ung thư mà không cần thông qua hệ thống phức hợp hòa hợp mô chủ yếu - MHC giúp tăng hiệu quả nhận diện và tiêu diệt tế bào ung thư. Cấu trúc điển hình của thụ thể này bao gồm vùng nhận diện kháng nguyên ngoại bào liên kết với vùng xuyên màng thông qua một trình tự peptide ngắn gọi là spacer/hinge, vùng xuyên màng sẽ liên kết với vùng hoạt hóa nội bào bên trong giúp hoạt hóa tế bào T [3].

Protein CD20 là phân tử mục tiêu chính trong các nghiên

cứu tạo tế bào CAR-T hướng đến ứng dụng trong điều trị bệnh ung thư máu liên quan tế bào B như bệnh lympho không Hodgkin tế bào B. CD20 biểu hiện ở tế bào B trưởng thành và tế bào B ung thư nhưng lại không biểu hiện ở tiền tế bào B và tế bào plasma tiết kháng thể, vì vậy, các liệu pháp nhắm đích CD20 không tác động đến quần thể tế bào B bình thường [4]. Kết quả từ các thử nghiệm lâm sàng đối với liệu pháp điều trị ung thư máu ác tính bằng CD20-CAR-T cho thấy rất triển vọng khi một số công bố thử nghiệm cho tỷ lệ khỏi bệnh đạt hơn 80% [5].

Ở nước ta, việc nghiên cứu và ứng dụng các phương pháp mới trong điều trị ung thư, trong đó có ung thư máu, hiện đang rất được quan tâm. Kế thừa các kết quả đạt được trong nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng kháng CD20, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tạo và bước đầu đánh giá hoạt tính của CD20-CAR trên tế bào Jurkat T nhằm tiếp cận hướng nghiên cứu mới trong điều trị ung thư bằng liệu pháp miễn dịch tế bào CAR-T [6].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Tế bào, chủng vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α được nuôi trong môi trường LB có bổ sung kháng sinh ampicillin (100 µg/ml).

Tế bào Jurkat T và Raji B (Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh cung cấp) được

*Tác giả liên hệ: Email: ndquan.snn@tphcm.gov.vn

Expression of CD20-specific chimeric antigen receptor (CD20-CAR) on Jurkat T cells and evaluation its biological activity

Nguyen Thanh Thao Vo, Dao Xuan Truc Chu,
Dam Kim Tuyen Huynh, Thi Viet Anh Phung,
Dang Quan Nguyen*

²Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 Highway 1, Quarter 2,
Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 November 2021; revised 15 November 2021; accepted 22 November 2021

Abstract:

CD20 is a potential target for immunotherapy treatments of haematological malignancies due to its specific expression and unique biological property. Over the years, many anti-CD20 monoclonal antibodies (mAbs) have been developed, such as Rituximab, Ibritumomab, Tositumomab, etc., and applied in B cells related to cancer treatments. Recently, a new immunological therapy, namely Chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy, in which the patient's T cells are reprogrammed ex vivo with a transgene encoding a CAR in order to active them against the tumour, has emerged as a promising treatment for B-cell malignancies. In this study, the authors generated and expressed two variants of chimeric receptor antigen-specific to CD20 on Jurkat T cells, in which one variant referenced the sequence from the patent (SEQ01) and the other was our own designed sequence (SEQ02). The transient expression after electroporation 24 hours confirmed the presence of mRNA and protein of CD20-CAR in both sequences. Moreover, these chimeric receptors were also detected on the membrane of Jurkat cells using flow cytometer analysis, indicating that the author could successfully transduce and express CD20-CAR in Jurkat cells. Co-culture CD20-Jurkat-CAR-T cells with CD20-expressing Raji B cells show that the generated Jurkat could be activated via their chimeric receptors through increasing the secretion of Interleukin-2 in both sequences. Taken together, our preliminary data suggest that the authors have been able to express the CD20-activating functional transgenic receptor on Jurkat cells, which will be applied for generating CD20-CAR-expressing CD4⁺/CD8⁺ T cells.

Keywords: CD20, chimeric antigen receptor, immunotherapy.

Classification number: 3.2

nuôi trong môi trường RPMI 1640 (Gibco) bổ sung 10% Fetal bovine serum (FBS, Sigma), 100 units/ml penicillin/streptomycin (Sigma). Tế bào được nuôi trong tủ ủ ở 37°C, 5% CO₂ và cấy truyền khi mật độ tế bào đạt hơn 90% không gian nuôi cấy.

2.2. Tạo dòng cassette CD20-CAR

Hai trình tự gen mã hóa cho CD20-CAR được thiết kế và đặt tổng hợp nhân tạo từ GENEWIZ: SEQ01 (1902 bp) và SEQ02 (1371 bp), trong đó, trình tự CD20-CAR SEQ01 được tham khảo từ patent số WO 2000023573A2 và trình tự CD20-CAR SEQ02 do nhóm tự thiết kế. Hai trình tự này được đồng hóa vào vector pcDNA3.3 bằng phương pháp TA, sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào *E. coli* DH5α và sàng lọc trong môi trường có ampicillin (100 µg/ml). Chọn dòng *E. coli* DH5α mang plasmid mong muốn và tiến hành giải trình tự. Các plasmid có trình tự gen tương đồng 100% với trình tự lý thuyết sẽ được sử dụng cho các bước tiếp theo.

2.3. Chuyển nạp plasmid mã hóa CD20-CAR vào tế bào Jurkat T

Các vector pcDNA3.3 mang cassette CD20-CAR (SEQ01, SEQ02) được chuyển nạp vào tế bào Jurkat T bằng phương pháp điện biến nạp sử dụng thiết bị ECM 630 (BTX). Ủ 4x10⁶ tế bào với 20 µg plasmid DNA trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, sốc điện với thông số 260 V, 1100 µF, 800 Ω và cuvette 4 mm. Tế bào sau khi điện biến nạp được nuôi trong môi trường RPMI 1640 bổ sung 10% FBS, penicillin/streptomycin, 37°C, 5% CO₂. Hiệu suất biến nạp được đánh giá thông qua mẫu biến nạp plasmid mang gen biểu hiện GFP bằng phương pháp phân tích tế bào theo dòng chảy.

2.4. Kiểm tra biểu hiện mRNA mã hoá CD20-CAR

Tế bào Jurkat T sau khi được chuyển nạp plasmid CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 sẽ được tách RNA bằng bộ kit (RNA purification kit, Thermo) và kiểm tra bằng phương pháp PCR (PCR Master Mix, Thermo) với 2 cặp mồi được thiết kế trong phạm vi trình tự gen mã hóa cassette CD20-CAR, 5'-ACTGGTTCTTCGATGTCTGGG-3', 5'-GAGGGTGTCTTGGGTTTTG-3' cho SEQ01 và 5'-GCTTCCGCTAATCAGTGCTTC-3', 5'-GATCTTGCTTCTGCTGGAA-3' cho SEQ02.

2.5. Kiểm tra biểu hiện protein CD20-CAR ở tế bào Jurkat T

Mẫu protein được hòa trong dung dịch Laemmli 4X có bổ sung β-mercaptoethanol, đun nóng ở 95°C, 5 phút, sau đó được phân tách trên gel polyacrylamide 10%. Protein từ gel sẽ được chuyển thấm lên màng nitro cellulose (GE). Màng GE lần lượt được khoá trong dung dịch TBST 5% sữa gầy, ủ với kháng thể sơ cấp kháng vùng CD3ζ (Abcam), sau đó ủ với kháng thể kháng IgG thô có gắn HRP (Thermo). Màng sau đó được ủ với cơ chất quang hóa Pierce ECL (Thermo) và đọc tín hiệu với hệ thống ImageQuant LAS 500 (GE). Kháng thể β-actin được sử dụng như chứng nội.

2.6. Kiểm tra biểu hiện protein CD20-CAR trên bề mặt tế bào Jurkat T

Tế bào Jurkat T đã được chuyển cassette CD20-CAR sau 48 giờ được thu nhận, rửa 2 lần với dung dịch PBS, 100 µl dịch huyền phù tế bào (2×10^6 tế bào/ml) được ủ với kháng thể có gắn FITC kháng vùng Fab của CD20-CAR (Sigma) trong điều kiện tránh sáng 30 phút, tế bào sau đó được rửa 3 lần với PBS để loại bỏ kháng thể tự do. Các mẫu tế bào sau khi ủ được phân tích bằng máy FACS Aria III-BD.

2.7. Kiểm tra hoạt động của CD20-CAR biểu hiện trên tế bào Jurkat T

Hoạt động của CD20-CAR trên tế bào Jurkat T được kiểm tra thông qua sự tiết IL-2 của Jurkat T khi tiếp xúc với tế bào Raji B biểu hiện CD20. Sự hiện diện của IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào được xác định bằng phương pháp ELISA sử dụng bộ kit IL-2 Human Elisa Kit (Thermo). Một cách ngắn gọn, 5×10^5 tế bào Jurkat T được điện biến nạp với các trình tự CD20-CAR SEQ01, SEQ02 và được nuôi cấy 48 giờ trong các giếng của đĩa 96 giếng. Các giếng tế bào Jurkat T được bổ sung 5×10^5 tế bào Raji B CD20⁺ và đồng nuôi cấy trong 24 giờ tiếp theo. Dịch nuôi cấy tế bào được ly tâm thu dịch nổi và 50 µl dịch nổi được cho vào mỗi giếng, bổ sung 50 µl kháng thể kháng IL-2, lắc nhẹ và ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ. Giếng được rửa và bổ sung 100 µl Streptavidin-HRP, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Giếng được rửa và bổ sung 100 µl dung dịch TMB, ủ trong tối 30 phút, ngừng phản ứng bằng 100 µl dung dịch ngừng phản ứng, đọc tín hiệu ở bước sóng OD 450 và 550 nm.

2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Kết quả được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và xử lý thống kê bằng phương pháp t-test, độ tin cậy 95%. Kết quả được cho là có sự khác biệt về mặt thống kê khi p-value < 0,05.

3. Kết quả

3.1. Thiết kế CD20-CAR

Cấu trúc cơ bản của CD20-CAR bao gồm 4 vùng: (1) Vùng nhận diện kháng nguyên scFV là vùng biến động của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD20 được liên kết với nhau bởi trình tự nối 15 axit amin ((Glyx4 - Ser)x3): VL-linker-VH; (2) Vùng bản lề: (Hinge); (3) Vùng xuyên màng: (TM); (4) Vùng hoạt tính nội bào. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế trình tự CD20-CAR (SEQ02) trong đó có kết hợp thêm một yếu tố đồng kích thích là domain 4-1BB (CD137). Bên cạnh đó, chúng tôi tổng hợp CD20-CAR (SEQ01) dựa trên bản quyền số WO 2000023573A2 như là một trình tự tham khảo đối chiếu. Sự giống và khác nhau giữa 2 trình tự được mô tả ở bảng 1.

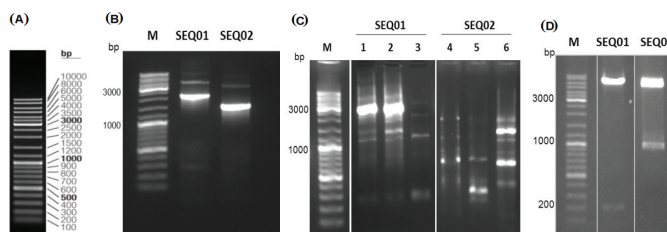
Bảng 1. Bảng so sánh các vùng trình tự của CD20-CAR SEQ01 và SEQ02.

Vùng domain	CD20-CAR-SEQ01 (phiên bản tham khảo đối chiếu)	CD20-CAR-SEQ02 (phiên bản nghiên cứu)
Trình tự tiết (Signal peptide)	Murine antibody CD20 kappa light chain	Kappa light chain of CD20 mAb [6]
Vùng nhận diện kháng nguyên (VLH)	Anti-CD20 Leu-16 hybridoma cell	CD20 mAb plasmid [6]
linker	Glycine-serine (18 aa)*	Glycine-serine (18 aa)*
Vùng bản lề (Hinge)	Human IgG1 Fc domain (Hinge-CH2-CH3)	Human IgG4 Fc domain (short Hinge 12 aa)
Vùng xuyên màng (TM)	CD4	CD28
Vùng hoạt tính nội bào 4-1BB		CD137
Vùng hoạt tính nội bào CD3 zeta chain	CD3 zeta chain (isoform 3)*	CD3 zeta chain (isoform 3)*

*: trình tự giống nhau.

3.2. Tạo dòng cassette CD20-CAR hoàn chỉnh vào vector pcDNA3.3

Sản phẩm PCR trình tự CD20-CAR SEQ01, SEQ02 được tạo dòng vào vector pcDNA3.3 bằng phương pháp TA (hình 1B). Kết quả kiểm tra PCR cho thấy, khuẩn lạc số 1 và 2 có sản phẩm PCR kích thước khoảng 1900 bp, tương ứng với kích thước của CD20-CAR SEQ01; khuẩn lạc số 6 có sản phẩm PCR kích thước khoảng 1400 bp, tương ứng với kích thước của CD20-CAR SEQ02 (hình 1C). Kết quả cắt plasmid thu nhận từ khuẩn lạc số 1 (SEQ01) với cặp enzyme BamHI-XbaI và khuẩn lạc số 6 (SEQ02) với cặp enzyme AgeI-BamHI cho thấy, cả 2 đoạn gen SEQ01 và SEQ02 đều được chèn vào đúng chiều khi cho sản phẩm cắt được 2 vạch có kích thước khoảng 200 và 1100 bp, tương ứng với sản phẩm cắt lý thuyết của cặp enzyme BamHI-XbaI và AgeI-BamHI (hình 1D). Kết quả giải trình tự cho thấy giống với trình tự lý thuyết 100%, như vậy, SEQ01 và SEQ02 (cassette CD20-CAR) đã được tạo dòng thành công vào vector pcDNA3.3.

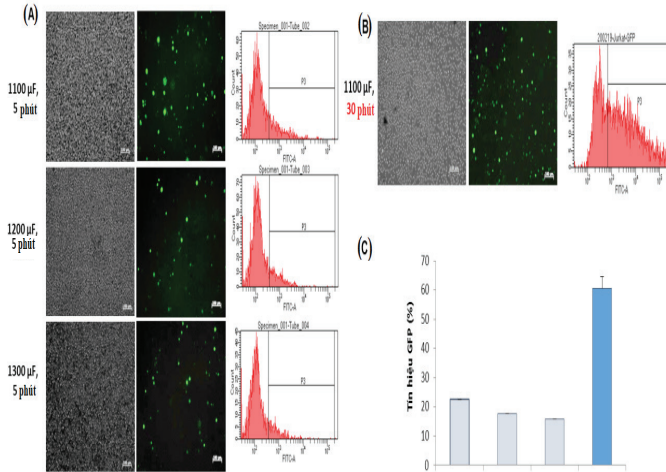


Hình 1. Tạo dòng SEQ01 và SEQ02 vào vector pcDNA3.3. (A) Kích thước thang DNA, #SM0331, Thermo; **(B)** PCR khuếch đại đoạn gen SEQ01, SEQ02; **(C)** PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5α được biến nạp với plasmid mang cassette SEQ01, SEQ02; **(D)** Kiểm tra sản phẩm cắt bằng enzyme cắt giới hạn.

3.3. Kết quả điện biến nạp chuyển plasmid CD20-CAR vào tế bào Jurkat T

Phương pháp điện biến nạp được sử dụng trong nghiên cứu này để chuyển plasmid mã hoá CD20-CAR vào tế bào Jurkat T. Để xác định điều kiện biến nạp thích hợp, chúng tôi sử dụng plasmid mã hoá protein GFP. Tế bào Jurkat T được ủ với plasmid DNA mã hoá GFP trong 5 phút trước khi thực hiện điện biến nạp với thông số 260 V, 800 Ω và thay đổi thông số điện dung (F): 1100, 1200 và 1300 µF. Kết quả phân tích FACS cho thấy, hiệu suất chuyển nạp plasmid GFP vào tế bào Jurkat T cao nhất đạt 22,5% tại giá trị điện dung là 1100 µF (hình 2A). Đáng chú ý, khi chúng tôi tăng thời gian ủ từ 5 lên

30 phút thì hiệu suất chuyển nạp tăng lên rõ rệt (đạt 62%) (hình 2B, 2C). Chúng tôi cho rằng, đây là hiệu suất khả quan có thể sử dụng để chuyển nạp CD20-CAR vào tế bào Jurkat T. Theo đó, chúng tôi sử dụng quy trình điện biến nạp với các thông số 260 V, 800 Ω , 1100 μ F và thời gian ủ DNA là 30 phút để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

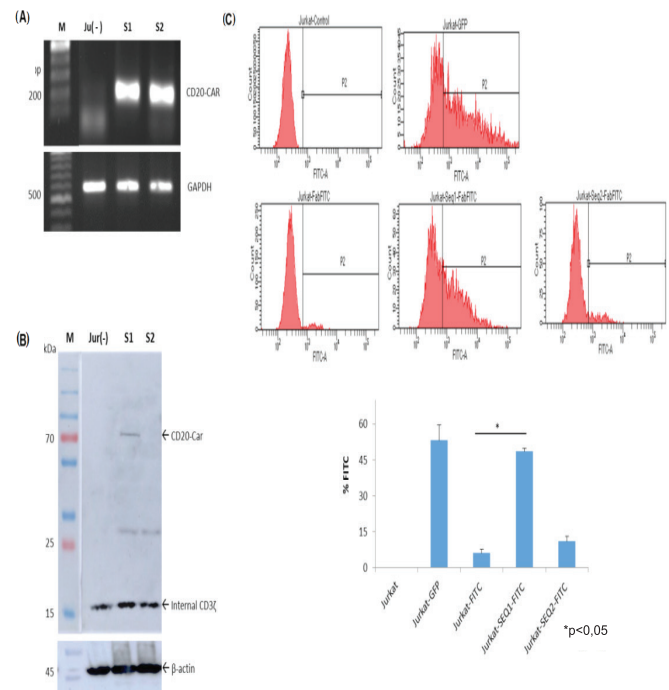


Hình 2. Quy trình điện biến nạp vào tế bào Jurkat T. (A) Quy trình điện biến nạp theo thông số 260 V, 800 Ω , thời gian ủ DNA 5 phút, thay đổi các thông số F tương ứng 1100, 1200 và 1300 μ F; (B) Quy trình điện biến nạp theo thông số 260 V, 800 Ω , 1100 μ F, thời gian ủ DNA 30 phút; (C) Đồ thị so sánh tỷ lệ tín hiệu huỳnh quang GFP của các quy trình.

3.4. Kiểm tra biểu hiện CD20-CAR trong tế bào Jurkat T

48 giờ sau khi biến nạp plasmid mang trình tự SEQ01 và SEQ02, sự biểu hiện của CD20-CAR mức độ mRNA và protein ở tế bào Jurkat T được kiểm tra bằng phương pháp PCR và western-blot. Kết quả phân tích RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu khuếch đại mRNA CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 cho thấy mRNA của 2 trình tự đều được biểu hiện ở tế bào Jurkat T (hình 3A). Tuy nhiên, phân tích western-blot dịch ly giải tế bào Jurkat T được biến nạp plasmid bằng kháng thể kháng vùng CD3 ζ chỉ phát hiện CD20-CAR SEQ01 có biểu hiện protein và không nhận thấy tín hiệu ở mẫu protein của SEQ02. Mặt khác, tín hiệu của CD3 ζ nội sinh và β -actin là như nhau ở 3 mẫu protein tế bào Jurkat T đối chứng và Jurkat T mang plasmid CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 (hình 3B). Như vậy, 2 plasmid CD20-CAR đã được biến nạp thành công vào tế bào Jurkat T và tế bào đã biểu hiện được protein CD20-CAR SEQ01.

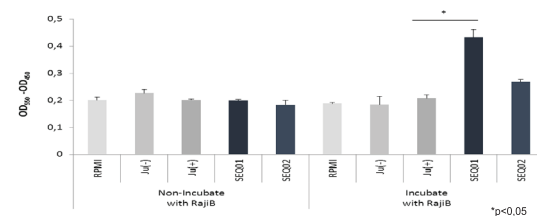
CAR chỉ có thể hoạt động một khi được biểu hiện đúng vị trí trên bề mặt tế bào T. Để xác định protein CD20-CAR có biểu hiện trên bề mặt tế bào Jurkat T hay không, chúng tôi tiến hành nhuộm tế bào đã được biến nạp plasmid mang SEQ01 và SEQ02 với kháng thể có gắn FITC kháng vùng Fab của CD20-CAR và phân tích FACS. Kết quả cho thấy, ở mẫu tế bào Jurkat T mang plasmid SEQ01, tỷ lệ tế bào có tín hiệu FITC cao hơn nhiều so với mẫu đối chứng Jurkat T không chuyển nạp plasmid (đạt khoảng 48%). Với mẫu tế bào Jurkat T mang plasmid SEQ02, tỷ lệ tế bào có tín hiệu FITC tăng nhẹ so với đối chứng (đạt khoảng 15%). Các kết quả này chứng tỏ, CD20-CAR đã được biểu hiện thành công trên bề mặt tế bào Jurkat T, mặc dù mức độ biểu hiện CD20-CAR của phiên bản nghiên cứu SEQ02 thấp hơn phiên bản đối chiếu SEQ01 khoảng 3,5 lần.



Hình 3. Kiểm tra biểu hiện CD20-CAR trong tế bào Jurkat. (A) Kiểm tra biểu hiện ở mức mRNA; (B) Kiểm tra biểu hiện ở mức protein; (C) Kiểm tra biểu hiện CD20-CAR trên bề mặt tế bào Jurkat T. Jurkat: mẫu tế bào đối chứng; Jurkat-GFP: mẫu tế bào đối chứng biến nạp GFP; Jurkat-FITC: mẫu tế bào đối chứng nhuộm bằng kháng thể đánh dấu FITC; Jurkat-SEQ1-FITC và Jurkat-SEQ2-FITC: mẫu tế bào biến nạp SEQ01 và SEQ02 nhuộm bằng kháng thể đánh dấu FITC.

3.5. Đánh giá hoạt tính sinh học của CD20-CAR

Sự liên kết giữa kháng nguyên CD20 và thụ thể đặc hiệu kháng nguyên CD20-CAR biểu hiện trên bề mặt tế bào sẽ kích hoạt các tế bào T này và một trong những dấu hiệu nhận biết đó là tế bào T tăng tiết IL-2. Kết quả đồng nuôi cấy tế bào Jurkat T biểu hiện CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 cùng với tế bào Raji B biểu hiện CD20 cho thấy, lượng IL-2 trong dịch đồng nuôi cấy tế bào Jurkat biểu hiện SEQ01 tăng rõ rệt so với trong dịch đồng nuôi cấy tế bào Jurkat đối chứng không biểu hiện thụ thể. Bên cạnh đó, dịch đồng nuôi cấy của tế bào Jurkat T biểu hiện SEQ02 cũng cho thấy có sự tăng biểu hiện nhẹ của IL-2 so với mẫu đối chứng, tuy lượng IL-2 biểu hiện vẫn thấp hơn so với CD20-CAR ở phiên bản đối chiếu SEQ01 khoảng 2 lần. Như vậy, CD20-CAR có khả năng kích hoạt tế bào Jurkat T thể hiện qua việc tăng tiết IL-2 (hình 4).



Hình 4. Sự tăng tiết IL-2 của tế bào Jurkat T biểu hiện thụ thể CD20-CAR khi được cảm ứng tiếp xúc với tế bào Raji B biểu hiện CD20. RPMI: mẫu môi trường không nuôi cấy tế bào; Ju(-): tế bào Jurkat; Ju(+): tế bào Jurkat T sốc điện; SEQ01 và SEQ02: tế bào Jurkat T biến nạp CD20-CAR SEQ01 và SEQ02.

4. Bàn luận

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về tế bào T biểu hiện CAR đã đạt được những kết quả quan trọng trong nghiên cứu cơ bản và đặc biệt là trong thử nghiệm lâm sàng. Việc biến đổi hay “huấn luyện” tế bào T giúp chúng có khả năng nhận diện chuyên biệt kháng nguyên ung thư thông qua các CAR đặc hiệu với kháng nguyên ung thư đó, CARs đã cho thấy những kết quả bất ngờ trong hiệu quả điều trị thông qua việc nhận diện kháng nguyên mà không phụ thuộc vào HLA hay phụ thuộc vào phức hợp tương thích mô MHC.

Hiện nay, CAR đã được nghiên cứu đến thế hệ thứ tư, chủ yếu khác nhau về các vùng kích thích nội bào và khả năng tiết cytokines. Các liệu pháp điều trị CAR-T được FDA công nhận hiện tại là dạng CAR-T thế hệ thứ 1 và rất nhiều các liệu pháp CAR-T thế hệ thứ 2 đang trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng [7-9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế và tạo 2 phiên bản CD20-CAR, trong đó SEQ02 là phiên bản do nhóm tự thiết kế và SEQ01 là phiên bản đối chiếu tham khảo từ trình tự của patent. Ngoài các trình tự giống với CD20-CAR SEQ01 như vùng linker và domain hoạt tính CD3 ζ , CD20-CAR SEQ02 mang vùng scFV là variable từ trình tự của kháng thể kháng CD20 Rituximab đã được công bố [6]. Khác với SEQ01, vùng Hinge của SEQ02 là đoạn ngắn chỉ bao gồm 12 axit amin tham khảo theo công bố của M. Hudecek và cs (2013) [10] cho thấy, các CAR mang vùng Hinge này có hoạt tính cao hơn so với CAR được thiết kế với các vùng Hinge dài hơn. Một điểm khác biệt là ngoài vùng CD3 ζ thì SEQ02 còn mang thêm 1 vùng hoạt tính 4-1BB từ CD137, với mong muốn SEQ02 sẽ có hoạt tính cao hơn so với SEQ01. Hai trình tự này được tạo dòng và chuyển nạp thành công vào tế bào Jurkat T. Phương pháp dùng virus và điện biến nạp thường được sử dụng trong chuyển nạp CAR-T, trong đó, điện biến nạp an toàn và tiết kiệm thời gian hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng hệ thống điện biến nạp BTX ECM 630 và thiết lập được điều kiện điện biến nạp cho tế bào T. Hiệu quả chuyển plasmid mã hoá GFP vào tế bào Jurkat T đạt hơn 60% khi sốc điện với các thông số 260 V, 800 Ω , 1100 μ F và thời gian ủ tế bào với DNA là 30 phút. Với kết quả khả quan này, quy trình có thể ứng dụng cho điện biến nạp plasmid CD20-CAR vào tế bào T tách từ máu sau này. Kết quả biến nạp CD20-CAR SEQ01 và SEQ02 cho thấy, cả 2 trình tự đều được chuyển thành công vào tế bào Jurkat T và có hoạt tính sinh học thông qua việc tăng lượng IL-2 tiết ra trong dịch nuôi cấy tế bào. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện và hoạt tính kích thích tế bào Jurkat T của CD20-CAR SEQ02 thấp hơn so với CD20-CAR SEQ01, điều này có thể do trình tự của SEQ02 chưa thật sự tối ưu làm hiệu quả biểu hiện protein CD20-CAR thấp. Cần tiếp tục nghiên cứu để nâng cao hiệu quả biểu hiện của CD20-CAR SEQ02.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết kế và tạo dòng thành công 2 phiên bản CD20-CAR, trong đó SEQ01 có trình tự mã hóa cho CD20-CAR tham khảo từ patent và SEQ02 do nhóm tự thiết kế. Cả 2 phiên bản SEQ01 và SEQ02 được chuyển vào tế bào Jurkat T bằng phương pháp điện biến nạp, trong đó CD20-CAR SEQ01 được biểu hiện thành công trên bề mặt tế bào T và thụ thể dạng khảm này cho thấy có hoạt tính kích hoạt Jurkat T tăng tiết IL-2. Các kết quả trên tế bào Jurkat T là tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo thực hiện trên tế bào lympho T thu nhận từ máu người, từng bước hướng đến xây dựng liệu pháp điều trị ung thư bằng tế bào CAR-T.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí sự nghiệp khoa học và công nghệ bởi Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn TP Hồ Chí Minh thông qua đề tài mã số YD01/18-20. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Fesnak, C.H. June, B.L. Levine (2016), “Engineered-T-cells-the-promise-and challenges of cancer immunotherapy”, *Nat. Rev. Cancer*, **16**, pp.566-581.
- [2] J. Hartmann, C.J. Buchholz, A. Bondanza, et al. (2017), “Clinical development of CAR T cells challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts”, *EMBO Mol. Med.*, **9**(9), pp.1183-1197, DOI: 10.1525/emmm.201607485.
- [3] G. Dotti, S. Gottschalk, B. Savoldo, et al. (2014), “Design and development of therapies using CAR-expressing T cells”, *Immunol. Rev.*, **257**(1), pp.107-126, DOI: 10.1111/imr.12131.
- [4] L. Wang, W. Qin, Y.J. Huo, et al. (2020), “Advances in targeted therapy for malignant lymphoma”, *Signal Transduct. Target.*, **5**, DOI: 10.1038/s41392-020-0113-2.
- [5] A. Martyniszyn, A.C. Krah, M.C. Andre, et al. (2017), “CD20-CD19 bispecific CAR T cells for the treatment of B-cell malignancies”, *Hum. Gene Ther.*, **28**(12), pp.1147-1158, DOI: 10.1089/hum.2017.126.
- [6] V.N.T. Thao, L.T.T. Le, C.D.X. Truc, et al. (2018), “Creating and evaluating the leukemia cell death activity of anti-CD20 monoclonal antibody”, *National Conference on Science and Biotechnology*, pp.689-695 (in Vietnamese).
- [7] B.G. Till, M.C. Jensen, J. Wang, et al. (2012), “CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results”, *Blood*, **119**(17), pp.3940-3950, DOI: 10.1182/blood-2011-10-387969.
- [8] H.M. Finney, A.N. Akbar, A.D.G. Lawson (2004), “Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: co-stimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR ζ chain”, *J. Immunol.*, **172**, pp.104-113.
- [9] C. Imai, K. Mihara, M. Andreansky, et al. (2004), “Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia”, *Leukemia*, **18**, pp.676-684, DOI: 10.1038/sj.leu.2403302.
- [10] M. Hudecek, M.T.L. Stanghellini, P.L. Kosasih, et al. (2013), “Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen receptor T-cells”, *Clin. Cancer Res.*, **19**(12), pp.3153-3164, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0330.