



Impact of CAR Structure in Nanobody-Based Constructs on the Cytotoxic Function of CAR-T Cells Targeting CD19⁺ Cells

Motahareh Arjomandnejad¹ · Fatemeh Rahbarizadeh¹

¹Department of Medical Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran



Received: 2025/08/10
Accepted: 2025/09/07

<http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.22.1.54>

Citation:

Arjomandnejad M, Rahbarizadeh F. Impact of CAR Structure in Nanobody-Based Constructs on the Cytotoxic Function of CAR-T Cells Targeting CD19⁺ Cells. J Iran Blood Transfus. 2025; 22 (3): 227-237

Correspondence: Rahbarizadeh F., Professor of Department of Medical Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University. P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82883884
E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives

In recent years, chimeric antigen receptors (CAR-T) therapy has revolutionized the treatment of hematologic malignancies, particularly B cell-derived cancers such as ALL and non-Hodgkin lymphomas. Most CARs employ single-chain variable fragments (scFvs) as the antigen-recognition domain. However, limitations including low stability, tendency to aggregate, and high immunogenicity have directed attention toward alternatives such as nanobodies (VHHs). In this study, CAR-T cells equipped with an anti-CD19 nanobody receptor were designed and constructed, and their specific ability to recognize and eliminate CD19⁺ cells was evaluated *in vitro*.

Materials and Methods

In this experimental study, the structure of a CAR containing an anti-CD19 nanobody was designed in both second- and third-generation formats with CD28 and 4-1BB domains. The constructs were cloned into a lentiviral vector and transduced into human T cells. Transduction efficiency was assessed via flow cytometry. Functional evaluation of the engineered cells following exposure to CD19⁺ target cells was evaluated in terms of activation marker expression, cytokine secretion (IFN- γ and interleukin-2), and cytotoxic activity. Experimental data were analyzed using GraphPad Prism software, and group comparisons were performed with one-way and two-way ANOVA tests as well as the t-test.

Results

The generated CAR-T cells showed robust receptor expression and, upon encountering CD19⁺ cells, exhibited specific cytokine responses and cytotoxic activity. In contrast, no responses were observed against CD19⁻ cells. Functional differences observed between constructs with short and long hinge regions, as well as between second- and third-generation CARs, highlighted the importance of structural design in optimizing CAR-T cell efficacy.

Conclusions

This study, conducted by the first research team in Iran to develop nanobody-based anti-CD19 CAR constructs, highlights the potential of nanobody integration as a safe and effective alternative to scFv-CARs. The findings offer a practical frame work for improving CAR-T cell therapies.

Key words: CAR T-Cell Therapy, Single-Chain Antibodies, CD19 Antigen



Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center. This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.



تأثیر ساختار CAR در سازه‌های مبتنی بر نانوبادی بر توانایی سیتوتوکسیک سلول‌های CAR-T علیه سلول‌های CD19⁺

مطهره ارجمندنژاد^۱، فاطمه رهبری‌زاده^۲

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه بیوتکنولوژی پزشکی - تهران - ایران
۲- PhD بیوشیمی بالینی - استاد دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه بیوتکنولوژی پزشکی - تهران - ایران

چکیده

سابقه و هدف

در سال‌های اخیر، درمان با سلول‌های T مهندسی شده با گیرنده کایمیریک (CAR-T) تحولی چشمگیر در درمان سرطان‌های خونی، به ویژه بدخیمی‌های B سلول مانند ALL و لنفوم‌های غیر هوچکینی ایجاد کرده است. بیشتر CARها از ناحیه متغیر زنجیره آنتی‌بادی‌ها (scFvs) single-chain variable fragments) به عنوان بخش شناسایی کننده آنتی‌ژن استفاده می‌کنند، اما محدودیت‌هایی مانند پایداری پایین، تجمع ناپایدار و ایمنی‌زایی بالا، توجه‌ها را به سوی جایگزین‌هایی مانند نانوبادی‌ها (VHH) جلب کرده است. در این مطالعه، سلول‌های CAR-T مجهز به گیرنده نانوبادی ضد CD19 طراحی و ساخته شد و توانایی اختصاصی آن‌ها در شناسایی و حذف سلول‌های CD19⁺ در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ساختار CAR حاوی نانوبادی ضد CD19 طراحی و در قالب نسل دوم و سوم، با دومین‌های CD28 و 4-1BB ساخته شد. سازه‌ها در وکتور لنتی‌ویروسی کلون شده و به سلول‌های T انسانی ترانسداکت شدند. پس از بررسی راندمان ترانسداکشن با فلوسیتومتری، عملکرد سلول‌های مهندسی شده در مواجهه با سلول‌های CD19⁺ از نظر بیان مارکرهای فعال‌سازی، ترشح سیتوکاین (اینترفرون-گاما و اینترلوکین-۲) و سمیت سلولی ارزیابی شد. تحلیل داده‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار GraphPad prism و مقایسه گروه‌ها با آزمون‌های ANOVA یک طرفه و دو طرفه و آزمون t انجام شد.

یافته‌ها

سلول‌های CAR-T تولید شده بیان بالایی از گیرنده را نشان داده و در مواجهه با سلول‌های CD19⁺ پاسخ سیتوکاینی و سمیت اختصاصی داشتند. در مقابل، نسبت به سلول‌های CD19⁺ پاسخ نداشتند. تفاوت عملکرد بین لولاهای کوتاه و بلند و نیز بین نسل دوم و سوم نشان‌دهنده اهمیت طراحی ساختاری در بهینه‌سازی عملکرد است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه که توسط نخستین تیم پژوهشی در ایران توسعه دهنده سازه‌های CAR مبتنی بر نانوبادی ضد CD19 انجام شد، نشان می‌دهد این رویکرد می‌تواند جایگزینی ایمن و کارآمد برای scFv-CARها باشد و چشم‌انداز عملی برای بهبود درمان‌های مبتنی بر سلول‌های CAR-T فراهم کند.

کلمات کلیدی: CAR-T سل ترابی، آنتی‌بادی‌های تک‌دومینی، آنتی‌ژن CD19



تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۶

doi <http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.22.1.54>

Citation:

Arjomandnejad M, Rahbarizadeh F. Impact of CAR Structure in Nanobody-Based Constructs on the Cytotoxic Function of CAR-T Cells Targeting CD19⁺ Cells. J Iran Blood Transfus. 2025; 22 (3): 227-237

نویسنده مسئول:

دکتر فاطمه رهبری‌زاده. استاد دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه بیوتکنولوژی پزشکی - تهران - ایران
صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

E-mail: Rahbarif@modares.ac.ir

کد اخلاق:

IR.TMU.REC.1394.300

مقدمه

بدخیمی‌های خونی به ویژه لوسمی‌ها و لنفوم‌ها از جمله بیماری‌های کشنده‌ای هستند که علیرغم پیشرفت‌های درمانی همچنان با نرخ بالای عود و مقاومت دارویی همراهاند (۱). روش‌های درمانی رایج از جمله شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و پیوند سلول‌های بنیادی، در بسیاری از بیماران پاسخ کامل و پایداری ایجاد نمی‌کنند و با عوارض جانبی شدید و کاهش کیفیت زندگی همراه هستند. بنابراین، نیاز به درمان‌های دقیق‌تر و هدفمندتر برای نابودی سلول‌های سرطانی احساس می‌شود (۲-۵).

در سال‌های اخیر، سلول‌های T مهندسی‌شده با گیرنده‌های کایمیریک (CAR-T cells) به عنوان یکی از نوآورانه‌ترین و مؤثرترین روش‌های درمانی سرطان‌های هماتولوژیک مطرح شده‌اند. این سلول‌ها با بهره‌گیری از گیرنده‌های مصنوعی، قادرند سلول‌های توموری را مستقل از MHC شناسایی کرده و از بین ببرند. با وجود موفقیت‌های CAR-T سل‌ها، محدودیت‌هایی چون پاسخ ایمنی علیه بخش‌های غیرانسانی گیرنده، پایداری پایین و تجمع‌های غیراختصاصی وجود دارد (۶-۸).

برای غلبه بر این مشکلات، استفاده از نانوبادی‌ها (VHH) به عنوان جایگزین scFv در ساختار CAR پیشنهاد شده است. نانوبادی‌ها قطعات آنتی‌بادی مشتق از شترسانان هستند که از نظر ساختار تک‌دومینی، بسیار پایدار، نفوذپذیر، کم‌حجم و ایمن‌تر از scFv ها هستند. این ویژگی‌ها نانوبادی‌ها را به گزینه‌ای جذاب برای طراحی نسل جدید CAR-T سل‌ها تبدیل کرده است. در همین راستا، مطالعه‌های پیشین صورت گرفته در آزمایشگاه ما نیز قابلیت نانوبادی‌ها را در هدف‌گیری مؤثر و اختصاصی سلول‌های سرطانی تأیید کرده‌اند؛ از جمله این مطالعه‌ها می‌توان به طراحی CAR های مبتنی بر نانوبادی علیه آنتی‌ژن‌های HER2، CD19 و MUC1 اشاره کرد که در آن‌ها سلول‌های T مهندسی شده با گیرنده‌های VHH توانستند کارآیی سیتوتوکسیک قابل مقایسه یا حتی بالاتری نسبت به سازه‌های رایج از خود نشان دهند (۹-۱۱).

در پروژه حاضر، از نانوبادی ضد CD19 که توسط دکتر بنی‌هاشم تولید و مشخصه‌یابی شده بود، برای طراحی ساختار گیرنده کایمیریک استفاده شد (۱۲). CD19 آنتی‌ژنی است که به صورت اختصاصی بر سطح سلول‌های B بیان می‌شود و در اکثر بدخیمی‌های B سلولی مانند ALL و DLBCL بیش‌بیین می‌گردد. هدف اصلی این پژوهش، طراحی و تولید CAR-T سل‌هایی با گیرنده نانوبادی ضد CD19 و بررسی عملکرد اختصاصی آن‌ها در شناسایی و از بین بردن سلول‌های CD19⁺ در شرایط آزمایشگاهی بود.

این تحقیق گامی مؤثر در جهت ارتقاء کارایی، ایمنی و پایداری سلول‌های CAR-T و ارائه جایگزینی مناسب برای گیرنده‌های مرسوم در ایمونوتراپی سرطان‌های خونی به‌شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی و محیط‌های کشت:

محیط‌های کشت سلولی: محیط‌های کشت RPMI ۱۶۴۰ (Glu⁺) و DMEM از شرکت جیبکو، ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium از شرکت StemCell Technologies تهیه گردیدند.

FBS: از شرکت جیبکو خریداری و به منظور غیرفعال‌سازی سیستم کمپلمان و سایر عوامل مخرب پروتئینی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری حرارت داده شد.

محیط فریز کردن سلول‌ها: از ترکیب ۱۰٪ DMSO و ۹۰٪ FBS برای ذخیره‌سازی همه رده‌های سلولی استفاده شد. رده‌های سلولی Raji (بیان‌کننده CD19) و K562 (فاقد CD19) از بانک سلولی ATCC تهیه شدند.

تولید ذرات ویروسی حامل سازه CAR:

در این تحقیق برای تولید ذرات ویروسی حاوی ژن کایمیریک از وکتورهای لنتی ویروسی نسل سوم (Self Inactivating) هدیه از آزمایشگاه دکتر فلات استفاده شد. پس از تأیید صحت توالی سازه‌های طراحی‌شده، استخراج پلاسمیدها با استفاده از کیت کیاژن Midiprep مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده جهت تولید لنتی ویروس‌های حامل گیرنده کایمیریک (CAR) به مرکز Viral Vector Core دانشگاه ماساچوست ارسال شدند (۱۳).

جداسازی سلول‌های T از خون محیطی اهداکننده سالم و فعال‌سازی آن‌ها:

جهت جداسازی سلول‌های T از خون محیطی افراد سالم، از کیت RosetteSep™ Human T Cell Enrichment Cocktail مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. نمونه‌های خونی از دو زن ۶۷ و ۳۱ ساله و سه مرد ۷۷، ۴۱ و ۳۵ ساله جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی، تعداد 1×10^6 سلول در هر چاهک از پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای در حجم ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت ImmunoCult™-XF T Cell Expansion Medium کشت داده شدند. به منظور فعال‌سازی سلول‌های T، عوامل تحریک‌کننده شامل ImmunoCult Human T cell Activator CD2/CD3/CD28 و سیتوکاین‌های IL-

21، IL-15 و IL-7 به محیط کشت اضافه شده و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند.

ترانسفکت کردن سلول‌های T:

به طور خلاصه، محلول رترونتکین با غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در PBS رقیق شد و به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر چاهک از پلیت‌های ۲۴ چاهکی تیمار نشده اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس محلول رترونتکین خارج شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول بلاکینگ شامل Hanks' balanced salt solution (HBSS) به همراه BSA ۲ درصد به هر چاهک افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس محلول بلاکینگ خارج گردید و چاهک‌ها با محلول HBSS حاوی BSA ۲/۵٪ شست و شو شدند. لنتی‌ویروس‌ها به سرعت ذوب و به هر چاهک پوشش داده‌شده با رترونتکین با نسبت تکثیر عفونی (Multi plicity of infection : MOI) برابر با ۲۰ در محیط کشت سلول T (۱ میلی‌لیتر به‌ازای هر چاهک) اضافه شدند. پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در ۲۰۰۰ g و دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سپس یک میلیون سلول تحریک‌شده در ازاء هر چاهک به پلیت‌های پوشش داده شده با رترونتکین اضافه شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و در نهایت به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. عمل ترانسداکشن روز بعد تکرار شد و پلیت‌ها یک شب دیگر انکوبه شدند (۱۴).

تکثیر سلول‌های T حاوی سازه CAR با استفاده از سلول‌های مغذی:

برای آماده‌سازی سلول‌های مغذی، از سلول‌های PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) تازه جدا شده از فرد سالم و هم‌چنین رده سلولی TM-LCL (هدیه‌ای از آزمایشگاه دکتر جنسن) استفاده شد. به منظور مهار تکثیر، سلول‌های PBMC و TM-LCL به ترتیب تحت تابش با دوزهای ۳۵ Gy و ۸ Gy قرار گرفتند. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های T با لنتی‌ویروس‌های حاوی سازه CAR، سلول‌های مغذی به همراه محیط کشت تازه حاوی سیتوکاین‌های IL-21، IL-15 و IL-7 به محیط کشت اضافه شد. به منظور حفظ شرایط رشد و تحریک مناسب، دو سوم محیط کشت هر دو روز یک بار با محیط تازه حاوی همان سیتوکاین‌ها تعویض شد.

بررسی قابلیت کشندگی سلول‌های T حاوی سازه CAR با استفاده از تست لوسیفراز:
در این روش، از دو رده سلولی Raji و k562 که به طور

پایدار بیان‌کننده لوسیفراز بودند، به عنوان سلول‌های هدف استفاده شد. سلول‌های T ترانسدوس‌شده با سازه CAR به مدت ۲۴ ساعت با سلول‌های هدف، با نسبت ۱۰ به ۱ (سلول هدف به سلول T)، هم‌کشتی داده شد. پس از این مدت، سوسترای دی لوسیفیرین به محیط کشت افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون، میزان نور تولید شده به عنوان شاخصی از زنده‌مانی سلول‌های هدف و در نتیجه کارایی کشندگی سلول‌های T اندازه‌گیری گردید. نقطه مرجع ۱۰۰٪ لیز با کشت سلول‌های هدف در محلول SDS ۱٪ به عنوان MINSDS تعیین شد. نقطه مرجع ۰٪ لیز (MAXmedia) با کشت سلول‌های هدف در محیط کشت بدون سلول‌های T مشخص گردید. درصد سیتوتوکسیسیته سلول‌های CAR-T با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۵):

$$\% \text{ Specific Lysis} = \left(1 - \frac{RLU_{\text{sample}} - RLU_{SDSmin}}{RLU_{MAXmedia} - RLU_{SDSmin}} \right) \times 100$$

RLU: Relative Luminescence Unit یا واحد نسبی نور
RLU_{sample}: مقدار RLU برای نمونه مورد نظر
RLU_{SDSmin}: مقدار RLU حاصل از لیز کامل سلول‌ها در حضور SDS (کنترل مثبت)
RLU_{MAXmedia}: مقدار RLU در شرایط پایه (سلول‌ها در محیط کشت بدون تیمار؛ کنترل منفی)
مقادیر خارج از بازه ۰٪ تا ۱۰۰٪ که به علت نوسانات فنی-زیستی و محدودیت‌های کنترل‌ها رخ می‌دهند، مطابق رویه رایج، تنها به ۰٪ یا ۱۰۰٪ کپ شدند و سایر داده‌ها بدون تغییر گزارش گردیدند.

فلو سیتومتری:

در روز سوم پس از ترانسداکشن، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های کونژوگه فلورسنت رنگ‌آمیزی شدند (جدول ۱). سپس نمونه‌ها با دستگاه فلو سیتومتر مدل LSRII مورد تحلیل قرار گرفتند و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار FlowJo تحلیل و تفسیر شدند.

جدول ۱: آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در فلو سیتومتری

مارکر	کونژوگه (Fluorochrome)	شرکت تولیدکننده
CD3	FITC	BioLegend (USA)
CD3	APC	BioLegend (USA)
CD4	APC	BioLegend (USA)
CD45	APC	BioLegend (USA)
IL-2	PE-Cy7	BioLegend (USA)
IFN-γ	PE-Cy7	BioLegend (USA)
CAR	FITC	ImmunoResearch (USA)
Viability dye	Violet Fixable Live/Dead	Invitrogen (USA)

سنجش تولید/اینترفرون-گاما و اینترلوکین-۲ توسط سلول‌های T مهندسی شده:

به منظور ارزیابی تولید سیتوکاین‌های اینترلوکین-۲ و اینترفرون-گاما در سلول‌های CAR-T، این سلول‌ها به مدت یک شب با سلول‌های هدف هم‌کشتی داده شدند. در چهار ساعت پایانی کشت، به محیط مونسنین (Monensin) افزوده شد تا از ترشح سیتوکاین جلوگیری شود و سپس انکوباسیون ادامه یافت. در ادامه، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های کونژوگه ضد اینترلوکین-۲ و اینترفرون-گاما رنگ‌آمیزی داخل سلولی شده و با استفاده از فلوسیتومتری مورد تحلیل قرار گرفتند. هم‌چنین، مایع رویی کشت برای سنجش مقدار ترشح شده اینترلوکین-۲ و اینترفرون-گاما با استفاده از کیت ELISA (Invitrogen) بررسی شد.

تحلیل آماری داده‌ها:

تجزیه و تحلیل داده‌های تجربی با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد. برای مقایسه میان گروه‌ها از آزمون‌های آماری ANOVA یک طرفه و دو طرفه و هم‌چنین آزمون T مستقل استفاده گردید. اختلافات با مقدار p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

افزایش کارایی ترانسداکشن و بیان گیرنده کایمیریک در سلول‌های T با استفاده از سلول‌های مغذی و سیتوکاین‌ها: جهت طراحی گیرنده‌های کایمیریک (CAR) مورد استفاده در این مطالعه، از نانوبادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن CD19 استفاده شد. این نانوبادی‌ها پیش‌تر توسط دکتر بنی‌هاشم از میان مجموعه‌ای از نانوبادی‌های مشتق از شترسانان جداسازی و مشخصه‌یابی شده بودند. در میان آن‌ها، دو نانوبادی H2 و H85 بالاترین میزان اتصال (affinity) به CD19 را نشان دادند و در ساختار گیرنده‌های CAR مورد استفاده قرار گرفتند.

هر دو سازه طراحی شده شامل ناحیه شناسایی‌کننده آنتی‌ژن (نانوبادی)، ناحیه لولا (hinge)، ناحیه ترانس ممبران (CD3، 4-1BB و یا هر دو) و ناحیه سیگنال‌دهنده داخل سلولی CD3 بودند که به صورت توالی ژنی در پلاسمیدهای لنتی‌ویروسی کلون شدند. بررسی کیفیت سلول‌های T توسط فلوسیتومتری و مقایسه آن با سلول‌های PBMCs جدا شده از خون نشان می‌دهد که پس از جداسازی حدود ۹۵٪ سلول‌ها حاوی CD3⁺ می‌باشند که در مقایسه با سلول‌های PBMCs (۴۵٪) میزان خلوص ۲ برابر افزایش یافته است (شکل A-۱). با توجه به پایین بودن سطح بیان گیرنده کایمیریک (CAR) در سلول‌های T پس از ترانسداکشن اولیه با وکتور ویروسی، از یک

دستورالعمل بهینه‌سازی شده برای تکثیر و گسترش سلول‌های ترانسداکت شده بهره گرفته شد. در این دستورالعمل، به منظور بهبود زنده‌مانی، رشد، و القای بیان پایدار سازه در سلول‌های T، از سلول‌های مغذی استفاده گردید. بدین ترتیب، سلول‌های T ترانسداکت شده در مجاورت سلول‌های مغذی که پیش‌تر با اشعه گاما غیرتکثیرپذیر شده بودند، در محیط کشت حاوی ترکیب سیتوکاین‌های IL-7، IL-15، IL-21 و IL-7 به مدت ۱۲ روز انکوبه شدند (شکل B-۱).

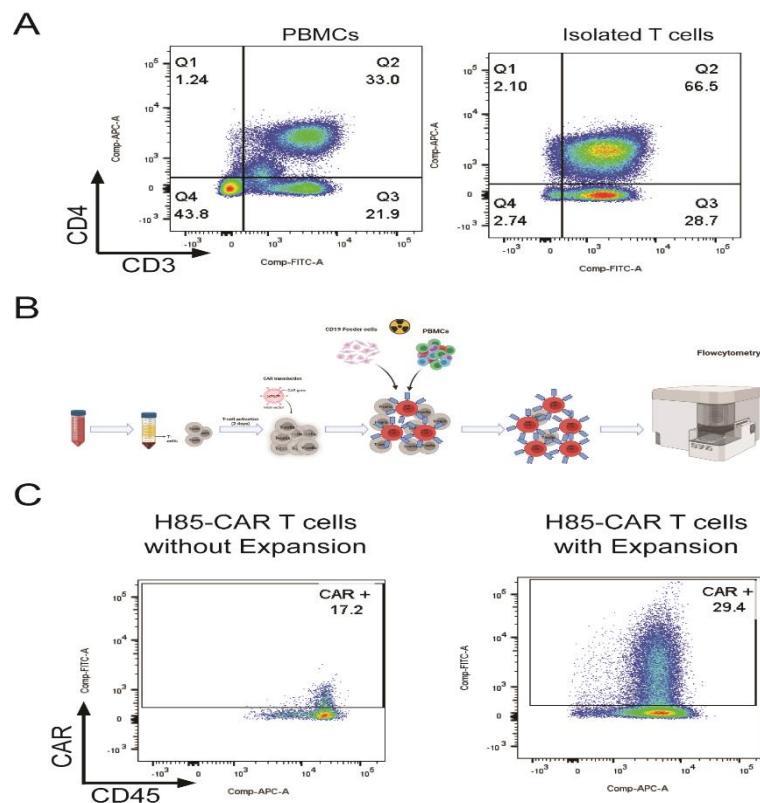
برای صحت‌سنجی نقش سلول‌های مغذی در بهبود بیان، گروه کنترلی از سلول‌های T ترانسداکت شده بدون تیمار سلول‌های مغذی نیز به صورت هم‌زمان تجزیه و تحلیل گردید. نتایج حاصل از آنالیز فلوسیتومتری نشان داد که گروه دریافت‌کننده سلول‌های مغذی، حدود ۱۲ درصد افزایش در سطح بیان گیرنده CAR نسبت به گروه کنترل داشته‌اند (شکل C-۱).

این افزایش بیان به ویژه در سلول‌های زنده، که با gating اختصاصی در نمودار فلوسیتومتری تفکیک شده‌اند، مشهود بود. این یافته تأکیدی بر نقش کلیدی محیط هم‌کشت و سیگنال‌های هم‌افزای سلول‌های مغذی و سیتوکاین‌ها در ارتقاء کارایی ترانسداکشن و بیان پایدار گیرنده‌های کایمیریک در سلول‌های T می‌باشد.

تولید اینترفرون-گاما توسط CAR-T های حاوی نانوبادی H85 و H2 در مواجهه با CD19:

یکی از ویژگی‌های کلیدی سلول‌های CAR-T، توانایی آن‌ها در تولید سیتوکاین‌های التهابی از جمله اینترفرون-گاما (IFN- γ) در پاسخ به شناسایی آنتی‌ژن هدف است. این پاسخ سیتوکاینی نقش مهمی در تحریک سیستم ایمنی و القای مرگ سلول‌های توموری دارد و به عنوان یکی از شاخص‌های مهم ارزیابی عملکرد سلول‌های CAR-T مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶).

در این مطالعه، به منظور ارزیابی عملکرد سیتوکاینی سلول‌های مهندسی‌شده، میزان تولید اینترفرون-گاما در شرایط مختلف از طریق دو روش مکمل شامل فلوسیتومتری داخل سلولی و آزمون الایزا (ELISA) بررسی گردید. در این آزمایش‌ها، سلول‌های CAR-T با سلول‌های هدف دارای آنتی‌ژن CD19 (سلول‌های Raji) و نیز با سلول‌های فاقد CD19 (سلول‌های K562) انکوبه شدند. هم‌چنین، یک گروه بدون سلول هدف به عنوان کنترل منفی برای بررسی سطح پایه‌ای تولید سیتوکاین در نظر گرفته شد، و تحریک با آنتی‌بادی‌های CD3/CD28 نیز به عنوان کنترل مثبت به منظور ارزیابی کلی عملکرد سلول‌های T انجام شد.



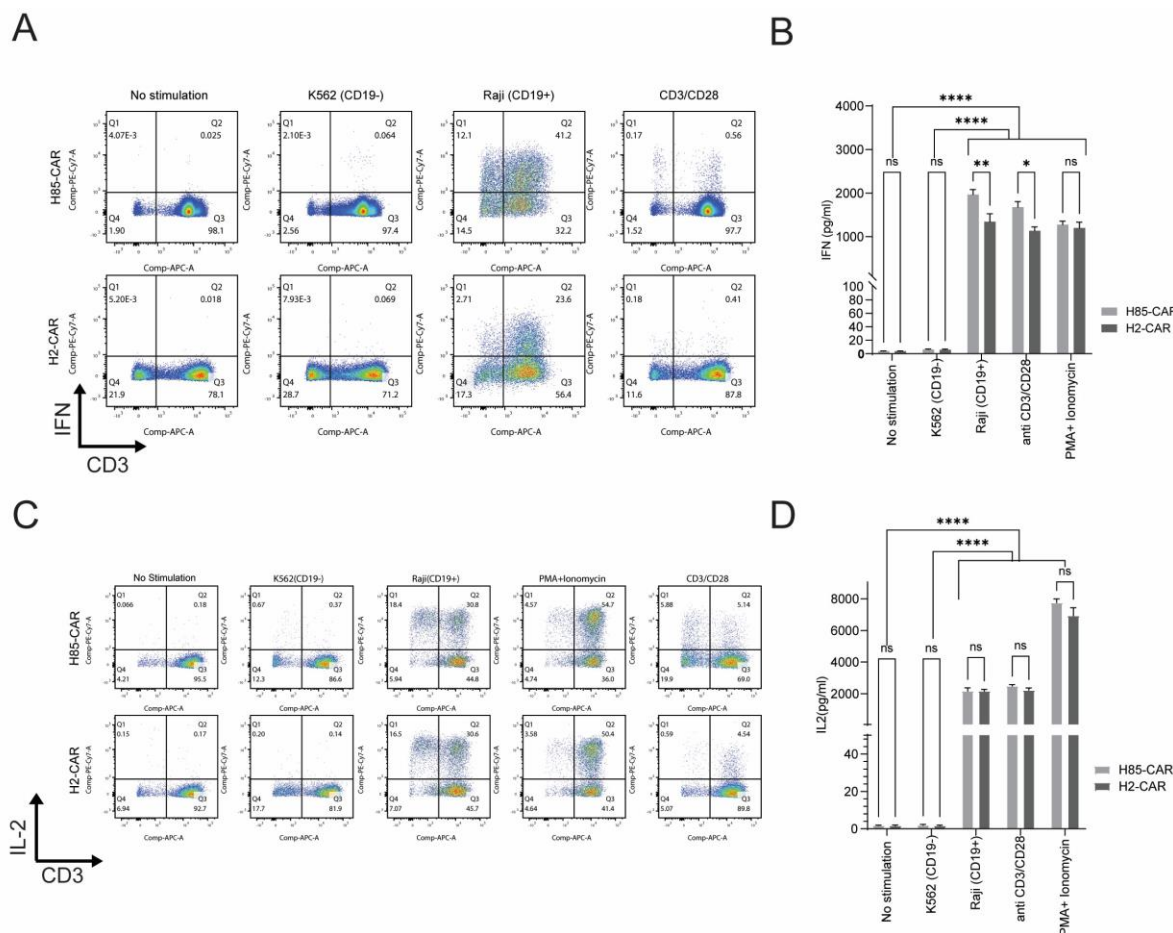
شکل ۱: ارزیابی تکثیر و بیان گیرنده در سلول های CAR-T. (A) تحلیل فلوسیتومتری سلول های PBMC پیش و پس از جداسازی سلول های T؛ پیش از جداسازی حدود ۵۵٪ سلول ها از نوع T بوده و پس از جداسازی خلوص سلول های T به حدود ۹۵٪ افزایش یافت. تنها سلول های زنده در نمودار نمایش داده شده اند. (B) نمای کلی از فرآیند تکثیر سلول های CAR-T پس از ترانسداکشن و کشت در حضور سیتوکاین ها و سلول های مغذی. (C) نمودار فلوسیتومتری نشان دهنده بیان گیرنده CAR در سلول های T مهندسی شده، با و بدون فرآیند تکثیر. نتایج نشان می دهد میزان بیان CAR پس از تکثیر تقریباً دو برابر افزایش یافته است. تنها سلول های زنده در نمودار نمایش داده شده اند.

نتایج به دست آمده از آزمون ELISA برای اندازه گیری اینترفرون-گاما در مایع رویی کشت نیز این یافته ها را تایید کرد و هم راستا با داده های فلوسیتومتری نشان داد که سلول های حاوی سازه H85 در مواجهه با سلول های Raji، مقادیر بیشتری از این سیتوکاین را ترشح می کنند (شکل B-۲).

هم چنین در آنالیز فلوسیتومتری، تنها سلول های زنده مورد تحلیل قرار گرفتند تا از صحت داده ها و حذف نویز ناشی از سلول های مرده اطمینان حاصل شود. در مجموع، این داده ها مؤید آن است که سازه حاوی نانوبادی H85 از نظر القای پاسخ عملکردی در سلول های T، اثربخشی بالاتری نسبت به H2 دارد و می تواند گزینه مناسبی برای توسعه نسل جدیدی از سلول های CAR-T بر پایه نانوبادی ها باشد. افزایش تولید سیتوکاین ها، به ویژه اینترلوکین-۲، یکی از شاخص های کلیدی فعال سازی سلول های T مهندسی شده با گیرنده کایمیریک (CAR-T) پس از شناسایی آنتی ژن هدف می باشد. به منظور بررسی عملکرد سازه های طراحی

نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که در حضور سلول های Raji، سلول های CAR-T حاوی هر دو سازه و نانوبادی های H2 و H85 به طور چشمگیری تولید اینترفرون-گاما را افزایش دادند؛ به طوری که درصد سلول های تولید کننده اینترفرون-گاما در این شرایط به مراتب بالاتر از شرایط فاقد آنتی ژن یا گروه کنترل بدون محرک بود (شکل A-۲). این یافته نشان دهنده پاسخ اختصاصی سلول های مهندسی شده به حضور آنتی ژن CD19 است.

نکته قابل توجه دیگر آن است که در مقایسه بین دو سازه طراحی شده، سلول های حاوی سازه نانوبادی H85 در مواجهه با سلول های Raji تقریباً دو برابر بیش از سلول های حاوی سازه شامل نانوبادی H2، اینترفرون-گاما تولید کردند. این تفاوت معنادار عملکردی می تواند ناشی از ویژگی های بیولوژیکی بهتر نانوبادی H85 در شناسایی و اتصال به CD19 باشد، که منجر به فعال سازی قوی تر مسیرهای سیگنالینگ در سلول های CAR-T می شود.



شکل ۲: تحلیل عملکرد سلول‌های CAR-T در شرایط کشت متفاوت. (A) تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری داخل سلولی برای بررسی تولید اینترفرون-گاما (IFN- γ) در سلول‌های CAR-T حاوی نانوبادی‌های H2 و H85 پس از کشت در شرایط مختلف. (B) سنجش غلظت اینترفرون-گاما (IFN- γ) در مایع رویی سلول‌های CAR-T حاوی نانوبادی‌های H2 و H85 با استفاده از آزمون ELISA. (C) بررسی تولید داخل سلولی اینترفرون-کین-۲ با فلوسیتومتری پس از تحریک سلول‌های CAR-T حاوی نانوبادی‌های H2 و H85. (D) سنجش غلظت اینترفرون-کین-۲ در مایع رویی کشت با استفاده از آزمون ELISA. نمودارها بر اساس داده‌های حاصل از سه دهنده مستقل تهیه شده‌اند که هر آزمایش برای هر دهنده در شش تکرار انجام شده است. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM نمایش داده شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دو طرفه ANOVA (2-way ANOVA) انجام شد. ns: غیرمعنادار ($p > 0.05$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. بدون تحریک (کنترل منفی)، تحریک با آنتی‌بادی CD3/CD28 (کنترل مثبت)، کشت با سلول‌های Raji، کشت با سلول‌های K562 و تحریک با PMA/ionomycin (کنترل مثبت) بوده است.

می‌باشد.

با این حال، بر خلاف آن چه در مورد اینترفرون-گاما مشاهده شد، مقایسه بین دو سازه نشان داد که میزان ترشح اینترفرون-کین-۲ در سلول‌های حاوی نانوبادی H85 و H2 تفاوت معناداری ندارد، و پاسخ ایمنی مشابهی از نظر این سیتوکاین میان دو گروه دیده می‌شود. این یافته می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که گرچه هر دو سازه توانایی تحریک ترشح اینترفرون-کین-۲ را دارند، اما سازه H85 نسبت به سازه H2 در این زمینه برتری عملکردی خاصی ندارد.

نتایج حاصل از آزمون ELISA نیز این یافته‌ها را تایید نمود (شکل D-۲). ترشح اینترفرون-کین-۲ به طور معناداری در هم‌کشت با سلول‌های Raji افزایش یافته بود، در حالی که هم‌کشتی با سلول‌های K562 و یا عدم وجود محرک،

شده در القای پاسخ ایمنی، میزان ترشح اینترفرون-کین-۲ در شرایط تحریکی مختلف به صورت دقیق ارزیابی گردید. برای این منظور از دو روش مکمل، شامل فلوسیتومتری داخل سلولی و آزمون ELISA بر روی مایع رویی کشت، استفاده شد.

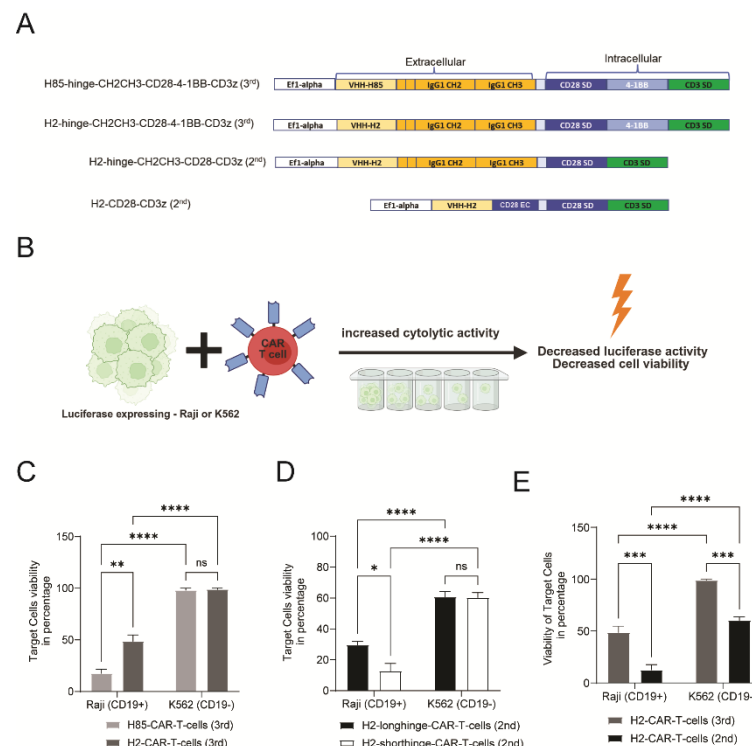
نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که در سلول‌های CAR-T بیان‌کننده هر دو سازه نانوبادی H85 و نانوبادی H2، میزان تولید اینترفرون-کین-۲ پس از هم‌کشتی با سلول‌های هدف Raji (دارای آنتی‌ژن CD19) افزایش قابل توجهی داشت، در حالی که در شرایط فاقد آنتی‌ژن (هم‌کشت با سلول‌های K562) یا عدم وجود محرک، چنین افزایشی مشاهده نشد (شکل C-۲). این نتایج بیانگر فعال شدن سلول‌های T در پاسخ به شناسایی آنتی‌ژن CD19

بررسی توانایی شناسایی آنتی‌ژن مستقل از MHC و هدف‌گیری سلول‌های توموری، سلول‌های CAR-T رده‌های Raji و K562 بیان‌کننده ژن لوسیفراز به نسبت ۱۰:۱ هم‌کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت، میزان زنده‌مانی سلول‌های هدف با افزودن دی‌لوسیفیرین و سنجش لومینسانس اندازه‌گیری شد (شکل B-۳). نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که هر دو سازه H2 و H85 فعالیت کشندگی قابل توجهی علیه سلول‌های Raji دارند، در حالی که چنین اثری بر سلول‌های K562 مشاهده نشد (شکل C-۳). هم‌چنین مقایسه بین سازه‌ها نشان داد که سلول‌های CAR-T حاوی نانوبادی H85 نسبت به سازه H2 عملکرد بهتری در القای کشندگی از خود نشان می‌دهند. در مرحله بعد، جهت بررسی تأثیر طول ناحیه لولا (hinge region) بر کارایی سازه، دو نسخه از سازه‌های نسل دوم حاوی نانوبادی H2 با لولاهای کوتاه و بلند مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هر دو سازه دارای توان کشندگی قابل توجهی علیه سلول‌های Raji هستند، اما نسخه دارای لولای کوتاه‌تر در القای کشندگی عملکرد بهتری نسبت به سازه با لولای بلندتر نشان داد (شکل D-۳).

منجر به ترشح قابل توجهی از این سیتوکاین نشد. هم‌چنین مشابه با نتایج فلوسیتومتری، تفاوت بارزی میان سازه H85 و H2 از نظر سطح ترشح اینترلوکین-۲ مشاهده نگردید. این عدم تفاوت در پاسخ اینترلوکین-۲، در تضاد با نتایج حاصل از بررسی ترشح اینترفرون-گاما می‌باشد، که در آن سازه H85 عملکرد بهتری از خود نشان داده بود. به طور کلی، این نتایج نشان می‌دهند که هر دو سازه قادر به فعال‌سازی مسیرهای ترشح اینترلوکین-۲ در پاسخ به آنتی‌ژن CD19 هستند، اما برخلاف اینترفرون-گاما، از نظر قدرت پاسخ‌دهی تفاوت معناداری بین آن‌ها مشاهده نمی‌شود. این تفاوت در الگوی سیتوکاینی می‌تواند به ساختار نانوبادی، ویژگی‌های سیگنالی CAR یا حتی حساسیت تنظیم مسیرهای سیگنالی متفاوت در سلول‌های T باز گردد، که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.

تأثیر طراحی سازه CAR بر توان کشندگی سلول‌های T مهندسی شده:

در این مطالعه، سازه‌های مختلف گیرنده کایمیریک (CAR) شامل لولاهای کوتاه و بلند و نیز نسل دوم و سوم طراحی و در سلول‌های T بیان شدند (شکل A-۳). برای



شکل ۳: طراحی و ارزیابی عملکرد سازه‌های مختلف CAR-T بر پایه نانوبادی. (A) نمای شماتیک از ساختار سازه‌های مختلف CAR طراحی‌شده در این مطالعه. (B) طرح کلی نحوه انجام آزمون سیتوتوکسیسیته در هم‌کشتی با سلول‌های هدف. (C) نتایج مقایسه سیتوتوکسیسیته دو سازه نسل سوم حاوی نانوبادی‌های H2 و H85. (D) مقایسه عملکرد سازه‌های نسل دوم حاوی نانوبادی H2 با لولای کوتاه در برابر لولای بلند در آزمایش سیتوتوکسیسیته. (E) ارزیابی تفاوت عملکرد بین سازه‌های نسل دوم و سوم CAR حاوی نانوبادی H2 در آزمایش سیتوتوکسیسیته. سلول‌های هدف شامل Raji (حاوی آنتی‌ژن CD19) و K562 (فاقد آنتی‌ژن CD19) بودند. نمودارها بر اساس داده‌های حاصل از سه دهنده مستقل تهیه شده‌اند که هر آزمایش برای هر دهنده در شش تکرار انجام شده است. نمودارها بر اساس میانگین $\pm$ SEM ترسیم شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون دوطرفه ANOVA (2-way ANOVA) انجام شد. ns: غیرمعنادار ($p > 0.05$); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

آنتی‌ژن‌هایی با دسترسی محدود یا اپی‌توپ‌های مخفی‌شده، که در طراحی‌های مبتنی بر scFv به‌سختی قابل دستیابی هستند (۱۸، ۱۹).

از سوی دیگر، استفاده از نانوبادی‌ها با حذف ناحیه linker میان زنجیره‌های سنگین و سبک، خطر mispairing یا جفت شدن نامناسب را نیز کاهش می‌دهد که در بسیاری از scFv‌ها دیده می‌شود و موجب کاهش کارایی یا حتی القای سیگنال‌های نامناسب می‌گردد. هم‌چنین نانوبادی‌ها به واسطه توانایی مهندسی بالا و قابلیت ادغام در فرمت‌های دو گانه یا چند گانه هدف‌گیری آنتی‌ژن، فرصت‌هایی جدید برای توسعه نسل‌های بعدی CAR-T فراهم می‌کنند (۲۰).

یکی از یافته‌های مهم این پژوهش، عملکرد برتر سازه حاوی نانوبادی H85 نسبت به H2 در القای پاسخ سیتوکاینی، به ویژه اینترفرون-گاما، و افزایش کشندگی در برابر سلول‌های CD19⁺ بود. این تفاوت عملکردی می‌تواند ناشی از ویژگی‌های متفاوت اتصال آنتی‌ژنی، پایداری فضایی، یا توانایی فعال‌سازی مؤلفه‌های سیگنال‌دهی پایین دستی در این دو نانوبادی باشد. جالب توجه است که سطوح تولید اینترفرون- γ بین دو سازه تفاوت معناداری نداشت، که ممکن است نشان‌دهنده تفاوت در مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به نوع سیتوکاین یا تفاوت در آستانه تحرک باشد. این یافته با گزارش‌های پیشین از جمله مطالعه بنی‌هاشم و همکاران هم‌راستا است که نشان دادند نانوبادی H85 دارای تمایل اتصال (affinity) بالاتری به CD19 نسبت به H2 می‌باشد (۱۲). هم‌چنین، مشاهدات مشابهی در مطالعه‌های دیگری مانند مائو و همکاران نیز گزارش شده است که در آن، تفاوت‌های عملکردی میان CARهایی با دامنه‌های شناسایی مختلف مورد بررسی قرار گرفته بود (۲۱).

افزون بر این، تحلیل سازه‌های مختلف نشان داد که طول ناحیه لولا و نوع اجزای سیگنال‌دهی داخل‌سلولی اثر تعیین‌کننده‌ای بر عملکرد نهایی سلول‌های CAR-T دارند. در مقایسه سازه‌هایی با لولاهای کوتاه و بلند و طراحی‌های نسل دوم و سوم، سازه حاوی لولای کوتاه و طراحی نسل دوم (مشمتمل بر دومین‌های CD28 و CD3 ζ) توان سیتوتوکسیک قوی‌تری در برابر سلول‌های CD19⁺ از خود نشان داد. این یافته با نتایج مطالعه‌های پیشین همسو است که در آن نشان داده شد طول و انعطاف‌پذیری ناحیه لولا می‌تواند فاصله فیزیکی میان CAR و آنتی‌ژن هدف را تنظیم کرده و در نتیجه بر نحوه سیناپس ایمنی و شدت سیگنال‌دهی اثرگذار باشد (۲۴-۲۲). نقش لولا نه تنها در تنظیم فاصله فضایی، بلکه در پایداری گیرنده، آنتی‌ژن‌گیری و در دسترس‌بودن دامنه شناسایی نیز اهمیت دارد. گزارش‌های دیگر نیز نشان داده‌اند که طول بیش از

در ادامه، دو سازه از نسل دوم و سوم CAR، هر دو حاوی نانوبادی H2، با یکدیگر مقایسه شدند (شکل E-۳). نتایج نشان داد که هر دو سازه توانایی کشندگی معناداری علیه سلول‌های هدف CD19⁺ دارند، اما فعالیت سازه نسل دوم به طور نسبی بالاتر از نسل سوم بوده و تفاوت معناداری بین این دو در پاسخ به سلول‌های هدف مشاهده شد. علاوه بر این، هر دو سازه به طور معناداری بین سلول‌های Raji و K562 تمایز عملکردی از نظر کشندگی نشان دادند. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهند که طراحی مناسب نانوبادی، طول ناحیه لولا و نوع نسل سازه CAR می‌تواند نقش مهمی در بهینه‌سازی عملکرد کشندگی سلول‌های CAR-T ایفا کند.

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که طراحی و تولید سلول‌های CAR-T بر پایه نانوبادی ضد CD19 می‌تواند منجر به القای پاسخ‌های ایمنی اختصاصی و کارآمد علیه سلول‌های B بدخیم شود. برخلاف ساختارهای رایج مبتنی بر scFv، که معمولاً از آنتی‌بادی‌های کامل انسانی یا موشی مشتق می‌شوند و مستعد تشکیل دیم‌های ناپایدار و القای پاسخ‌های ایمنی هستند، نانوبادی‌ها (VHH) به واسطه اندازه کوچک (~15 kDa)، ساختار تک دومینی، پایداری حرارتی بالا و قابلیت بیان مؤثر در سلول‌های پستانداران و حتی پروکاریوت‌ها، جایگزینی مطلوب برای افزایش پایداری و عملکرد CAR محسوب می‌شوند (۱۷، ۱۱).

در مطالعه حاضر، جایگزینی scFv با نانوبادی منجر به افزایش بیان گیرنده در سطح سلول‌های T و تقویت پاسخ‌های عملکردی علیه سلول‌های CD19⁺ گردید. یافته‌های این مطالعه در راستای گزارش اخیر منتشر شده توسط نصیری و همکاران نیز قرار دارد، که در آن نشان داده شد سلول‌های T مهندسی شده با گیرنده کایمیریک مبتنی بر نانوبادی ضد (VHH-CAR) CD19 دارای کارایی کشندگی توموری مشابه با سلول‌های CAR-T کلاسیک بر پایه (FMC63) scFv هستند، بدون آن که تفاوت معناداری در تولید سیتوکاین یا توان تکثیر مشاهده شود (۱۰). هم‌راستایی داده‌های ما با این گزارش، به ویژه در زمینه اثربخشی عملکردی، بیان سطحی CAR و پایداری سلولی، نشان می‌دهد که نانوبادی‌ها می‌توانند جایگزینی مؤثر و ایمن برای scFv در طراحی نسل‌های جدید سلول‌های CAR-T باشند و گزینه‌ای جذاب برای کاهش پیچیدگی ساختاری، بهبود نفوذ بافتی و کاهش ایمنی‌زایی تلقی شوند. افزون بر این، مطالعه‌های متعددی نیز مزایای مشابهی برای نانوبادی‌ها گزارش کرده‌اند، از جمله کاهش ایمنی‌زایی، بهبود نفوذ به بافت‌های توموری، و توانایی هدف‌گیری

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های CAR-T مبتنی بر نانوبادی ضد CD19 می‌توانند به طور مؤثری سلول‌های B بدخیم را شناسایی و از بین ببرند. به‌کارگیری نانوبادی در ساختار گیرنده کایمیریک منجر به افزایش پاسخ سیتوکایینی و کشندگی هدفمند شد و انتخاب نوع نانوبادی، طول ناحیه لولا و نسل سازه نقش تعیین‌کننده‌ای در بهینه‌سازی عملکرد این سلول‌ها ایفا کردند. این یافته‌ها پتانسیل بالای نانوبادی‌ها را به عنوان جایگزینی مؤثر برای scFv در نسل‌های آینده سلول‌های CAR-T نشان می‌دهد و می‌تواند راه را برای طراحی درمان‌های ایمن‌تر و مؤثرتر در سرطان‌های خونی هموار سازد.

حمایت مالی

این پژوهش به عنوان بخشی از رساله دکتری و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس مجوز گرفته است (IR.TMU.REC.1394.300).

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار کردند در انتشار این مقاله، هیچ گونه منافع تجاری نداشتند.

نقش نویسندگان

مطهره ارجمندنژاد: طراحی مطالعه، ایده پردازی، انجام آزمایش‌ها، بررسی و تحلیل داده‌ها، نگارش و ویرایش مقاله. دکتر فاطمه رهبری‌زاده: طراحی مطالعه، ایده پردازی، بررسی و نظارت بر انجام آزمایش‌ها، نگارش و ویرایش مقاله.

تشکر و قدردانی

این پژوهش به عنوان بخشی از رساله دکتری و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدردانی صمیمانه خود را از دانشگاه School (دکتر Terence Flotte و دکتر Allison Keeler)، به دلیل نقش مؤثرشان در پیشبرد این پژوهش ابراز می‌داریم.

حد لولا ممکن است با کاهش ثبات ساختاری و اختلال در انتقال سیگنال همراه باشد، در حالی که لولاهای کوتاه‌تر می‌توانند تعامل مؤثرتری میان CAR و آنتی‌ژن ایجاد کنند (۲۶، ۲۵).

از منظر طراحی داخل سلولی، نتایج مطالعه ما نشان داد که نوع دومین‌های سیگنال‌دهی نقش تعیین‌کننده‌ای در عملکرد نهایی سلول‌های CAR-T دارد. مقایسه میان سازه‌های نسل دوم و سوم حاکی از آن بود که، علی‌رغم پیچیدگی بیشتر طراحی نسل سوم که به طور معمول شامل دو دومین هم تحریکی مانند CD28 و 4-1BB می‌باشد، سازه نسل دوم (CD3ζ و CD28) در این مطالعه پاسخ سیتوتوکسیک قوی‌تری از خود نشان داد. این تفاوت می‌تواند ناشی از تداخل یا تعارض در مسیرهای سیگنال‌دهی هم‌زمان باشد، که موجب کاهش شدت پاسخ اولیه یا تأخیر در فعال‌سازی سلول می‌شود؛ موضوعی که پیش‌تر نیز در مطالعه‌ها مطرح شده است (۲۸، ۲۷). در برخی گزارش‌ها، مانند مطالعه ژائو و همکاران، سازه‌های نسل سوم مزایایی نظیر پایداری عملکردی طولانی‌تر و کاهش خستگی سلولی را در شرایط مزمن نشان داده‌اند (۲۹، ۲۷). با این حال، در زمینه درمان‌های نیازمند پاسخ فوری و قوی، هم‌چون بدخیمی سلول‌های B با بیان بالای CD19، ممکن است طراحی نسل دوم با پاسخ سریع‌تر و مؤثرتر، عملکرد بهتری ارائه دهد.

افزون بر این، مطالعاتی نظیر لانگ و همکاران نیز نشان داده‌اند که نوع دومین هم تحریکی نه تنها بر قدرت و دوام پاسخ اثر می‌گذارد، بلکه بر ویژگی‌های حافظه‌ای، بقای درون‌تنی، و سطح بیان سیتوکاین‌ها نیز تأثیرگذار است (۳۰). داده‌های ما این موضوع را تأیید می‌کند، به گونه‌ای که سازه نسل دوم در شرایط آزمایشگاهی پاسخ کشندگی بهتری نسبت به نسل سوم ارائه داد. این یافته‌ها بر اهمیت انتخاب هدفمند دومین‌های داخل سلولی بر اساس نوع بیماری، شدت آنتی‌ژن و هدف درمانی تأکید دارد.

در مجموع، یافته‌های ما بر اهمیت طراحی ساختاری دقیق در سازه‌های CAR تأکید دارد و نشان می‌دهد که انتخاب هدفمند نوع دامنه شناسایی، طول لولا و دومین‌های سیگنال‌دهی داخل سلولی باید با در نظر گرفتن توازن میان شدت پاسخ اولیه، دوام طولانی مدت و اجتناب از خستگی سلولی صورت گیرد. این ملاحظات می‌توانند به بهینه‌سازی کارایی درمانی سلول‌های CAR-T، به ویژه در مواجهه با تومورهای مقاوم یا محیط‌های سرکوبگر ایمنی، کمک شایانی نمایند.

References:

- 1- Rheingold SR, Bhojwani D, Ji L, Xu X, Devidas M, Kairalla JA, *et al.* Determinants of survival after first relapse of acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2024; 38(11): 2382-94.
- 2- Iqbal M, Kharfan-Dabaja MA. Relapse of Hodgkin lymphoma after autologous hematopoietic cell transplantation: A current management perspective. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2021; 14(2): 95-103.
- 3- Zhou D, Zhu X, Xiao Y. CAR-T cell combination therapies in hematologic malignancies. *Exp Hematology Oncol* 2024; 13(1): 69.
- 4- Cuenca M, Peperzak V. Advances and Perspectives in the Treatment of B-Cell Malignancies. *Cancers (Basel)* 2021; 13(9): 2266.
- 5- Maleki EH, Bahrami AR, Matin MM. Cancer cell cycle heterogeneity as a critical determinant of therapeutic resistance. *Genes Dis* 2024; 11(1): 189-204.
- 6- Mazinani M, Rahbarizadeh F. New cell sources for CAR-based immunotherapy. *Biomark Res* 2023; 11(1): 49.
- 7- Ramírez-Chacón A, Betriu-Méndez S, Bartoló-Ibars A, González A, Martí M, Juan M. Ligand-based CAR-T cell: Different strategies to drive T cells in future new treatments. *Front Immunol* 2022; 13: 932559.
- 8- Tang L, Huang Z, Mei H, Hu Y. Immunotherapy in hematologic malignancies: achievements, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1): 306.
- 9- Rajabzadeh A, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D, Kabir Salmani M, Hamidieh AA. A VHH-Based Anti-MUC1 Chimeric Antigen Receptor for Specific Retargeting of Human Primary T Cells to MUC1-Positive Cancer Cells. *Cell J* 2021; 22(4): 502-13.
- 10- Nasiri F, Safarzadeh Kozani P, Rahbarizadeh F. T-cells engineered with a novel VHH-based chimeric antigen receptor against CD19 exhibit comparable tumoricidal efficacy to their FMC63-based counterparts. *Front Immunol* 2023; 14: 1063838.
- 11- Jamnani FR, Rahbarizadeh F, Shokrgozar MA, Mahboudi F, Ahmadvand D, Sharifzadeh Z, *et al.* T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: Towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840(1): 378-86.
- 12- Banihashemi SR, Hosseini AZ, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D. Development of specific nanobodies (VHH) for CD19 immuno-targeting of human B-lymphocytes. *Iran J Basic Med Sci* 2018; 21(5): 455-64.
- 13- Sena-Esteves M, Gao G. Production of High-Titer Retrovirus and Lentivirus Vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018(4).
- 14- Arjomandnejad M, Sylvia K, Blackwood M, Nixon T, Tang Q, Muhuri M, *et al.* Modulating immune responses to AAV by expanded polyclonal T-regs and capsid specific chimeric antigen receptor T-regulatory cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2021; 23: 490-506.
- 15- Brown CE, Wright CL, Naranjo A, Vishwanath RP, Chang WC, Olivares S, *et al.* Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing. *J Immunol Methods* 2005; 297(1-2): 39-52.
- 16- Benmebarek MR, Karches CH, Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci* 2019; 20(6): 1283.
- 17- Safarzadeh Kozani P, Naseri A, Mirarefin SMJ, Salem F, Nikbakht M, Evazi Bakhshi S, *et al.* CAR-T cells for cancer immunotherapy. *Biomark Res* 2022; 10(1): 24.
- 18- Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol* 2017; 8: 1603.
- 19- Mazinani M, Rahbarizadeh F. CAR-T cell potency: from structural elements to vector backbone components. *Biomark Res* 2022; 10(1): 70.
- 20- Bao C, Gao Q, Li LL, Han L, Zhang B, Ding Y, *et al.* The Application of Nanobody in CAR-T Therapy. *Biomolecules* 2021; 11(2): 238.
- 21- Mao R, Kong W, He Y. The affinity of antigen-binding domain on the antitumor efficacy of CAR T cells: Moderate is better. *Front Immunol* 2022; 13: 1032403.
- 22- Hirobe S, Imaeda K, Tachibana M, Okada N. The Effects of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Hinge Domain Post-Translational Modifications on CAR-T Cell Activity. *Int J Mol Sci* 2022; 23(7): 4056.
- 23- Qin L, Lai Y, Zhao R, Wei X, Weng J, Lai P, *et al.* Incorporation of a hinge domain improves the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *J Hematol Oncol* 2017; 10(1): 68.
- 24- Fujiwara K, Tsune A, Kusabuka H, Ogaki E, Tachibana M, Okada N. Hinge and Transmembrane Domains of Chimeric Antigen Receptor Regulate Receptor Expression and Signaling Threshold. *Cells* 2020; 9(5): 1182.
- 25- Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, *et al.* The nonsignaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for *in vivo* antitumor activity. *Cancer Immunol Res* 2015; 3(2): 125-35.
- 26- Li N, Quan A, Li D, Pan J, Ren H, Hoeltzel G, *et al.* The IgG4 hinge with CD28 transmembrane domain improves VHH-based CAR T cells targeting a membrane-distal epitope of GPC1 in pancreatic cancer. *Nat Commun* 2023; 14(1): 1986.
- 27- Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, *et al.* Structural Design of Engineered Costimulation Determines Tumor Rejection Kinetics and Persistence of CAR T Cells. *Cancer Cell* 2015; 28(4): 415-28.
- 28- Milone MC, Fish JD, Carpenito C, Carroll RG, Binder GK, Teachey D, *et al.* Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther* 2009; 17(8): 1453-64.
- 29- Gomes-Silva D, Mukherjee M, Srinivasan M, Krenciute G, Dakhova O, Zheng Y, *et al.* Tonic 4-1BB Costimulation in Chimeric Antigen Receptors Impedes T Cell Survival and Is Vector-Dependent. *Cell Rep* 2017; 21(1): 17-26.
- 30- 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): 581-90.