

EVALUATING THE QUALITY OF CAR-T CELLS RECOGNIZING CD19 PROTEIN FOR THE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA TREATMENT

Can Van Mao^{1*}, Le Duy Cuong²

¹Department of Pathophysiology, Vietnam Military Medical University -
160 Phung Hung, Phuc La Ward, Ha Dong Dist, Hanoi City, Vietnam

²108 Military Central Hospital - 1 Tran Hung Dao, Bach Dang Ward, Hai Ba Trung Dist, Hanoi City, Vietnam

Received: 07/03/2025

Revised: 23/03/2025; Accepted: 25/04/2025

ABSTRACT

Objectives: Evaluating the quality of CAR - T cells for CAR - T cell therapy in vitro treats acute lymphoblastic leukemia.

Research subjects and methods: CAR - T CD19RCD137/pMC and CAR - T CD19RCD137 - iCasp9 - IL15/pMC cells were cultured to determine sterility. The cell suspension sample product was tested the endotoxin limit standard. Then, the protein was extracted by SDS page electrophoresis and western blotting. The albumin standard curve was constructed and *E. coli* protein was quantified using a Western Blot analysis system. Evaluating the expression of *E. coli* mRNA using real - time PCR.

Results: Endotoxin detection limit: 0.005 - 0.5 EU/ml, endotoxin concentration < 0.045 EU/ml. CAR - T cells were sterile. Establishing the standard curve with 1 ml of culture fluid containing 352.585 µg of protein. The weight of total protein residue in 1 ml of culture fluid is 1.15 mg, the total protein content accounts for 3.3%. The proportion of *E. coli* protein in the culture fluid sample of CAR - T cells is 0.06 - 0.21%. The culture fluid of CAR T cell samples at 3, 7 and 14 days did not show *E. coli*.

Conclusion: The results of bacterial culture, quantification of endotoxin and *E. coli* protein showed that the CAR - T cell product met the quality standard.

Keywords: CAR - T cell, endotoxin, *E. coli* protein.

*Corresponding author

Email: canvanmao@vmmu.edu.vn Phone: (+84) 944888323 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66i3.2535>

ĐÁNH GIÁ CHẤT LƯỢNG CỦA TẾ BÀO CAR-T NHẬN BIẾT PROTEIN CD19 ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH BẠCH CẦU LYMPHO CẤP

Cần Văn Mão^{1*}, Lê Duy Cường²

¹Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân y - 160 Phùng Hưng, P. Phúc La, Q. Hà Đông, Tp. Hà Nội, Việt Nam

²Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 - 1 Trần Hưng Đạo, P. Bạch Đằng, Q. Hai Bà Trưng, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 07/03/2025

Chỉnh sửa ngày: 23/03/2025; Ngày duyệt đăng: 25/04/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu tiến hành đánh giá chất lượng của tế bào CAR - T in vitro trong ứng dụng liệu pháp tế bào CAR - T điều trị bệnh bạch cầu lympho cấp.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Tế bào CAR - T CD19RCD137/pMC và CAR - T CD19RCD137 - iCasp9 - IL15/pMC được nuôi cấy để xác định tính vô trùng. Kiểm tra sản phẩm mẫu dịch tế bào đạt tiêu chuẩn về giới hạn nội độc tố. Sau đó tách chiết protein bằng kỹ thuật điện di SDS page và western blotting. Dùng đường chuẩn albumin và định lượng protein *E. coli* bằng hệ thống phân tích Western Blot. Đánh giá biểu hiện của mRNA *E. coli* bằng kỹ thuật real - time PCR.

Kết quả: Giới hạn phát hiện nội độc tố: 0,005 - 0,5 EU/ml, nồng độ nội độc tố < 0,045 EU/ml. Tế bào CAR - T đảm bảo vô trùng. Xây dựng đường chuẩn với 1 ml dịch nuôi có chứa 352,585 µg protein. Trọng lượng khối cặn protein tổng số trong 1 ml dịch nuôi là 1,15 mg, lượng protein tổng số chiếm 3,3 %. Tỷ lệ protein *E. coli* có trong mẫu dịch nuôi cấy tế bào CAR - T là 0,06 - 0,21%. Mẫu dịch nuôi cấy tế bào CAR - T tại các thời điểm ngày 3, 7 và 14 không biểu hiện *E. coli*.

Kết luận: Kết quả cấy khuẩn, định lượng nội độc tố endotoxin và protein *E. coli* cho thấy sản phẩm tế bào CAR - T đáp ứng chất lượng.

Từ khóa: Tế bào CAR - T, độc tố endotoxin, protein *E. coli*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạch cầu cấp là tình trạng tăng sinh ác tính của dòng lympho hoặc tủy, phổ biến nhất ở trẻ em dưới 15 tuổi, trong đó bạch cầu lympho cấp (Acute Lymphoblastic Leukemia - ALL) chiếm đến 75% các ca [1], [2]. Hiện nay, điều trị bạch cầu cấp chủ yếu là hóa trị liệu qua 3 giai đoạn: cảm ứng, củng cố và duy trì, nhằm tiêu diệt bệnh và phục hồi chức năng tủy. Tuy nhiên, hóa trị không thể chữa khỏi hoàn toàn mà chủ yếu giúp đạt tiêu giảm toàn phần để tiến hành ghép tế bào gốc, song tỷ lệ thành công ở người trưởng thành chỉ khoảng 20% [3]. Do đó, việc nghiên cứu các phương pháp điều trị mới hiệu quả hơn là rất cần thiết.

Một trong những phương pháp tiên tiến hiện nay là liệu pháp miễn dịch sử dụng tế bào T mang thụ thể kháng nguyên nhân tạo (CAR - T), giúp nhận diện và tiêu diệt tế bào ung thư. Năm 2017, Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê duyệt 2 sản phẩm

CAR - T là Kymriah (Novartis) cho trẻ em bị ALL và Yescarta (Kite Pharma) cho lymphoma không Hodgkin ở người lớn. Phương pháp CAR - T đã đánh dấu bước tiến quan trọng trong điều trị ung thư bằng tế bào miễn dịch. Tuy nhiên, tại Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu ứng dụng thực tiễn liệu pháp này cho ung thư nói chung và ALL nói riêng. Do đó, nghiên cứu này nhằm đánh giá chất lượng tế bào CAR - T in vitro, tạo tiền đề cho ứng dụng điều trị ALL trong tương lai.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Tế bào CAR - T CD19RCD137/pMC và CAR - T CD19RCD137 - iCasp9 - IL15/pMC với nồng độ 10⁶ tế bào/mL được nuôi cấy trong môi trường RPMI RPMI

*Tác giả liên hệ

Email: canvanmao@vmmu.edu.vn Điện thoại: (+84) 944888323 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66i3.2535>

- 1640, huyết thanh bào thai bò (FBS = fetal bovin serum) 10%; dung dịch Penicillin và Streptomycin 1%; trypsin - EDTA (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Cộng hòa Liên bang Đức), 01 SB100X, 02 plasmid (plasmid CD19RCD137/pSB và plasmid iCasp9 - IL15/pSB), 02 Minicircle (minicircle CD19RCD137/pSB minicircle iCasp9 - IL15/pSB).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Kỹ thuật cấy khuẩn

Để đánh giá tính vô trùng của chế phẩm tế bào CAR - T trước khi sử dụng, kỹ thuật cấy khuẩn được thực hiện nhằm phát hiện sự hiện diện của vi sinh vật gây bệnh trong dịch nuôi cấy tế bào. Cụ thể, 10 ml dịch nuôi cấy tế bào CAR - T được chia đều và bơm vào hai chai cấy máu chuyên biệt: một chai dành cho vi khuẩn ưa khí và một chai cho vi khuẩn kỵ khí. Các mẫu sau đó được đưa vào hệ thống nuôi cấy tự động FX TOP - STACK, kết hợp với máy cấy BACTEC để theo dõi sự phát triển của vi khuẩn. Phương pháp này không chỉ giúp xác định độ vô trùng của sản phẩm mà còn cho phép phân lập và định danh các vi khuẩn thường gặp trong bệnh phẩm máu, từ đó đảm bảo độ an toàn sinh học của tế bào CAR - T trước khi ứng dụng lâm sàng.

2.2.2. Kiểm tra nội độc tố bằng chế phẩm LAL

Để xác định sự hiện diện của nội độc tố (endotoxin) - thành phần độc hại từ màng ngoài của vi khuẩn Gram âm có thể gây phản ứng viêm mạnh, phương pháp sử dụng chất thử LAL (Limulus Amebocyte Lysate) được áp dụng. Trong quy trình này, 25 μ l mẫu dịch nuôi cấy tế bào hoặc các mẫu cần đánh giá sẽ được đưa vào thẻ PTS, một thiết bị chuyên dụng do Charles River (Mỹ) sản xuất. Sau đó, các phản ứng được tiến hành và kết quả kiểm tra giới hạn nội độc tố được đọc và phân tích bằng máy Endosafe® nexgen - PTS™ instrument. Kỹ

thuật này giúp xác định mẫu có chứa nội độc tố hay không một cách nhanh chóng và chính xác, từ đó đánh giá được mức độ an toàn của tế bào CAR - T.

2.2.3. Tách chiết protein

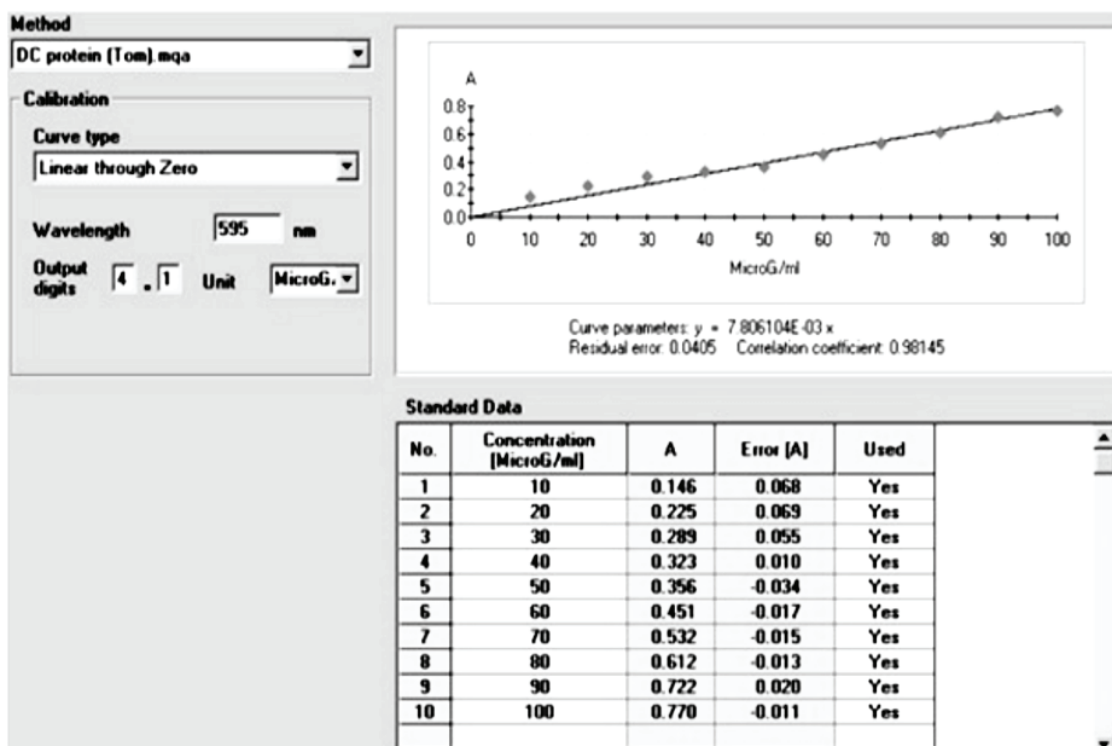
Protein được tách chiết từ cặn tế bào trong dịch nuôi bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy, loại bỏ phần nổi phía trên, sau đó rửa sạch cặn trong dung dịch PBS lạnh. Dung dịch đệm RIPA được thêm vào ống eppendorf chứa cặn, sau đó trộn đều bằng pipet để phá vỡ cấu trúc tế bào. Huyền phù tế bào sau đó được ủ lạnh trên đá trong 5 phút, rồi sử dụng máy siêu âm (sonicator) để làm vỡ hoàn toàn màng tế bào. Mẫu được kiểm tra hiệu quả ly giải bằng kính hiển vi quang học. Dịch nổi sau ly tâm sẽ được thu và dùng để đo nồng độ protein. Nồng độ lý tưởng để phân tích là từ 3 - 5 μ g/ μ l.

Việc định lượng protein được tiến hành theo phương pháp Bradford, dựa trên phản ứng giữa thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue với protein, tạo nên sự thay đổi màu sắc có thể đo được ở bước sóng 595 nm. Độ hấp thụ quang học (OD) tỉ lệ thuận với lượng protein trong mẫu, và giá trị Δ OD (OD mẫu trừ OD đối chứng với HCl) sẽ được dùng để xác định nồng độ dựa vào đường chuẩn. Đường chuẩn được dựng bằng cách pha loãng dung dịch albumin thành các nồng độ từ 0 - 90 μ g/ml, kết hợp với thuốc thử Bradford và đo OD tương ứng, từ đó suy ra hàm lượng protein của mẫu phân tích.

Dựng đường chuẩn albumin: Pha loãng dung dịch albumin thành các nồng độ khác nhau như ở bảng 1. Đo mật độ quang ở bước sóng 595 nm. Từ đó suy ra hàm lượng protein có trong mẫu thí nghiệm. Mẫu được pha loãng sao cho mật độ quang đo được trong khoảng đường chuẩn. Từ phương trình đường chuẩn và mật độ quang của mẫu khảo sát, suy ra hàm lượng protein của mẫu là X (μ g/ml) có trong m (g) nguyên liệu.

Bảng 1. Dựng đường chuẩn albumin

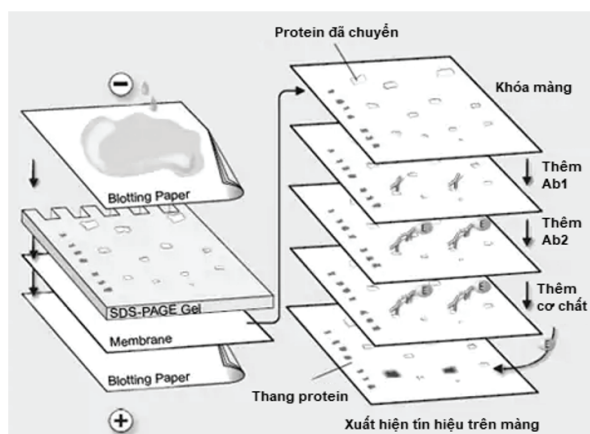
Ống nghiệm	Đối chứng	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nồng độ (μ g/ml)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Dung dịch albumin chuẩn (μ l)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Nước cất (μ l)	1000	990	980	970	960	950	940	930	920	910
Thuốc thử Bradford (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2



Hình 1. Đường chuẩn albumin

2.2.4. Phản ứng Western Blot định lượng protein *E. coli*

Phương pháp Western Blot là kỹ thuật tiêu chuẩn nhằm xác định sự hiện diện và định lượng các loại protein cụ thể, như protein của *E. coli* trong mẫu. Đầu tiên, các protein được phân tách dựa trên kích thước bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide (SDS - PAGE). Sau đó, chúng được chuyển lên màng nitrocellulose hoặc PVDF thông qua quá trình gọi là blotting. Tại đây, các protein mục tiêu được phát hiện bằng các kháng thể đặc hiệu và tín hiệu phát ra từ kháng thể được ghi nhận để đánh giá sự hiện diện của protein mong muốn. Kỹ thuật này giúp kiểm tra độ tinh khiết và mức độ biểu hiện của protein trong mẫu nghiên cứu.



Hình 2. Chuyển protein lên màng (blotting), khóa màng và phát hiện protein mục tiêu

2.2.5. Đánh giá biểu hiện của mRNA *E. coli* bằng kỹ thuật real - time PCR

Để đánh giá mức độ biểu hiện gen của vi khuẩn *E. coli*, RNA tổng số được tách chiết từ dòng tế bào Hep2 sử dụng bộ GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Hoa Kỳ). RNA sau đó được chuyển thành cDNA nhờ bộ tổng hợp cDNA của hãng Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Hoa Kỳ). Kỹ thuật real - time PCR được tiến hành với các cặp mồi đặc hiệu: 401F (5' - TGATTGGCAAATCTGGCCG - 3') và 611R (5' - GAAATCGCCCAAATCGCCAT - 3') do Invitrogen cung cấp, nhằm xác định mức độ biểu hiện của mRNA *E. coli*. Việc sử dụng real - time PCR giúp phân tích định lượng chính xác sự biểu hiện gen trong mẫu, hỗ trợ đánh giá hiệu quả kiểm soát vi sinh vật và mức độ an toàn sinh học của tế bào CAR - T trong nghiên cứu.

2.3. Xử lý và phân tích số liệu

Dữ liệu thu thập được từ các thí nghiệm, bao gồm kết quả kiểm tra nội độc tố, đánh giá tiết trùng, định lượng protein tổng số, phân tích protein *E. coli* và biểu hiện mRNA *E. coli*, được tổng hợp và xử lý theo quy trình chuẩn. Các kết quả định lượng như nồng độ nội độc tố, hàm lượng protein, mật độ quang học (OD) được phân tích bằng phương pháp thống kê mô tả. Giá trị OD từ phương pháp Bradford được sử dụng để xây dựng đường chuẩn, từ đó tính toán hàm lượng protein tổng số trong dịch nuôi cấy tế bào. Tỷ lệ protein *E. coli* được xác định thông qua phân tích hình ảnh điện di Western Blot và so sánh tỷ lệ tương đối giữa mẫu khảo sát và

mẫu đối chứng. Mức độ biểu hiện mRNA *E. coli* được đánh giá bằng kỹ thuật real - time PCR với các cặp mồi đặc hiệu, kết quả được phân tích định tính qua tín hiệu huỳnh quang theo chu kỳ khuếch đại. Tất cả số liệu được ghi nhận, xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2016 và được trình bày dưới dạng bảng, biểu đồ nhằm phục vụ cho việc phân tích, đánh giá chất lượng tế bào CAR - T một cách toàn diện.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kiểm tra nội độc tố (endotoxin) của khối tế bào CAR - T

Để đánh giá mức độ an toàn sinh học của khối tế bào CAR - T, đặc biệt là khả năng gây phản ứng viêm do tạp nhiễm vi khuẩn Gram âm, xét nghiệm phát hiện nội độc tố đã được thực hiện trên mẫu dịch môi trường nuôi cấy tế bào CAR - T. Phương pháp sử dụng là kiểm tra giới hạn nội độc tố bằng bộ kit Endosafe® nexgen - PTS™, theo công nghệ LAL với giới hạn phát hiện từ 0,005 - 0,5 EU/ml. Kết quả đo cho thấy nồng độ nội độc tố trong mẫu dịch môi trường CAR - T là < 0,045 EU/ml. Giá trị này nằm dưới ngưỡng nguy cơ cho phép, chứng minh rằng chế phẩm tế bào CAR - T không bị nhiễm nội độc tố đáng kể và đạt yêu cầu về độ an toàn sinh học cho ứng dụng lâm sàng.

3.2. Kết quả tính tiệt trùng của khối tế bào CAR - T

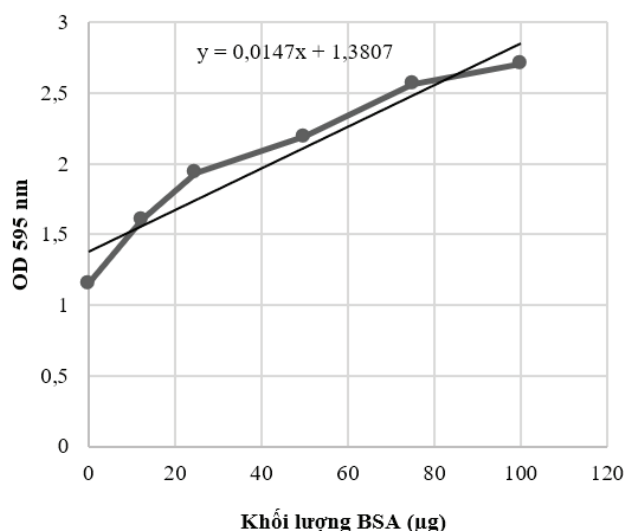
Việc kiểm tra độ tiệt trùng của khối tế bào CAR - T được thực hiện bằng kỹ thuật cấy vi sinh tự động trên hệ thống máy BACTEC, với mục đích phát hiện sự hiện diện của vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí trong mẫu. Mẫu bệnh phẩm sử dụng là dịch môi trường nuôi cấy tế bào sau quá trình sản xuất CAR - T. Mỗi mẫu được cấy vào hai chai cấy máu: một chai dành cho vi khuẩn ái khí và một chai dành cho vi khuẩn kỵ khí. Sau thời gian nuôi cấy theo quy trình tiêu chuẩn, kết quả cho thấy cả hai mẫu đều âm tính với vi sinh vật. Cụ thể, mẫu 1 (chai cấy máu ái khí) và mẫu 2 (chai cấy máu kỵ khí) đều không phát hiện sự phát triển của vi khuẩn. Điều này khẳng định rằng khối tế bào CAR - T đã đạt tiêu chuẩn vô trùng, đủ điều kiện để sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo hoặc hướng tới ứng dụng điều trị.

3.3. Kết quả định lượng protein *E. coli*

3.3.1. Kết quả định lượng protein trong mẫu thí nghiệm

Bảng 2. Xây dựng đường chuẩn protein trong mẫu thí nghiệm

Khối lượng BSA (μg)	0	12,5	25	50	75	100
OD 595 nm	1,146	1,608	1,936	2,194	2,562	2,708



Biểu đồ 1. Đường chuẩn protein trong mẫu thí nghiệm

Để xác định hàm lượng protein tổng số có trong dịch nuôi cấy tế bào CAR - T, phương pháp Bradford đã được áp dụng. Trước tiên, một đường chuẩn protein được thiết lập bằng cách sử dụng dung dịch chuẩn BSA (Bovine Serum Albumin) với các nồng độ từ 0 đến 100 μg/ml. Mỗi nồng độ được đo mật độ quang học (OD) tại bước sóng 595 nm. Kết quả đo được ghi nhận trong bảng 2 và biểu diễn bằng đường cong chuẩn trong biểu đồ 1, cho thấy mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ protein và giá trị OD 595 nm.

Từ đường cong chuẩn, mẫu dịch nuôi cấy chứa protein tổng số được đem đo OD với thể tích 100 μl. Kết quả cho giá trị OD = 1,899, tương ứng với hàm lượng protein là 35,2585 μg. Như vậy, trong 1 ml dịch nuôi cấy sẽ có tổng lượng protein là 352,585 μg. Khi so sánh với trọng lượng khối căn protein tổng số trong cùng thể tích (1,15 mg), có thể tính được tỉ lệ protein tổng số chiếm khoảng 3,3% khối lượng. Đây là một chỉ số quan trọng nhằm đánh giá mật độ protein có trong dịch nuôi, từ đó phục vụ cho việc xác định hiệu suất sản xuất cũng như kiểm soát tạp nhiễm tiềm tàng trong sản phẩm.

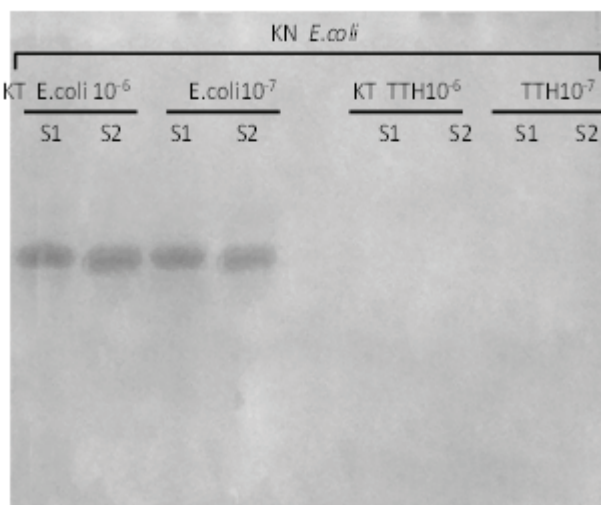
Bảng 3. Lượng protein tổng số

Đo 100 μl dịch nuôi có chứa protein tổng số	OD	1,899
	Khối lượng (μg)	35,2585
= > Với 1 ml dịch nuôi có chứa lượng protein tổng số	Khối lượng (μg)	352,585

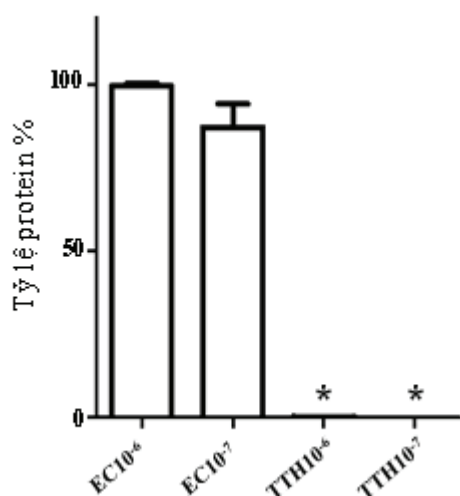
Dựa trên giá trị OD 595 nm = 1,899 từ phép đo quang phổ của 100 μl dịch nuôi cấy tế bào CAR - T, hàm lượng protein tổng số được tính toán dựa trên đường cong chuẩn đã dựng trước đó, cho kết quả là 35,2585 μg. Suy ra, trong 1 ml dịch nuôi sẽ chứa lượng protein tổng số là 352,585 μg. Đồng thời, trọng lượng khối căn protein (bao gồm protein và các thành phần tế bào khác) trong cùng thể tích 1 ml dịch nuôi được xác định là 1,15 mg. Từ đó, tỉ lệ protein chiếm trong tổng khối lượng căn

được tính là 3,3%. Tỷ lệ này phản ánh hiệu quả của quá trình sản xuất và nuôi cấy tế bào CAR - T, đồng thời là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá mức độ tinh sạch và tiềm năng tập nhiễm protein ngoại lai.

3.3.2. Kết quả định lượng protein *E. coli* trong mẫu thí nghiệm



A. Hình ảnh điện di protein mẫu kháng thể và dịch nuôi cấy tế bào CAR - T



B. Tỷ lệ protein ở mẫu kháng thể kháng *E. coli* và dịch nuôi cấy tế bào CAR - T

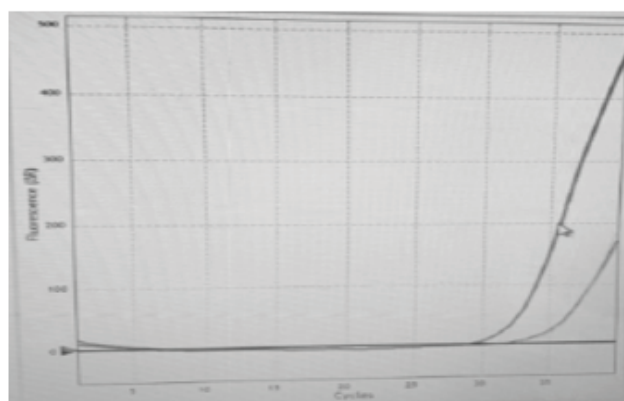
Hình 3. Kết quả định lượng protein *E. coli* trong mẫu thí nghiệm

Phân tích thành phần protein có nguồn gốc từ vi khuẩn *E. coli* được thực hiện bằng kỹ thuật Western Blot. Mẫu dịch nuôi cấy tế bào CAR - T và mẫu đối chứng (kháng thể đặc hiệu với protein *E. coli*) được tách protein bằng điện di trên gel SDS - PAGE, sau đó chuyển lên màng nitrocellulose. Các protein đích được phát hiện thông qua sử dụng kháng thể kháng *E. coli* kết hợp với chất phát tín hiệu.

Hình 3 minh họa kết quả phân tích: Phần A là ảnh điện

di cho thấy sự hiện diện của các băng protein trong cả hai mẫu, và phần B thể hiện biểu đồ so sánh tỷ lệ protein *E. coli* giữa mẫu CAR - T và mẫu đối chứng. Kết quả cho thấy hàm lượng protein có nguồn gốc từ *E. coli* trong mẫu dịch nuôi cấy CAR - T dao động từ 0,06 - 0,21%. Mức tạp nhiễm này được đánh giá là thấp, nằm trong giới hạn cho phép đối với các sản phẩm sinh học, phản ánh quy trình sản xuất đảm bảo kiểm soát được nguy cơ nhiễm protein ngoại lai.

3.4. Kết quả biểu hiện mRNA *E. coli*



Hình 4. Mức độ biểu hiện *E. coli* tại các thời điểm ngày 3, 7, 14

Để đánh giá khả năng tập nhiễm vi khuẩn ở cấp độ di truyền, kỹ thuật real - time PCR được áp dụng nhằm phát hiện biểu hiện mRNA của *E. coli* trong dịch nuôi cấy tế bào CAR - T tại các thời điểm ngày 3, 7 và 14 sau nuôi. RNA được tách chiết từ mẫu dịch nuôi, tổng hợp thành cDNA, sau đó sử dụng cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại trình tự gen của *E. coli*.

Hình 4 trình bày kết quả phân tích real - time PCR, cho thấy tại cả 3 thời điểm khảo sát, không phát hiện tín hiệu khuếch đại đặc hiệu cho mRNA của *E. coli*. Điều này cho thấy không có sự biểu hiện gen của vi khuẩn trong mẫu, đồng nghĩa với việc dịch nuôi cấy tế bào CAR - T không bị nhiễm *E. coli* ở cấp độ phân tử. Kết quả này là minh chứng quan trọng cho độ tinh sạch và an toàn sinh học của sản phẩm trước khi ứng dụng trong điều trị.

4. BÀN LUẬN

Khác với tế bào T tự nhiên chỉ nhận diện các kháng nguyên trình diện qua phức hợp HLA, tế bào T mang thụ thể kháng nguyên dạng cấu trúc nhân tạo (CAR - T) có khả năng nhận diện trực tiếp kháng nguyên bề mặt tế bào mà không cần trình diện qua HLA, nhờ vào phần ngoại bào của thụ thể CAR. Đặc biệt, với các thiết kế tiên tiến như CAR đa đặc hiệu hoặc đồng biểu hiện nhiều CAR, tế bào CAR - T có thể đồng thời nhận diện hai hoặc nhiều kháng nguyên khác nhau. Điều này không chỉ giúp tăng cường độ nhạy trong tiêu diệt tế bào u mà còn làm giảm khả năng tế bào khối u thoát khỏi sự giám sát miễn dịch. Một trong những ví dụ điển hình là tế bào CAR - T nhắm mục tiêu kép CD19 và CD22, đã được đưa vào thử nghiệm lâm sàng nhằm nâng cao hiệu quả điều trị bệnh ALL [4].

Ngoài ra, hệ thống vector phi virus như Sleeping Beauty (SB) dựa trên transposon DNA cũng đã được sử dụng để tạo ra tế bào CAR - T phục vụ nghiên cứu lâm sàng. Mặc dù SB có ưu điểm về chi phí thấp và an toàn gen tương đối cao, nhưng hiệu quả chuyển gen vẫn còn hạn chế. Do đó, để tạo được lượng tế bào CAR - T đạt chuẩn, cần phải kích thích mạnh bằng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo cùng với các cytokine đặc hiệu, kéo dài thời gian nuôi cấy in vivo, ảnh hưởng phần nào đến tính ổn định và chi phí sản xuất [5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung đánh giá chất lượng sản phẩm tế bào CAR - T thông qua các chỉ tiêu vi sinh và sinh hóa quan trọng trước khi hướng tới ứng dụng điều trị ALL. Cụ thể, xét nghiệm nội độc tố bằng hệ thống Endosafe cho thấy nồng độ nội độc tố trong dịch nuôi cấy CAR - T < 0,045 EU/ml, thấp hơn nhiều so với ngưỡng cho phép (0,5 EU/ml), cho thấy sản phẩm không bị tạp nhiễm nội độc tố vi khuẩn Gram âm. Kết quả cấy khuẩn trên máy BACTEC cho thấy cả hai mẫu (ái khí và kỵ khí) đều âm tính, chứng minh sản phẩm đạt tiêu chuẩn vô trùng.

Bên cạnh đó, hàm lượng protein tổng số trong dịch nuôi được xác định là 352,585 µg/ml, chiếm khoảng 3,3% tổng khối lượng cần thu được. Điều này phản ánh quá trình nuôi cấy hiệu quả, đồng thời hỗ trợ trong việc đánh giá thành phần tạp chất và kiểm soát chất lượng sản phẩm. Đặc biệt, kết quả Western Blot cho thấy tỉ lệ protein có nguồn gốc từ *E. coli* trong mẫu dao động từ 0,06 - 0,21%, là mức rất thấp và nằm trong giới hạn chấp nhận được đối với các sản phẩm sinh học. Quan trọng hơn, phân tích biểu hiện mRNA *E. coli* tại các thời điểm ngày 3, 7 và 14 bằng kỹ thuật real - time PCR đều cho kết quả âm tính, chứng tỏ không có sự hiện diện gen vi khuẩn ở cấp độ phân tử trong dịch nuôi cấy.

Những kết quả thu được từ nghiên cứu này hoàn toàn phù hợp với các báo cáo trước đó về chất lượng sinh học và độ ổn định của sản phẩm CAR - T sau nuôi cấy. Nhiều nghiên cứu cũng ghi nhận rằng sản phẩm CAR - T vẫn duy trì được đặc tính miễn dịch và hiệu quả sinh học trong thời gian ngắn sau nuôi, miễn là đảm bảo được các điều kiện sản xuất vô trùng, không tạp nhiễm và tuân thủ tiêu chuẩn GMP [6]. Do đó, nghiên cứu này không chỉ góp phần đánh giá thực nghiệm tính an toàn của CAR - T tại phòng thí nghiệm mà còn là tiền đề cho các bước phát triển ứng dụng lâm sàng tại Việt Nam trong tương lai.

5. KẾT LUẬN

Kết quả cấy khuẩn và định lượng nội độc tố endotoxin, protein *E. coli* trên cho thấy sản phẩm tế bào CAR - T đáp ứng yêu cầu nghiên cứu về tính tinh sạch, độ tiệt trùng và không chứa độc tố.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E, Cancer statistics, CA Cancer J Clin, 2010, 60 (5): 277-300.
- [2] Judith F, Steuber C, Poplack D, Acute lymphoblastic leukemia, Principle and Practice of Pediatric Oncology, 2005.
- [3] Terwilliger T, Abdul-Hay M, Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update, Blood cancer journal, 2017, 7 (6): e577, 10.1038/bcj.2017.53.
- [4] Mohanty R, Chowdhury C.R, Arega S, Sen P, Ganguly P, Ganguly NJO, CAR T cell therapy: A new era for cancer treatment, 2019, 42 (6): 2183-95.
- [5] Kebriaei P, Singh H, Huls M.H, Figliola M.J, Bassett R, Olivares S et al, Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells, 2016, 126 (9): 3363-76.
- [6] Tumaini B, Lee D.W, Lin T, Castiello L, Stroncek D.F, Mackall C et al, Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells, 2013, 15 (11): 1406-15.