

Original Article

In vitro comparison of cytotoxicity of CD19 CAR-CIK and CD19 CAR-T cells

Moradi V.¹, Ranjbar A.², Omidkhoda A.¹, Ahmadbeigi N.²

¹Hematology and Blood Transfusion Science Department. School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Gene Therapy Research Center, Digestive Disease Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Despite the success of CAR-T cells in the treatment of hematologic malignancies, the use of allogeneic sources of T lymphocytes to produce these cells is associated with risk of GvHD. Cytokine induced killer (CIK) cells are a population with a lower risk of GvHD. Therefore, CAR-CIK cells can be evaluated as a potential alternative for CAR-T cells.

Materials and Methods

In this experimental study, after isolation and culture of mononuclear cells isolated from the peripheral blood of two healthy donors, T and CIK cells are transduced with CD19 gene containing lentiviral vector. On the 16th day of culture, to compare the cytotoxicity of CAR-T and CAR-CIK cells, these cells were co-cultured with CD19+ K562 target cells, and the death rate among the target cells was measured using a lactate dehydrogenase release assay kit. Student T-test, Anova and post-hoc Tukey were used for statistical analysis using Graph Pad prism software 8. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

In both CAR-CIK and CAR-T cell, CAR receptor caused a significant increase in cytotoxicity. So that no significant difference was observed between the cytotoxicity of CAR-T cells (67.8% $\pm$ 1.7) and CAR-CIK (65.1% $\pm$ 1.8).

Conclusions

CAR-CIK cells show a suitable *in vitro* cytotoxicity, so they can be considered as a potential alternative for CAR-T cells. However, more preclinical and clinical studies are needed to compare other effective dimensions in the function of these two cell types.

Key words: Chimeric Antigen Receptors, T Cells, Cytokine-Induced Killer Cells, Graft-Versus-Host Disease

Received: 5 Sep 2023

Accepted: 14 Nov 2023

Correspondence: Omidkhoda A., PhD of Hematology and Blood Transfusion. Associate Professor of School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences.

P.O.Box: 14177-44361, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82415227; Fax: (+9821) 88634118

E-mail: a-omidkhoda@tums.ac.ir

Correspondence: Ahmadbeigi N., PhD of Hematology and Blood Transfusion. Associate Professor of Gene Therapy Research Center, Digestive Disease Research Institute, Tehran University of Medical Sciences.

P.O.Box: 13135-14117, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82415227; Fax: (+9821) 8863411

E-mail: n-ahmadbeigi@tums.ac.ir

مقایسه میزان کشندگی سلول‌های CD19 CAR-T و CD19 CAR-CIK در محیط *in vitro*

وحید مرادی^۱، اعظم رنجبر^۲، آزاده امیدخدا^۳، ناصر احمدیگی^۴

چکیده

سابقه و هدف

علی‌رغم موفقیت‌های سلول‌های CAR-T در درمان بدخیمی‌های خونی، استفاده از منابع آلوژنیک لنفوسیت‌های T برای تولید این سلول‌ها با خطر ایجاد GvHD همراه است. سلول‌های CIK سلول‌هایی با خطر پایین GvHD می‌باشند؛ بنابراین سلول‌های CAR-CIK می‌توانند به عنوان جایگزینی بالقوه برای سلول‌های CAR-T مورد ارزیابی قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، پس از جداسازی و کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی دو اهداکننده سالم، سلول‌های T و CIK با استفاده از وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن *CD19 CAR* ترانسداکت شدند. در روز شانزدهم کشت برای مقایسه کشندگی سلول‌های CAR-T و CAR-CIK از هم‌کشتی این سلول‌ها با سلول‌های هدف CD19⁺ K562 استفاده شد و میزان مرگ در بین سلول‌های هدف با استفاده از کیت سنجش لاکتات دهیدروژناز اندازه‌گیری شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار Graph Pad Prism ورژن ۸ و تجزیه و تحلیل Student T-test و Anova و پست هاک Tukey استفاده شد و $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در هر دو گروه سلول‌های CAR-T و CAR-CIK گیرنده CAR موجب افزایش معنادار کشندگی سلول‌ها شد؛ به طوری که تفاوت معناداری بین قدرت کشندگی سلول‌های CAR-T ($67/8 \pm 1/7$) و CAR-CIK ($1/8 \pm 1/8$) مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

سلول‌های CAR-CIK در محیط *in vitro* کشندگی مناسبی را از خود بروز می‌دهند لذا می‌توانند به عنوان جایگزینی برای سلول‌های CAR-T مطرح باشند. با این حال مطالعه‌های بیشتری جهت مقایسه سایر ابعاد مؤثر در عملکرد این دو سلول مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی: Chimeric Antigen Receptors، سلول‌های T، سلول‌های کشنده القا شده با سیتوکین، بیماری پیوند علیه میزبان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۳

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - دانشکده علوم پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی - مرکز تحقیقات ژن درمانی - پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - دانشیار گروه هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - دانشکده علوم پیراپزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۷۷-۴۴۳۶۱

۴- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - دانشیار مرکز تحقیقات ژن درمانی پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۳۱۳۵-۱۴۱۱۷

مقدمه

لنفوسیت‌های T بیان‌کننده گیرنده آنتی‌ژنی دوگانه [Chimeric antigen receptor T cells (CAR-T cells)] در سال‌های اخیر به عنوان یکی از شاخه‌های ایمنی درمانی سرطان، موفقیت‌های چشمگیری را به خصوص در زمینه درمان بدخیمی‌های خونی لنفوسیت‌های B کسب کرده‌اند؛ به گونه‌ای که از سال ۲۰۱۷ تاکنون، هشت محصول مجوز عرضه بالینی را اخذ نموده‌اند (۱، ۲). CAR یک گیرنده صنعتی می‌باشد که در آن دامین خارج سلولی از ناحیه متغیر زنجیره یک آنتی‌بادی [single-chain variable fragment (scFv)] تشکیل شده است که توسط یک دامین غشاگذر به دامین‌های پیام‌رسان داخل سلول متصل می‌شود. دامین‌های پیام‌رسان داخل سلولی از نواحی پیام‌رسان زنجیره CD3 zeta و دامین کمک محرک (مانند CD28) تشکیل شده است (۳). بدین ترتیب این گیرنده اختصاصیتی مطابق با اختصاصیت ناحیه scFv به کار رفته خواهد داشت و برخلاف گیرنده سلولی درون‌زای لنفوسیت‌های T، قادر به شناسایی آنتی‌ژن‌های توموری بدون نیاز به عرضه آن‌ها توسط مولکول‌های سازگاری بافتی نسجی [major histocompatibility complex (MHC)] خواهد بود. این ویژگی سلول‌های CAR-T را قادر می‌سازد تا سلول‌های سرطانی را که با کاهش بیان سطحی مولکول‌های MHC خود را از دسترس لنفوسیت‌های T پنهان کرده‌اند، شناسایی کرده و از بین ببرند (۴).

تمامی CAR-T cell‌هایی که مجوز عرضه بالینی را دریافت کرده‌اند، از منبع اتولوگ تهیه می‌شوند. در این روش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیمار که حاوی لنفوسیت‌های T هستند از طریق لوکوفریز جداسازی می‌شوند. پس از کشت و فعال‌سازی این سلول‌ها در محیط کشت حاوی IL-2 و آنتی‌بادی‌های anti-CD3، anti-CD28 و anti-CD2، ژن بیان‌کننده CAR از طریق وکتورهای ویروسی/غیر ویروسی به سلول‌ها منتقل می‌شود. سپس سلول‌ها به مدت دو تا سه هفته در محیط کشت تکثیر می‌شوند تا به مقدار مناسب برای تزریق به بیمار برسند (۵). علی‌رغم تحویلی که سلول‌های CAR-T اتولوگ در درمان بدخیمی‌های لنفوسیت‌های B کسب کرده‌اند،

این روش با چالش‌های اساسی روبرو می‌باشد. این نوع از درمان به صورت یک روند شخصی‌سازی شده برای هر بیمار طی می‌شود که منجر به افزایش هزینه تولید محصول می‌شود، به طوری که هزینه هر بار تزریق این محصولات در آمریکا بین ۳۷۵۰۰۰ تا ۴۵۰۰۰۰ دلار می‌باشد (۶). از سوی دیگر این روش فرآیندی زمان‌بر است به طوری که سریع‌ترین فرآیند تولید مربوط به فرآورده Kymriah می‌باشد که تولید آن به ۱۹ تا ۲۰ روز زمان نیاز دارد. با توجه به این که این درمان عمدتاً برای بیمارانی که در مراحل نهایی بیماری قرار داشته و نسبت به سایر درمان‌ها مقاومت نشان داده‌اند استفاده می‌شود، این مسأله تأخیری بسیار بزرگ محسوب می‌شود، چرا که در طی فرآیند تولید ممکن است به علت پیشرفت بیماری بیمار فوت کرده و یا صلاحیت درمان را از دست بدهد (۷). امکان شکست فرآیند تولید و هم چنین امکان آلودگی محصول نهایی با سلول‌های بدخیم در طی انجام لوکوفریز از دیگر مشکلات این روش درمانی محسوب می‌شود (۸-۱۰).

با توجه به مشکلات مذکور استفاده از منابع آلونژیک لنفوسیت‌های T برای تولید سلول‌های CAR-T در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. لنفوسیت‌های T آلونژیک را می‌توان از خون محیطی اهداکنندگان سالم، سلول‌های بنیادی پر توان و خون بند ناف تهیه کرد (۱۱، ۱۲). با این حال استفاده از تمامی این منابع آلونژیک با دو مشکل اساسی روبرو می‌باشد: خطر ایجاد بیماری پیوند علیه میزبان [Graft versus (GvHD)] و پایداری پایین این سلول‌ها در محیط بدن به علت پاسخ‌های ایمنی میزبان (۱۳).

سلول‌های کشنده القاشده با سیتوکین (CIK cells): Cytokine induced killer cells (CIK cells) سلول‌هایی با فنوتیپ مخلوط لنفوسیت‌های T و سلول‌های کشنده طبیعی [Natural killer cells (NK cells)] هستند که در محیط آزمایشگاه با افزودن ترتیبی γ -Interferon (IFN)، IL-2 (Interleukin) و آنتی‌بادی anti-CD3 در طی زمان‌های مشخص از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی [Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)] تکثیر می‌شوند (۱۴). سلول‌های CIK جمعیت هتروژنی از

سلول‌هایی با چهار نوع فنوتیپ متفاوت می‌باشند که شامل جمعیت غالبی از سلول‌ها با فنوتیپ $CD3^+ CD56^+$ ، سلول‌های $CD3^+ CD56^-$ و درصد کمی از سلول‌های $CD3^- CD56^+$ و سلول‌های $CD3^- CD56^-$ می‌باشد (۱۵). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که استفاده از سلول‌های CIK آلونژیک در مقایسه با لنفوسیت‌های $\alpha\beta$ -T با خطر پایین‌تری از ایجاد GvHD همراه است (۱۶، ۱۷). هم‌چنین مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که با انتقال ژن *CAR* به سلول‌های CIK، این سلول‌ها قادر خواهند بود تا هم از طریق مکانیسم‌های وابسته به *CAR* و هم از طریق مکانیسم‌های مستقل از *CAR* (از طریق گیرنده‌های فعال‌کننده سلول NK مانند گیرنده NKG2D) به مقابله با سلول‌های بدخیم پردازند (۱۸).

با توجه به این که یک جایگزین مناسب برای سلول‌های *CAR*-T لازم است تا در عین خطر پایین GvHD از کشندگی قابل مقایسه‌ای با این سلول‌ها نیز برخوردار باشد، در این مطالعه یک بررسی *in vitro* اولیه جهت مقایسه قدرت کشندگی سلول‌های *CAR*-T و *CD19* و *CAR*-CIK در برابر سلول‌های K562 بیان‌کننده مولکول سطحی *CD19* صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و کشت سلول‌های T و CIK:

پس از اخذ فرم رضایت از دو اهداکننده سالم ۲۸ و ۳۸ ساله که دارای شمارش طبیعی گلبول‌های سفید خون بودند، به میزان ۲۰ میلی‌لیتر خون وریدی در ضد انعقاد K2EDTA گرفته شد. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی [Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)] از نمونه خون اهداکنندگان سالم از روش سانتریفیوژ گرادپان شیب غلظت با فایکول ۱/۰۷۷ (innova-train، آلمان) استفاده شد. برای کشت سلول‌های CIK ابتدا PBMC ها جهت حذف سلول‌های چسبنده به مدت سه ساعت در محیط Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (ایده زیست، ایران) فاقد سرم جنین گاوی [Fetal bovine serum (FBS)] کشت داده شدند. پس از

گذشت مدت زمان مذکور، سلول‌های غیرچسبنده جدا شده و به تعداد یک میلیون سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. به هر چاهک یک میلی‌لیتر محیط RPMI دارای FBS ۱۰٪ (دنازیست، ایران) و $IFN-\gamma$ (Miltenyi Biotech، آلمان) با غلظت ۱۰۰۰ U/mL افزوده شد. در روز بعد $IL-2$ (Miltenyi Biotech، آلمان) با غلظت ۳۰۰ IU/mL و آنتی‌بادی $anti-CD3$ OKT3 و آنتی‌بادی $anti-CD3$ OKT3 (Miltenyi Biotech، آلمان) با غلظت ۱۰۰ ng/mL به هر کدام از چاهک‌ها افزوده شد. چاهک‌ها هر روز بررسی شده و محیط هر چاهک هر دو تا سه روز با محیط تازه دارای FBS ۱۰٪ و $IL-2$ (۳۰۰ U/mL) تعویض شد. برای کشت لنفوسیت‌های T ابتدا PBMC های جدا شده از اهداکنندگان سالم به تعداد یک میلیون سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. به هر چاهک میزان یک میلی‌لیتر محیط TexMACS (Miltenyi Biotech، آلمان) حاوی FBS ۱۰٪، $IL-2$ با غلظت ۱۰۰ U/mL و بیدهای معنایسی Coat شده با آنتی‌بادی‌های $anti-CD3$ ، $anti-CD2$ و $anti-CD28$ (Miltenyi Biotech، آلمان) به تعداد نصف سلول‌های موجود در هر چاهک افزوده شد. سلول‌ها هر روز از نظر مورفولوژیک بررسی شده و محیط هر چاهک هر سه روز یک بار با محیط تازه حاوی FBS ۱۰٪ و $IL-2$ (۱۰۰ U/mL) تعویض شد.

تولید وکتور لنتی ویروسی:

برای تولید وکتور لنتی ویروسی از پلاسمیدهای psPAX2، pMD2G و پلاسمیدهای Transfer که در مطالعه پیشین گروه طراحی و به کار برده شده بودند استفاده شد (۱۹). لازم به ذکر است که در این مرحله از دو نوع پلاسمید transfer جهت تولید دو وکتور ویروسی متفاوت استفاده شد. پلاسمید Transfer اول که به صورت bicistronic دارای ژن‌های *CAR* و *GFP* بود و پلاسمید transfer دوم برای تولید وکتور ویروسی Mock که کاملاً مشابه پلاسمید Transfer اول بود به استثنای این که فاقد توالی کد کننده *CAR* بود. پلاسمیدهای مورد نظر با استفاده از حامل پلی‌اتیلن‌ایمین [polyethylenimine (PEI)] به درون سلول‌های LentiX 293T ترانسفکت شدند. در فواصل

سانتی‌گرا و CO_2 ۵٪ انکوبه شدند و پس از طی زمان مذکور، محیط حاوی سوپ ویروسی با محیط تازه دارای FBS ۱۰٪ و IL-2 تعویض شد.

ایمونوفنوتایپینگ سلول‌ها:

سلول‌های T و CIK در روز چهاردهم پس از کشت جهت بررسی بیان مولکول‌های سطحی سلول‌های T و CIK مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور هر کدام از جمعیت‌های سلولی به تعداد 1×10^5 عدد سلول در صد میکرولیتر PBS حاوی BSA ۳٪ حل شدند. سپس جمعیت‌های سلول‌های T با پنج میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های anti-CD3-perCP (BD Bioscience، آمریکا)، anti-CD4- (BD Bioscience، آمریکا) و anti-CD8-PE (BD Bioscience، آمریکا) و جمعیت‌های سلول‌های CIK با پنج میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های anti-CD3-perCP (BD Bioscience، آمریکا) و anti-CD56-PE (BD Bioscience، آمریکا) رنگ‌آمیزی شدند و با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibur مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین برای بررسی میزان ترانسداکشن سلول‌ها از سنجش میزان بیان پروتئین GFP در سلول‌های ترانسداکت شده با روش فلوسیتومتری استفاده شد. برای بررسی داده‌های فلوسیتومتری از نرم‌افزار Flow Jo استفاده شد.

تولید رده سلولی $CD19^+ K562$:

رده سلولی RAJI به عنوان منبعی با میزان بالای بیان CD19 محسوب می‌شود بنابراین در مطالعه حاضر از سلول‌های RAJI (مرکز ملی ذخایر ژنتیک، ایران) به عنوان منبع RNA ژن $CD19$ استفاده شد. برای این منظور در ابتدا RNA تام سلول‌های RAJI با روش Trizol/choloroform استخراج شد. در ادامه با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل (cdNA) (پیشگام، ایران) از RNA استخراج شده برای سنتز cdNA استفاده شد. برای تکثیر قطعه $CD19$ از cdNA سنتز شده آغازگرهای جلوبرنده و معکوس برای ایزوفرم سوم ژن $CD19$ طراحی شدند. هم‌چنین برای تعیین دمای بهینه واکنش از گرادیان دمایی بین ۶۷ تا ۷۱ درجه سانتی‌گرا برای مرحله آنیلینگ استفاده شد. توالی

زمانی ۲۴ ساعت، ۳۶ ساعت، ۴۸ ساعت و ۶۰ ساعت پس از ترانسفکشن، سوپ حاوی پارتیکل‌های ویروسی جمع‌آوری شده و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گرا با فیلتر پلی‌اترسولفون ۰/۴۵ μm فیلتر شد. در مرحله بعد جهت تغلیظ ویروس، از روش گرادیان سوکروز ۲۰٪ استفاده شد. به طور خلاصه در هر کدام از لوله‌های اولتراسانتریفیوژ به میزان یک دهم حجم سوپ ویروسی سوکروز ۲۰٪ ریخته شد و سپس سوپ ویروسی به آرامی به هر لوله افزوده شد، به طوری که یک محلول دو فازی در هر لوله ایجاد شد. در ادامه لوله‌ها با دور ۵۰۰۰۰ g و در دمای چهار درجه سانتی‌گرا به مدت سه ساعت سانتریفیوژ شدند. پس از حذف مایع روی رسوب ویروسی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر محیط TexMACS حل شده و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گرا ذخیره شد. در نهایت برای تعیین تیترو ویروس تغلیظ شده سلول‌های LentiX 293T پس از شمارش، با رقت‌های مختلف ویروس تغلیظ شده ترانسداکت شدند و با تعیین درصد سلول‌های آلوده شده (سلول‌های GFP^+)، تیترو ویروس تعیین شد.

ترانسداکشن سلول‌ها:

جمعیت سلول‌های T و CIK در روز سوم کشت هر کدام به سه گروه تقسیم شدند: گروه اول شامل سلول‌های ترانسداکت نشده (T و CIK)، گروه دوم شامل سلول‌های ترانسداکت شده با وکتور ویروسی حاوی CAR (CAR-T) و CAR-CIK و گروه سوم شامل سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس Mock (Mock T و Mock CIK). جهت ترانسداکشن سلول‌ها از ضریب آلوده سازی [multiplicity of infection (MOI)] ۵ استفاده شد. برای انجام ترانسداکشن پس از کشت سلول‌های T و CIK در یک پلیت ۲۴ خانه، حجم هر خانه به گونه‌ای تنظیم شد که پس از افزودن میزان مورد نیاز از سوپ ویروسی و محیط کشت، حجم نهایی به ۳۰۰ میکرولیتر برسد. به خانه‌های حاوی سلول‌های T و CIK ترانسداکت نشده نیز به ترتیب ۳۰۰ میکرولیتر محیط TexMACS و RPMI افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه

قطعه CD19 تکثیر شده استفاده شد. بدین منظور قطعه CD19 تکثیر شده و پلاسمید pCDH-EF1a-eFFly-eGFP هر دو توسط آنزیم‌های محدودکننده Not1 و Xba1 (NEB ، آمریکا) برش داده شده و سپس توسط آنزیم T4 DNA Ligase (Thermo Fisher، آمریکا) به هم متصل شدند.

آغازگرها، شرایط واکنش PCR و مواد مورد استفاده در واکنش PCR در جدول قابل مشاهده می‌باشد (جدول ۱). در مرحله بعد از پلاسمید pCDH-EF1a-eFFly-eGFP (Addgene ، آمریکا) دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین به عنوان پلاسمید پذیرنده برای کلون کردن

جدول ۱: توالی آغازگرها، شرایط واکنش و مواد مورد استفاده برای تکثیر قطعه cDNA از CD19

CD19-PCR-F: 5'-GCTCTAGACCCCGAGAGTCTGACCACC-3' CD19-PCR-R: 5'-AAATGCGGCCGCTCTGGTGCTCCAGGTGCCCAT-3'			توالی آغازگرها
۹۴ درجه سانتی‌گراد	۶۰ ثانیه	۱ چرخه	چرخه دمایی واکنش PCR
۹۴ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	۳۵ چرخه	
۶۷-۷۱ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه		
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۶۰ ثانیه		
۷۲ درجه سانتی‌گراد	۳۰۰ ثانیه	۱ چرخه	
۱۲/۵ میکرولیتر	Pfu 2X Master mix	مواد مورد نیاز برای انجام واکنش	
۱ میکرولیتر	Forward primer (10 μM)		
۱ میکرولیتر	Reverse primer (10 μM)		
۹/۵ میکرولیتر	Nuclease free water		
۱ میکرولیتر	cDNA diluted 1:2		
۲۵ میکرولیتر	حجم نهایی		

جدول ۲: توالی آغازگرها، شرایط واکنش و مواد مورد استفاده برای Colony PCR

Colony-PCR-CD19-F: 5'- GGCTCGCATCTCTCCTTCACG -3' Colony-PCR -CD19-R: 5'- CGA GAC CAG GTC AGC TGC TGA -3'			توالی آغازگرها
۹۵ درجه سانتی گراد	۶۰ ثانیه	۱ چرخه	چرخه دمایی واکنش PCR
۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه	۳۵ چرخه	
۶۳ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه		
۷۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه		
۷۲ درجه سانتی گراد	۳۰۰ ثانیه	۱ چرخه	
۲۵ میکرولیتر	Taq Master Mix (2X)	مواد مورد نیاز برای انجام واکنش	
۱ میکرولیتر	Forward primer (10 μM)		
۱ میکرولیتر	Reverse primer (10 μM)		
۲۳ میکرولیتر	Nuclease free water		
تک کلون	قطعه الگو		
۲۵ میکرولیتر	حجم نهایی		

CIK، Mock T، Mock CIK و سلول‌های T و CIK ترانسداکت نشده جمع‌آوری شدند تا میزان کشندگی آن‌ها در برابر سلول‌های CD19⁺K562 مورد ارزیابی قرار گیرد. به این منظور از کیت ارزیابی کشندگی بر اساس سنجش میزان رهائش لاکتات دهیدروژناز (LDH release cytotoxicity assay) شرکت Abcam استفاده شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت هر کدام از سلول‌ها در نسبت (effector: target (E:T ratio) ۱:۱، ۱:۵ و ۱:۱۰ با سلول‌های هدف (CD19⁺K562) در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند.

هر نسبت E:T به صورت تکرار سه تایی کشت داده شد تا میانگین حاصل از سه چاهک به عنوان عدد نهایی گزارش گردد. جهت حذف تداخل رهائش LDH از سلول‌های در حال آپوپتوز و LDH موجود در محیط کشت، سلول‌های effector (در هر سه نسبت ۱×، ۲× و ۱۰×)، سلول‌های هدف و محیط کشت فاقد سلول نیز به صورت تکرار سه تایی در پلیت کشت داده شدند تا میزان LDH آن‌ها اندازه‌گیری شده و از میزان LDH چاهک‌های تست کاسته شود تا تخمین صحیحی از میزان کشندگی سلول‌ها حاصل گردد.

سلول‌ها یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵٪ انکوبه شده و روز بعد بر اساس دستورالعمل کیت میزان مرگ در بین سلول‌های هدف در هر چاهک بر اساس میزان رهائش LDH از سلول‌ها اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه پلیت‌ها با دور ۲۰۰ g سانتریفیوژ شدند و ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک برداشته شد و پس از افزودن معرف‌های موجود در کیت جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری:

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار Graph Pad prism ورژن ۸ استفاده شد و $p < 0/05$ معنادار در نظر گرفته شد. برای مقایسه بین دو گروه از آزمایش student T-test و جهت مقایسه بین چند گروه از آزمایش ANOVA و پست هاک Tukey استفاده شد.

پلاسمید نو ترکیب حاصل با استفاده از شوک دمایی به داخل *E.coli* Stbl4 competent cell ها ترانسفرم شده و باکتری‌های ترانسفرم شده در محیط LB Agar (Thermo fisher، انگلیس) دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

پس از ۲۴ ساعت شش عدد از کلنی‌های رشد کرده بر روی پلیت (کلنی‌هایی که با موفقیت ترانسفرم شده و دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین بودند) انتخاب شده و برای Colony PCR مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). کلنی‌های به کار رفته برای Colony PCR به طور هم‌زمان در محیط LB broth (Thermo fisher، انگلیس) کشت داده شدند. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد از کیت استخراج پلاسمید (پیشگام، ایران) برای استخراج پلاسمید نو ترکیب از باکتری‌های رشد کرده استفاده شد.

برای تولید وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن CD19، پلاسمیدهای psPAX2، pMD2G و پلاسمید Transfer نو ترکیب با استفاده از PEI به درون سلول‌های LentiX 293T ترانسفکت شدند و مطابق مراحل ذکر شده در قسمت‌های پیشین سوپ ویروسی در فواصل معین جمع‌آوری شده و پس از تغلیظ تعیین تیتراژ شد. سلول‌های K562 در محیط RPMI + ۱۰٪ FBS کشت داده شده و دو مرتبه با فاصله زمانی ۷۲ ساعت با ضریب آلوده‌سازی (MOI) ۳ ترانسداکت شدند. ۷۲ ساعت پس از دومین ترانسداکشن، سلول‌های K562 برای بررسی بیان CD19 و GFP مورد ارزیابی قرار گرفتند. به این منظور در هر نوبت 1×10^5 سلول در بافر فسفات (کالا زیست، ایران) حاوی ۳٪ آلبومین سرم گاوی (Sigma-Aldrich، آمریکا) حل شده و با پنج میکرولیتر آنتی‌بادی anti-CD19 متصل به فلوروکروم APC (BD Bioscience، آمریکا) رنگ‌آمیزی شدند و با دستگاه فلوسیتومتری BD FACSCalibur برای بررسی میزان بیان GFP و CD19 مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی میزان کشندگی سلول‌ها:

در روز شانزدهم کشت سلول‌های CAR-T، CAR-

یافته‌ها

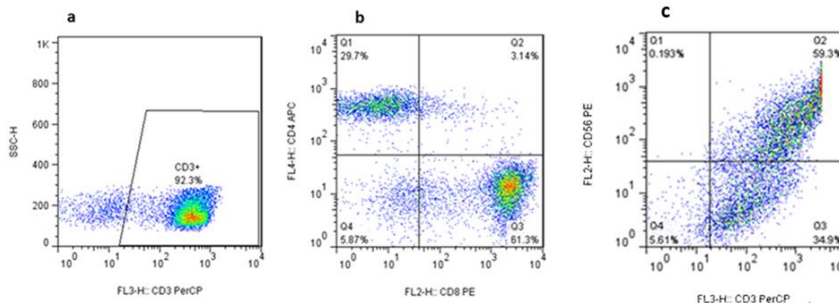
تولید وکتور لنتی ویروسی:

پس از ترانسفکت سلول‌های 293T LentiX با پلاسمیدهای Transfer، psPAX2 و pMD2G به واسطه PEI، سوپ ویروسی در فواصل مشخص جمع‌آوری شده و تغلیظ شد. جهت تعیین تعداد پارتیکل‌های ویروسی در هر میکرولیتر از سوپ ویروس تغلیظ شده، سه غلظت از سوپ ویروس تغلیظ شده تهیه شده و به سلول‌های 293T LentiX دارای شمارش مشخص افزوده شد. ۷۲ ساعت پس از عمل ترانسداکشن، سلول‌های 293T LentiX با آنزیم تریپسین از کف پلیت کنده شده و جهت تعیین تیترو ویروس مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تعیین تیتراز بررسی بیان GFP در سلول‌ها استفاده شد. به این ترتیب ویروس‌های تغلیظ شده در سری‌های مختلف کاری تعیین تیترو شدند که تیترو ویروس حاوی CAR به طور میانگین برابر با 2250 ± 15500 پارتیکل در هر میکرولیتر و تیترو

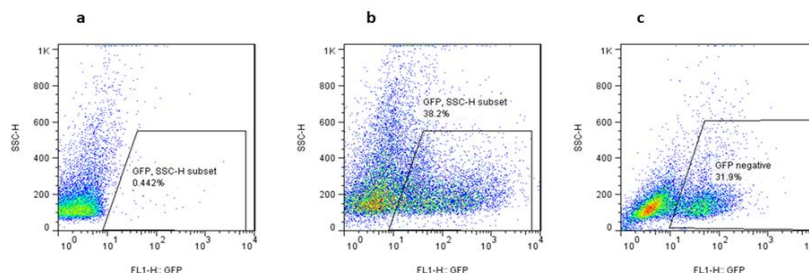
ویروس Mock برابر با 4200 ± 22500 پارتیکل در هر میکرولیتر بود.

ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های T و CIK:

به طور میانگین در بین تمامی گروه‌های لنفوسیت‌های T میزان خلوص سلول‌های $CD3^+$ برابر با $1 \pm 91/6\%$ بود. از این میان ۱ $\pm 33/12\%$ سلول‌ها شامل سلول‌های $CD4^+$ ، ۱ $\pm 60/5\%$ سلول‌ها شامل سلول‌های $CD8^+$ و به ترتیب ۰/۹ $\pm 3/72\%$ و ۱ $\pm 3/82\%$ سلول‌ها شامل سلول‌های $CD4^+ CD8^-$ و $CD4^- CD8^-$ بود. هم‌چنین در بین تمامی جمعیت‌های سلول‌های CIK به طور میانگین جمعیت $CD3^+ CD56^+$ برابر با $3/1 \pm 59/72\%$ ، جمعیت $CD3^+ CD56^-$ برابر با $3/8 \pm 32/88\%$ ، جمعیت $CD3^- CD56^+$ برابر با $1/9 \pm 5/89\%$ و جمعیت $CD3^- CD56^-$ برابر با $2/5 \pm 1/52\%$ بود (شکل ۱).

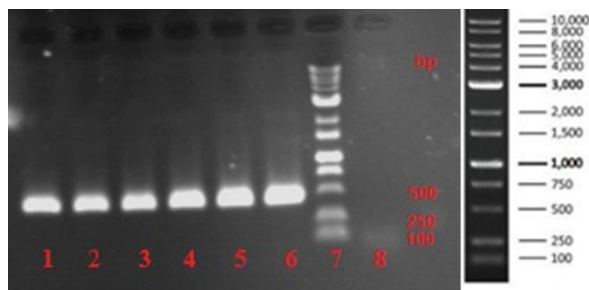


شکل ۱: ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های T و CIK در روز چهاردهم پس از کشت. (a) میزان سلول‌های $CD3^+$ در بین جمعیت سلول‌های T. (b) میزان بیان $CD8$ و $CD4$ در بین جمعیت لنفوسیت‌های $CD3^+$ ؛ در بین جمعیت سلول‌های $CD3^+$ T غالبیت به ترتیب مربوط به سلول‌های $CD8^+ CD4^-$ ، $CD8^- CD4^-$ ، $CD8^- CD4^+$ و $CD8^+ CD4^+$ بیان $CD3$ و $CD56$ در سلول‌های CIK که بیانگر غالبیت جمعیت سلول‌های $CD3^+ CD56^+$ می‌باشد.

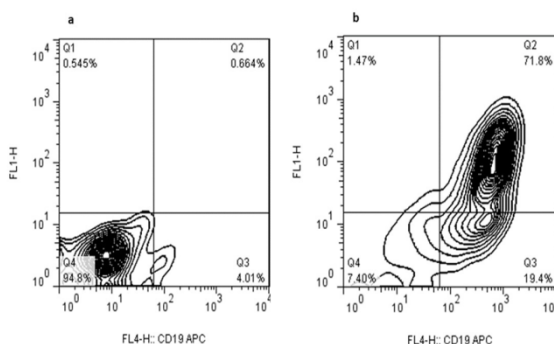


شکل ۲: بررسی میزان بیان GFP در سلول‌های T و CIK جهت تعیین میزان ترانسداکشن سلول‌ها. (a) سلول‌های کنترل GFP منفی (ترانسداکشن نشده). (b) میزان بیان GFP در سلول‌های CIK. (c) میزان بیان GFP در سلول‌های T.

باند‌هایی به اندازه ۱۷۰۰ جفت باز مورد انتظار بود که چنین بانندی در تمامی دماهای به کار رفته برای آنیلینگ ایجاد شده بود (شکل ۳). دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه آنیلینگ انتخاب و برای ادامه به کار گرفته شد. برای کلون کردن قطعه CD19 به داخل پلاسمید pCDH-EF1a-eFFly-eGFP هر دو قطعه با آنزیم‌های NOT1 و Xba1 برش داده شدند که باندهای حاصل از برش پلاسمید pCDH-EF1a-eFFly-eGFP در نمودار قابل مشاهده می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۵: باندهای حاصل از Colony PCR. قطعه ۵۰۰ جفت بازی مورد انتظار در محصول واکنش هر ۶ کلنی به کار رفته به عنوان قطعه الگو دیده می‌شود (ستون‌های ۱-۶). ستون شماره ۷ شامل Ladder و ستون شماره ۸ شامل نمونه کنترل منفی فاقد قطعه الگو (No template control) می‌باشد.

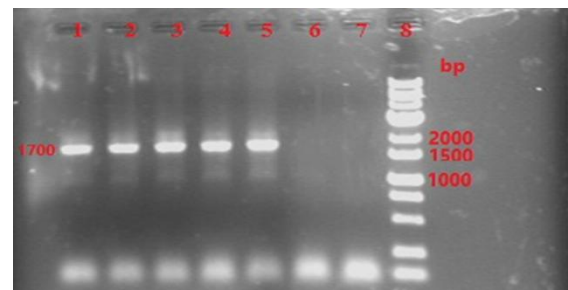


شکل ۶: میزان بیان GFP و CD19 در سلول‌های K562 ترانسداکت شده. (a) سلول‌های K562 ترانسداکت نشده فاقد بیان GFP و CD19 به عنوان کنترل منفی. (b) سلول‌های K562 ترانسداکت شده با وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن CD19 و GFP؛ بیش از ۹۱٪ سلول‌ها از نظر بیان CD19 مثبت بوده و ۷۱/۸٪ سلول‌ها از نظر بیان هر دو مولکول CD19 و GFP مثبت هستند.

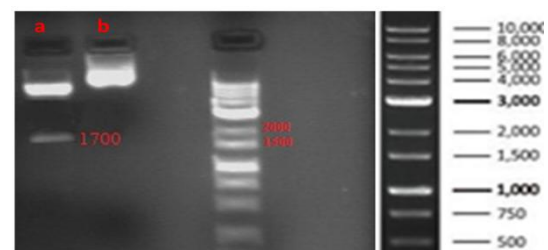
میزان بیان GFP در هر دو گروه سلول‌های CAR-Clk و CAR-T به ترتیب برابر با $0.9 \pm 3.6\%$ و $1.8 \pm 3.4\%$ بود (شکل ۲). همچنین میزان بیان GFP در سلول‌های Mock T و Mock Clk به ترتیب برابر با $1.2 \pm 4.4\%$ و $2.5 \pm 4.5\%$ بود.

تولید رده سلولی $CD19^+ K562$:

با توجه به آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه CD19 از cDNA سنتز شده، در این مرحله تشکیل



شکل ۳: باندهای حاصل از تکثیر قطعه CD19 از cDNA سنتز شده. ستون‌های ۱-۵ به ترتیب بیانگر محصولات واکنش PCR در دماهای آنیلینگ ۶۷-۷۱ می‌باشد. باند ۱۷۰۰ جفت بازی مورد انتظار در تمامی دماهای به کار برده شده دیده می‌شود. ستون شماره ۶ و ۷ شامل کنترل منفی فاقد قطعه الگو (No template control)، و ستون ۸ شامل Ladder می‌باشد.



شکل ۴: الکتروفورز قطعات حاصل از برش پلاسمید pCDH-EF1a-eFFly-eGFP توسط آنزیم‌های Not1 و Xba1 بر روی ژل آگارز. (a) قطعات حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید، قطعه ۱۶۶۶ جفت بازی تشکیل شده مربوط به لوسیفراز است که در اثر هضم آنزیمی از ساختار پلاسمید خارج شده است؛ قطعه ۷۱۹۵ جفت بازی تشکیل شده قطعه‌ای است که برای ادامه مراحل کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. (b) پلاسمید بدون هضم آنزیمی.

نمودار ۱).

سلول‌های CIK فاقد CAR در تمامی نسبت‌های E: T کشتندگی بیشتری را در مقایسه با سلول‌های T فاقد CAR از خود بروز دادند با این حال این تفاوت به لحاظ آماری معنادار نبود. بین سلول‌های Mock CIK و CIK و سلول‌های Mock T و T نیز تفاوت معناداری مشاهده نشد. انتقال گیرنده CAR به هر دو سلول CIK و T موجب افزایش معنادار کشتندگی این سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های CIK و T فاقد CAR شد ($p < 0.001$). سلول‌های CAR-CIK و CAR-T هر دو یک کشتندگی وابسته به دوز را از خود نشان دادند به طوری که با افزایش دوز میزان مرگ در بین سلول‌های هدف به طور معناداری نسبت به دوزهای پیشین افزایش یافت (نمودار ۲). سلول‌های CAR-CIK کشتندگی قابل مقایسه‌ای را با سلول‌های CAR-T از خود نشان دادند به طوری که تفاوت معناداری بین قدرت کشتندگی این دو جمعیت سلولی مشاهده نشد (نمودار ۲).

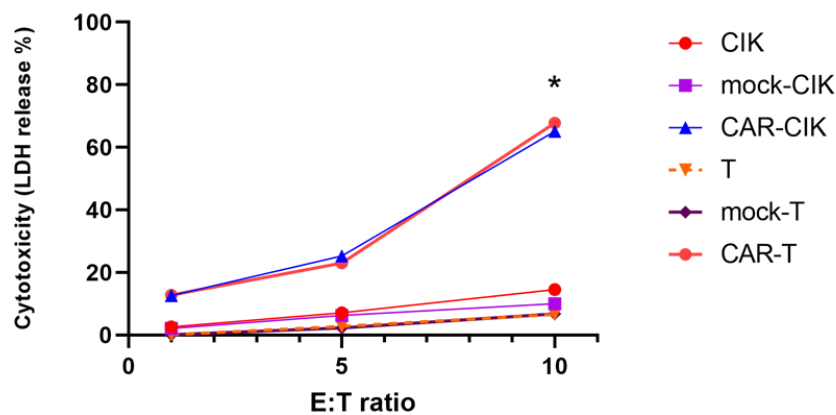
با توجه به آغازگرهای طراحی شده برای Colony PCR تشکیل باندی با طول ۵۰۰ جفت باز مورد انتظار بود که چنین باندی در هر شش کلون مورد استفاده مشاهده شد (شکل ۵). پس از تولید و تغلیظ وکتور لنتی ویروسی حاوی ژن *CD19* سوپ ویروس تغلیظ شده با انجام فلوسیتومتری تعیین تیتراژ شد که تیتراژ آن برابر با 1.438 ± 15938 پارتیکل در هر میکرولیتر بود. ۷۲ ساعت پس از دومین ترانسداکشن، میزان بیان *CD19* و GFP در سلول‌های K562 به ترتیب برابر با $91/2\%$ و $71/8\%$ بود (شکل ۶).

بررسی میزان کشتندگی سلول‌ها:

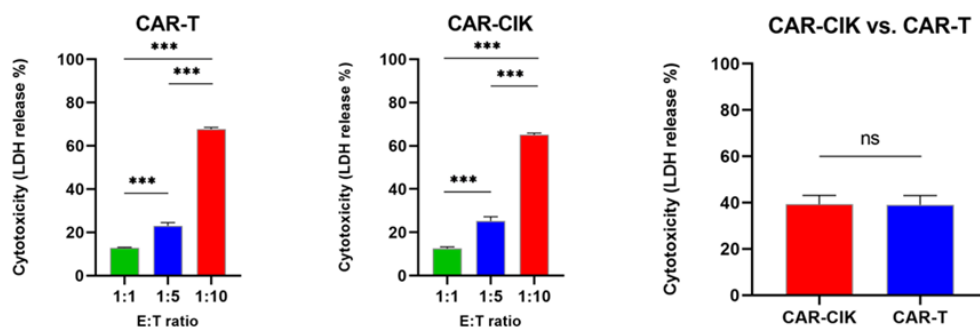
برای بررسی میزان کشتندگی، هر یک از سلول‌های effector در سه نسبت ۱:۱، ۱:۵ و ۱:۱۰ با سلول‌های target (سلول‌های *CD19*⁺ K562) به صورت شبانه کشت داده شدند و صبح روز بعد میزان مرگ در بین سلول‌های target بر اساس میزان رهایش LDH اندازه‌گیری شد (جدول ۳ و

جدول ۳: نتایج کشتندگی سلول‌های effector بر روی سلول‌های

سلول effector	اهداکننده	کشدگی در E:T =۱ (درصد)			کشدگی در E:T =۵ (درصد)			کشدگی در E:T =۱۰ (درصد)			میانگین (درصد)
CIK	۱	۳	۳	۲	۶	۸	۹	۱۶	۱۵	۱۶	۸/۱
	۲	۳	۳	۲	۶	۶	۸	۱۳	۱۴	۱۳	
Mock-CIK	۱	۲	۲	۲	۸	۶	۶	۱۵	۱۴	۱۳	۷/۲
	۲	۲	۲	۳	۶	۶	۶	۱۳	۱۳	۱۱	
CAR-CIK	۱	۱۳	۱۳	۱۵	۲۹	۲۷	۳۲	۶۶	۶۷	۶۷	۳۴/۳
	۲	۱۳	۱۱	۱۱	۲۳	۲۲	۱۹	۶۳	۶۳	۶۵	
T	۱	۰	۱	۰	۳	۳	۳	۹	۶	۶	۳/۲
	۲	۰	۰	۰	۲	۴	۲	۵	۷	۷	
mock-T	۱	۰	۰	۰	۲	۲	۳	۸	۸	۷	۳/۱
	۲	۰	۱	۰	۳	۲	۲	۶	۶	۶	
CAR-T	۱	۱۲	۱۲	۱۳	۲۶	۲۷	۲۶	۶۸	۶۹	۷۰	۳۴/۵
	۲	۱۴	۱۳	۱۳	۲۱	۲۰	۱۸	۶۵	۶۷	۶۸	



نمودار ۱: مقایسه قدرت کشندگی سلول‌های T، Mock T، CAR-T، CIK، Mock CIK و CAR-CIK در برابر سلول‌های هدف K562⁺ CD19. برای مقایسه قدرت کشندگی سلول‌های effector در سه نسبت E:T ۱:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱ با سلول‌های هدف کشت داده شدند و پس از گذشت یک شب میزان مرگ در بین سلول‌های هدف با بررسی میزان رهائش لاکتات دهیدروژناز از سلول‌های آسیب دیده اندازه‌گیری شد. E: T= Effector: Target ratio (p< ۰/۰۵).



نمودار ۲: (a) مقایسه قدرت کشندگی سلول‌های CAR-T در نسبت‌های مختلف (E: T. b) مقایسه قدرت کشندگی سلول‌های CAR-CIK در نسبت‌های مختلف (E: T. c) مقایسه قدرت کشندگی سلول‌های CAR-T و CAR-CIK. ***P< 0.001.

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که همانند لنفوسیت‌های T، انتقال گیرنده CD19 CAR به سلول‌های CIK نیز موجب افزایش معنادار قدرت کشندگی این سلول‌ها در برابر سلول‌های هدف CD19⁺ می‌شود. همچنین نشان داده شد که سلول‌های CD19 CAR-CIK در محیط *in vitro* کشندگی قابل مقایسه‌ای را با سلول‌های CD19 CAR-T نشان می‌دهند، به طوری که تفاوت معناداری در قدرت

کشندگی سلول‌های CAR CIK با سلول‌های CAR-T مشاهده نشد.

درمان‌های رایج سرطان از قبیل شیمی‌درمانی و پرتو درمانی همیشه قادر به ریشه‌کن سازی کامل بیماری نبوده و به علاوه اثرات مخربی را بر روی بافت‌های سالم بدن برجای می‌گذارند. در سال‌های اخیر ظهور سلول‌های CAR-T تحولی عظیم در درمان سرطان ایجاد کرده است به طوری که این روش درمانی امروزه جزو روش‌های

سلول‌های CAR-CIK تفاوت معناداری را در قدرت کشندگی در مقایسه با سلول‌های CIK فاقد CAR از خود نشان دادند. سلول‌های CAR-CIK همانند سلول‌های CAR-T یک کشندگی وابسته به دوز را از خود نشان دادند به طوری که با افزایش نسبت E:T میزان کشندگی این سلول‌ها نیز به طور معناداری افزایش یافت.

مطالعه‌ها نشان داده‌اند که استفاده از سازه CAR نسل سوم که دارای دو دامین کمک محرک می‌باشد، موجب آپوپتوز ناشی از فعال شدن شدید (Activation induced cell death) در سلول‌های CAR-T می‌شود (۳). با این حال این نتایج در مورد سلول‌های CIK متغیر می‌باشد. در حالی که مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ نشان داد که استفاده از CAR نسل سوم بر علیه آنتی‌ژن کارسینومامبریونیک (CEA) موجب آپوپتوز ناشی از فعال‌سازی شدید می‌شود (۲۳)، مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۶ نشان داد که استفاده از نسل سوم CAR بر علیه آنتی‌ژن گیرنده فولات (FRα) در مقایسه با نسل دوم این گیرنده موجب پاسخ بهتر سلول‌های CAR-CIK در برابر سلول‌های بیان‌کننده FRα می‌شود (۲۵). این تفاوت ممکن است به تفاوت قدرت اتصال CAR با دو آنتی‌ژن متفاوت مربوط باشد به طوری که در موارد اتصال با avidity پایین استفاده از نسل سوم CAR می‌تواند کمک‌کننده باشد در حالی که در مواقع اتصال با تمایل (avidity) بالا استفاده از CAR نسل سوم با ارسال سیگنال‌های فعال‌سازی قوی می‌تواند موجب مرگ ناشی از فعال شدن شدید سلول گردد. از طرفی به این دلیل که استفاده از دامین‌های پیام‌رسانی DAP10 و DAP12 به عنوان جایگزین دامین CD3 Zeta و دامین کمک محرک 2B4 به جای CD28 و 4-1BB در ساختمان CAR در سلول‌های CAR-NK نتایج مثبتی را نشان داده است، لازم است تا تاثیر این ساختارها در عملکرد سلول‌های CAR-CIK نیز مورد بررسی قرار گیرد (۲۶).

علاوه بر موارد ذکر شده چند مورد دیگر نیز می‌تواند در مقایسه سلول‌های CAR-T و CAR-CIK در نظر گرفته شود. برای مثال میزان نیاز به IL-2 جزو مواردی می‌باشد که می‌تواند در مقایسه این دو نوع سلول حائز اهمیت باشد، چرا که استفاده از IL-2 به علت ایجاد سمیت در بدن

درمانی استاندارد برای بسیاری از بدخیمی‌های لنفوسیت‌های B به حساب می‌آید. این درمان به صورت استاندارد از طریق جداسازی لنفوسیت‌های T اتولوگ از بیمار و آماده‌سازی آن‌ها در محیط *ex vivo* برای تزریق مجدد به بیمار انجام می‌شود که با مشکلاتی اساسی از قبیل هزینه بسیار بالا و زمان آماده‌سازی طولانی مواجه می‌باشد. از طرفی استفاده از منابع آلورژنیک سلول‌های T نیز با خطر ایجاد GvHD و ایمنی‌زایی در بدن میزبان روبرو می‌باشد (۱۰-۶).

سلول‌های CIK به عنوان یک سلول قابل تهیه از منابع آلورژنیک و با خطر پایین ایجاد GvHD می‌توانند جایگزینی بالقوه برای لنفوسیت‌های T در ایمنی درمانی با سلول‌های بیان‌کننده CAR باشند. مطالعه‌های متعددی نشان داده‌اند که انتقال گیرنده CAR به سلول‌های CIK موجب افزایش قدرت کشندگی این سلول‌ها در برابر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۰-۲۲). هم‌چنین نشان داده شده که این سلول‌ها می‌توانند هم از طریق سیگنالینگ وابسته به CAR و هم از طریق مکانیسم‌های مستقل از CAR قدرت کشندگی خود را بر سلول هدف اعمال کنند. از طرفی نشان داده شده که سیگنالینگ CAR در سلول‌های CIK علاوه بر ایجاد سیتوتوکسیسیته وابسته به CAR می‌تواند موجب تقویت پاسخ‌های مستقل از CAR نیز بشود (۲۳). به علاوه الگوی بیان گیرنده‌های کموکاینی در سلول‌های CIK به گونه‌ای است که در عین کاهش ترافیک آن‌ها به ارگان‌های هدف GvHD موجب افزایش ترافیک آن‌ها به ارگان‌های توموری می‌شود (۲۴). تمامی این موارد این سلول‌ها را به عنوان جایگزینی بالقوه و با خطر پایین GvHD برای سلول‌های CAR-T مطرح می‌کند.

در این مطالعه نیز هم‌راستا با مطالعه‌های پیشین نشان داده شد که انتقال گیرنده CAR به سلول‌های CIK موجب افزایش قدرت کشندگی این سلول‌ها می‌شود (۲۵، ۲۰-۲۲، ۱۸). طبق نتایج مطالعه حاضر با این که سلول‌های CIK فاقد CAR حدی پایه از کشندگی را بر روی سلول‌های هدف اعمال می‌کنند، با این حال انتقال گیرنده CAR موجب افزایش معنادار قدرت کشندگی این سلول‌ها می‌گردد. به طوری که در هر سه نسبت E:T به کار رفته

پرداخت.

حمایت مالی

هزینه‌های این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران تأمین شده است.

ملاحظات اخلاقی

در پایان لازم به ذکر می‌باشد که این مطالعه به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران رسیده است (کد اخلاق: IR.TUMS.SPH.REC.1400.171).

عدم تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع در مطالعه حاضر وجود نداشته است.

نقش نویسندگان

وحید مرادی: انجام مراحل عملی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج، تهیه پیش‌نویس مقاله
اعظم رنجبر: انجام مراحل عملی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج

دکتر آزاده امیدخدا: طراحی مطالعه، بازبینی و اصلاح پیش‌نویس مقاله
دکتر ناصر احمدبیگی: مدیریت و طراحی مطالعه، بازبینی و اصلاح پیش‌نویس مقاله

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از اساتید، کارکنان و دانشجویان پژوهشکده گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی تهران، تشکر و قدردانی می‌گردد.

با محدودیت دوز روبرو می‌باشد (۲۷). همان طور که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد کشت سلول‌های CIK در محیط کشت به میزان بیشتری از IL-2 در مقایسه با سلول‌های T نیاز دارد. همچنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که سلول‌های CIK فعال شده در مقایسه با سلول‌های T فعال شده میزان IL-2 کمتری از خود آزاد می‌کنند (۲۳). این موارد یعنی کم بودن میزان IL-2 مترشح از سلول‌های فعال شده و نیاز به منابع خارجی سیتوکین می‌تواند در عملکرد *in vivo* سلول‌ها اثرگذار باشد. بنابراین لازم است تا در مطالعه‌های *in vitro* میزان سیتوتوکسیسیتی بلند مدت این سلول‌ها در عدم حضور IL-2 مورد مقایسه قرار گیرد و مطالعه‌های *in vivo* تکمیلی نیز برای پایش بلند مدت این سلول‌ها در درون بدن انجام شود. همچنین لازم است تا میزان بیان سطحی نشانگرهای فرسودگی (exhaustion) سلولی از قبیل PD-1 و LAG-3 نیز در بلند مدت در این سلول‌ها مورد مقایسه قرار گیرد تا از بعد کامل‌تری بتوان این دو سلول را مورد مقایسه قرار داد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر نشان داده شد که سلول‌های CAR-CIK از قدرت کشندگی قابل مقایسه‌ای با سلول‌های CAR-T برخوردار هستند. طبق نتایج مطالعه حاضر و مطالعه‌های پیشین می‌توان گفت که سلول‌های CAR-CIK آلورژیک دو شرط لازم برای استفاده به عنوان جایگزین سلول‌های CAR-T آلورژیک، یعنی قدرت کشندگی کافی و خطر پایین GvHD را دارا می‌باشند. با این حال لازم است تا مطالعه‌های بیشتری برای ارزیابی و مقایسه سایر ابعاد مؤثر در عملکرد این سلول‌ها در دست انجام قرار گیرد تا بتوان با دید دقیق‌تری به مقایسه این دو جمعیت سلولی

References:

- 1- Sengsayadeth S, Savani BN, Oluwale O, Dholaria B. Overview of approved CAR-T therapies, ongoing clinical trials, and its impact on clinical practice. *EJHaem* 2022; 3(Suppl 1): 6-10.
- 2- Cao X, Li W, Yu Y, Liu T, Zhou Y. China enters CAR-T cell therapy era. *Innovation (Camb)* 2021; 3(1): 100197.
- 3- Sterner RC, Sterner RM. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J* 2021; 11(4): 69.
- 4- Arabi F, Torabi-Rahvar M, Shariati A, Ahmadbeigi N, Naderi M. Antigenic targets of CAR T Cell Therapy. A retrospective view on clinical trials. *Exp Cell Res* 2018; 369(1): 1-10.
- 5- Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017; 4: 92-101.
- 6- Choi G, Shin G, Bae S. Price and Prejudice? The Value of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy. *Int J Environ Res Public Health* 2022; 19(19): 12366.

- 7- Martinez-Cibrian N, Español-Rego M, Pascal M, Delgado J, Ortiz-Maldonado V. Practical aspects of chimeric antigen receptor T-cell administration: From commercial to point-of-care manufacturing. *Front Immunol* 2022; 13: 1005457.
- 8- Mehta PH, Fiorenza S, Koldej RM, Jaworowski A, Ritchie DS, Quinn KM. T Cell Fitness and Autologous CAR T Cell Therapy in Haematologic Malignancy. *Front Immunol* 2021; 12: 780442.
- 9- Ren A, Tong X, Xu N, Zhang T, Zhou F, Zhu H. CAR T-Cell Immunotherapy Treating T-ALL: Challenges and Opportunities. *Vaccines (Basel)* 2023; 11(1): 165.
- 10- Alcantara M, Tesio M, June CH, Houot R. CAR T-cells for T-cell malignancies: challenges in distinguishing between therapeutic, normal, and neoplastic T-cells. *Leukemia* 2018; 32(11): 2307-15.
- 11- Liu DD, Hong WC, Qiu KY, Li XY, Liu Y, Zhu LW, *et al.* Umbilical cord blood: A promising source for allogeneic CAR-T cells. *Front Oncol* 2022; 12: 944248.
- 12- Ueda T, Shiina S, Iriguchi S, Terakura S, Kawai Y, Kabai R, *et al.* Optimization of the proliferation and persistency of CAR T cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng* 2023; 7(1): 24-37.
- 13- Smirnov S, Petukhov A, Levchuk K, Kulemzin S, Staliarova A, Lepik K, *et al.* Strategies to Circumvent the Side-Effects of Immunotherapy Using Allogeneic CAR-T Cells and Boost Its Efficacy: Results of Recent Clinical Trials. *Front Immunol* 2021; 12: 780145.
- 14- Muhammadnejad S, Monzavi SM, Torabi-Rahvar M, Sotoudeh M, Muhammadnejad A, Tavakoli-Shiraji S, *et al.* Efficacy of adoptively transferred allogeneic CIK cells on colorectal cancer: Augmentative antitumoral effects of GvHD. *Int Immunopharmacol* 2023; 114: 109446.
- 15- Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent *in vivo* antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1994; 153(4): 1687-96.
- 16- Drobycki WR, Majewski D, Ozker K, Hanson G. Ex vivo anti-CD3 antibody-activated donor T cells have a reduced ability to cause lethal murine graft-versus-host disease but retain their ability to facilitate alloengraftment. *J Immunol* 1998; 161(5): 2610-9.
- 17- Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8(+) natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon gamma production. *Blood* 2001; 97(10): 2923-31.
- 18- Ren X, Ma W, Lu H, Yuan L, An L, Wang X, *et al.* Modification of cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors (CARs) enhances antitumor immunity to epidermal growth factor receptor (EGFR)-positive malignancies. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64(12): 1517-29.
- 19- Kiani J, Naderi M, Torabi-Rahvar M, Ranjbar A, Aghayan HR, Janzamin E, *et al.* Generation of CD19-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Arch Iran Med* 2019; 22(1): 7-10.
- 20- Schlimper C, Hombach AA, Abken H, Schmidt-Wolf IG. Improved activation toward primary colorectal cancer cells by antigen-specific targeting autologous cytokine-induced killer cells. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 238924.
- 21- Pizzitola I, Agostoni V, Cribioli E, Pule M, Rousseau R, Finney H, *et al.* *in vitro* comparison of three different chimeric receptor-modified effector T-cell populations for leukemia cell therapy. *J Immunother.* 2011; 34(6): 469-79.
- 22- Marin V, Pizzitola I, Agostoni V, Attianese GM, Finney H, Lawson A, *et al.* Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica* 2010; 95(12): 2144-52.
- 23- Hombach AA, Rappl G, Abken H. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 "super-stimulation. *Mol Ther* 2013; 21(12): 2268-77.
- 24- Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Sega EI, *et al.* *in vivo* trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood* 2008; 112(6): 2563-74.
- 25- Zuo S, Wen Y, Panha H, Dai G, Wang L, Ren X, *et al.* Modification of cytokine-induced killer cells with folate receptor alpha (FR α)-specific chimeric antigen receptors enhances their antitumor immunity toward FR α -positive ovarian cancers. *Mol Immunol* 2017; 85: 293-304.
- 26- Yu T, Yu SK, Xiang Y, Lu KH, Sun M. Revolution of CAR Engineering For Next-Generation Immunotherapy In Solid Tumors. *Front Immunol* 2022; 13: 936496.
- 27- MacDonald A, Wu TC, Hung CF. Interleukin 2-Based Fusion Proteins for the Treatment of Cancer. *J Immunol Res* 2021; 2021: 7855808.