

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

NGUYỄN THỊ HIỀN HẠNH

NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ TÁC DỤNG KHÁNG  
MỘT SỐ DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ  
BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI  
KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 TRÊN THỰC NGHIỆM

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI - 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ QUỐC PHÒNG

HỌC VIỆN QUÂN Y

NGUYỄN THỊ HIỀN HẠNH

**NGHIÊN CỨU TÍNH AN TOÀN VÀ TÁC DỤNG KHÁNG  
MỘT SỐ DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ  
BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI  
KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 TRÊN THỰC NGHIỆM**

Ngành: Khoa học Y sinh

Mã số: 9 72 01 01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS. TS. CÁN VĂN MÃO
- TS. BÙI KHẮC CƯỜNG

HÀ NỘI - 2024

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi với sự hướng dẫn khoa học của tập thể cán bộ hướng dẫn.

Các kết quả nêu trong luận án là trung thực và được công bố một phần trong các bài báo khoa học. Luận án chưa từng được công bố. Nếu có điều gì sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận án

**Nguyễn Thị Hiền Hạnh**

## **LỜI CẢM ƠN**

Trước hết, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Đảng ủy - Ban Giám đốc Học viện Quân Y, Đảng ủy - Ban Giám Bệnh viện Quân Y 103, Phòng Sau đại học, Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y, Trung tâm nghiên cứu động vật - Học viện Quân y, Bộ môn Trung tâm Huyết học Truyền máu - Bệnh viện Quân Y 103 đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc đến thầy PGS. TS. Cán Văn Mão, TS. Bùi Khắc Cường đã tận tình giúp đỡ, trực tiếp hướng dẫn tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Ngô Thu Hằng - Phó chủ nhiệm Bộ môn, các thầy cô giáo cùng toàn thể cán bộ nhân viên Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y đã luôn động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu để tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS Tạ Việt Hưng - Giám đốc Trung tâm, cùng toàn thể cán bộ nhân viên Bộ môn Trung tâm Huyết học Truyền máu - Bệnh viện Quân Y 103 đã luôn động viên, giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và công tác.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Nhà khoa học trong Bộ môn và Hội đồng đánh giá luận án các cấp đã dành thời gian để cho tôi những ý kiến quý báu trong quá trình hoàn thiện và bảo vệ luận án.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình và bạn bè đã luôn ở bên cạnh động viên, chia sẻ với tôi mọi điều trong cuộc sống và tạo mọi điều kiện tốt nhất cho tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Nghiên cứu sinh

**Nguyễn Thị Hiền Hạnh**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

LỜI CẢM ƠN

MỤC LỤC

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC HÌNH

DANH MỤC BẢNG

|                                                                                        |          |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>                                                                | <b>1</b> |
| <b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>                                              | <b>3</b> |
| 1.1. ĐẠI CƯƠNG BỆNH BẠCH CẦU .....                                                     | 3        |
| 1.1.1. Dịch tễ học.....                                                                | 3        |
| 1.1.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu .....                         | 4        |
| 1.1.3. Phân loại .....                                                                 | 7        |
| 1.1.4. Các phương pháp điều trị .....                                                  | 9        |
| 1.2. LIỆU PHÁP TẾ BÀO CAR-T.....                                                       | 11       |
| 1.2.1 Tổng quan về liệu pháp tế bào CAR-T .....                                        | 11       |
| 1.2.2. Độc tính của liệu pháp tế bào CAR-T với cơ thể.....                             | 15       |
| 1.2.3. Ứng dụng liệu pháp tế bào CAR-T trong điều trị bệnh bạch cầu ..                 | 18       |
| 1.2.4. Các phương pháp tăng tính an toàn của liệu pháp tế bào CAR-T trên lâm sàng..... | 24       |
| 1.2.5. Cytokin và liệu pháp tế bào CAR-T.....                                          | 25       |
| 1.3. KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 .....                                                        | 28       |
| 1.3.1. Con đường tín hiệu PD-1 .....                                                   | 28       |
| 1.3.2. Kháng thể kháng PD-1 .....                                                      | 30       |
| 1.3.3. Ứng dụng kháng thể kháng PD-1 trong điều trị.....                               | 32       |
| 1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU LIỆU PHÁP CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 .....      | 36       |

|                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>                                                                      | <b>38</b> |
| 2.1. THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....                                                                                       | 38        |
| 2.1.1. Thời gian nghiên cứu .....                                                                                               | 38        |
| 2.1.2. Địa điểm nghiên cứu .....                                                                                                | 38        |
| 2.2. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU.....                                                                                      | 38        |
| 2.2.1. Tế bào CAR-T .....                                                                                                       | 38        |
| 2.2.2. Kháng thể kháng PD-1 .....                                                                                               | 38        |
| 2.2.3. Các dòng tế bào ung thư bạch cầu .....                                                                                   | 39        |
| 2.2.4. Động vật .....                                                                                                           | 39        |
| 2.2.5. Trang thiết bị sử dụng cho nghiên cứu.....                                                                               | 39        |
| 2.2.6. Hóa chất và vật tư tiêu hao.....                                                                                         | 40        |
| 2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....                                                                                               | 41        |
| 2.3.1. Thiết kế nghiên cứu.....                                                                                                 | 41        |
| 2.3.2. Nội dung nghiên cứu .....                                                                                                | 41        |
| 2.3.3. Phương pháp nghiên cứu.....                                                                                              | 42        |
| 2.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH KẾT QUẢ, XỬ LÝ SỐ LIỆU.....                                                                          | 58        |
| 2.5. ĐẠO ĐỨC NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT.....                                                                                      | 59        |
| 2.6. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU .....                                                                                                     | 60        |
| <b>Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....</b>                                                                                       | <b>61</b> |
| 3.1. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO CAR-T VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 TRÊN THỰC NGHIỆM..... | 61        |
| 3.1.1. Chất lượng của khối tế bào CAR-T .....                                                                                   | 61        |
| 3.1.2. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm .....                     | 63        |
| 3.2. TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO DÒNG UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 ..                     | 73        |
| 3.2.1. Kết quả đánh giá tác dụng ly giải tế bào <i>in vitro</i> .....                                                           | 73        |

|                                                                                                             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.2. Thay đổi nồng độ cytokin được giải phóng ở môi trường nuôi cấy tế bào .....                          | 86         |
| <b>Chương 4. BÀN LUẬN .....</b>                                                                             | <b>102</b> |
| 4.1. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO CAR-T VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1   | 102        |
| 4.1.1. Chất lượng của tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 .....                         | 102        |
| 4.1.2. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm ..... | 104        |
| 4.2. TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO DÒNG UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1    | 111        |
| 4.2.1. Đánh giá tác dụng ly giải tế bào <i>in vitro</i> .....                                               | 111        |
| 4.2.2. Thay đổi nồng độ cytokin được giải phóng ở môi trường nuôi cấy tế bào .....                          | 121        |
| 4.3. HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI .....                                                                               | 130        |
| <b>KẾT LUẬN .....</b>                                                                                       | <b>132</b> |
| <b>KIẾN NGHỊ .....</b>                                                                                      | <b>133</b> |
| <b>DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU ĐÃ CÔNG BỐ</b>                                                        |            |
| <b>LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN</b>                                                                                |            |
| <b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b>                                                                                   |            |

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

| TT | Phân viết<br>tắt | Phân viết đầy đủ<br>(tiếng anh)    | Phân viết đầy đủ<br>(tiếng việt)         |
|----|------------------|------------------------------------|------------------------------------------|
| 1  | aAPC             | Artificial antigen-presenting cell | Tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo  |
| 2  | ADN              | Acid Deoxyribonucleic              |                                          |
| 3  | AML              | Acute myeloid leukemia             | Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy               |
| 4  | ALL              | Acute lymphoid leukemia            | Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho            |
| 5  | ALT              | Alanine transaminase               |                                          |
| 6  | AST              | Aspartate transaminase             |                                          |
| 7  | BCMA             | Anti-B-cell maturation antigen     | Kháng nguyên trưởng thành chống tế bào B |
| 8  | CD               | Cluster of differentiation         | Cụm biệt hóa                             |
| 9  | CML              | Chronic myeloid leukemia           | Bệnh bạch cầu mạn dòng tủy               |
| 10 | CLL              | Chronic lymphoid leukemia          | Bệnh bạch cầu mạn dòng lympho            |
| 11 | CAR              | Chimeric antigen receptors         | Thụ thể kháng nguyên khảm                |
| 12 | CRS              | Cytokine release syndrome          | Hội chứng giải phóng cytokin             |
| 13 | FDA              | Food and Drug Administration       | Cơ quan thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ    |
| 14 | FSC              | Forward scatter                    | Tán xạ thẳng                             |
| 15 | FITC             | Fluorescein isothiocyanate         |                                          |
| 16 | HLA              | Human Leukocyte Antigen            | Kháng nguyên bạch cầu người              |
| 17 | HE               | Hematoxylin-Eosin                  |                                          |
| 18 | IL               | Interleukin                        |                                          |



| <b>TT</b> | <b>Phân viết<br/>tắt</b> | <b>Phân viết đầy đủ<br/>(tiếng anh)</b>                       | <b>Phân viết đầy đủ<br/>(tiếng việt)</b>                                    |
|-----------|--------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 19        | ICANS                    | Immune Effector Cell-<br>Associated Neurotoxicity<br>Syndrome | Hội chứng nhiễm độc thần kinh<br>liên quan đến tế bào hiệu ứng<br>miễn dịch |
| 20        | KT                       |                                                               | Kháng thể                                                                   |
| 21        | NFAT                     | Nuclear factor of activated T<br>cells                        | Yếu tố hạt nhân của tế bào T<br>được kích hoạt                              |
| 22        | PCR                      | Polymerase Chain Reaction                                     | Phản ứng chuỗi polymerase                                                   |
| 23        | RNA                      | Ribonucleic Acid                                              |                                                                             |
| 24        | RBC                      | Red Blood Cell                                                | Số lượng hồng cầu                                                           |
| 25        | MC                       | Minicircle                                                    |                                                                             |
| 26        | MM                       | Multiple Myeloma                                              | Đa u tủy xương                                                              |
| 27        | NST                      |                                                               | Nhiễm sắc thể                                                               |
| 28        | NST Ph                   |                                                               | Nhiễm sắc thể Philadelphia                                                  |
| 29        | PBMC                     | Peripheral Blood Mononuclear<br>Cell                          | Tế bào đơn nhân máu ngoại vi                                                |
| 30        | PD-1 Ab                  | PD-1 Antibody                                                 | Kháng thể kháng PD-1                                                        |
| 31        | PLT                      | Platelet Count                                                | Số lượng tiểu cầu                                                           |
| 32        | scFV                     | Single-chain Fv domain                                        | Miền Fv chuỗi đơn                                                           |
| 33        | SB                       | Sleeping Beauty                                               |                                                                             |
| 34        | SSC                      | Side scatter                                                  | Tán xạ bên                                                                  |
| 35        | SLO                      | Secondary lymphoid organs                                     | Cơ quan lympho thứ cấp                                                      |
| 36        | TB                       |                                                               | Tế bào                                                                      |
| 37        | TCR                      | T Cell Receptor                                               | Thụ thể tế bào T                                                            |
| 38        | TNF                      | Tumor necrosis factor                                         | Yếu tố hoại tử khối u                                                       |

## DANH MỤC HÌNH

| Hình  | Tên hình                                                                                | Trang |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.1.  | Các thể hệ của công nghệ tế bào CAR-T .....                                             | 14    |
| 1.2.  | Quy trình sản xuất CAR-T trong lâm sàng .....                                           | 20    |
| 1.3.  | Kiểm soát miễn dịch qua thụ thể PD-1 .....                                              | 32    |
| 2.1.  | Máy đếm tế bào dòng chảy BD FACSLyric .....                                             | 54    |
| 2.2.  | Hình ảnh đường chuẩn trong Kit ELISA IL-6 .....                                         | 58    |
| 3.1.  | Tỷ lệ biểu hiện tế bào CAR-T .....                                                      | 62    |
| 3.2.  | Biểu hiện CAR bằng Real-time PCR .....                                                  | 62    |
| 3.3.  | Ảnh hưởng của tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đến trọng lượng chuột ..... | 64    |
| 3.4.  | Hình ảnh đại thể các cơ quan ở các nhóm chuột .....                                     | 64    |
| 3.5.  | Ảnh hưởng đối với hệ thống tạo máu ở chuột .....                                        | 65    |
| 3.6.  | Đặc điểm chỉ số AST, ALT giữa các nhóm .....                                            | 66    |
| 3.7.  | Hình thái vi thể gan chuột ở các nhóm (HE vật kính 20X) .....                           | 67    |
| 3.8.  | Kết quả chỉ số Urê, Creatinin giữa các nhóm .....                                       | 68    |
| 3.9.  | Hình thái vi thể thận chuột ở các nhóm (HE vật kính 20X) .....                          | 70    |
| 3.10. | Ly giải tế bào Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:2 .....                                       | 73    |
| 3.11. | Ly giải tế bào Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:5 .....                                       | 74    |
| 3.12. | Ly giải tế bào Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:10 .....                                      | 75    |
| 3.13. | Ly giải tế bào Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:2 .....                                        | 77    |
| 3.14. | Ly giải tế bào Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:5 .....                                        | 78    |
| 3.15. | Ly giải tế bào Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:10 .....                                       | 79    |
| 3.16. | Ly giải tế bào K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:2 .....                                        | 81    |
| 3.17. | Ly giải tế bào K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:5 .....                                        | 82    |
| 3.18. | Ly giải tế bào K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:10 .....                                       | 83    |
| 3.19. | So sánh tỷ lệ ly giải 3 dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T .....        | 84    |

| Hình  | Tên hình                                                                                                                     | Trang |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.20. | So sánh tỷ lệ ly giải 3 dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 .....            | 85    |
| 3.21. | So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                         | 86    |
| 3.22. | So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB Raji ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ .....                         | 88    |
| 3.23. | So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                          | 89    |
| 3.24. | So sánh khả năng bài tiết IL-6 của TB CAR-T đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ.....                      | 90    |
| 3.25. | So sánh khả năng bài tiết IL-6 của TB CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ ..... | 91    |
| 3.26. | So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                         | 92    |
| 3.27. | So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB Raji ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ .....                         | 93    |
| 3.28. | So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                          | 94    |
| 3.29. | So sánh khả năng bài tiết IL-2 của TB CAR-T đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ.....                      | 95    |
| 3.30. | So sánh khả năng bài tiết IL-2 của TB CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ ..... | 96    |
| 3.31. | So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- $\alpha$ khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                | 97    |
| 3.32. | So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- $\alpha$ khi đồng nuôi cấy với TB Raji ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                 | 98    |

| <b>Hình</b> | <b>Tên hình</b>                                                                                                                       | <b>Trang</b> |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.33.       | So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- $\alpha$ khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ.....                          | 99           |
| 3.34.       | So sánh khả năng bài tiết TNF- $\alpha$ của TB CAR-T đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ.....                      | 100          |
| 3.35.       | So sánh khả năng bài tiết TNF- $\alpha$ của TB CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ ..... | 101          |

## DANH MỤC BẢNG

| <b>Bảng</b> | <b>Tên bảng</b>                                                                                     | <b>Trang</b> |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.1.        | Kết quả đánh giá tính tiết trùng của khối tế bào CAR-T .....                                        | 61           |
| 3.2.        | Kết quả định lượng Endotoxin môi trường tế bào CAR-T .....                                          | 63           |
| 3.3.        | So sánh trọng lượng trung bình của chuột trước thí nghiệm .....                                     | 63           |
| 3.4.        | So sánh tương đối hoạt độ AST và ALT với giá trị tham chiếu ở chuột. 66                             |              |
| 3.5.        | Tỷ lệ thoái hóa hạt giữa bốn nhóm .....                                                             | 68           |
| 3.6.        | So sánh tương đối nồng độ Creatinin và Urê với giá trị tham chiếu ở chuột.....                      | 69           |
| 3.7.        | Nồng độ cytokin IL-6 của các nhóm nghiên cứu.....                                                   | 71           |
| 3.8.        | Nồng độ cytokin IL-2 của các nhóm nghiên cứu.....                                                   | 71           |
| 3.9.        | Nồng độ cytokin TNF- $\alpha$ của các nhóm nghiên cứu.....                                          | 72           |
| 3.10.       | Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Daudi .....  | 86           |
| 3.11.       | Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Raji .....   | 87           |
| 3.12.       | Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào K562 .....   | 89           |
| 3.13.       | Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm NC đồng nuôi cấy với tế bào Daudi .....          | 91           |
| 3.14.       | Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Raji .....   | 93           |
| 3.15.       | Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm NC đồng nuôi cấy với tế bào K562.....            | 94           |
| 3.16.       | Nồng độ TNF- $\alpha$ trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm NC đồng nuôi cấy với tế bào Daudi ..... | 96           |

| <b>Bảng</b> | <b>Tên bảng</b>                                                                                            | <b>Trang</b> |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.17.       | Nồng độ TNF- $\alpha$ trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Raji ..... | 98           |
| 3.18.       | Nồng độ TNF- $\alpha$ trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào K562 ..... | 99           |

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh bạch cầu chiếm khoảng 2,4% tổng số ca mắc ung thư mới và 3,1% tỷ lệ tử vong liên quan đến ung thư trên thế giới [1]. Đây là một bệnh máu ác tính đặc trưng bởi các tế bào tiền thân tạo máu biến đổi và thâm nhiễm lan tỏa vào tủy xương. Hiện nay hóa trị liệu là phương pháp điều trị bệnh bạch cầu phổ biến nhất. Hiệu quả điều trị của liệu pháp này còn hạn chế, các bệnh nhân sau khi điều trị không thể lui bệnh hoàn toàn và tỷ lệ tái phát cao. Khi đó, ghép tế bào gốc tạo máu là lựa chọn duy nhất, nhưng phương pháp này gặp nhiều khó khăn như tìm kiếm mẫu tế bào gốc hòa hợp HLA - Human Leukocyte Antigen (Kháng nguyên bạch cầu người). Tỷ lệ mắc và tử vong của bệnh bạch cầu đã giảm trong thập kỷ qua. Gần đây, chiến lược điều trị mới như điều trị nhắm đích trong đó có liệu pháp tế bào CAR-T được phát triển và ghi nhận các kết quả khả quan.

Liệu pháp tế bào CAR-T hướng đích thụ thể CD19 điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho có nhiều kết quả đáng khích lệ. Hiện nay, Cục Quản lý thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ đã cấp phép điều trị cho sáu sản phẩm tế bào CAR-T, bốn trong số sáu sản phẩm là CAR-T CD19 [2]. Đây chính là niềm hy vọng cho những bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu nhưng chưa tìm được mẫu tế bào gốc phù hợp. Mặc dù, hiệu quả điều trị của liệu pháp CAR-T đã được báo cáo và sử dụng trên thế giới. Tuy nhiên, theo nhiều nghiên cứu lâm sàng một số bệnh nhân vẫn không đáp ứng với liệu pháp CAR-T và gặp phải các tác dụng phụ nghiêm trọng như hội chứng giải phóng cytokin và nhiễm độc thần kinh [3]. Vì vậy, việc cải thiện hiệu quả của tế bào CAR-T, giảm sự xuất hiện của tác dụng phụ và cải thiện tỷ lệ điều trị bệnh lâu dài hiện là những vấn đề đáng quan tâm nhất đối với liệu pháp CAR-T hiện nay.

PD-1 là một protein được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T. Khi PD-L1 gắn với thụ thể PD-1 gây ra hiện tượng bất hoạt động của tế bào T và hoạt động

miễn dịch của tế bào T bị ức chế [4]. Sự hiện diện của PD-1 trên bề mặt tế bào CAR-T được cho là góp phần làm giảm chức năng của liệu pháp CAR-T. Do vậy phong tỏa PD-1 trên tế bào CAR-T bằng chất ức chế hoặc kháng thể loại trừ PD-1 được cho là tăng cường hiệu quả tiêu diệt khối u của tế bào CAR-T [5]. Kháng thể kháng PD-1 sẽ kích hoạt tế bào CAR-T giúp tăng cường hiệu quả, nâng cao chức năng của tế bào CAR-T từ đó sẽ cải thiện được tiên lượng, giảm sự xuất hiện tác dụng phụ và tăng hiệu quả điều trị. Trên thế giới, tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đã được sử dụng trong một số nghiên cứu tiền lâm sàng và thử nghiệm lâm sàng nhằm mục đích để nâng cao hiệu quả của liệu pháp điều trị ung thư. Phong tỏa PD-1 đang được coi là một hướng mới đầy hứa hẹn giúp cải thiện chức năng của tế bào CAR-T mang lại hiệu quả điều trị tốt [3]. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả kết hợp tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 trên bệnh bạch cầu.

Từ những cơ sở lý luận và thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành đề tài:

***“Nghiên cứu tính an toàn và tác dụng kháng một số dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm”*** với hai mục tiêu:

1. *Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm.*
2. *Đánh giá tác dụng kháng một số dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm.*



## **Chương 1**

### **TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

#### **1.1. ĐẠI CƯƠNG BỆNH BẠCH CẦU**

##### **1.1.1. Dịch tễ học**

##### ***1.1.1.1. Tình hình bệnh bạch cầu trên thế giới***

Theo thống kê GLOBOCAN năm 2022, bệnh bạch cầu là ung thư được chẩn đoán phổ biến thứ 13 và là nguyên nhân thứ 10 gây tử vong do ung thư trên toàn thế giới, với 486.777 trường hợp mắc mới và 305.033 ca tử vong do bệnh bạch cầu. Trên toàn cầu, gánh nặng bệnh bạch cầu cao hơn ở những người nam so với nữ, tỷ lệ mắc bệnh chuẩn hóa theo độ tuổi ở nam giới là 6,2% so với nữ là 4,4. Tỷ lệ tử vong ở nam giới 3,7% cũng cao hơn nữ giới là 2,5% [1].

Tỷ lệ mắc bệnh bạch cầu theo tuổi nói chung ở Hoa Kỳ có xu hướng cao nhất ở người da trắng (15 trên 100.000), tiếp theo là người da đen (11 trên 100.000) và người gốc Tây Ban Nha (10,6 trên 100.000). Tỷ lệ mắc ở người Châu Á/Đảo Thái Bình Dương (7,8 trên 100.000) và người Mỹ gốc Ấn Độ/Alaska (8,3 trên 100.000) thấp hơn khi so sánh. Các mô hình chủng tộc và dân tộc tương tự áp dụng cho tỷ lệ tử vong điều chỉnh theo tuổi, cũng là cao hơn đối với người da trắng (7 trên 100.000), người da đen (5,6 trên 100.000) và người gốc Tây Ban Nha (4,8 trên 100.000) hơn người Châu Á/Đảo Thái Bình Dương (3,8 trên 100.000) và người Mỹ gốc Ấn Độ/Alaska (3,3 trên 100.000). Mặc dù tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong cao nhất ở người da trắng nhưng tỷ lệ sống sót thấp nhất đối với bệnh nhân da đen ở mọi lứa tuổi. Tỷ lệ sống thêm 5 năm ở bệnh nhân dưới 65 tuổi là 73% với chủng tộc da trắng và 63% với chủng tộc người da đen. Đối với độ tuổi từ 65 trở lên, tỷ lệ sống thêm 5 năm là 50% đối với chủng tộc người da trắng và 43% đối với chủng tộc người da đen [6].

### **1.1.1.2. Tình hình bệnh bạch cầu ở Việt Nam**

Ở Việt Nam bệnh bạch cầu cấp chiếm tỷ lệ hàng đầu trong các bệnh về máu, thường gặp ở người trẻ (< 40 tuổi). Trẻ em gặp 80% là bệnh bạch cầu cấp dòng lympho, người lớn 80% là bạch cầu cấp dòng tủy. Bệnh bạch cầu mạn dòng tủy chiếm 18% trong các bệnh bạch cầu, tỷ lệ nam/nữ là 2/1 [7], [8]. Theo thống kê GLOBOCAN năm 2022, Việt Nam có 5789 ca mắc mới đứng thứ 8 và có 4330 ca tử vong đứng thứ 6 do bệnh bạch cầu [9].

### **1.1.2. Nguyên nhân và cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu**

#### **1.1.2.1. Nguyên nhân**

Cho đến nay chưa xác định được các nguyên nhân gây bệnh bạch cầu, tuy nhiên nhiều yếu tố nguy cơ làm tăng tỷ lệ mắc bệnh như:

- Tiền sử tiếp xúc với bức xạ ion hoá (ví dụ, bom nguyên tử ở Nagasaki và Hiroshima) hoặc với các hóa chất (ví dụ benzene) [10].
- Điều trị trước đó với một số loại thuốc chống ung thư, bao gồm các chất alkyl hóa, các chất ức chế topoisomerase II, hydroxyurea và duy trì lenalidomide sau ghép tế bào gốc tự thân với các thuốc điều trị đa u tủy xương; có thể dẫn đến một loại bệnh bạch cầu cấp dòng tủy được gọi là t-AML hoặc AML liên quan đến điều trị [11].
- Nhiễm trùng với một virus (ví dụ: virus lympho T ở người HTLV-1 và HTLV-2, virus Epstein Barr) hiếm khi gây ra một số dạng của ALL; điều này được thấy chủ yếu ở các khu vực phổ biến như Châu Á và Châu Phi [11].
- Tiền sử rối loạn huyết học trước đây, bao gồm hội chứng rối loạn sinh tủy và bệnh lý tủy, có thể dẫn đến AML.
- Các điều kiện di truyền trước đây (ví dụ: Thiếu máu Fanconi, Hội chứng Bloom thất điều, Hội chứng Down, sắc tố xeroderma, hội chứng Li-Fraumeni) dẫn đến bệnh bạch cầu cấp dòng tủy và bệnh bạch cầu lympho cấp tính [12], [13].

### **1.1.2.2. Cơ chế bệnh sinh**

Bệnh bạch cầu là một bệnh máu ác tính liên quan đến việc sản sinh quá nhiều bạch cầu chưa trưởng thành hoặc bất thường, cuối cùng sẽ ngăn chặn việc sản sinh ra các tế bào máu bình thường và gây ra các triệu chứng liên quan đến giảm sinh tế bào máu. Bệnh xảy ra khi một số tế bào máu bị đột biến ADN và một số bất thường nhất định làm cho tế bào phát triển và phân chia nhanh hơn và tiếp tục sống trong khi các tế bào bình thường sẽ chết. Theo thời gian, các tế bào bất thường này có thể lấn át các tế bào máu bình thường trong tủy xương, dẫn đến giảm các tế bào bạch cầu, tế bào hồng cầu và tiểu cầu bình thường, gây ra ảnh hưởng đến chức năng các cơ quan và sức khỏe bệnh nhân.

Sự biến đổi ác tính thường xảy ra ở tế bào gốc vạn năng, mặc dù đôi khi nó liên quan đến tế bào gốc biệt hóa với khả năng tự tái tạo hạn chế. Tăng sinh bất thường, nhân dòng vô tính, biệt hóa không bình thường và giảm quá trình apoptosis (chết tế bào theo chương trình) dẫn đến việc thay thế các tế bào máu bình thường bằng các tế bào ác tính.

Các lỗi bất thường về di truyền như chuyển đoạn nhiễm sắc thể đối ứng, xóa nhiễm sắc thể, đột biến điểm và thay đổi ngoại di truyền có thể ngăn chặn sự trưởng thành của tế bào gốc qua các giai đoạn tạo máu khác nhau, dẫn đến sự tăng sinh không kiểm soát của các tế bào bạch cầu chưa trưởng thành [6].

#### **\* Quá trình tạo tế bào máu bình thường và bệnh máu ác tính**

Các tế bào máu gồm hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu được cơ quan tạo máu sinh ra hàng ngày để thực hiện chức năng nuôi dưỡng, bảo vệ cơ thể. Cơ quan tạo máu ở người trưởng thành chủ yếu là tủy xương; ngoài ra hệ thống hạch bạch huyết, tuyến ức cũng tham gia vào quá trình tạo máu. Cấu tạo của cơ quan tạo máu là tổ chức tạo máu còn gọi là vi môi trường tạo máu và tế bào gốc tạo máu. Tạo máu là quá trình nhân lên của tế bào gốc kèm theo hiện tượng biệt hóa và trưởng thành để hình thành nên các tế bào chức năng. Quá trình này được kiểm soát chặt chẽ, thông qua cơ chế điều hòa tạo máu. Cơ chế điều hòa

tạo máu hết sức phức tạp nhằm đảm bảo sinh vừa đủ số lượng tế bào theo yêu cầu của cơ thể [14].

Một sự bất thường trong tạo máu do các nguồn gốc khác nhau làm cho tế bào nhân lên quá mức mất sự kiểm soát bình thường của cơ thể hay nhân lên mà không biệt hóa, trưởng thành được đó là hiện tượng ác tính và hậu quả là bệnh máu ác tính [15], [16]. Sự tăng sinh mất kiểm soát kèm theo có hay không ức chế biệt hóa, trưởng thành có thể xảy ra ở các tế bào dòng tủy hay dòng lympho vì vậy người ta chia bệnh máu ác tính thành các bệnh ác tính dòng tủy và bệnh ác tính dòng lympho.

Bệnh máu ác tính là do tăng sinh các tế bào máu không kiểm soát được có thể kèm theo ức chế biệt hóa, trưởng thành. Như vậy, ở đây có hiện tượng mất kiểm soát sự nhân lên của tế bào và có thể kèm theo rối loạn biệt hóa của quá trình tạo máu. Những tế bào này ở trong tủy, máu hay tổ chức lympho. Khi phân tích vật chất di truyền (ADN và nhiễm sắc thể) các tế bào tạo máu ở những bệnh nhân này người ta phát hiện các bất thường và những bất thường đó có liên quan tới bệnh và thể bệnh. Tất cả các hiện tượng này là do hoạt động của gen chi phối [17].

#### **\* Hoạt hóa gen ung thư ở bệnh máu ác tính**

- Chuyển đoạn và cấu trúc lại nhiễm sắc thể (NST):

Chuyển một đoạn của NST này tới NST khác tạo nên sự sắp xếp mới, chuyển phần khởi động của gen này nối với phần gen khác làm gen mới này được phiên mã, hay chuyển phần cấu trúc gen này đến với phần cấu trúc của gen khác tạo ra gen lai mới, mã hóa một protein mới có hoạt tính tăng sinh tế bào. Bệnh bạch cầu kinh dòng bạch cầu do cơ chế này mà gây ra.

Nhiễm sắc thể Philadelphia (NST Ph) là một NST đột biến gặp ở trên 90% bệnh nhân bệnh bạch cầu mạn dòng tủy. Đây là một NST thuộc nhóm G được tạo ra do sự chuyển đoạn giữa nhánh dài của NST số 9 và NST số 22. Như vậy NST Ph1 là kết quả chuyển đoạn t (9;22) (q34; q11). Gen hỗn hợp

*bcr-abl* được tạo thành do kết quả chuyển đoạn t (9; 22) (q34; q11) tạo nên NST Ph1. Gen hỗn hợp *bcr-abl* được tìm thấy trên tất cả bệnh nhân bệnh bạch cầu mạn dòng tủy có NST Ph1 dương tính và cả trên các bệnh nhân bệnh bạch cầu mạn dòng tủy có NST Ph1 âm tính. Do đó người ta đưa ra giả thiết rằng sự hình thành gen này đóng vai trò quan trọng nhất trong cơ chế bệnh sinh của bệnh bạch cầu mạn dòng tủy [16], [18]. Đột biến tạo ra gen tổ hợp *bcr-abl* và sản phẩm của gen này là protein p190 được coi là một trong những cơ chế gây bệnh bạch cầu cấp dòng lympho, trong khi đột biến tương tự với sản phẩm là protein p210 là nguyên nhân gây bệnh bạch cầu mạn dòng bạch cầu hạt [15].

- Đột biến điểm:

Khi có sự thay đổi thành phần hoặc số lượng các nucleotid trên ADN sẽ gây nên đột biến điểm. Đó là các dạng thêm bớt, thay thế hay đảo vị trí của một vài cặp nucleotid trên gen. Ví dụ: protein sản phẩm của gen *RAS* có chức năng truyền tin trong tế bào bằng cách phân giải GTP thành GDP. Theo Hoffbrand thì oncogen *RAS* khi bị đột biến ở các bộ ba mã hóa 12, 13 hoặc 61 sẽ tạo ra protein mới. Protein này có khả năng phân giải cao làm tế bào phản ứng quá mạnh với chất kích thích và là nguyên nhân của nhiều bệnh ác tính [19].

- Nhân gen: Có nhiều nghiên cứu cho thấy thừa NST 8 sẽ thừa gen *MYC* và gây bệnh bạch cầu [20].

### 1.1.3. Phân loại

Cách tiếp cận hiện tại để phân loại bệnh bạch cầu dựa trên hệ thống của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 2016 (Phân loại Bệnh bạch cầu). Phân loại của WHO dựa trên sự kết hợp của các đặc điểm lâm sàng, hình thái học, miễn dịch và di truyền [21].

Bệnh bạch cầu thường được phân loại dựa theo: Cấp tính hoặc mạn tính dựa trên tỷ lệ phần trăm của các tế bào non hoặc bạch cầu trong tủy xương hoặc máu. Dòng tủy hoặc lympho dựa trên dòng tế bào ác tính.

- Bệnh bạch cầu cấp là một nhóm bệnh đặc trưng bởi sự tăng sinh và tích lũy trong tủy xương và ở máu ngoại vi của những tế bào tạo máu chưa trưởng thành, ác tính (Blast). Những tế bào này sẽ dần dần thay thế và ức chế quá trình trưởng thành và phát triển của các dòng tế bào bình thường trong tủy xương. Chúng được chia hai nhóm chính: Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy (Acute myeloid Leukemia - AML) và Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (Acute lymphoid Leukemia - ALL) [22].

+ Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy: có một số thể phụ và u tiên thân được phân biệt với nhau bởi hình thái học, miễn dịch học, hóa mô học và bất thường di truyền của WHO năm 2016 tất cả đều có ý nghĩa quan trọng đối với tiên lượng và điều trị. Bảy lớp được mô tả trong phân loại của WHO năm 2016, bao gồm [23]:

- AML có kèm theo bất thường vật chất di truyền tái diễn.
- AML có liên quan với hội chứng rối loạn sinh tủy xương (AML-MRC).
- AML có liên quan đến trị liệu (t-AML).
- AML không xếp loại được theo các cách khác (NOS).
- Sarcoma tủy.
- Tăng sinh dòng tủy có liên quan đến hội chứng Down.
- Tân sản tế bào tua non dạng tương bào.

Tiêu chuẩn hình thái học từ hệ thống phân loại Pháp-Mỹ-Anh (FAB) trước đây được sử dụng cho các phân nhóm không được quy định khác (NOS).

+ Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho [23]:

- Bệnh bạch cầu cấp dòng tế bào lympho B.
- Bệnh bạch cầu cấp dòng tế bào lympho T.
- Thể đề xuất bổ sung: bệnh bạch cầu cấp dòng tế bào lympho NK.

- Bệnh bạch cầu mạn là sự tăng sinh của các tế bào trưởng thành hơn hoặc đã biệt hóa. Chia thành hai nhóm chính: Bệnh bạch cầu mạn dòng tủy (CML) và Bệnh bạch cầu mạn dòng lympho (CLL).

Vào năm 2023, Hiệp hội Ung thư Hoa Kỳ ước tính sự phân bố các trường hợp mới ở Hoa Kỳ theo loại bệnh bạch cầu như sau [22]:

- + Bệnh bạch cầu cấp dòng tủy: 34%.
- + Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho: 11%.
- + Bệnh bạch cầu mạn dòng tủy: 15%.
- + Bệnh bạch cầu mạn dòng lympho: 31%.
- + Các bệnh bạch cầu khác: 9%.

#### **1.1.4. Các phương pháp điều trị**

Điều trị bệnh bạch cầu phụ thuộc vào dạng ung thư, giai đoạn của ung thư. Một số dạng bệnh bạch cầu phát triển chậm và chưa cần điều trị ngay lập tức. Mục đích tiêu diệt tối đa các tế bào ác tính để đạt lui bệnh hoàn toàn và tránh tái phát [24].

- Hóa trị: sử dụng thuốc để tiêu diệt tối đa và ngăn chặn sự phát triển của các tế bào ung thư trong cơ thể, đồng thời bảo tồn và hỗ trợ mô tạo máu phục hồi. Có thể dùng một loại thuốc duy nhất hoặc kết hợp các loại thuốc khác nhau. Cơ chế tác động của thuốc sẽ ngăn cản quá trình nhân lên của tế bào ở những giai đoạn khác nhau của quá trình phân bào.

- Xạ trị: sử dụng bức xạ năng lượng cao để tiêu diệt tế bào ung thư và ức chế sự phát triển của chúng. Bức xạ có thể được áp dụng cho một vùng hoặc toàn bộ cơ thể.

- Ghép tế bào gốc thay thế tủy xương bị bệnh bằng tủy xương khỏe mạnh tự thân hoặc đồng loài. Các tế bào gốc có thể được thu thập từ tủy xương, máu ngoại vi hoặc máu cuống rốn [25].

- Liệu pháp miễn dịch: là sử dụng hệ thống miễn dịch để chống lại ung thư. Liệu pháp miễn dịch có thể giúp cơ thể tạo ra nhiều tế bào miễn dịch hơn hoặc giúp các tế bào miễn dịch hiện có tìm và tiêu diệt tế bào ung thư [26].

- Liệu pháp nhắm mục tiêu: phương pháp điều trị ung thư này nhắm vào những thay đổi hoặc đột biến di truyền biến các tế bào khỏe mạnh thành các tế bào bất thường.

- Một hướng tiếp cận mới là liệu pháp sử dụng tế bào T mang thụ thể kháng nguyên khảm CAR. Liệu pháp CAR-T thành công nhất hiện nay là các cấu trúc CAR nhận biết thụ thể CD19. Khi tổng hợp các kết quả của 11 thử nghiệm lâm sàng sử dụng liệu pháp CAR-T kháng CD19, Lorentzen và đồng tác giả đã thấy có đến 60/72 (83%) bệnh nhân ALL đã thuyên giảm hoàn toàn bệnh [27]. So với thuốc sinh học đặc trị như kháng thể đơn dòng, liệu pháp CAR-T cũng có khả năng trị liệu trúng đích, nhưng vượt trội về tính hiệu quả. Đối với ALL, liệu pháp CAR-T hiệu quả ngay cả trong các ca đã kháng hóa trị, xạ trị hay đã di căn. Đặc biệt, tế bào CAR-T có thể tự tăng sinh và tồn tại lâu dài trong cơ thể để diệt các tế bào ung thư tái phát (nguyên nhân chính khiến trị liệu ung thư hiện nay thất bại) [28]. Năm 2015 nghiên cứu của Porter D. L và cộng sự báo cáo kết quả thử nghiệm ban đầu bằng cách sử dụng tế bào CAR-T để điều trị cho 14 bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu lympho mạn tính tái phát và khó chữa cho thấy sự tăng sinh *in vivo* của các tế bào CAR T tương quan với các phản ứng lâm sàng và các tế bào CAR-T vẫn tồn tại và duy trì chức năng sau 4 năm ở hai bệnh nhân đầu tiên đạt được lui bệnh hoàn toàn [29]. Nghiên cứu của Magnani C. F và cộng sự 2020 cho thấy sự tăng sinh tế bào CAR-T đã đạt được ở phần lớn bệnh nhân. Tế bào CAR-T có thể đo được bằng PCR sao chép gen chuyển lên đến 10 tháng [30].



## 1.2. LIỆU PHÁP TẾ BÀO CAR-T

### 1.2.1 Tổng quan về liệu pháp tế bào CAR-T

#### 1.2.1.1. Lịch sử hình thành và phát triển của liệu pháp tế bào CAR-T

Năm 1989 Eshhar Z. và cộng sự lần đầu tiên tạo ra gen thụ thể khả năng của tế bào T (chimeric TCR gene). Gen này có thể được biểu hiện ở tế bào T người và cho phép tế bào này nhận diện và phản ứng với các kháng nguyên đích với độ đặc hiệu cao, tương tự như phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Năm 1993, nhằm kết hợp lợi ích từ tính đặc hiệu của kháng thể và hoạt động gây độc tế bào của tế bào T CD8+, Eshhar đã nối vùng biến thiên đơn chuỗi (single chain variable region, scFv) của một phân tử kháng thể với vùng hằng định của thụ thể tế bào T (thường là chuỗi zeta của phức hợp TCR/CD3). Nhờ đó, Eshhar đã xây dựng được gen thụ thể dạng khả năng (chimeric receptor gene) trên tế bào T và kích thích chúng biểu hiện thành “scFvR $\zeta$  T cells” (được cho là tế bào CAR-T thế hệ đầu tiên). Tuy nhiên, công nghệ này chỉ đạt được những lợi ích hạn chế trong thử nghiệm lâm sàng do không thể gia tăng lượng tế bào khi tiếp xúc lặp lại nhiều lần với kháng nguyên. Vì thế, tế bào CAR-T thế hệ thứ hai đã được phát triển bằng cách gắn thêm một phân tử đồng kích thích CD28 hoặc 4-1BB vào giữa scFv và chuỗi CD3 $\zeta$ . Việc gắn thêm này đã giúp kích hoạt tế bào T một cách bền vững, từ đó tăng tiết cytokin và khuếch đại sự tăng sinh tế bào khi tiếp xúc lặp lại với kháng nguyên [31].

Năm 2003 đánh dấu sự khởi đầu của tế bào CAR-T nhắm đến thụ thể CD19 trên tế bào lympho B. Sadelain M. và cộng sự lần đầu tiên chỉ ra rằng tế bào CAR-T nhắm đích kháng nguyên CD19 có khả năng diệt trừ tế bào B ác tính trên mô hình chuột mang đột biến SCID/Beige. Ngoài ra, đồng cảm ứng bằng kháng nguyên CD80 và phân tử IL-15 cũng tăng sự phát triển của tế bào CAR-T và khả năng diệt tế bào ác tính [32]. Vào năm 2009, quy trình công nghệ sản xuất tế bào CAR-T nhắm đích kháng nguyên CD19 lần đầu tiên được công bố; dựa vào đó, thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 1 đã được tiến hành trên

các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu mạn dòng lympho (CLL) và bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (ALL). Kết quả của cuộc thử nghiệm lâm sàng này lần đầu được công bố vào năm 2013, chỉ ra sự thuyên giảm bệnh đáng kể của những bệnh nhân tham gia, đặc biệt là trên những bệnh nhân trưởng thành mắc bệnh ALL [33]. Dựa vào những kết quả nghiên cứu trên, liệu pháp sử dụng tế bào CAR-T nhắm đích CD19 được Cục Quản lý Dược và Thực phẩm Mỹ (FDA) công nhận là một bước đột phá, mở đường cho nhiều nghiên cứu và tiến bộ trong lĩnh vực này. Đến năm 2017, FDA đã cho phép dùng liệu pháp tế bào CAR-T trong chữa trị bệnh ALL ở người lớn và trẻ em [34], [35].

Từ khía cạnh miễn dịch học, các tế bào ung thư xuất phát từ các tế bào tự thân bị biến đổi mà thoát khỏi các cơ chế điều hoà phát triển bình thường của cơ thể. Việc nhận dạng và tấn công các tế bào ung thư của hệ thống miễn dịch cũng như sự trốn thoát của tế bào ung thư xảy ra theo ba giai đoạn [36]:

- Giai đoạn một là các tế bào ung thư được nhận dạng bởi hệ thống miễn dịch thông qua các kháng nguyên khối u và bị tiêu diệt.
- Giai đoạn hai là các tế bào ung thư tìm cách cân bằng nhờ việc duy trì sự tăng sinh và nhân rộng được kiểm soát bởi đáp ứng miễn dịch thích nghi.
- Giai đoạn ba là sự trốn thoát của các tế bào ung thư khỏi sự kiểm soát của hệ thống miễn dịch nhờ tích lũy thêm các đột biến làm cho các tế bào ung thư trở nên bất tử và di căn.

Các tế bào lympho T sở hữu thụ thể tế bào T đặc hiệu, nhạy cảm và liên tục tìm kiếm các tín hiệu ung thư, qua đó kích thích đáp ứng miễn dịch liên tiếp khi xác định được các kháng nguyên ung thư. Tuy nhiên, tế bào T thông thường chỉ có thể tấn công yếu ớt hoặc không thể chống lại tế bào ung thư đã bị biến đổi do: tính sinh miễn dịch yếu, không biểu hiện kiểu hình rõ ràng và khả năng tương tác và ức chế đáp ứng miễn dịch cao của các tế bào biến đổi. Do vậy thụ thể kháng nguyên dạng khảm (Chimeric Antigen Receptors - CARs) đã được phát triển để kích thích và hoạt hoá đáp ứng của tế bào T chống lại tế bào ung

thư [37]. Tế bào CAR-T có tiềm năng chống lại các bệnh ung thư máu. Hàng loạt các thử nghiệm lâm sàng sử dụng CAR-T CD19 cho thấy tỷ lệ đáp ứng từ 50-90% đối với ung thư tế bào lympho B không kiểm soát được bằng các liệu pháp thông thường [38], [39], [40].

Kể từ tháng 10 năm 2021, có bốn sản phẩm CAR-T hiện đã được phê duyệt dành cho bệnh u lympho không Hodgkin (NHL), hai sản phẩm dành cho bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tế bào B (B-ALL) và một sản phẩm dành cho bệnh đa u tủy (MM) [41].

Hiện nay, tế bào CAR-T được sử dụng rộng rãi trong liệu pháp miễn dịch tế bào cho các khối u khác nhau. Theo thống kê, hơn 300 thử nghiệm lâm sàng về liệu pháp tế bào CAR-T đã được nhiều cơ quan quản lý dược phẩm quốc gia phê duyệt, bao gồm cả FDA của Hoa Kỳ. Trong việc phát triển liệu pháp tế bào CAR-T, Trung Quốc và Hoa Kỳ là những nước tiên phong. Trên toàn cầu, số lượng nghiên cứu lâm sàng về điều trị bằng tế bào CAR-T đang tăng lên đáng kể trong hai thập kỷ qua. Cho đến năm 2022, có 377 thử nghiệm lâm sàng ở Hoa Kỳ và 636 thử nghiệm ở Trung Quốc trong khi Châu Âu chỉ có 58 thử nghiệm vẫn kém xa hai quốc gia dẫn đầu này [42]. Các thử nghiệm lâm sàng nhắm vào CD19 chiếm hơn 40% số thử nghiệm tế bào CAR-T ở Hoa Kỳ [43].

#### **1.2.1.2. Các thế hệ tế bào CAR-T**

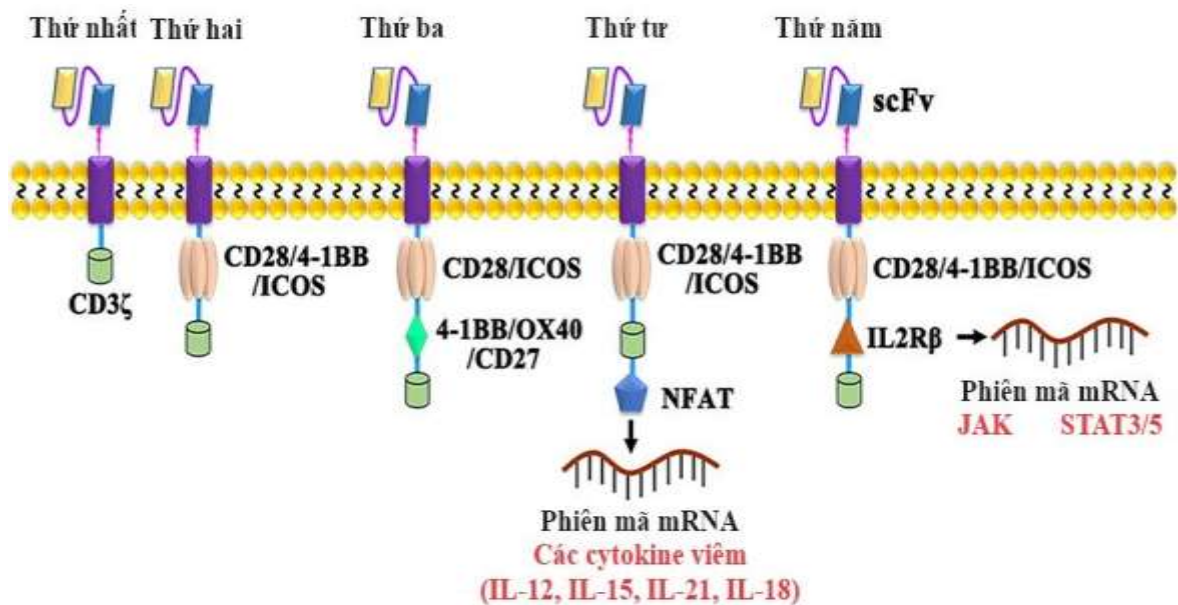
Các thế hệ tế bào CAR-T được phát triển gồm có:

##### **- Tế bào CAR-T thế hệ thứ nhất**

Tế bào CAR-T thế hệ thứ nhất được phát triển đầu tiên năm 1993, có đặc điểm nổi bật là sử dụng chuỗi CD3ζ làm tín hiệu nội bào. Tuy nhiên, thiết kế này khiến tế bào CAR-T thiếu các phân tử có giá trị nên không thể sản xuất đủ IL-2 cần thiết để duy trì hoạt động diệt tế bào ung thư. Vì vậy, việc sử dụng thế hệ này trong điều trị thường yêu cầu bổ sung IL-2 ngoại sinh. Hầu hết các nghiên cứu sử dụng CAR-T thế hệ đầu đều không đạt được kết quả như mong đợi [44], [45].

### - Tế bào CAR-T thế hệ thứ hai

Đặc trưng của thế hệ thứ hai là sử dụng tín hiệu kép cho việc hoạt hóa tế bào. Ngoài các miền CD3 $\zeta$  nội bào, tế bào CAR-T thế hệ thứ hai còn mang các phân tử đồng kích thích như CD28, CD134 (OX-40) hoặc CD137 (4-1BB) giúp tăng cường kích hoạt tế bào T, tăng sinh, sống sót và sản xuất cytokin. Các sản phẩm được FDA phê chuẩn hiện có trên thị trường đều là tế bào CAR-T thế hệ thứ 2. Các liệu pháp tế bào CAR-T thế hệ thứ 2 nhắm vào CD19 hiện đang được đưa vào thực hành lâm sàng và được phát hiện là có hiệu quả cao chống lại các khối u ác tính của tế bào B [44].



Hình 1. 1. Các thế hệ của công nghệ tế bào CAR-T

\* Nguồn: theo Chen L. và cộng sự (2022) [45]

### - Tế bào CAR-T thế hệ thứ ba

Tế bào CAR-T thế hệ thứ ba được tạo ra bằng cách sử dụng đồng thời nhiều vùng đồng kích thích. Trong số các cấu trúc khác nhau của các sản phẩm tế bào CAR-T thế hệ thứ 3, tế bào CAR-T dựa trên CD3 $\zeta$ -CD28-4-1BB hiện là cấu trúc được sử dụng phổ biến nhất, với mục đích tăng cường hơn nữa khả năng bài tiết cytokin và khả năng diệt tế bào ung thư. Tuy nhiên, do kích hoạt quá mức nhiều tín hiệu qua trung gian là các phân tử đồng kích thích nên tế bào

CAR-T thế hệ thứ 3 có tỷ lệ tác dụng phụ nghiêm trọng cao hơn và sự cạn kiệt tế bào CAR-T nhanh hơn so với tế bào CAR-T thế hệ thứ 2 [45].

#### **- Tế bào CAR-T thế hệ thứ tư**

CAR thế hệ thứ tư, còn gọi là tế bào T được chuyển hướng để tiêu diệt phổ biến qua trung gian cytokin, bổ sung các gen mã hóa cytokin để tăng cường tác dụng diệt tế bào ung thư bằng cách tiết ra các cytokin gây viêm. Ngoài sự thay đổi về miễn tín hiệu nội bào thì về cơ bản CAR-T thế hệ thứ tư giống với cấu trúc của tế bào CAR-T thế hệ thứ 2. Kết hợp thêm yếu tố hạt nhân của tế bào T được kích hoạt (NFAT- nuclear factor of activated T cells) có các chất biến đổi miễn dịch chuyển gen như cytokin (IL-2, IL-5, IL-12, IFN- $\gamma$ ). NFAT được xây dựng thành các yếu tố phiên mã để điều chỉnh sự biểu hiện cảm ứng hoặc cấu thành của protein chuyển gen và việc đưa chúng đến vị trí khối u mục tiêu khi kích hoạt tế bào CAR-T, do đó tạo ra vi môi trường khối u thuận lợi hơn cho các phản ứng miễn dịch [44].

#### **- Tế bào CAR-T thế hệ thứ 5**

Cấu trúc tế bào CAR-T liên tục được cải tiến, tế bào CAR-T thế hệ thứ năm, hay 'thế hệ tiếp theo', cũng dựa trên thế hệ CAR-T thứ hai, với việc bổ sung các miền nội bào của các thụ thể cytokin (ví dụ: đoạn chuỗi IL-2R $\beta$ ). Thế hệ này bao gồm các tế bào CAR-T thông thường được cải tiến đáng kể, là các CAR-T đơn trị nhắm mục tiêu riêng vào một kháng nguyên cụ thể, cũng như các CAR-T tiên tiến vượt xa các CAR thông thường bằng cách kết hợp các cấu trúc bổ sung vào CAR truyền thống để nhận biết nhiều hơn một kháng nguyên hoặc các mục tiêu mật độ kháng nguyên thấp [44], [45].

### **1.2.2. Độc tính của liệu pháp tế bào CAR-T với cơ thể**

#### **1.2.2.1. Hội chứng giải phóng cytokin và nhiễm độc thần kinh**

Độc tính phổ biến nhất của liệu pháp tế bào CAR-T là hội chứng giải phóng cytokin (CRS - Cytokine release syndrome), là một phản ứng viêm toàn thân qua trung gian là sự hoạt động quá mức của các tế bào tác động và

một lượng lớn cytokin. CRS với tỷ lệ mắc là 42 - 100% và 0 - 46% bệnh nhân bị CRS nặng sau khi truyền tế bào CAR-T. Các tế bào CAR-T cũng có thể kích hoạt tế bào miễn dịch bên ngoài như đại thực bào, từ đó giải phóng các cytokin gây viêm và góp phần vào sinh lý bệnh của CRS. CRS thường biểu hiện với các triệu chứng sốt, đau cơ, căng cứng, mệt mỏi và chán ăn nhưng có thể dẫn đến đa cơ rối loạn chức năng trong những trường hợp nghiêm trọng hơn [46], [47].

Hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào hiệu ứng miễn dịch (ICANS - Immune Effector Cell-Associated Neurotoxicity Syndrome) là độc tính cấp tính phổ biến thứ hai được quan sát thấy với liệu pháp tế bào CAR-T, với tỷ lệ mắc từ 2% đến 64% đối với ICANS mọi cấp độ và 0 - 50% đối với ICANS nặng. Sinh lý bệnh của ICANS ít được hiểu rõ hơn CRS. ICANS có liên quan chặt chẽ với CRS, luôn xảy ra và đạt cực đại vài ngày sau CRS mặc dù một số trường hợp hiếm khi xảy ra độc lập. Như CRS, cytokin, chemokin, và mức độ tăng sinh của tế bào CAR-T có liên quan đến mức độ nghiêm trọng của nhiễm độc thần kinh. Ở trạng thái viêm, tính toàn vẹn của hàng rào máu não bị phá vỡ, gây ra một loạt phản ứng sinh lý bệnh trong não. Có vẻ như sự kích hoạt nội mô mạch máu não và sự phá vỡ hàng rào máu não xảy ra khi bắt đầu ICANS. Nếu không có chức năng rào cản của hàng rào máu não, một lượng lớn tế bào miễn dịch và cytokin sẽ xâm nhập vào hệ thần kinh trung ương. Cùng với các tế bào tiền viêm thường trú được kích hoạt, các tế bào miễn dịch đã xâm nhập làm trầm trọng thêm dòng viêm trong hệ thần kinh trung ương, gây ra phù não, huyết khối, tan máu và các triệu chứng tâm thần kinh khác được quan sát thấy trong ICANS. ICANS chủ yếu được quản lý bằng cách chăm sóc hỗ trợ cho bệnh nhân độc tính nhẹ và corticosteroid thường được sử dụng cho các trường hợp nặng hơn [46].

Liệu pháp tế bào CAR-T cũng đi kèm với một số tác dụng phụ nguy hiểm khác [47], [48]:

- Hội chứng ly giải khối u: số lượng tế bào ung thư chết hàng loạt làm rối loạn các chuyển hoá trong cơ thể.
- Tác dụng lên tế bào chủ và lạc đích: trong một số trường hợp, loại kháng nguyên được sử dụng làm mục tiêu tấn công của tế bào CAR-T cũng có biểu hiện trong một vài loại tế bào bình thường. Vì vậy chúng trở thành đối tượng bị tiêu diệt.

#### **1.2.2.2. Nguy cơ cơ thể sinh miễn dịch với chính liệu pháp tế bào CAR-T**

Một số yếu tố nguy cơ sinh miễn dịch đã được xác định [47], [49]:

- Các cấu trúc có bản chất không phải của con người hoặc một phần con người của miền ngoại bào của cấu trúc CAR.
- Bản chất kết hợp của cấu trúc CAR khi scFv là một vùng của một protein lớn hơn bao gồm xuyên màng và một hoặc nhiều lĩnh vực tín hiệu nội bào.
- Sự hiện diện của trình tự cấu trúc chưa trưởng thành không phải của con người trong trình liên kết với các miền khác nhau của cấu trúc CAR.
- Sự hiện diện của trình tự mầm không phải của con người trong các miền được giới thiệu trên cấu trúc CAR-T, bao gồm miền tự sát.
- Sự hiện diện tiềm tàng của các protein virus và các yếu tố không phải của con người còn sót lại.
- Các yếu tố liên quan đến việc xóa, chỉnh sửa gen và lỗi trong biểu hiện gen.

#### **\* Đáp ứng miễn dịch dịch thể với liệu pháp tế bào CAR-T**

Đáp ứng với việc sử dụng CAR-Ts mang vùng CAR ngoại bào không có nguồn gốc con người, chẳng hạn như scFv có nguồn gốc từ protein kháng thể đơn dòng của chuột. Các đáp ứng miễn dịch đối với scFv cũng có thể được tạo ra, tương tự như các đáp ứng kháng thể kháng thuốc trung hòa [49].

Đáp ứng kháng thể kháng CAR-T đã được báo cáo trong một nghiên cứu với các tế bào T được thiết kế để biểu hiện vùng CAR đặc hiệu của thụ thể

folate (FR: Folate receptor) dựa trên kháng thể kháng FR của chuột. Các tế bào CAR-T đặc hiệu FR được phát triển để điều trị ung thư buồng trứng di căn [50].

**\* *Đáp ứng miễn dịch tế bào chống lại liệu pháp CAR-T***

Ngoài miễn dịch dịch thể, có một số bằng chứng mạnh mẽ được đưa ra về việc kích thích phản ứng miễn dịch tế bào chống lại tế bào CAR-T. Các liệu pháp CAR-T tự thân đặc hiệu với CD20 và CD19 đã được phát triển để điều trị u lympho thể nang tái phát hoặc kháng trị [49].

Bằng cách áp dụng phương pháp qPCR, người ta xác định được rằng tế bào CAR-T lưu hành đã giảm đáng kể sau một thời gian ngắn, thường là từ 24 giờ đến 7 ngày sau khi truyền. Để điều tra lý do khiến tế bào CAR-T giảm nhanh chóng, tế bào đơn nhân máu ngoại vi của bệnh nhân được đánh giá về sự hiện diện của đáp ứng miễn dịch tế bào trước và sau khi điều trị. Hoạt tính chống CAR-T đặc hiệu gây độc tế bào được đánh giá bằng cách sử dụng xét nghiệm giải phóng Chromium 51 ( $^{51}\text{Cr}$ ), cho thấy sự hiện diện của các tế bào cảm ứng chức năng trong máu được thu thập từ bệnh nhân đã được điều trị [50].

**1.2.2.3. *Ảnh hưởng của miễn dịch dịch thể và tế bào***

Sự thành công của điều trị CAR-T phụ thuộc rất nhiều vào sự tồn tại của các tế bào CAR-T trong hệ thống tuần hoàn. Thường thì sự thanh lọc nhanh chóng của các tế bào CAR-T khỏi tuần hoàn có liên quan đến sự phát triển của miễn dịch dịch thể hoặc tế bào đặc hiệu chống lại CAR-T. Một phản ứng miễn dịch mạnh mẽ sẽ làm giảm các tế bào CAR-T xuống dưới mức phát hiện trong vòng 18-34 ngày sau khi truyền lặp lại [50].

**1.2.3. *Ứng dụng liệu pháp tế bào CAR-T trong điều trị bệnh bạch cầu***

**1.2.3.1. *Quy trình sản xuất tế bào CAR-T***

- Thu nhận tế bào đơn nhân từ máu ngoại vi:

Bước đầu tiên trong quy trình sản xuất tế bào CAR-T tự thân là thu nhận tế bào máu đơn nhân từ máu ngoại vi của bệnh nhân, thường sử dụng



leukapheresis. Máu ngoại vi được lấy ra khỏi người bệnh để thu nhận tế bào miễn dịch chứa tế bào T, các thành phần còn lại được đưa trở lại hệ thống lưu thông máu của bệnh nhân [51].

- Hoạt hóa tế bào T:

Có thể sử dụng các tế bào trình diện kháng nguyên dòng tuỷ như tế bào tua để hoạt hoá tế bào T hoặc sử dụng tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo như dòng tế bào bệnh bạch cầu dòng tuỷ K562 làm tế bào nuôi giúp hoạt hoá tế bào T.

Phương pháp đơn giản và phổ biến để hoạt hoá tế bào T là sử dụng kháng thể đơn dòng kháng CD3 và CD28. Những kháng thể này được phủ lên đĩa nuôi cấy hoặc được gắn với hạt từ hoặc tồn tại dưới dạng chất nền cấu trúc nano [51].

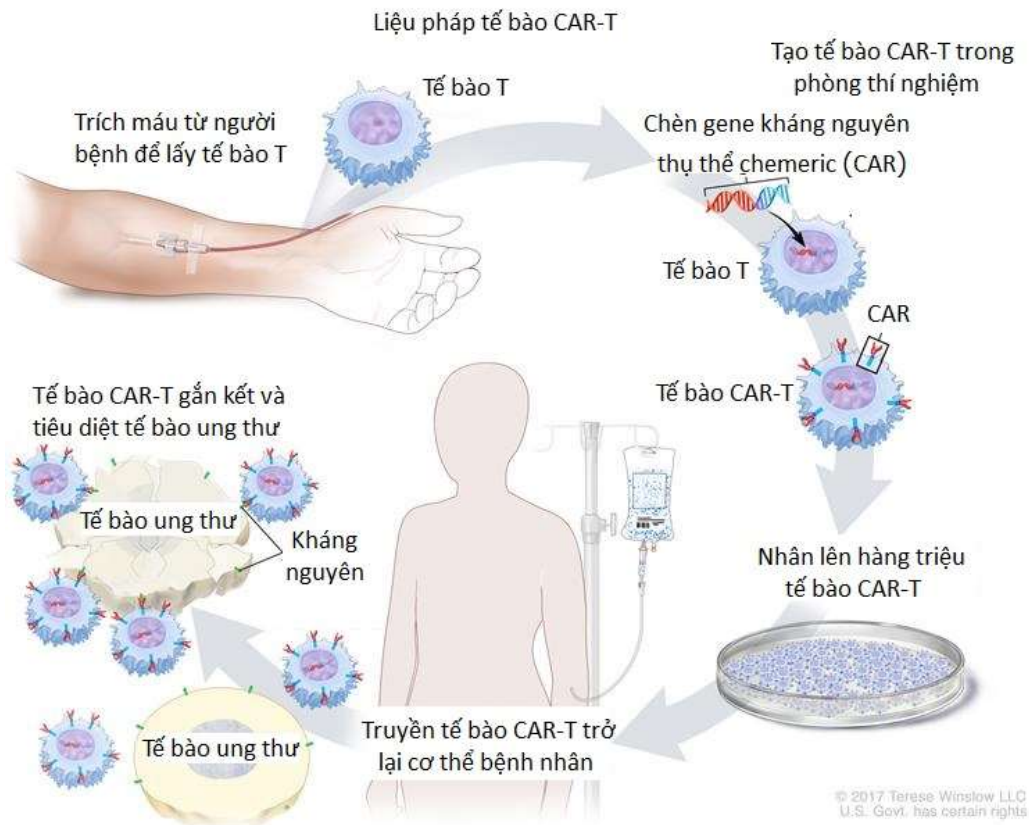
- Chuyển nạp gen và tăng sinh tế bào T:

Tế bào T sau đó được chuyển nạp gen mã hoá cho CAR và nhân lên trong một vài ngày cho đến hàng tuần. Mục đích của bước này là tạo ra lượng lớn tế bào CAR-T ( $10^{11}$  tế bào) để khi tiêm trở lại bệnh nhân. Mặc dù các hệ thống nuôi cấy tĩnh (đĩa và các chai nuôi cấy) được sử dụng rất phổ biến trong các phòng thí nghiệm, nhưng chúng thường đắt và khó đạt được lượng lớn tế bào, do đó cần các lò phản ứng sinh học với khả năng nuôi cấy quy mô lớn và ưu việt hơn.

Các hệ thống nuôi cấy đa nhiệm, bao gồm hoạt hoá, chuyển nạp, nuôi dưỡng, tăng sinh, rửa và thu hoạch tế bào trong một quy trình khép kín và tự động hoá sẽ làm giảm được các rủi ro về nhiễm trùng và giảm tổng chi phí vận hành trong phòng thí nghiệm và nguyên vật liệu. Hãng Miltenyi Biotec đã phát triển một hệ thống nuôi cấy khép kín và tự động bởi gọi là CliniMACS Prodigy<sup>TM</sup> chỉ cần 7 đến 14 ngày để tăng sinh đủ số lượng tế bào CAR-T cần tiêm cho bệnh nhân.

Mặc dù tế bào T nhân lên tốt *in vitro*, nhưng cần cân bằng giữa số lượng tế bào tối đa khi tăng sinh với khả năng biệt hoá bởi vì điều này làm tế bào T

già đi và có tuổi thọ ngắn trong cơ thể sau khi truyền. Các cơ sở lâm sàng khác nhau sử dụng các cytokin khác nhau như IL-2, IL-7 và IL-15 [52]. Tuy nhiên, vai trò kép của IL-2 là tăng sinh cả tế bào T thường và tế bào T điều hoà thì có thể không tốt cho mục đích sử dụng CAR-T trong điều trị ung thư.



Hình 1. 2. Quy trình sản xuất CAR-T trong lâm sàng

\* Nguồn: theo Tallantyre E. và cộng sự (2021) [53]

#### - Truyền tế bào CAR-T trở lại bệnh nhân:

Các tế bào CAR-T sau khi vượt qua được các đánh giá và kiểm tra chất lượng sẽ được truyền cho bệnh nhân. Liều lượng của tế bào CAR-T, bao gồm liều tế bào tối ưu, số liều truyền và thời gian truyền biến đổi tùy quy trình được thiết lập ở các trung tâm lâm sàng. Số lượng tế bào CAR-T đạt đỉnh trong khoảng 1 đến 2 tuần sau khi truyền. Mức độ tăng sinh và tồn tại của tế bào CAR-T là một trong những yếu tố quan trọng để đánh giá hiệu quả của liệu pháp CAR-T.

### ***1.2.3.2. Các nghiên cứu ứng dụng liệu pháp tế bào CAR-T***

Các thử nghiệm lâm sàng tế bào CAR-T điều trị bệnh bạch cầu đều tập trung nhắm đích là thụ thể CD19. CD19 là kháng nguyên lý tưởng do nó được biểu hiện mạnh trên bề mặt tất cả các tế bào B nhưng lại không biểu hiện trong tế bào gốc tạo máu [54]. Hàng loạt các thử nghiệm lâm sàng sử dụng CAR-T CD19 cho thấy tỷ lệ đáp ứng từ 50 - 90% đối với ung thư tế bào lympho B không kiểm soát được bằng các liệu pháp thông thường [38], [39], [40].

Hai liệu pháp CAR-T CD19 điều trị ALL đã được FDA thông qua là Kymriah và Yescarta. Kymriah được chỉ định cho bệnh nhi và thanh niên mắc bệnh bạch cầu lympho B cấp tính. Yescarta được chỉ định cho bệnh nhân trưởng thành mắc ung thư lymphoma tế bào B lớn. Tỷ lệ đáp ứng của bệnh nhân với hai liệu pháp điều trị trên ở mức cao: 83% bệnh nhân có dấu hiệu thuyên giảm chỉ với một lần tiêm Kymriah trong khi, tỷ lệ đáp ứng với liệu pháp Yescarta là 72% [55].

Năm 2020 nghiên cứu của Wang M. và cộng sự về liệu pháp sử dụng tế bào CAR-T KTE-X19 cho 68 bệnh nhân u lympho tế bào vỏ tái phát hoặc khó điều trị thì thấy 57% bệnh nhân phân tích hiệu quả ban đầu đã thuyên giảm lâu dài. Sau 12 tháng, ước tính tỷ lệ sống không tiến triển bệnh 61%. Tuy nhiên, hội chứng giải phóng cytokin độ 3 trở lên và các biến chứng thần kinh xảy ra lần lượt ở 15% và 31% bệnh nhân; không có trường hợp nào tử vong [56]. Ramos C. A. và cộng sự đã nghiên cứu điều trị liệu pháp tế bào CAR-T CD30 trên 41 bệnh nhân u lympho Hodgkin. Kết quả cho thấy hội chứng giải phóng cytokin được quan sát thấy ở 10 bệnh nhân và tất cả đều là độ 1. Không quan sát thấy độc tính thần kinh. Với thời gian theo dõi trung bình là 533 ngày, tỷ lệ sống không bệnh tiến triển trong 1 năm và tỷ lệ sống toàn bộ cho tất cả các bệnh nhân được đánh giá lần lượt là 36% và 94% [57].

Năm 2021, nghiên cứu của Mei H. và cộng sự đã xây dựng một liệu pháp CAR-T BM38 đặc hiệu kép được nhân bản hóa nhằm mục tiêu BCMA

và CD38 ở 23 bệnh nhân bị đa u tủy xương tái phát và kháng trị được truyền CAR-T BM38 trong thử nghiệm giai đoạn I. Kết quả cho thấy CAR-T BM38 đặc hiệu kép là khả thi, an toàn và hiệu quả ở bệnh nhân đa u tủy xương tái phát và kháng trị. Trong thử nghiệm pha I, hội chứng giải phóng cytokin xảy ra ở 20 bệnh nhân (87%) và chủ yếu là độ 1-2 (65%). Độc tính huyết học là phổ biến, bao gồm giảm bạch cầu trung tính ở 96% bệnh nhân, giảm bạch cầu ở 87%, thiếu máu ở 43% và giảm tiểu cầu ở 61% bệnh nhân. Thời gian sống không bệnh tiến triển trung bình là 17,2 tháng. Đáng chú ý, các tế bào BM38 CAR-Ts có thể được phát hiện ở 77,8% bệnh nhân được đánh giá sau 9 tháng và 62,2% sau 12 tháng [58].

Năm 2022, một nghiên cứu về liệu pháp tế bào CAR-T kháng CD19 có tiềm năng cho các ứng dụng lâm sàng rộng rãi. Nghiên cứu này cho thấy hiệu quả và độ an toàn của nó trong điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho tái phát hoặc kháng trị và u lympho không Hodgkin (NHL). Tỷ lệ lui bệnh hoàn toàn là 80% và tỷ lệ sống sót sau 1 năm là 51%. Tỷ lệ hội chứng giải phóng cytokin là 69% và hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác nhân miễn dịch là 8%. Đối với liệu pháp tế bào CAR-T có sẵn, tỷ lệ lui bệnh hoàn toàn đối với ALL là 70% và đối với u lympho không Hodgkin là 52% [59].

Năm 2023, một nghiên cứu tổng hợp của Yu M. và cộng sự về hiệu quả của liệu pháp CAR-T kháng CD19 ở những bệnh nhân mắc bệnh u lympho không Hodgkin tế bào B (B-NHL) và bệnh bạch cầu cấp tế bào B (B-ALL). Trong số 260 bệnh nhân mắc B-NHL, tỷ lệ đáp ứng và lui bệnh hoàn toàn tốt nhất gộp chung lần lượt là 77% và 52%. Trong 159 bệnh nhân mắc B-ALL, tỷ lệ lui bệnh hoàn toàn là 92% và tỷ lệ sống sót sau 12 tháng và tỷ lệ sống sót không tiến triển gộp chung là 65,0% và 73,0% tương ứng. Nghiên cứu này chứng minh tính an toàn và hiệu quả lâm sàng của các liệu pháp tế bào CAR-T nhằm mục tiêu kép trong các khối u ác tính của tế bào B. Hơn nữa, cần có các

thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng được thiết kế tốt để thiết lập vai trò của liệu pháp tế bào CAR-T nhắm mục tiêu kép ở những bệnh nhân có khối u ác tính tế bào B [60].

**\* Các nghiên cứu thử nghiệm tiền lâm sàng của liệu pháp tế bào CAR-T**

- Tạo mô hình ung thư máu trên chuột thiếu hụt miễn dịch:

Một loạt các khối u tế bào máu ác tính có thể phát triển được ở chuột thiếu hụt miễn dịch. Khả năng sử dụng ghép dị loài ung thư ác tính từ tế bào máu người, để đánh giá hiệu quả điều trị của thuốc tiền lâm sàng [61].

- Sử dụng Luciferase trên chuột gây bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp:

Luciferase đã được sử dụng như một chất chỉ thị hữu ích cho nghiên cứu hình ảnh phát quang sinh học cả trên *in vitro* và *in vivo* để đánh giá các sự kiện sinh học ở các sinh vật khác nhau. Các loại gen luciferase khác nhau đã được phát hiện hoặc phát triển, bao gồm đom đóm, Renilla và Vargula luciferase [62]. Khả năng theo dõi sự tiến triển của bệnh bạch cầu với các dòng tế bào bạch cầu chuyển nạp luciferase được sử dụng để đánh giá hoạt động *in vivo* của các tế bào CAR-T.

Các loài linh trưởng không phải con người để đánh giá an toàn thì chúng có mức độ tương đồng cao hơn với con người so với loài gặm nhấm và tiến triển bệnh tương tự trong hệ thống miễn dịch nguyên vẹn. Do đó, các mô hình bệnh ở loài linh trưởng khả thi hơn trong việc đánh giá sinh học hạn chế loài và phù hợp hơn về mặt lâm sàng để đánh giá độc tính liên quan đến miễn dịch và độc tính lâm sàng có khả năng gây tử vong, chẳng hạn như bão cytokin. Ung thư ở chó và ung thư ở người có vị trí khối u, kiểu di căn và phản ứng với điều trị tương tự nhau, tuy nhiên, các phương pháp điều trị miễn dịch hiệu quả ở chó đang tụt hậu so với phương pháp điều trị ở người do thiếu hiểu biết về miễn dịch học ở chó. Tương tự như con người, cả tế bào B ác tính và bình thường của chó đều biểu hiện CD20 cho phép các tế bào CAR-T nhắm mục tiêu theo dòng dõi cụ thể. Tuy nhiên, rituximab không liên kết với CD20 ở chó và do đó

không có liệu pháp nhắm mục tiêu CD20 cho chó [63]. Các mô hình này có thể được sử dụng để đánh giá hiệu quả điều trị và điều trị thất bại trên các dòng tế bào ALL.

#### **1.2.4. Các phương pháp tăng tính an toàn của liệu pháp tế bào CAR-T trên lâm sàng**

##### ***1.2.4.1. Các phương pháp làm giảm tác dụng phụ của liệu pháp tế bào CAR-T***

- Chuyển đồng thời 2 cấu trúc CAR vào tế bào T, nhằm nhận biết 2 kháng nguyên khác nhau trên tế bào ung thư: một phân tử CAR cung cấp tín hiệu hoạt hóa (giống như thế hệ thứ nhất) và phân tử CAR còn lại sẽ cung cấp tín hiệu đồng kích thích. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là có thể giảm hiệu quả điều trị [64].

- Cảm ứng biểu hiện CAR thông qua thụ thể NOTCH nhân tạo. Nguyên tắc là thụ thể NOTCH nhân tạo trên tế bào CAR-T khi tương tác với 1 kháng nguyên đặc hiệu trên tế bào ung thư sẽ cảm ứng sự biểu hiện của cấu trúc CAR. Sau đó, phân tử CAR mới sinh sẽ tương tác với kháng nguyên đích và ly giải tế bào ung thư [50].

- Sử dụng chiến lược gen tự sát trong thiết kế tế bào CAR-T nhằm kiểm soát sự tăng sinh của tế bào CAR-T trong cơ thể người bệnh, hạn chế hiện tượng “on-target, off-tumor” hay phát sinh các tế bào T ung thư. Gen tự sát được dùng phổ biến nhất là HSV-TK (herpes simplex virus thymidine kinase). Khi bổ sung ganciclovir (GCV), HSV-TK cùng với các kinase của người sẽ thực hiện quá trình phosphoryl hóa GCV tạo GCV-triphosphate, vốn có khả năng kết thúc sớm quá trình kéo dài mạch DNA và gây chết tế bào theo chương trình. Gần đây, hệ thống iCasp9 đã được chứng minh tính hiệu quả trong thử nghiệm lâm sàng cấy ghép tế bào gốc tạo máu.

##### ***1.2.4.2. Các phương pháp làm giảm nguy cơ sinh miễn dịch của liệu pháp CAR-T***

Các chiến lược khác nhau nhằm giảm nguy cơ sinh miễn dịch của điều trị CAR-T bao gồm: giảm hàm lượng protein của virus, nhân tính hóa cấu trúc

CAR và điều trị hóa trị liệu giảm bạch huyết. Nhân hóa cấu trúc CAR là một giải pháp rõ ràng được áp dụng rộng rãi cho phần lớn các phương pháp điều trị dựa trên protein đương thời. Việc sử dụng phương pháp điều trị hóa trị liệu giảm bạch huyết với Fudarabine và Cyclophosphamide đã được báo cáo rộng rãi, đặc biệt đối với thể hệ thứ hai và thứ ba của liệu pháp CAR-T [49].

Các tế bào CAR-T có khả năng tạo ra các phản ứng miễn dịch kháng CAR cả ở thể dịch và tế bào đối với các thành phần không tự thân của cấu trúc CAR hoặc đối với các protein còn sót lại có nguồn gốc từ các vector chuyển gen, vốn có khả năng gây miễn dịch. Ngược lại, phản ứng này có thể góp phần hạn chế hiệu quả và do đó ức chế sự thành công của tế bào CAR T được sử dụng sau đó. Hơn nữa, scFv của nhiều CAR hiện đang được phát triển có nguồn gốc từ chuột hoặc các kháng thể đơn dòng không phải của con người. Để tránh tình trạng tế bào CAR-T bị bất hoạt sớm do phản ứng miễn dịch với scFv có nguồn gốc từ chuột, có thể xem xét các sản phẩm tế bào CAR-T thay thế sử dụng scFv được nhân bản hóa. Các nghiên cứu ban đầu liên quan đến cấu trúc tế bào CAR-T nhắm mục tiêu CD19 được nhân bản hóa đã báo cáo tỷ lệ đáp ứng lâm sàng khác nhau, bao gồm cả ở những bệnh nhân tiến triển hoặc tái phát sau lần truyền tế bào CAR-T chứa scFv chuột trước đó [65].

### **1.2.5. Cytokin và liệu pháp tế bào CAR-T**

Liệu pháp tế bào CAR-T sẽ tạo ra rất nhiều các tác nhân gây độc tế bào nhắm vào khối u. Các tế bào CAR-T không hoạt động độc lập trong cơ thể sống mà tạo ra sự tương tác qua trung gian cytokin với vi môi trường khối u để có hoạt động tối ưu. Để tiêu diệt tế bào ung thư, tế bào CAR-T hoạt động theo cơ chế tiêu diệt trực tiếp phụ thuộc vào tiếp xúc hoặc cơ chế gây độc gián tiếp, thông qua giải phóng các cytokin tiền viêm hoặc bằng cách tác động lên các tế bào khác [66]. Sau khi tương tác gắn kết với kháng nguyên đích trên bề mặt khối u, tế bào CAR-T kích hoạt tiết ra các cytokin gây viêm, bao gồm IFN- $\gamma$  và

TNF- $\alpha$ . Bên cạnh đó, các cytokin do tế bào CAR-T sản xuất như TNF- $\alpha$ , IL-2, GM-CSF và IFN- $\gamma$  kích hoạt đại thực bào tiết các cytokin tiền viêm [46].

Hội chứng giải phòng cytokin (CRS) là kết quả trực tiếp của quá trình kích hoạt đồng bộ các tế bào CAR-T gặp các tế bào bạch cầu lympho B biểu hiện CD19, và dòng thác tín hiệu cytokin được kích hoạt đầu ra bởi các tế bào phản ứng của hệ thống miễn dịch bẩm sinh [67]. Các cytokin liên quan đến CRS có thể được sản xuất trực tiếp bởi các tế bào CAR-T được truyền vào hoặc các tế bào miễn dịch khác như đại thực bào có thể tạo ra các cytokin để đáp ứng với các cytokin được tạo ra bởi các tế bào CAR-T được truyền vào. Nhiều loại cytokin bao gồm IL-6, interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-2-thụ thể- $\alpha$ , IL-8 và IL-10 đều tăng cao trong huyết thanh của bệnh nhân bị sốt, nhịp tim nhanh, hạ huyết áp và các độc tính khác sau khi truyền tế bào CAR-T. Cytokin điều khiển CRS là IL-6, một chất trung gian chính gây viêm. Khi CRS xảy ra, nồng độ IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  và IFN- $\gamma$  trong máu tăng lên đáng kể; đặc biệt, IL-6 song song với mức độ nghiêm trọng của CRS.

- TNF- $\alpha$  được sản xuất bởi nhiều loại tế bào khác nhau bao gồm đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào T và tế bào NK [68]. Bên cạnh đó sự hoạt hóa tế bào T dẫn đến việc giải phóng TNF- $\alpha$  chịu trách nhiệm kích hoạt hệ thống bạch cầu đơn nhân / đại thực bào và liên quan đến sự gia tăng đáng kể hội chứng giải phóng cytokin cấp. Đây là một cytokin tiền viêm được sản xuất và tiết ra bởi các tế bào lympho gây độc tế bào khi nhận ra mục tiêu của khối u, đóng vai trò quan trọng trong liệu pháp miễn dịch điều trị ung thư. Khi nhận ra các kháng nguyên khối u, tế bào CAR-T tiết ra các cytokin gây viêm, bao gồm IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$ , để gây ra hiện tượng chết của tế bào khối u, kích thích đại thực bào sản xuất cytokin. Ngoài ra, các đại thực bào có thể được kích hoạt bởi các cytokin do tế bào CAR-T sản xuất, chẳng hạn như TNF- $\alpha$ , IL-2, GM-CSF và IFN- $\gamma$  [46].



Trong khi tế bào CAR-T ly giải khối u thông qua tương tác trực tiếp giữa tế bào T và tế bào khối u, thì việc tế bào CAR-T kích hoạt sản xuất cytokin có thể tăng cường hơn nữa khả năng chống khối u của chúng [69]. TNF- $\alpha$  là yếu tố hoại tử khối u và là một trong những cytokin dồi dào nhất được tiết ra bởi các tế bào CAR-T khi xâm nhập khối u. TNF- $\alpha$  là chất trung gian chính của quá trình kích hoạt nội mô do tế bào CAR-T gây ra. Mức độ TNF- $\alpha$  tăng cao đã được báo cáo ở những bệnh nhân điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T, điều này có liên quan đến độc tính của tế bào CAR-T như hội chứng giải phóng cytokin CRS, hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác động miễn dịch ICANS [70].

- IL-6 là một cytokin đa chức năng, được sản xuất bởi nhiều loại tế bào, trong đó có nguồn gốc chủ yếu là tế bào bạch cầu đơn nhân, lympho B và đại thực bào [71]. Tăng IL-6 gặp sau điều trị bởi liệu pháp CAR-T và liên quan chặt chẽ đến đáp ứng viêm hệ thống, một hội chứng không mong muốn hay gặp sau điều trị bởi liệu pháp CAR-T [72]. IL-6 là nhân tố trung tâm trong đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Tuy nhiên, sự bài tiết kéo dài, tăng và quá mức IL-6 liên quan đến bệnh sinh nhiều bệnh lý, trong đó có ung thư, đặc biệt là ung thư bạch cầu [73]. Vai trò quan trọng trong sự sống của tế bào ung thư bạch cầu của IL-6 và hiệu quả kháng ung thư khi ức chế tín hiệu IL-6 đã được báo cáo, đặc biệt là trên ung thư bạch cầu [73].

- IL-2 có thể kích thích sự tăng trưởng các tế bào miễn dịch như lympho T, tăng khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư. IL-2 là dưỡng chất quan trọng trong nuôi dưỡng tế bào miễn dịch như tế bào lympho xâm nhập khối u, tế bào CAR-T, và NK. IL-2 thúc đẩy sự tăng sinh và chức năng của tế bào T [74]. Tuy nhiên, IL-2 như con dao 2 lưỡi. Bên cạnh vai trò như là nhân tố trung tâm trong sự sống và tăng sinh của tế bào lympho T, độc tính của IL-2 cũng là mối quan ngại lớn và là rào cản trong việc ứng dụng tế bào CAR-T. Chuyển gen biểu hiện các cytokin và/hoặc các thụ thể cytokin vào trong tế bào CAR-T hứa hẹn

nhieu lợi ích dựa trên khả năng thúc đẩy sự phát triển/sự tồn tại của tế bào CAR-T và khả năng hoạt động của các cytokin trong sự ức chế miễn dịch của vi môi trường khối u [75].

### **1.3. KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1**

#### **1.3.1. Con đường tín hiệu PD-1**

##### ***1.3.1.1. Các đường hướng tín hiệu đích của PD-1***

Rất nhiều nghiên cứu đã tìm hiểu về tác động của PD-1 lên các đường hướng tín hiệu quan trọng được kích hoạt bởi thụ thể tế bào T (TCR) các thụ thể đồng kích hoạt, nhằm xác định bằng cách nào sự gắn PD-1 ức chế sự tăng trưởng và sự biệt hóa cảm ứng của các tế bào T đã được kích hoạt, đồng thời làm giảm sự sản sinh các cytokin. Đã có nhiều tranh cãi về việc đâu là đường hướng tín hiệu đầu tiên mà PD-1 nhắm đến. Hầu hết các nghiên cứu ủng hộ mô hình mà mục tiêu đầu tiên PD-1 nhắm đến là TCR và các tín hiệu theo sau TCR. Tuy nhiên, cũng có giả thuyết rằng thụ thể CD28 được ưu tiên là mục tiêu đầu tiên của PD-1 hơn là TCR, trong khi đó có nghiên cứu khác lại chỉ ra rằng cả TCR và CD28 đều được nhắm đích như nhau bởi PD-1 [76].

SHP-1 và SHP-2 phosphatase không chỉ tham gia vào đường hướng tín hiệu PD-1 mà còn có vai trò quan trọng và có chức năng trái ngược trong việc kích hoạt thông qua TCR. Mặc dù SHP-1 truyền tín hiệu ức chế [77], SHP-2 được coi là một nhân tố điều hòa dương trong quá trình kích hoạt tế bào T [78] và có thể thực hiện thông qua cơ chế dephosphoryl vùng ức chế của các nhân tố điều hòa dương. Cả hai phosphatase đều tham gia vào sự hình thành bộ tín hiệu TCR [79], [80], [81]. Vì biểu hiện PD-1 chỉ được tạo ra sau khi kích hoạt và tham gia vào các vi cụm tín hiệu TCR khi liên kết với PD-L1, nên có thể cho rằng các phân tử PD-1 được nhóm lại và ổn định bởi các tương tác PD-L1 xung quanh các phân tử TCR. Một vài protein gần đây đã được xác định là các phân tử thành phần của bộ tín hiệu PD-1 ví dụ như Grb2, Lck, and ZAP-70, cũng như là thành phần của bộ tín hiệu TCR [82]. Các nghiên cứu sau đó cần

phải làm sáng tỏ tương tác phức tạp giữa tín hiệu TCR và PD-1, cũng như xác định các phân tử thành phần chung giữa tín hiệu TCR và PD-1, đồng thời xác định cơ chế tín hiệu bao gồm SHP-1 và/hoặc SHP-2, và tìm ra các cơ chất trực tiếp của chúng.

Mặc dù tín hiệu thông qua PD-1 và các tác động chức năng chủ yếu hướng đến các tế bào T, có hai nghiên cứu đặt ra câu hỏi liệu đường hướng tín hiệu PD-1: PD-L1 có mặt trong tế bào ung thư hay không. Đã có nghiên cứu cho thấy quần thể con của các dòng tế bào u ác tính chuột và người, và các quần thể nhỏ của các tế bào ác tính từ mô sinh thiết bệnh nhân biểu hiện PD-1. Không giống như tế bào T mà ở đó sự liên kết của PD-1 dẫn đến sự ức chế các con đường tín hiệu PI3K/Akt, MAPK, và mTOR, sự gắn PD-1 ở các tế bào khối u ác tính được phát hiện là đã kích thích các đường hướng tín hiệu này và làm tăng trưởng khối u. Điều này có thể gợi ý rằng, các tế bào ung thư sử dụng con đường tín hiệu PD-1: PD-L1 để hỗ trợ sự phát triển của nó, bằng cách kích thích đường hướng tín hiệu mTOR ở các tế bào lân cận [83].

#### ***1.3.1.2. Cơ chế và kết quả của đường tín hiệu PD-1***

Biểu hiện của PD-L1 trong tế bào ung thư ban đầu được coi là cơ chế chính của sự ức chế miễn dịch và suy giảm tế bào T gây ra bởi ung thư [84]. Tín hiệu PD-L1 trong các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) được xác định sẽ điều hòa và ức chế sự kích hoạt tế bào T. Trong quá trình đáp ứng miễn dịch chống khối u, APC hấp thu các kháng nguyên khối u từ các mô khối u, di chuyển đến hạch bạch huyết và trình diện kháng nguyên cho tế bào T, dẫn đến kích hoạt tế bào T. Sau đó, các tế bào T được kích hoạt sẽ di chuyển đến các mô khối u để tiêu diệt. Tín hiệu PD-L1 đóng vai trò quan trọng trong việc ức chế chức năng tế bào T. Đáp ứng ức chế cũng có thể tạo ra như một hệ quả của việc ức chế đáp ứng miễn dịch tế bào T thông qua các tế bào APC có biểu hiện PD-L1 trong vùng không chứa tế bào ung thư [85]. Đáp ứng kháng ung thư của tế bào T được kích

thích trong các hạch bạch huyết tiêu khối u bằng cách ức chế tác động ức chế thông qua PD-L1 của các tế bào APC nằm ở vùng ngoài khối u.

Tín hiệu thông qua PD-L1 được nghiên cứu đầu tiên trên các tế bào ung thư. PD-L1 được coi là một lá chắn miễn dịch sẽ truyền các tín hiệu chống lại sự chết ở tế bào ung thư, sau khi gắn bởi PD-1 được biểu hiện trên tế bào T, do đó, kích thích sự kháng lại sự tiêu diệt của tế bào T và bảo vệ tế bào ung thư [86]. Các nghiên cứu sau đó đề xuất rằng PD-L1 có thể kích hoạt các tín hiệu nội bào ở tế bào ung thư theo hướng không phụ thuộc PD-1 và làm gia tăng sự tăng sinh cũng như khả năng sống sót của tế bào ung thư thông qua sự ức chế thực bào và kích hoạt mTOR [87].

PD-L1 được biểu hiện trong tế bào T sau quá trình kích hoạt, tuy nhiên thì khả năng truyền tín hiệu của nó đến tế bào T vẫn còn gây nhiều tranh cãi. Trong nghiên cứu của Manish và cộng sự đã xác định một tương tác cụ thể, không bị nghi ngờ trước đây giữa hai thành viên họ B7, B7-1 và PD-L1, đồng thời chứng minh rằng tương tác này có ý nghĩa quan trọng về mặt chức năng. Các tín hiệu qua B7-1 hoặc PD-L1 có tính chất ức chế, dẫn đến giảm biểu hiện của các dấu hiệu kích hoạt bề mặt tế bào, giảm sự tăng sinh tế bào T và giảm sản xuất cytokin. Sự tương tác trực tiếp giữa hai phân tử này bổ sung thêm một chiều hướng mới cho các tương tác điều hòa miễn dịch trong họ phân tử kích thích giá trị B7:CD28 và buộc phải xem xét lại quan điểm về tương tác giữa các phân tử trong họ B7:CD28 trong việc điều chỉnh hoạt hóa và dung nạp tế bào T. Nghiên cứu này cũng làm tăng tầm quan trọng của B7-1 và PD-L1 trên tế bào T [88].

### **1.3.2. Kháng thể kháng PD-1**

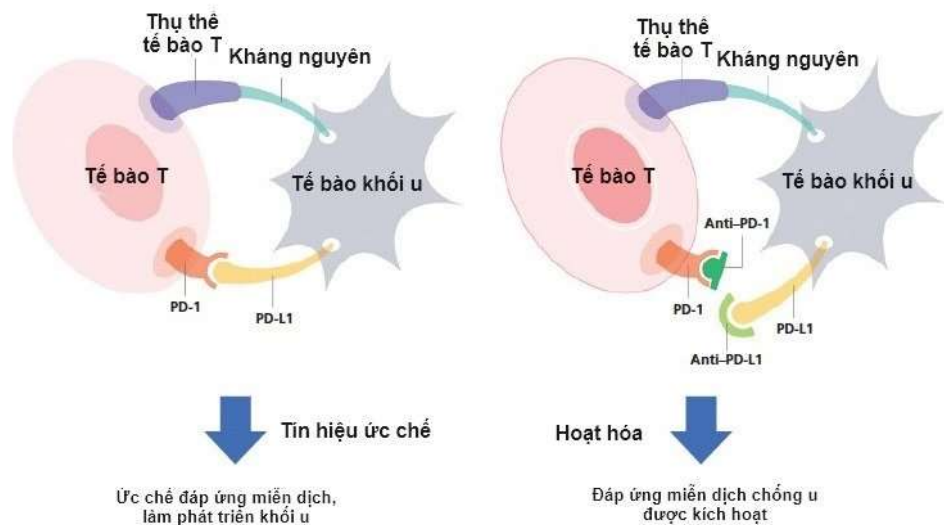
Năm 1992, Tasuku H. đã khám phá ra PD-1, một protein được biểu hiện trên bề mặt của tế bào T. Qua nhiều năm nghiên cứu tại phòng thí nghiệm ở trường Đại học Kyoto, ông đã làm sáng tỏ được chức năng của PD-1. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, kháng PD-1 có vai trò làm tăng cường sự hoạt hóa của

tế bào T để chống lại khối u. Ở những thí nghiệm trên chuột, việc khóa lại PD-1 cũng cho thấy sự đột phá đầy hứa hẹn trong việc chống lại khối u. Với những nghiên cứu trên lâm sàng sau đó, năm 2012, một nghiên cứu quan trọng đã chứng minh những hiệu quả rõ ràng trong việc điều trị bệnh nhân với nhiều loại hình ung thư khác nhau. Kết quả thu được rất ấn tượng, một số bệnh nhân di căn đã được chữa khỏi, điều mà trước đây được xem như không thể điều trị được [89].

PD-1 là một thụ thể ức chế biểu hiện trên bề mặt của các tế bào T được hoạt hóa bởi kháng nguyên để chống lại khối u [4]. Thụ thể này nhận biết và bám vào PD-L1 và PD-L2. Trong khi, PD-L1 biểu hiện ở tế bào trình diện kháng nguyên và nhiều loại tế bào khác, thì PD-L2 chủ yếu biểu hiện trên tế bào trình diện kháng nguyên [90]. PD-1 không bị tác động bởi các chất kích thích miễn dịch mà thông qua việc phát ra các tín hiệu để ngăn cản sự phosphoryl hóa các con đường tín hiệu trung gian quan trọng của tế bào T và qua đó dập tắt hoạt động của tế bào này [91]. Chất ức chế con đường PD-1/PD-L1 có khả năng loại bỏ khối u thông qua việc tái hoạt hóa tế bào T độc, qua đó làm tăng hoạt động cũng như tỷ lệ tế bào T độc. Ức chế thụ thể PD-1 giúp giải phóng quá trình ức chế miễn dịch mà gây bất hoạt tế bào T, do đó cho phép tế bào T “bất hoạt” được tái hoạt hóa và tăng hiệu quả của hệ miễn dịch bất chấp sự hiện diện của PD-L trong khối u. Bằng chứng nghiên cứu lâm sàng cho thấy chất ức chế PD-1/PD-L hoạt động hiệu quả nhất với những khối u đã có tế bào T độc hoạt hóa, nhưng bị ức chế bởi con đường PD-1/PD-L1. Tuy nhiên đáp ứng miễn dịch cũng được ghi nhận ở một số khối u không có sự biểu hiện của phối tử của PD-1 là PD-L1 hay PD-L2.

PD-L1 là một protein xuyên màng, có mặt tại màng tế bào ung thư, trong khi đó thụ thể PD-1 có mặt trên bề mặt của các tế bào miễn dịch như: tế bào T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên, đại thực bào. Khi PD-L1 gắn với thụ thể PD-1 gây ra hiện tượng bất hoạt động của tế bào T và hoạt động miễn dịch của tế bào T bị ức chế. Vì thế khi dùng kháng thể ức chế PD-1 hoặc PD-L1 sẽ gây

ra hiện tượng ức chế trực liên kết PD-1/PD-L1, từ đó hệ miễn dịch của tế bào T được kích hoạt và tấn công tế bào ung thư [4].



Hình 1.3. Kiểm soát miễn dịch qua thụ thể PD-1

\* Nguồn: theo Bartolović N. và cộng sự (2023) [92]

### 1.3.3. Ứng dụng kháng thể kháng PD-1 trong điều trị

Một số chiến lược đã được thử nghiệm để kiểm tra tác động của việc can thiệp PD-1 trong mô hình tiền lâm sàng, bao gồm các tế bào tua được thiết kế *ex vivo* để biểu hiện cả PD-L1 và các phức hợp peptide-MHC hoặc các chất chủ vận PD-1 bám màng. Các chất chủ vận bám màng đặc biệt hiệu quả để kích thích dung nạp sau ghép tạng vì các tế bào của người cho được truyền trước khi ghép. Sẽ cần thiết để đảm bảo rằng các chất chủ vận PD-1 khôi phục dung nạp miễn dịch nhưng không cho phép miễn dịch bảo vệ [93], [94].

Ức chế kháng thể nhắm đích PD-1 hoặc PD-L1 đã cho thấy thành công đáng kể trong thử nghiệm lâm sàng. Một số thử nghiệm lâm sàng sử dụng kháng thể nhắm vào sự tương tác giữa PD-1 và PD-L1 để điều trị ung thư đã cho thấy khả năng đầy hứa hẹn trong việc kéo dài thời gian sống sót, nhưng không phải tất cả bệnh nhân đều đáp ứng với thuốc ức chế PD-1/PD-L1 [95], [96]. Tuy nhiên, hầu hết các bệnh nhân không cho thấy sự thuyên giảm ổn định sau điều trị liệu pháp PD-1. Hệ miễn dịch có khả năng chiến đấu với các tế bào ung thư,

nhưng một số tế bào của hệ miễn dịch lại kích thích sự chuyển hóa và tăng trưởng của khối u [97]. Vì cả khối u và xâm nhập miễn dịch đều ảnh hưởng đến các đáp ứng trong điều trị, nên cần phải cân nhắc cả hai yếu tố này khi phát triển các liệu pháp điều trị kết hợp.

**\* *Tương quan với kết quả lâm sàng***

Những nỗ lực đáng kể đang được tiến hành để xác định các dấu ấn sinh học để dự đoán bệnh nhân nào sẽ được chỉ định ức chế con đường PD-1 khi sử dụng nó như một liệu pháp điều trị đơn lẻ và phát triển các liệu pháp kết hợp hiệu quả. Khi điều trị chỉ nhắm vào việc ức chế PD-1, sự có mặt của các tế bào T CD8<sup>+</sup> ở viền xung quanh khối u xâm lấn và biểu hiện của PD-L1 trong khối u ở mức độ cao có liên quan đến đáp ứng điều trị với tỷ lệ tốt hơn [98], [99]. Tuy nhiên, biểu hiện của PD-L1 không phải lúc nào cũng có liên quan đến kết quả điều trị: một số khối u dương tính với PD-L1 đáp ứng kém với ức chế PD-1, trong khi đó một số khối u âm tính với PD-L1 lại cho thấy đáp ứng điều trị tốt [100]. Ở một vài khối u, các đột biến có thể gây ra sự biểu hiện liên tục không kiểm soát của PD-L1, mặc dù không có đáp ứng viêm. Do đó, các dấu ấn sinh học thường có hiệu quả đáp ứng dự đoán với điều trị PD-1 hơn là chỉ mức độ biểu hiện PD-L1 [101]. Một số nghiên cứu cho thấy sự gia tăng khả năng nhân thành dòng TCR trong khối u có liên quan đến đáp ứng tốt hơn với điều trị bằng chất ức chế PD-1 [102], cho thấy sự ít đa dạng TCR hoặc nhiều quần thể tế bào T tương đồng có thể có liên quan đến miễn dịch kháng ung thư tốt hơn. Đột biến tế bào soma trong khối u đại diện cho một cơ hội để hệ thống miễn dịch đáp ứng với các epitopes (phần của kháng nguyên mà kháng thể bám vào) khác với kháng nguyên từ chính nó, mà có khả năng tăng tính sinh miễn dịch của khối u. Các nghiên cứu tiền lâm sàng ủng hộ giả thuyết là kháng nguyên mới làm tăng tính sinh miễn dịch của khối u. Các báo cáo lâm sàng cho thấy có nhiều mức độ khác nhau xét về sự liên hệ giữa sự trầm trọng của đột biến và kết quả lâm sàng sau khi sử dụng ức chế checkpoint (PD-1 hoặc CTLA4)

[103], [104]. Ung thư sắc tố da và ung thư phổi không phải tế bào nhỏ có mức độ đột biến cao do tiếp xúc lâu dài với tác nhân gây đột biến và có một số tỷ lệ đáp ứng cao nhất với ức chế PD-1. Ở bệnh nhân mắc ung thư sắc tố ác tính, giải trình tự toàn bộ exome của mẫu khối u trước trị liệu với Nivolumab hoặc Pembrolizumab cho thấy nhìn chung sự trầm trọng của các đột biến soma không ảnh hưởng đáng kể đến tính đáp ứng với điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 (nhóm đáp ứng được xác định khi bệnh nhân không tiến triển hoàn toàn, một phần, hoặc ổn định khối u, nhóm không đáp ứng là nhóm có khối u vẫn phát triển). Tuy nhiên, tải lượng đột biến cao hơn có liên quan đến tăng khả năng sống sót của tế bào ung thư sau khi điều trị với kháng thể kháng PD-1. Một nhóm bệnh nhân với mức độ đột biến thấp cũng đáp ứng với điều trị kháng thể kháng PD-1. Các đáp ứng tế bào T với kháng nguyên mới cho phép khả năng đề thúc đẩy miễn dịch kháng khối u tiềm năng trong khi đó tránh được các vấn đề như tự miễn. Do đó, chiến lược để tăng đáp ứng với kháng nguyên mới qua việc tiêm vaccine, chiếu xạ hoặc trị liệu đích (ví dụ: các thuốc nhắm đến kinase hoặc thụ thể của nhân tố sinh trưởng) có khả năng cao để làm tăng tỷ lệ đáp ứng với ức chế chốt kiểm soát [105]. Tuy nhiên, nhiều kháng nguyên của khối u có thể có độ tương đồng cao với kháng nguyên của người bệnh. Cân nhắc vai trò quan trọng của tín hiệu PD-1 trong việc duy trì dung nạp tự thân, các chất ức chế PD-1 có thể hoạt động một phần bằng cách thúc đẩy các tế bào T tự hoạt hóa đặc hiệu cho các kháng nguyên tự thân trong khối u, điều này có thể giải thích cho tính đáp ứng với điều trị PD-1 cả trong khối u có mức độ đột biến thấp.

#### **\* Điều trị phối hợp**

Điều trị phối hợp đại diện cho thể hệ liệu pháp điều trị lâm sàng tiếp theo của ung thư. Chiến lược điều trị phối hợp sử dụng chất ức chế PD-1 bao gồm ức chế các thụ thể ức chế khác (ví dụ như LAG3, TIM3 hoặc TIGIT; ức chế các cytokin điều hòa miễn dịch (ví dụ như sản xuất IL-10 và interferon mãn tính loại 1), vận chuyển chất chủ vận cho các phân tử đồng kích thích (ví dụ



như CD40 hoặc ICOS); kiểm soát cytokin nội môi (ví dụ IL-2, IL-7, hoặc IL-15); liệu pháp miễn dịch (tế bào CAR-T và Vắc-xin ung thư) tiêm Vắc-xin để kích thích đáp ứng của tế bào T và vận chuyển các tế bào T [105], [106]. Ngoài việc điều trị phối hợp nhắm đến các đường hướng tín hiệu miễn dịch một cách trực tiếp, có nhiều nghiên cứu đang hướng đến điều hòa trao đổi chất và di truyền ngoài gen, do tầm quan trọng của chúng trong việc xác định trạng thái và chức năng của tế bào. Các tác nhân dược học nhắm đến trao đổi chất (ví dụ như methotrexate, dichloroacetate và chất ức chế isocitrate dehydrogenase) và epigenome (bao gồm tất cả các hợp chất hóa học được thêm vào bộ gen của một người) (ví dụ như chất ức chế histone deacetylase, bao gồm vorinostat và romidepsin, và chất ức chế DNA methyltransferase, ví dụ 5-azacitidine và decitabine) được sử dụng trong thử nghiệm lâm sàng để điều trị ung thư, mặc dù tác dụng của chúng đến hệ miễn dịch chỉ mới được tìm hiểu. Có vẻ sẽ có tiềm năng khi sử dụng phối hợp chất ức chế PD-1 và các chất trung gian trong tín hiệu trao đổi chất [107]. Liệu pháp điều trị phối hợp sử dụng chất ức chế PD-1 và các chất thay đổi di truyền ngoài nhân sẽ làm tăng hiệu quả lâm sàng liệu có hiệu quả hay không cần được xác định. Kháng thể kháng PD-L1 là phương pháp điều trị đơn lẻ không thể thay đổi toàn bộ di truyền ngoài gen của các tế bào T bất hoạt trong bệnh ung thư, nhưng điều trị phối hợp với các tác nhân thay đổi di truyền ngoài nhân có thể cho phép tái lập trình các tế bào này. Một trong những rào cản quan trọng nhất đối với đáp ứng miễn dịch *de novo* của kháng nguyên ung thư là sự trình diện của kháng nguyên trong trạng thái viêm tương ứng. Rất nhiều dạng điều trị đích (ví dụ cetuximab, dabrafenib và trametinib), hóa trị (ví dụ 5-fluorouracil, doxorubicin và oxaliplatin), và xạ trị có thể kích thích miễn dịch bằng cách tăng miễn dịch với ung thư, từ đó có thể vượt qua được rào cản này. Liều lượng hóa trị và/hoặc xạ trị cao có thể có tác động bất lợi đến các tế bào miễn dịch. Các nghiên cứu bổ sung cần xác định

việc phối hợp phương pháp điều trị nào hay chất đối kháng miễn dịch nào và làm sao để tối ưu liều lượng và trình tự để cải thiện kết quả điều trị.

#### **1.4. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU LIỆU PHÁP CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1**

Liệu pháp tế bào CAR-T và điều trị ức chế chốt kiểm soát miễn dịch PD-1, tương ứng là liệu pháp dựa trên tế bào và kháng thể, cho thấy tiềm năng hứa hẹn và đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ phê duyệt để điều trị các khối u ác tính về huyết học. Tuy nhiên, các tác dụng phụ nghiêm trọng và thuyên giảm lâm sàng trong thời gian ngắn, sự kết hợp giữa liệu pháp tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 đã được áp dụng để nâng cao hiệu quả điều trị trên tiền lâm sàng và một số thử nghiệm lâm sàng [108]. Nhằm mục tiêu nhiều con đường ức chế có thể nâng cao hiệu quả của tế bào CAR-T. Bên cạnh đó, hơn một nửa số bệnh nhân được điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T nhắm mục tiêu CD19 đối với bệnh ung thư hạch tế bào B lớn không đạt được sự thuyên giảm lâu dài, có thể một phần là do PD-1/PD-L1 gây rối loạn chức năng tế bào CAR-T [109]. PD-1 là một thụ thể bề mặt tế bào có tác dụng ức chế hoạt động viêm của tế bào T bằng cách liên kết với các phối tử. Sự điều hòa giảm chức năng tế bào T do khối u gây ra có thể được đảo ngược bằng các chất ức chế điểm kiểm soát miễn dịch. Đã có báo cáo rằng phong tỏa PD-1 có thể tăng cường hoạt động chống ung thư của tế bào CAR-T và cũng có thể giúp tế bào CAR-T khỏi cạn kiệt và thoái hóa. Khả năng sống sót của bệnh nhân có tế bào CAR-T được kéo dài. Kháng thể kháng PD-1 và tế bào CAR-T có tiềm năng cải thiện chức năng và tăng cường hiệu quả, giảm tác dụng phụ.

Năm 2017, một nghiên cứu của Li S. và cộng sự đã thiết kế các tế bào CAR-T tiết ra các kháng thể kháng PD-1 (CAR. $\alpha$ PD-1-T) và đánh giá hiệu quả của chúng trong mô hình chuột xenograft ung thư biểu mô phổi thì thấy hiệu quả hơn so với TB CAR-T đơn thuần [110]. Năm 2019, cũng đã có một trường hợp được báo cáo sử dụng CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1

liệu thấp trên bệnh nhân ung thư hạch không Hodgkin tế bào B giúp thuyên giảm hơn 10 tháng và giảm tác dụng phụ [111]. Phân tích tổng hợp của Hou B. và cộng sự năm 2019 chỉ ra rằng tỷ lệ đáp ứng của liệu pháp tế bào CAR-T trong khối u rắn đạt 9%. Do vậy bằng cách kết hợp tế bào CAR-T với các liệu pháp liệu pháp miễn dịch khác như kháng thể kháng PD-1 có thể sẽ mang lại hiệu quả lâm sàng tốt hơn trong điều trị các khối u ác tính thể rắn [112]. Đã có thử nghiệm giai đoạn I của liệu pháp tế bào CAR-T ở bệnh nhân mắc bệnh màng phổi ác tính kết hợp với Pembrolizumab, kháng thể kháng PD-1. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống trung bình là 23,9 tháng, bệnh ổn định được duy trì trong 6 tháng ở 8/18 bệnh nhân [113]. Một nghiên cứu của Zhou Y. và cộng sự năm 2023 khi phân tích trên 57 bệnh nhân ung thư hạch từ 5 thử nghiệm lâm sàng cho thấy liệu pháp tế bào CAR-T kết hợp với liệu pháp miễn dịch kháng PD-1 trong điều trị bệnh nhân ung thư hạch có hiệu quả. Tỷ lệ bệnh nhân đáp ứng một phần, hoàn toàn và tổng thể là 21%, 27% và 65%. Tỷ lệ mắc chung của hội chứng giải phóng cytokin, giảm bạch cầu, sốt và mệt mỏi được ước tính là 57% , 47% , 59% và 50% [3]. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện nay chưa có nghiên cứu nào đánh giá hiệu quả khi kết hợp hai liệu pháp trên đặc biệt trên bệnh bạch cầu.

Từ những cơ sở lý luận và thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng và tác dụng của liệu pháp tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm để có cơ sở cho việc phát triển kỹ thuật này và ứng dụng trong điều trị bệnh bạch cầu trên người.

## **Chương 2**

### **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.1. THỜI GIAN, ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

##### **2.1.1. Thời gian nghiên cứu**

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 12/2020 đến 12/2023.

##### **2.1.2. Địa điểm nghiên cứu**

Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y

Trung tâm Nghiên cứu động vật thực nghiệm - Học viện Quân Y

Khoa Huyết học - Truyền máu, Sinh hóa, Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Quân Y 103

Bộ môn Miễn dịch - Học viện Quân Y

Khoa Vi sinh vật - Bệnh viện TWQĐ 108

#### **2.2. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU**

##### **2.2.1. Tế bào CAR-T**

Các khối tế bào CAR-T CD19 được chuyển nạp bằng vector Sleeping beauty CD19R/pSB mã hóa phân tử CAR thế hệ thứ hai kháng CD19 từ tế bào đơn nhân máu ngoại vi của người khỏe mạnh, tự nguyện tham gia hiến máu và tiểu cầu tại Bộ môn trung tâm Huyết học - Truyền máu, Bệnh viện Quân Y 103, Học viện Quân Y. Các tế bào CAR - T này là sản phẩm của đề tài nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia mã số KC10.39/16-20, được bảo quản và duy trì tại phòng tế bào của Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y. Khối tế bào CAR-T đạt các tiêu chuẩn cơ sở: có biểu hiện cấu trúc CAR CD19, có khả năng ly giải tế bào ung thư CD19+; không nhiễm vi khuẩn, nấm.

##### **2.2.2. Kháng thể kháng PD-1**

Kháng thể kháng PD-1 (PD-1 Ab) Mã ATC: L01XC18, Mỹ hàm lượng 25mg/mL.

### 2.2.3. Các dòng tế bào ung thư bạch cầu

- Tế bào Daudi (ATCC CCL-231) dòng tế bào ung thư hạch lympho CD19+ Burkitt (ATCC, Hoa Kỳ). Dòng tế bào Daudi bao gồm các tế bào lympho B được phân lập từ máu ngoại vi của một nam thanh niên da đen 16 tuổi mắc bệnh u lympho Burkitt vào tháng 5 năm 1967. Các tế bào lympho B này đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu về quá trình sinh bệnh bạch cầu.

- Tế bào Raji (ATCC CCL-86) là dòng tế bào ung thư bạch cầu lympho B CD19+ (ATCC, Hoa Kỳ). Dòng tế bào lympho Raji được phân lập vào năm 1963 từ khối u lympho Burkitt ở xương hàm trên bên trái của một bé trai da đen 11 tuổi. Dòng tế bào này có thể được sử dụng trong nghiên cứu miễn dịch học.

- Tế bào K562 (ATCC CCL-243) dòng tế bào ung thư bạch cầu mạn tính dòng tủy CD19- (ATCC, Hoa Kỳ). Tế bào K562 được phân lập từ tủy xương của một bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu tủy mãn tính 53 tuổi. Dòng tế bào K562 được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu rối loạn hệ thống miễn dịch và miễn dịch học.

Các tế bào được bảo quản tại Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân Y.

Quá trình nghiên cứu, các dòng tế bào được nuôi cấy, tăng sinh theo đúng quy trình, được bảo quản và duy trì tại phòng tế bào của Bộ môn Sinh lý bệnh, Học viện Quân Y.

### 2.2.4. Động vật

Chuột nhắt trắng, cân nặng  $30g \pm 5g$ , được cung cấp bởi Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm, Học viện Quân Y đủ tiêu chuẩn thí nghiệm, số lượng 60 con.

### 2.2.5. Trang thiết bị sử dụng cho nghiên cứu

- Hệ thống phòng thí nghiệm phục vụ nuôi cấy tế bào: Phòng sạch, tủ ấm CO<sub>2</sub>, kính hiển vi soi ngược, máy ly tâm, tủ mát 4<sup>0</sup>C, tủ âm - 20<sup>0</sup>C, - 80<sup>0</sup>C, bình chứa Nitơ lỏng.

- Hệ thống phòng nuôi chuột đảm bảo các tiêu chuẩn: không khí, ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, thức ăn, nước uống sạch...

- Cân điện tử để theo dõi trọng lượng của chuột.
- Máy đếm tế bào dòng chảy BD FACSLyris, Mỹ.
- Máy realtime PCR: 7500 Fast - Applied Biosystems, Mỹ
- Máy phân tích huyết học XN1000, hãng Sysmex, Nhật Bản.
- Máy xét nghiệm sinh hóa AU580, hãng Beckman Coulter, Mỹ.

#### **2.2.6. Hóa chất và vật tư tiêu hao**

##### **\* Hóa chất:**

- Môi trường nuôi cấy tế bào Tcell, Texmacs, RPMI bổ sung thêm 10% huyết thanh bê FBS (Fetal Bovine Serum) và 1% kháng sinh (penicillin và streptomycin).
- Dung dịch đệm PBS, còn 70<sup>0</sup> và 90<sup>0</sup>.
- Bộ kit tách RNA từ tế bào nuôi cấy (Thermo Scientific™, Mỹ).
- Bộ kit chuyển cDNA: RevertAid RT Reverse Transcription Kit của hãng Thermo Scientific™, Mỹ.
- Primer làm kỹ thuật realtime PCR của Công ty Phù Sa, Việt Nam.
- Bộ kit làm ELISA định lượng nồng độ IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ :
  - + Mouse IL-2 ELISA kit mã MBS2701039, Mouse IL-6 ELISA kit mã MBS2508516, Mouse TNF- $\alpha$  ELISA kit - MBS2500421 của hãng MyBiosource.
  - + Human IL-2 Uncoated ELISA Kit mã 2237558-007, Human IL-6 Uncoated ELISA Kit mã 298722-008, Human TNF- $\alpha$  Uncoated ELISA Kit mã 279143-009 của hãng Thermo Fisher Scientific.
- Hóa chất làm xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu.
- Hóa chất làm xét nghiệm các chỉ số sinh hóa máu: AST, ALT, Urê, Creatinin.
- Hóa chất nhuộm tế bào (bộ kit nhuộm CFSE, 7-AAD), hóa chất chạy Realtime PCR.

##### **\* Vật tư tiêu hao:**

- Đĩa và chai nuôi cấy tế bào các kích thước (Chai T75, T25; Đĩa 10cm, 6cm, 6 giếng, 12 giếng, 24 giếng).

- Ống falcon các kích cỡ khác nhau (50ml, 15ml).
- Đầu côn, eppendorf, lọ vi khuẩn (Invitrogen, Hoa Kỳ) và một số dụng cụ tiêu hao khác.

## **2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.3.1. Thiết kế nghiên cứu**

Nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào và động vật (chuột nhắt trắng). Nghiên cứu tiền cứu can thiệp có so sánh nhóm chứng.

### **2.3.2. Nội dung nghiên cứu**

#### ***2.3.2.1. Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm***

- \* Đánh giá chất lượng của tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1
  - Đánh giá tính tiết trùng (cấy khuẩn).
  - Đánh giá tỷ lệ biểu hiện CAR sau nuôi cấy tăng sinh.
  - Đánh giá hàm lượng Endotoxin.
- \* Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên động vật thực nghiệm:
  - Đánh giá tình trạng toàn thân, trọng lượng, vị trí tiêm trên chuột.
  - Đánh giá nồng độ cytokin được giải phóng trên động vật sau khi tiêm tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1.
  - Đánh giá chức năng các cơ quan: chức năng của gan thận được đánh giá qua các chỉ số sinh hóa máu, kết quả giải phẫu bệnh quan sát biến đổi hình thái gan thận. Chức năng của cơ quan tạo máu được đánh giá thông qua các chỉ số huyết học.

#### ***2.3.2.2. Đánh giá tác dụng kháng một số dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1***

- \* Đánh giá tác dụng của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên các dòng tế bào ung thư bạch cầu (Daudi, Raji, K562):
  - Qua tỷ lệ ly giải tế bào bằng kỹ thuật Flow Cytometry.

- Thiết kế nghiên cứu đánh giá ly giải trên 4 nhóm: PBMC, PD-1 Ab, CAR-T, CAR-T phối hợp với PD-1 Ab.

- Đánh giá khả năng bài tiết cytokin của tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên *in vitro*: nồng độ cytokin được giải phóng ra môi trường nuôi cấy tế bào ở các nhóm tế bào ung thư đồng nuôi cấy với 4 nhóm PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell - tế bào đơn nhân máu ngoại vi), PD-1 Ab, CAR-T và CAR-T phối hợp với PD-1 Ab.

### **2.3.3. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.3.3.1. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào**

##### *a. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào PBMC và CAR-T*

- Lấy tube tế bào (PBMC và CAR-T) đã được bảo quản trong nitơ lỏng  $-196^{\circ}\text{C}$ . Chuyển tế bào vào bể ổn nhiệt  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút để rã đông. Nhanh chóng chuyển tế bào vào 10 mL TexMacs đã làm ấm và ly tâm 400 xg, 5 phút để lắng tế bào xuống và loại bỏ dịch nổi, thêm vào 5 ml môi trường nuôi cấy tế bào T đã được làm ấm trước để tạo dịch huyền phù.

- Cho môi trường nuôi cấy tế bào tương ứng với từng kích thước đĩa nuôi cấy và mật độ là  $10^6$  tế bào/ml. Duy trì trong tủ nuôi  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , độ ẩm > 90%. Môi trường nuôi cấy được thay 2 ngày/ lần nhằm duy trì mật độ tế bào ở  $10^6/\text{mL}$ . IL-2 (100U/mL) được bổ sung hai ngày một lần. Sau tăng sinh, tế bào PBMC và CAR-T được bảo quản ở nitơ lỏng  $-196^{\circ}\text{C}$  trong dung dịch FBS + 10% DMSO đến khi sử dụng (mật độ  $2 \times 10^6/\text{mL}$ ).

##### *b. Kỹ thuật nuôi cấy các dòng tế bào ung thư*

Tế bào Daudi, Raji và K562 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI bổ sung thêm 10% huyết thanh bê FBS và 1% kháng sinh. Tế bào được nuôi cấy trên đĩa hoặc chai nuôi cấy tế bào.

- Quy trình nuôi cấy tế bào:

+ Lấy tube tế bào đã được bảo quản trong nitơ lỏng  $-196^{\circ}\text{C}$ . Chuyển tế bào vào bể ổn nhiệt  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 phút để rã đông.



+ Cho môi trường nuôi cấy tế bào tương ứng với từng kích thước đĩa hoặc chai nuôi cấy.

+ Dùng pipet trộn đều sau đó hút dịch tế bào ở tube lưu tế bào cho vào đĩa môi trường nuôi cấy.

Kiểm tra tế bào trên kính hiển vi soi ngược để đánh giá đặc điểm hình thái tế bào và mật độ tế bào.

+ Cho đĩa nuôi vào tủ nuôi cấy tế bào có 5% CO<sub>2</sub>, nhiệt độ 37°C.

+ Kiểm tra tế bào tăng sinh sau 48 giờ nuôi cấy trên kính hiển vi soi ngược, đánh giá mật độ tế bào, tỷ lệ sống chết.

+ Kiểm tra và thay môi trường 2 - 3 lần/tuần.

- Quá trình tăng sinh tế bào: khi tế bào phát triển đạt mật độ cao thì tiến hành tách tế bào để cấy chuyển sang đĩa nuôi mới với quy trình sau:

+ Hút toàn bộ môi trường trong đĩa nuôi cấy vào ống falcon. Ly tâm loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ.

+ Sau khi ly tâm xong loại bỏ toàn bộ môi trường nuôi cấy cũ bằng pipet. Cho dung dịch PBS 1X vào ly tâm và rửa tế bào 1-2 lần.

+ Cho tế bào đã rửa vào đĩa môi trường nuôi cấy mới.

+ Kiểm tra đĩa nuôi dưới kính hiển vi, xem các mật độ tế bào và sự phân bố tế bào đã đều trên đĩa chưa.

- Thu hoạch và bảo quản tế bào: sau 2 tuần nuôi cấy lượng tế bào tăng sinh đủ lớn có thể tiến hành thu hoạch và cất giữ tế bào. Tiến hành thu tế bào (các bước tiến hành như quá trình tăng sinh tế bào). Mật độ tế bào trong môi trường được xác định bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học hoặc máy đếm tế bào sống chết. Chuẩn nồng độ tế bào về 10<sup>7</sup> tế bào/ml dung dịch bảo quản tế bào (FBS + 10% DMSO).

### **2.3.3.2. Đánh giá chất lượng khối tế bào CAR-T**

#### **a. Kỹ thuật cấy khuẩn**

Tính vô trùng của các khối tế bào PBMC, CAR-T, CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 và môi trường có cho kháng thể kháng PD-1 được kiểm tra

bằng phương pháp cấy khuẩn. Tiêu chuẩn chấp nhận là không có sự phát triển của vi khuẩn.

\* Các bước tiến hành cấy khuẩn trên hệ thống máy cấy máu tự động:

- 10ml dịch nuôi cấy tế bào PBMC, CAR-T, CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 và môi trường có cho kháng thể kháng PD-1 bơm vào 02 chai cấy máu (1 chai hiếu khí và 1 chai kỵ khí) và nuôi cấy, phân lập và định danh các vi khuẩn gây bệnh thường gặp trong bệnh phẩm máu bằng máy cấy máu tự động FX TOP - STACK.

- Chai cấy máu được theo dõi hàng ngày nhờ hệ thống máy cấy máu tự động ủ và lắc liên tục. Máy cấy máu sử dụng đèn huỳnh quang trong máy quét 10 phút/lần vào lớp màng ở đáy chai để phát hiện nồng độ CO<sub>2</sub> hoặc sử dụng bộ phận cảm ứng đo màu và ánh sáng phản chiếu để phát hiện nồng độ CO<sub>2</sub> hòa tan trong môi trường nuôi cấy. Khi vi sinh vật phát triển trong chai cấy máu, CO<sub>2</sub> sẽ được sản sinh. Bộ phận cảm nhận ở đáy chai cấy máu có khả năng hấp thụ khí CO<sub>2</sub>, sẽ chuyển từ màu xanh sẫm sang màu vàng. Máy cấy máu sẽ cảm nhận được thay đổi của phản chiếu qua sự đổi màu từ sẫm sang nhạt. Máy cấy máu sẽ quét và ghi lại sự thay đổi này 10 phút/lần.

- Chai cấy máu dương tính được cấy trên các môi trường thạch đĩa giàu chất dinh dưỡng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn gây bệnh. Các vi khuẩn và nấm được định danh dựa trên hệ thống định danh bằng khối phổ Vitek MS.

#### *b. Kiểm tra nội độc tố bằng chế phẩm LAL*

Kiểm tra sản phẩm mẫu dịch tế bào có đạt tiêu chuẩn về giới hạn nội độc tố (endotoxin) dưới giới hạn cho phép. Nội độc tố được phát hiện bằng cách đặt mẫu phản ứng với chất thử LAL, thông qua phản ứng để tìm ra mẫu dương tính với nội độc tố. Lấy 25µl mẫu môi trường nuôi cấy tế bào hoặc các mẫu cần đánh giá cho vào thẻ PTS (Charles River, Mỹ) và đọc kết quả kiểm tra nội độc tố mẫu bằng máy Endosafe® nexgen-PTS™ instrument (Charles River, Mỹ).

*c. Đánh giá tỷ lệ biểu hiện CAR bằng kỹ thuật Flow cytometry*

-  $10^6$  tế bào CAR-T sau khi nuôi cấy được thụ và nhuộm với CD19 tái tổ hợp có gắn FITC (rCD19-FITC, abcam, mã ab246020).

- Sau khi nhuộm, tế bào được rửa bằng PBS 1X và hòa tan trong PBS 1X bổ sung 1% FBS trước khi phân tích với hệ thống máy Flow cytometry BD FACSLyric để đánh giá tỷ lệ biểu hiện CAR là tỷ lệ dương tính FITC.

*d. Đánh giá biểu hiện của tế bào CAR-T bằng kỹ thuật Realtime PCR*

Kỹ thuật realtime PCR là kỹ thuật mà kết quả khuếch đại ADN đích được hiển thị sau mỗi chu trình nhiệt của phản ứng PCR. Kết quả khuếch đại được quan sát thông qua các tín hiệu huỳnh quang được giải phóng trong quá trình phản ứng PCR xảy ra. Các tín hiệu này được phát hiện và ghi lại dưới dạng biểu đồ, từ đó có thể đưa ra đánh giá về số lượng sản phẩm khuếch đại ADN đích có mặt ở mỗi chu kỳ.

Kỹ thuật Realtime PCR được tiến hành với cả 4 cặp mồi (34, 39, 42 và GAPDH) cho 3 mẫu CAR-T, PBMC, nước.

\* Quy trình tách chiết RNA từ tế bào PBMC, CAR-T theo hướng dẫn của kit GeneJET RNA Purification Kit của hãng Thermo Scientific, Hoa Kỳ

- Chuẩn bị dung dịch  $\beta$ -mercaptoethanol or DTT bằng cách cho 20  $\mu$ L của 14.3 M  $\beta$ -mercaptoethanol or 2 M DTT vào mỗi 1 mL dung dịch Lysis Buffer đã có trong bộ kit.

*Bước 1: Chuẩn bị tế bào*

+ Thu tế bào và chuẩn nồng độ tế bào về  $10^7$  tế bào/mL  
 + Tạo khối tế bào bằng cách ly tâm ống nghiệm chứa tế bào trong 5 phút ở tốc độ 250 RCF/phút. Loại bỏ tất cả dịch nổi bằng pipet, rửa lại 1 lần với PBS 1X để loại bỏ hết dung dịch môi trường nuôi cấy.

*Bước 2: Phá vỡ tế bào bằng cách cho 600  $\mu$ L dung dịch Lysis Buffer có  $\beta$ -mercaptoethanol or DTT đã được chuẩn bị ở trên, dùng pipet trộn đều nhẹ nhàng trong 10 giây.*

*Bước 3:* Thêm 360  $\mu$ l cồn 96 - 100% vào dịch ly giải, trộn đều bằng pipet.

*Bước 4:* Chuyển 700  $\mu$ l dịch ly giải bao gồm cả những chất kết tủa ở đáy vào cột GeneJET RNA Purification để trong ống nghiệm 2 ml. Đậy nắp nhẹ nhàng, ly tâm 1 phút ở tốc độ  $\geq 12000$  vòng/phút. Loại bỏ dịch bên dưới ở ống nghiệm 2 ml. Lặp lại cho đến khi hết dịch ly giải tế bào ở bước số 3. Kết thúc chuyển cột GeneJET RNA Purification vào ống nghiệm 2 ml mới.

*Bước 5:* Thêm 700  $\mu$ l Wash Buffer 1 vào cột GeneJET RNA Purification. Đậy nắp, ly tâm tốc độ  $\geq 12000$  vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch bên dưới ở ống nghiệm 2 ml.

*Bước 6:* Thêm 600  $\mu$ l Wash Buffer 2 vào cột GeneJET RNA Purification. Đậy nắp, ly tâm tốc độ  $\geq 12000$  vòng/phút trong 1 phút. Loại bỏ dịch bên dưới ở ống nghiệm 2 ml.

*Bước 7:* Thêm 250  $\mu$ l Wash Buffer 2 vào cột GeneJET RNA Purification. Đậy nắp, ly tâm tốc độ  $\geq 12000$  vòng/phút trong 2 phút. Loại bỏ dịch bên dưới ở ống nghiệm 2 ml. Để cột GeneJET RNA Purification vào một ống nghiệm 1,5 ml mới.

*Bước 8:* Thêm 100  $\mu$ l nước RNase-free trực tiếp vào màng cột spin. Đóng nắp nhẹ nhàng và ly tâm tốc độ  $\geq 12000$  vòng/phút trong 1 phút. Bỏ cột GeneJET RNA Purification đi, thu được RNA, bảo quản ở nhiệt độ -20 đến -70°C cho tới khi sử dụng.

\* Quy trình tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của kit của hãng Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ)

- *Bước 1. Tổng hợp chuỗi cDNA thứ nhất*

Rã đông, trộn đều và ly tâm nhanh hỗn hợp kit để ở đá lạnh.

Thêm các hóa chất vào ống nghiệm vô trùng không có nuclease tự do theo chỉ dẫn dưới đây:

| Thành phần    | Nội dung                       | Thể tích |
|---------------|--------------------------------|----------|
| Mẫu RNA       | RNA toàn bộ hay poly           | 10 µl    |
| primer        | Olig (dt) <sub>18</sub> primer | 1 µl     |
|               | Random Hexamer primer          | 1 µl     |
| Tổng thể tích |                                | 12 µl    |

- Bước 2. Ly tâm nhanh và ủ ấm ở 65°C trong 5 phút.

- Bước 3. Thêm hỗn hợp dưới đây theo hướng dẫn

|                                       |       |
|---------------------------------------|-------|
| + 5X reaction Buffer                  | 4 µl  |
| + Ribo lock Nnease Inhibiter (20u/µl) | 1 µl  |
| + 10mM dNTP Mix                       | 2 µl  |
| + Revert Aid M-Mul VRT (200 u/µl)     | 1 µl  |
| + Sản phẩm của bước 1                 | 12 µl |
| + Tổng                                | 20 µl |

- Bước 4. Trộn nhẹ nhàng và ly tâm nhanh

- Bước 5. Ủ trong 5 phút ở 25°C sau đó là ở 42°C trong 60 phút.

- Bước 6. Hoàn thành phản ứng này ở nhiệt độ 70°C trong 5 phút. Sản phẩm phản ứng phiên mã ngược có thể được sử dụng trực tiếp trong các phản ứng PCR hoặc bảo quản ở -70°C.

Biểu hiện mRNA của tế bào CAR-T được phân tích bằng cách sử dụng Realtime PCR với các primer được thiết kế trên NCBI Primer-Blast và nhập từ Công ty Phù Sa:

| STT | Tên mỗi | Trình tự (5' - 3')     | Chiều dài |
|-----|---------|------------------------|-----------|
| 1   | 34 - F  | TAGCGCCACGAACCTTCTCTCT | 185 bp    |
|     | 34 - R  | GCTTGCCGTAGGTGGCAT     |           |
| 2   | 39 - F  | CACCTACGACGCCCTTCACA   | 179 bp    |
|     | 39 - R  | TGTGGCCGTTTACGTCGC     |           |
| 3   | 42 - F  | TGCAGAAAGATAAGATGGCGGA | 179 bp    |
|     | 42 - R  | TAACAGAGAGAAGTTCGTGGC  |           |

Hỗn hợp phản ứng Realtime PCR chứa 10 µl Master Mix có Syber Green 2X (Hãng Invitrogen, Thermo Fisher, Hoa Kỳ); 3,0 µl mẫu cDNA; 1,0 µl primer forward; 1,0 µl primer reverse và 7,0 µl H<sub>2</sub>O, cho thể tích cuối cùng là 20 µL.

Chu trình nhiệt gồm: hoạt hóa ở 95°C trong 2 phút, 45 vòng gồm 95°C trong 15 giây (biến tính), 60°C trong 20 giây (gắn mồi), 72°C trong 30 giây (kéo dài). Kết thúc phản ứng ở 72°C trong 2 phút.

Mẫu chứng âm và chứng dương lên đúng một sản phẩm theo dự kiến là một đường cong nóng chảy. Mẫu không có tín hiệu ở cả 3 cặp mồi thì không có biểu hiện gen CAR và mẫu có tín hiệu là có biểu hiện gen CAR.

#### ***2.3.3.3. Đánh giá tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1***

Chuột nhắt trắng, số lượng 60 con được chia làm 4 nhóm, mỗi nhóm 15 con (8 chuột cái và 7 chuột đực). Mỗi nhóm được nuôi vào 2 lồng chuột cái và chuột đực riêng biệt:

- Nhóm 1 (chứng): Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường phúc mạc + Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

- Nhóm 2 (CAR-T): Tiêm 10<sup>6</sup> tế bào CAR-T/0,1ml/chuột đường phúc mạc + Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

- Nhóm 3 (PD-1 Ab): Tiêm 0,1 ml PBS/chuột đường phúc mạc + Tiêm kháng thể kháng PD-1 (250µg)/0,1ml/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

- Nhóm 4 (CAR-T + PD-1 Ab): Tiêm 10<sup>6</sup> tế bào CAR-T/0,1ml/chuột đường phúc mạc + Tiêm kháng thể kháng PD-1 (250µg)/0,1ml/chuột đường tĩnh mạch đuôi.

\*Các chỉ tiêu theo dõi trước và trong quá trình nghiên cứu:

Tình trạng chung được theo dõi hàng ngày, thể trọng của chuột được theo dõi hàng tuần trong quá trình nghiên cứu. Kết thúc thí nghiệm sau bốn tuần theo dõi, tiến hành lấy máu chuột, quan sát hình ảnh đại thể các cơ quan của

chuột, lấy mẫu mô gan và thận của 100% số chuột thí nghiệm ở 4 nhóm để tiến hành làm các xét nghiệm và phân tích kết quả:

*a. Đánh giá ảnh hưởng đến chức năng tạo máu*

Thông qua số lượng hồng cầu (HC), nồng độ huyết sắc tố, số lượng bạch cầu (BC), công thức bạch cầu, số lượng tiểu cầu (TC) ở xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu thực hiện trên máy XN1000 (Sysmex - Nhật Bản).

Nguyên lý máy xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu:

- Xét nghiệm đếm số lượng bạch cầu sử dụng phương pháp đếm tế bào dòng chảy sử dụng Laser bán dẫn và phân loại tế bào bằng cách chiếu chùm Laser có bước sóng 633nm và phân tích cường độ ánh sáng tán xạ thẳng (FSC), ánh sáng tán xạ bên (SSC), và ánh sáng huỳnh quang bên (SFL). Cường độ của hai loại ánh sáng tán xạ (FSC và SSC) phản ánh được cấu trúc bề mặt của tế bào, hình dạng hạt, cấu trúc nhân tế bào, chỉ số khúc xạ, và độ phản xạ của tế bào. Nhìn chung, tín hiệu FSC sẽ mạnh hơn với các tế bào có kích thước lớn, và tín hiệu SSC trở nên mạnh hơn với tế bào có cấu trúc nhân bên trong phức tạp hơn. Cường độ ánh sáng huỳnh quang chủ yếu phản ánh loại và số lượng axit nucleic và các bào quan của tế bào; ba loại tín hiệu này được dùng để đếm và phân loại các tế bào bạch cầu, hồng cầu có nhân, hồng cầu lưới và tiểu cầu.

- Kênh đo RBC/PLT đếm các tế bào hồng cầu và tiểu cầu bằng phương pháp trở kháng sử dụng dòng chảy động học. Mẫu pha loãng được đưa qua khe đếm và các tế bào máu sẽ được tạo áp lực đi vào khe đếm nhờ dòng chảy tập trung. Khi tế bào đi qua chính giữa khe đếm, các thông tin thể tích của tế bào phản ánh qua xung điện sẽ được ghi nhận chính xác.

- Xét nghiệm định lượng Hemoglobin dựa trên nguyên lý tế bào hồng cầu bị phá vỡ bởi hóa chất ly giải, giải phóng ra Hemoglobin tự do, kết hợp với thuốc thử thích hợp tạo thành phức hợp ổn định. Máy phân tích sẽ chiếu ánh sáng Laser qua dung dịch chứa phức hợp này và đo độ hấp thụ ánh sáng để tính toán ra nồng độ Hemoglobin trong máu ngoại vi.

*b. Đánh giá ảnh hưởng đến chức năng gan, thận*

- Mức độ hủy hoại tế bào gan thông qua định lượng hoạt độ enzym trong máu: AST (Aspartate transaminase), ALT (Alanine transaminase).

- Đánh giá chức năng thận thông qua định lượng nồng độ Urê, Creatinin huyết tương.

Máu tĩnh mạch ngoại vi của chuột được được ly tâm 5 phút, tốc độ 5000 vòng/phút, sau đó tách huyết tương và thực hiện các xét nghiệm Urê, Creatinin, GOT/AST và GPT/ALT. Các xét nghiệm được thực hiện trên hệ thống xét nghiệm sinh hóa AU580 (Beckman Coulter - Hoa Kỳ). Xét nghiệm đạt tiêu chuẩn ISO 15189-2012, nội kiểm xét nghiệm tối thiểu 2 lần/1 ngày.

*c. Mô bệnh học*

Kết thúc thí nghiệm tiến hành mổ và quan sát đại thể toàn bộ các cơ quan của chuột bằng kỹ thuật nhuộm tiêu bản HE và soi trên kính hiển vi quang học để đánh giá cấu trúc vi thể gan, thận của 100% số chuột ở mỗi lô. Các mẫu bệnh phẩm gan, thận sau khi lấy ra khỏi cơ thể chuột được cố định ngay trong formol trung tính 10% với thể tích dung dịch cố định gấp 20 - 30 lần thể tích bệnh phẩm. Sau đó bệnh phẩm được gửi ngay tới khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quân y 103.

- Nguyên lý cắt nhuộm Hematoxylin - Eosin:

Bệnh phẩm sau khi chuyển đúc xong được cắt mỏng thành lát (có độ dày từ 1µm đến vài chục µm) bằng những máy cắt mỏng (microtome) khác nhau để ánh sáng có thể đi qua được, kết hợp nhuộm màu nên quan sát được hình dạng cấu trúc của tế bào hoặc mô dưới kính hiển vi.

- Tiến hành kỹ thuật:

+ Bệnh phẩm đúc trong khối paraffin được cắt thành các lát mỏng từ 3-5µm, sau đó được cố định trên lam kính.

+ Lam kính được đưa qua các bể nhuộm chứa các hóa chất khác nhau để nhuộm màu nhân và bào tương của tế bào cùng các thành phần khác ngoài tế bào.



- + Nhuộm nhân với Hematoxylin và nhuộm bào tương với Eosin.
- + Sau khi nhuộm xong soi trên kính hiển vi quang học nhân tế bào bắt màu xanh, bào tương bắt màu hồng đỏ là đạt yêu cầu.
- Đọc kết quả trên kính hiển vi quang học.

*d. Đánh giá khả năng bài tiết cytokin bằng xét nghiệm ELISA định lượng nồng độ IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$*

- Kít IL - 2 (Mybiosource) : Để bộ kit và mẫu ở nhiệt độ phòng (18-25 độ) trước khi sử dụng.

Quy trình thực hiện:

*Bước 1: Chuẩn bị hóa chất*

+ Đối với mẫu tiêu chuẩn: Thêm 1ml Standard diluent vào Standard tube, giữ 10 phút ở nhiệt độ phòng, lắc đều cho dung dịch tan hoàn toàn (không tạo bọt). Nồng độ ống vừa pha là 8000pg/ml. Chuẩn bị 7 ống, mỗi ống chứa 0,5ml dung dịch Standard diluent rồi tiến hành pha loãng các ống với nồng độ tương ứng 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml. Chuẩn bị 1 ống cuối cùng chỉ chứa dung dịch Standard diluent (ống blank với nồng độ 0pg/ml).

+ Đối với mẫu thử: Cần pha loãng mẫu nếu nồng độ mẫu vượt quá đường chuẩn. Sử dụng PBS để pha loãng mẫu.

+ Dung dịch rửa: Pha 20ml dung dịch rửa gốc 30X vào 580 ml nước cất được 600ml dung dịch rửa tiêu chuẩn nồng độ 1X.

+ Chuẩn bị dung dịch Detection reagent A và Detection reagent B: Pha loãng 100 lần bằng cách cho 120 $\mu$ l dung dịch Detection reagent A và Detection reagent B với 12ml dung dịch Assay diluent A và Assay diluent B tương ứng.

*Bước 2: Đánh dấu các giếng với tên tương ứng: 7 giếng cho mẫu tiêu chuẩn (standard), 1 giếng trắng (blank) và mẫu thử vào giếng. Dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở 37°C trong 1 giờ (100 $\mu$ l/giếng).*

*Bước 3:* Bóc tấm màng che khay đĩa, loại bỏ dung dịch trong đĩa. Thêm 100µl dung dịch Detection reagent A vào các giếng, dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

*Bước 4:* Loại bỏ dung dịch, rửa các giếng 3 lần với dung dịch rửa 1X trong 1-2 phút/lần (350µl/giếng).

*Bước 5:* Thêm 100µl dung dịch Detection reagent B vào các giếng, dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

*Bước 6:* Loại bỏ dung dịch, rửa các giếng 5 lần với dung dịch rửa 1X trong 1-2 phút/lần (350µl/giếng).

*Bước 7:* Thêm 90µl dung dịch Substrate solution vào các giếng. Ủ tối 37°C trong 10-20 phút (không quá 30p, các giếng chuyển sang màu xanh).

*Bước 8:* Thêm 50µl dung dịch dừng phản ứng vào các giếng, dung dịch chuyển sang màu vàng.

*Bước 9:* Đọc kết quả ngay ở bước sóng 450nm.

- Kít TNF- $\alpha$  và IL-6 (Mybiosource): Để bộ kit và mẫu ở nhiệt độ phòng (18-25 độ) trước khi sử dụng.

Quy trình thực hiện:

*Bước 1:* Chuẩn bị hoá chất

+ Đối với mẫu tiêu chuẩn và mẫu thử: chuẩn bị tương tự quy trình IL-2.

+ Dung dịch rửa: Pha 30ml dung dịch rửa gốc vào 720 ml nước cất được 750ml dung dịch rửa tiêu chuẩn (Làm ấm dung dịch rửa gốc ở 40°C và lắc đều đến khi dung dịch tan hoàn toàn)

+ Chuẩn bị dung dịch kháng thể kháng biotyl - Biotinylated detection Ab working solution: Pha loãng bằng cách cho 120µl dung dịch Concentrated biotinylated detection Ab với 14ml dung dịch Biotinylated detection Ab diluent.

+ Chuẩn bị dung dịch HRP Conjugate working solution: Pha loãng bằng cách cho 120µl concentrated HRP conjugate với 14ml dung dịch HRP conjugate diluent.

*Bước 2:* Đánh dấu các giếng với tên tương ứng: 7 giếng cho mẫu tiêu chuẩn (standard tương ứng nồng độ: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25), 1 giếng trắng (blank) và mẫu thử vào giếng. Dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở 37°C trong 1,5 giờ (100µl/giếng).

*Bước 3:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa, thêm 100µl Biotinylated detection Ab working solution, dán tấm màng che khay đĩa ủ 37°C trong 1 giờ.

*Bước 4:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa, thêm 350µl Wash buffer/giếng, giữ 1-2 phút, rửa 3 lần.

*Bước 5:* Thêm 100µl HRP Conjugate working solution vào các giếng. Dán đĩa và ủ ở 37°C trong 30 phút.

*Bước 6:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa, thêm 350µl Wash buffer/giếng, giữ 1-2 phút, rửa 5 lần.

*Bước 7:* Thêm 90µl Substrate reagent vào các giếng. Dán tấm màng che khay đĩa và ủ tối ở 37°C trong 15 phút.

*Bước 8:* Thêm 50µl Stop solution vào các giếng.

*Bước 9:* Đọc đĩa ở bước sóng 450nm.

#### ***2.3.3.4. Đánh giá khả năng ly giải tế bào CD19+ của CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 in vitro bằng kỹ thuật Flow Cytometry***

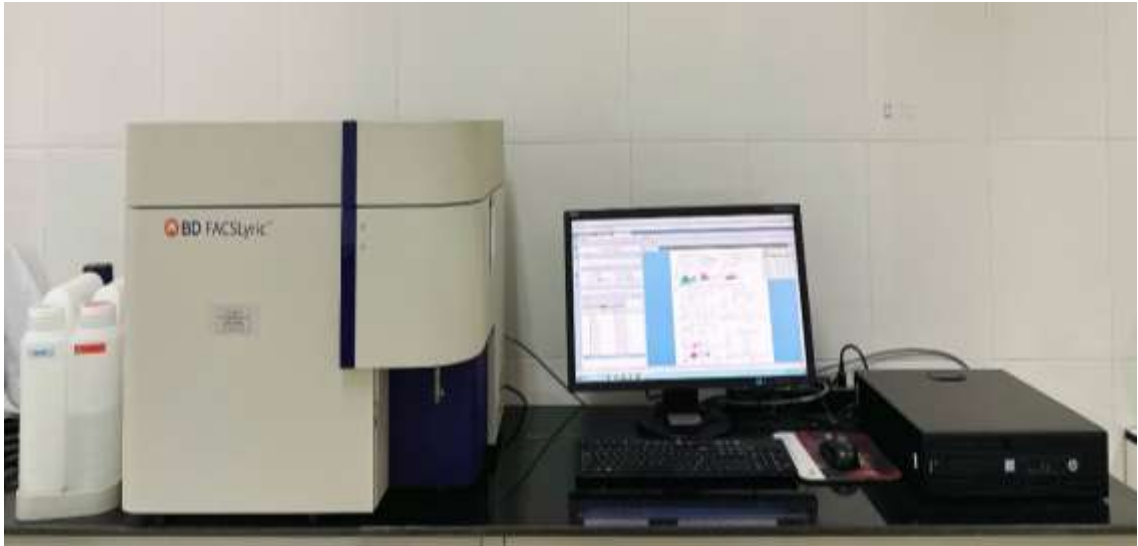
##### **\* Nguyên lý:**

Sử dụng chất nhuộm tế bào huỳnh quang Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) để đánh dấu tế bào ung thư bạch cầu. Đây là một chất nhuộm có liên kết ổn định khi tích hợp vào trong tế bào và giữ lại ở tế bào trong thời gian dài, thuốc nhuộm sẽ không được chuyển sang các tế bào lân cận.

Sử dụng chất nhuộm nhân tế bào phát huỳnh quang là 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) để kiểm tra tỷ lệ tế bào ung thư bị ly giải trên quần thể tế bào ung thư bạch cầu dương tính với CFSE.

7-AAD là loại thuốc nhuộm nhân phát huỳnh quang, chúng có khả năng liên kết rất mạnh với ADN của nhân tế bào. Khi tế bào ở trạng thái bình thường,

chất này không thể xâm nhập vào bên trong để gắn với ADN của nhân tế bào sống. Chỉ khi màng tế bào bị tổn thương 7-AAD mới có thể đi vào trong tế bào và liên kết với ADN nhân tế bào. Do đó, sử dụng chất nhuộm nhân 7-AAD để dàng phát hiện màng tế bào bị tổn thương, tế bào chết.



Hình 2. 1. Máy đếm tế bào dòng chảy BD FACSLyric

*\* Nguồn: Chụp tại Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y*

**\* Quy trình thực hiện:**

- Bước 1: chuẩn bị tế bào

+ Các dòng tế bào ung thư được rửa hai lần với PBS 1X (ly tâm 300g, 10 phút).

+ Nhuộm CFSE đánh dấu các dòng tế bào ung thư: cho dung dịch nhuộm CFSE vào hòa tan tế bào đã chuẩn bị ở mật độ  $10^7$  tế bào/ mL. Ủ 15 phút trong tối ở  $37^{\circ}\text{C}$ .

+ Rửa tế bào với 10mL RPMI + 1%FBS (ly tâm 400g, 5 phút).

+ Tế bào sau đó được hòa tan bằng RPMI, 10% FBS về mật độ  $10^5/\text{mL}$ , đếm tế bào và chuyển  $10^5$  tế bào/ giếng vào các đĩa nuôi cấy 24-giếng và được nuôi ít nhất 30 phút trước khi bổ sung tế bào PBMC, tế bào CAR-T và PD-1 Ab.

+ Tế bào PBMC, CAR-T được rửa hai lần với PBS 1X (ly tâm 400g, 5 phút) sau đó hòa tan vào môi trường nuôi cấy TB mới và đếm số lượng tế bào.

- Bước 2: đồng nuôi cấy tế bào

+ Giếng có các tế bào ung thư Daudi/ Raji/ K562 (Target) được bổ sung các tế bào PBMC, CAR-T (Effector) theo tỷ lệ target:effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10. Kháng thể kháng PD-1 bổ sung vào giếng với nồng độ 20µg/mL và giếng điều trị kết với CAR-T theo các tỷ lệ target:effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10. Với cỡ mẫu mỗi tỷ lệ n=3, lặp lại ở 3 giếng độc lập. Hỗn hợp tế bào được nuôi 6 giờ trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm >90% trước khi được phân tích bằng flow cytometry.

- Bước 3: chuẩn bị mẫu tế bào và chạy flow cytometry

+ Sau 6 giờ đồng nuôi cấy, toàn bộ tế bào được thu và rửa 2 lần bằng PBS 1X.

+ Nhuộm với 1µL 7-AAD 1X trong 500 µL PBS 1X ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng trong buồng tối.

+ Sau đó ly tâm ở 300 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ phần dịch nổi phía trên. Hòa tan lại với 500 µL PBS có bổ sung 0,1% BSA.

+ Chạy flow cytometry trong 1 giờ đánh giá tỷ lệ tế bào bắt màu CFSE chết.

+ Bước 4: đọc kết quả

Đánh giá tỷ lệ tế bào chết trên hệ thống FACSllyric (BD) gồm: xác định quần thể tế bào cần đánh giá là quần thể tế bào ung thư dương tính với CFSE. Quần thể 7-AAD dương tính trong quần thể dương tính với CFSE được chọn cho đếm tỷ lệ tế bào sống chết.

**2.3.3.5. Đánh giá khả năng bài tiết cytokin của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên in vitro**

Khả năng bài tiết cytokin của các tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19+ sẽ được tiến hành trên hai dòng tế bào ung thư CD19+ là Daudi và Raji tại 2 thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Tế bào CD19- được sử dụng đối chứng là K562 và nhóm chứng sử dụng tế bào PBMC.

- Nghiên cứu được thiết kế trên 4 nhóm:

+ Nhóm PBMC (chứng) (n = 3):  $10^6$ /mL tế bào PBMC được nuôi đồng thời cùng  $10^6$ /mL tế bào ung thư (Daudi/Raji/K562).

+ Nhóm PD-1 Ab (n = 3):  $10^6$ /mL tế bào ung thư (Daudi/Raji/K562) được bổ sung 20 $\mu$ g/mL PD-1 Ab.

+ Nhóm CAR-T (n = 3):  $10^6$ /mL tế bào CAR-T được nuôi đồng thời cùng  $10^6$ /mL tế bào ung thư (Daudi/Raji/K562).

+ Nhóm CAR-T+PD-1 Ab (n = 3):  $10^6$ /mL tế bào CAR-T + 20 $\mu$ g/mL PD-1 Ab được nuôi đồng thời cùng  $10^6$ /mL tế bào ung thư (Daudi/Raji/K562).

- Sau 24 giờ và 48 giờ hỗn hợp tế bào được thu và tách dịch nuôi cấy tế bào để định lượng nồng độ IL-2, IL-6 và TNF- $\alpha$  bằng các bộ sinh phẩm IL-2 Human ELISA Kit, TNF- $\alpha$  Human ELISA Kit, IL-6 Human ELISA Kit của hãng Thermo Fisher Scientific.

\* Quy trình thực hiện:

*Bước 1:* Chuẩn bị hoá chất

- Dung dịch gắn Coating buffer (1X): Pha loãng 10 lần bằng cách cho 2,5ml dung dịch gốc (coating buffer 10X) với 25ml nước khử ion.

- Kháng thể gắn Capture antibody: Pha loãng 250 lần bằng cách cho 100 $\mu$ l capture antibody với 25ml coating buffer 1X.

- 5X ELISA/ELISPOT diluent: Pha loãng 5 lần bằng cách cho 30ml dung dịch gốc với 150ml nước khử ion.

- Chuẩn bị các nồng độ standard.

- Kháng thể phát hiện Detection antibody: Pha loãng 250 lần bằng cách cho 100 $\mu$ l Detection antibody với 25ml dung dịch 1X ELISA/ELISPOT diluent

- Enzym: Pha loãng 100 lần bằng cách cho 250 $\mu$ l pre-titrated Streptavidin-HRP concentrate (Kít IL-2 sử dụng Avidin-HRP) concentrate với 25ml dung dịch 1X ELISA/ELISPOT diluent.

*Bước 2:* Tra 100 $\mu$ l Coating buffer đã pha loãng vào các giếng. Dán tấm màng che và ủ qua đêm ở 4°C.

*Bước 3:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa và rửa 3 lần với Wash buffer.

*Bước 4:* Cố định các giếng với 200 $\mu$ l dung dịch ELISA/ELISPOT Diluent 1X. Để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

*Bước 5:* Chuẩn bị mẫu tiêu chuẩn

- Loại bỏ dung dịch và rửa tối thiểu 1 lần với Wash buffer.
- Tra mẫu tiêu chuẩn, mẫu trắng (blank) và mẫu thử vào giếng (100 $\mu$ l/giếng, mẫu tiêu chuẩn lặp lại 2 lần ở 8 nồng độ khác nhau).
- Dán tấm màng che khay đĩa, ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ.

*Bước 6:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa và rửa 3 lần với Wash buffer.

*Bước 7:* Thêm 100 $\mu$ l dung dịch Detection antibody đã pha loãng vào các giếng. Dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ.

*Bước 8:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa và rửa 5 lần với Wash buffer.

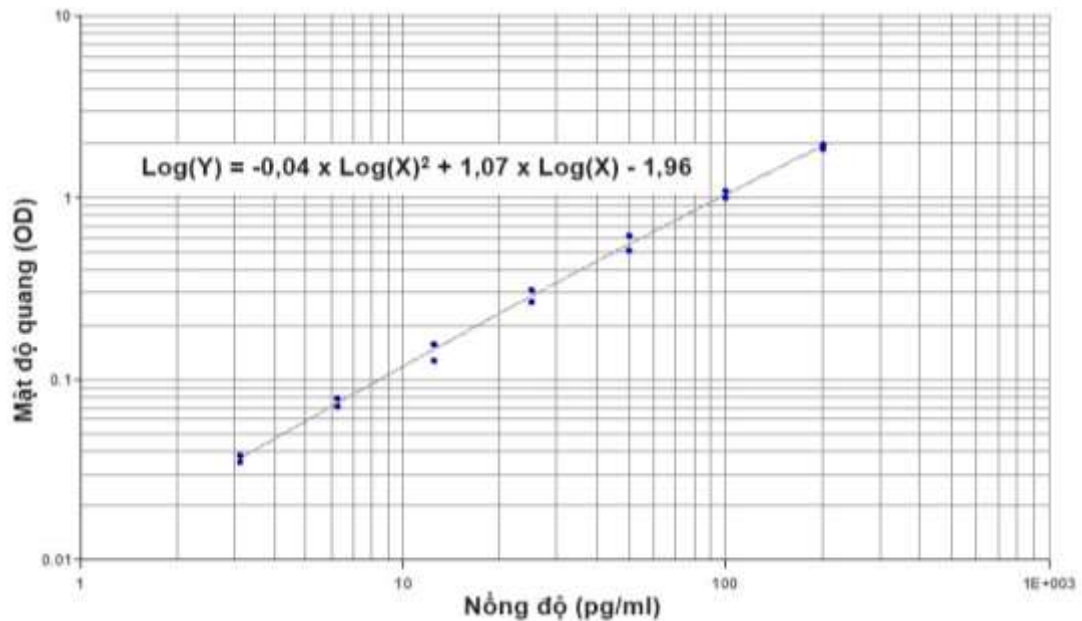
*Bước 9:* Thêm 100 $\mu$ l dung dịch Streptavidin-HRP đã pha vào các giếng. Dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

*Bước 10:* Loại bỏ dung dịch trong đĩa và rửa 7 lần với Wash buffer.

*Bước 11:* Thêm 100 $\mu$ l dung dịch 1X TMB Solution vào các giếng. Dán tấm màng che khay đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút.

*Bước 12:* Thêm 100 $\mu$ l dung dịch dừng phản ứng (Stop solution) vào mỗi giếng (Kít IL-2 thêm 50  $\mu$ l dung dịch Stop solution). Đo mật độ quang (OD) ngay ở bước sóng 450 nm bằng máy đọc ELISA DAR800 của hãng Diaglostic Automation, Inc (Mỹ).

Xây dựng đường chuẩn cho từng đĩa Elisa và tính toán nồng độ cho từng mẫu cần đo.



Hình 2.2. Hình ảnh đường chuẩn trong Kit ELISA IL-6

Quá trình thí nghiệm được tiến hành tại Labo Sinh học phân tử - Bộ môn Sinh lý bệnh - Học viện Quân y.

#### 2.4. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH KẾT QUẢ, XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các số liệu nghiên cứu được xử lý theo các thuật toán thống kê áp dụng trong y sinh học. Sử dụng phần mềm IBM SPSS 22.0 và GraphPad Prism 8.0.

- Phân tích số liệu:

- + So sánh tỷ lệ phần trăm bằng phép kiểm Chi square hoặc Fisher-Exact.
- + So sánh trung bình của 2 nhóm độc lập bằng phép kiểm student (t) đối với biến số tuân theo phân phối chuẩn hoặc phép kiểm Mann-Whitney U test đối với biến số không tuân theo phân phối chuẩn.
- + So sánh trung bình của nhiều hơn 2 nhóm độc lập bằng phép kiểm ANOVA một chiều đối với biến số tuân theo phân phối chuẩn hoặc phép kiểm Kruskal-Wallis test đối với biến số không tuân theo phân phối chuẩn. Phân tích poshoc của phép kiểm ANOVA bằng phép kiểm Turkey hoặc Games-Howell.
- + So sánh ghép cặp sử dụng paired-sample T test với biến số tuân theo phân phối chuẩn hoặc phép kiểm Wilcoxon đối với biến số không tuân theo phân phối chuẩn.



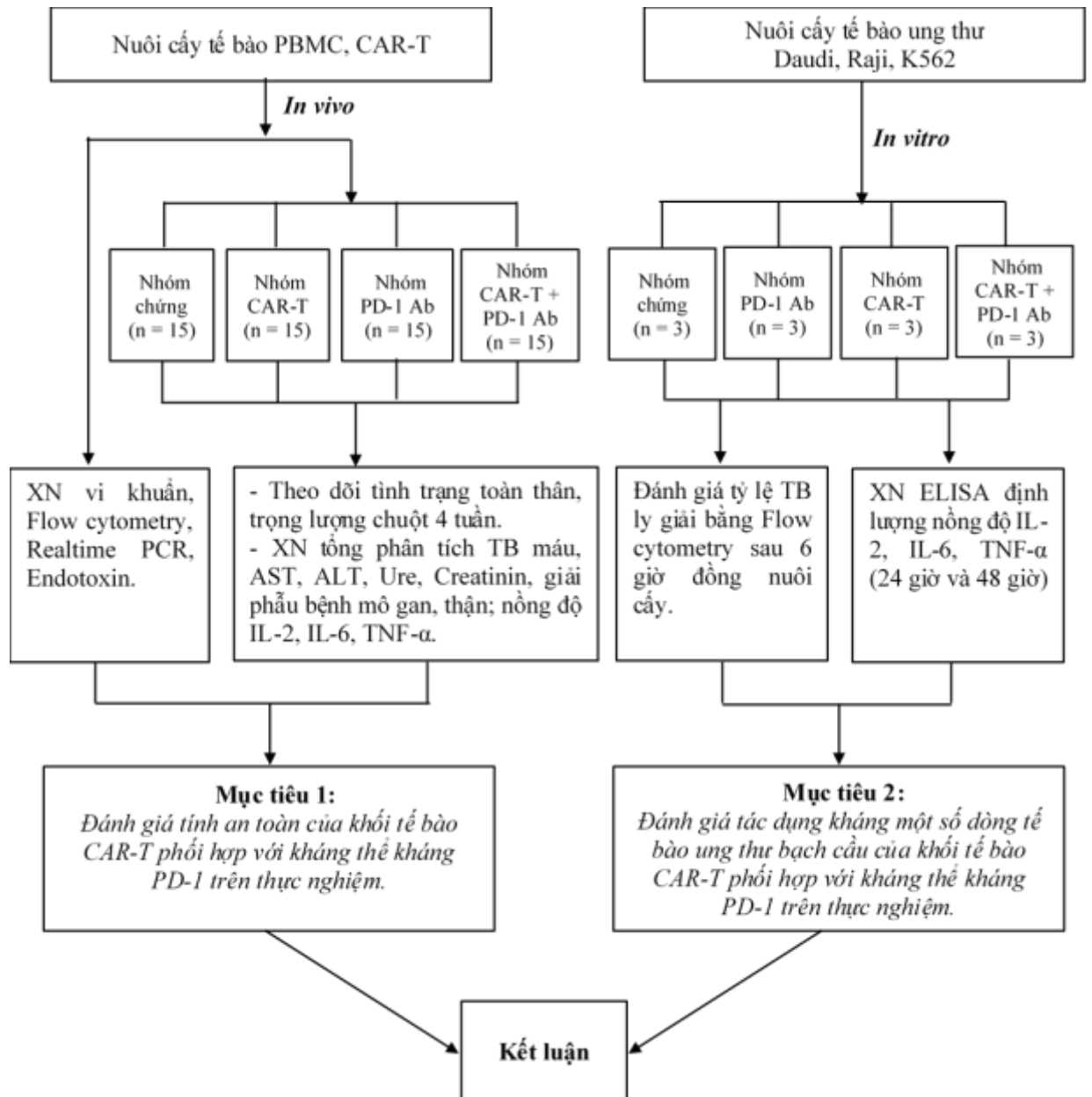
+ Hệ số tương quan Spearman được tính toán nếu ít nhất có một đại lượng là biến liên tục có phân bố không chuẩn. Tính chặt chẽ của quan hệ được xác định theo các giá trị:

- $|r| < 0,3$ : ít tương quan
  - $0,3 \leq |r| < 0,5$ : tương quan mức độ vừa
  - $0,5 \leq |r| < 0,7$ : tương quan khá chặt chẽ
  - $|r| \geq 0,7$ : tương quan rất chặt chẽ
  - $r(+)$ : tương quan thuận
  - $r(-)$ : tương quan nghịch
- Giá trị  $p < 0,05$  được xem là có ý nghĩa thống kê:
- \* :  $p < 0,05$
  - \*\* :  $p < 0,01$
  - \*\*\* :  $p < 0,001$
  - \*\*\*\* :  $p < 0,0001$

## 2.5. ĐẠO ĐỨC NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT

Động vật thí nghiệm được nuôi trong điều kiện thí nghiệm đảm bảo nhiệt độ, ánh sáng, thức ăn và nước uống đầy đủ. Các thao tác, quy trình thí nghiệm trên động vật được thực hiện theo đúng tiêu chuẩn, quy định của phòng thí nghiệm động vật tại Trung tâm nghiên cứu động vật thực nghiệm - Học viện Quân Y.

## 2.6. SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



### Chương 3

#### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO CAR-T VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1 TRÊN THỰC NGHIỆM

##### 3.1.1. Chất lượng của khối tế bào CAR-T

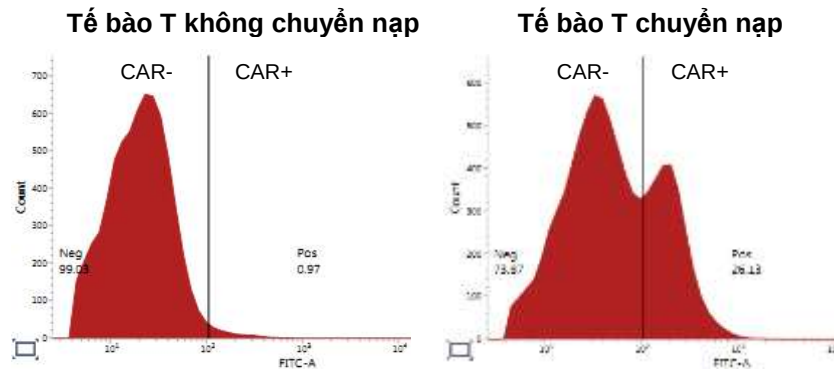
- Tính tiệt trùng:

**Bảng 3. 1.** Kết quả đánh giá tính tiệt trùng của khối tế bào CAR-T

| Mẫu             | Xét nghiệm        | Kết quả |
|-----------------|-------------------|---------|
| Chứng           | Vi khuẩn hiếu khí | Âm tính |
|                 | Vi khuẩn kỵ khí   | Âm tính |
| PBMC            | Vi khuẩn hiếu khí | Âm tính |
|                 | Vi khuẩn kỵ khí   | Âm tính |
| CAR-T           | Vi khuẩn hiếu khí | Âm tính |
|                 | Vi khuẩn kỵ khí   | Âm tính |
| PD-1 Ab         | Vi khuẩn hiếu khí | Âm tính |
|                 | Vi khuẩn kỵ khí   | Âm tính |
| CAR-T + PD-1 Ab | Vi khuẩn hiếu khí | Âm tính |
|                 | Vi khuẩn kỵ khí   | Âm tính |

Sau khi làm xét nghiệm vi khuẩn nuôi cấy và định danh trên hệ thống tự động hiếu khí và kỵ khí của môi trường nuôi cấy chứng, PBMC, CAR-T, PD-1, CAR-T + PD-1 Ab đều cho kết quả âm tính.

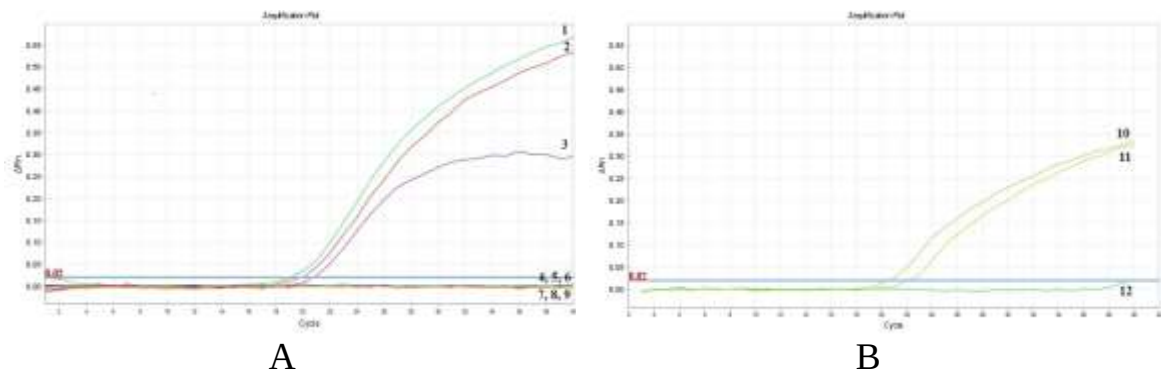
- Tỷ lệ biểu hiện CAR:



Hình 3. 1. Tỷ lệ biểu hiện tế bào CAR-T

Tỷ lệ biểu hiện của CAR trên bề mặt tế bào T sau quá trình chuyển nạp được phân tích bằng phương pháp tế bào dòng chảy. Kết quả cho thấy khoảng 26,13% tế bào T có biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng (là tỷ lệ dương tính FITC). Tế bào T không được chuyển nạp không có biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng. Tế bào CAR-T được tăng sinh cho những thí nghiệm tiếp theo.

- Biểu hiện của tế bào CAR-T bằng kỹ thuật Realtime PCR:



Hình 3. 2. Biểu hiện CAR bằng Real-time PCR

**A. CAR-Primer:** 1, 2, 3: TB CAR-T 4, 5, 6: TB PBMC 7, 8, 9: Chứng âm  
**B. GAPDH-Primer:** 10: TB CAR-T 11: TB PBMC 12: Chứng âm

Nhằm đánh giá biểu hiện của tế bào CAR-T sau khi phân tích realtime PCR với ba cặp môi đặc hiệu cho vùng gen biểu hiện phân tử CAR của tế bào CAR-T, tế bào chứng PBMC, nước. Kết quả cho thấy từ chu kỳ thứ 20 ở cả ba cặp môi, mẫu CAR-T có tín hiệu, chứng tỏ có biểu hiện gen CAR. Trong khi đó mẫu PBMC và chứng âm (nước) không có tín hiệu ở cả ba cặp môi, chứng tỏ không có biểu hiện gen CAR.

- Hàm lượng Endotoxin:

**Bảng 3. 2.** Kết quả định lượng Endotoxin môi trường tế bào CAR-T

| Mẫu môi trường         | Kết quả     |
|------------------------|-------------|
| Chứng                  | < 0,1 EU/ml |
| Tế bào CAR-T           | < 0,1 EU/ml |
| Tế bào CAR-T + PD-1 Ab | < 0,1 EU/ml |

Giới hạn nội độc tố cho phép là từ 0,005 - 0,5 EU/ml. Kết quả cho thấy mẫu dịch môi trường tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đều trong giới hạn cho phép.

### 3.1.2. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

#### 3.1.2.1. Tình trạng toàn thân của chuột trong quá trình thí nghiệm

- Tình trạng chung:

Sau khi tiêm tế bào CAR-T và PD-1 Ab trong quá trình theo dõi chuột vẫn ăn uống, vận động bình thường, nhanh nhẹn, lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, không thấy biểu hiện đi lỏng. Tại vị trí tiêm da chuột bình thường, không chảy máu, không nhiễm trùng. Tỷ lệ chuột sống ở 4 nhóm là 100% cho đến ngày cuối cùng của thí nghiệm.

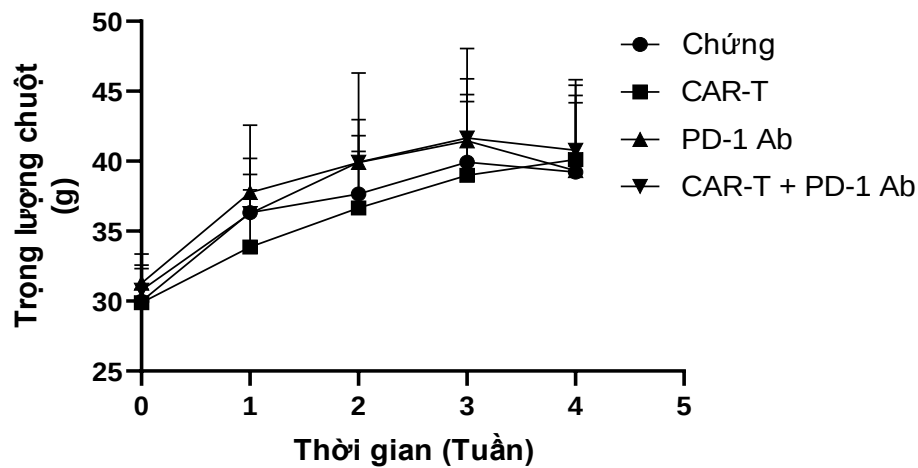
- Sự thay đổi trọng lượng chuột trong quá trình thí nghiệm

**Bảng 3. 3.** So sánh trọng lượng trung bình của chuột trước thí nghiệm

| Thông số<br>Nhóm       | n  | $\bar{X} \pm SD$ | $p^{\#}$ |
|------------------------|----|------------------|----------|
| Nhóm 1 (chứng)         | 15 | $29,98 \pm 2,33$ | > 0,05   |
| Nhóm 2 (CAR-T)         | 15 | $29,88 \pm 0,96$ |          |
| Nhóm 3 (PD-1 Ab)       | 15 | $31,28 \pm 2,09$ |          |
| Nhóm 4 (CAR-T+PD-1 Ab) | 15 | $30,78 \pm 1,77$ |          |

# ANOVA test

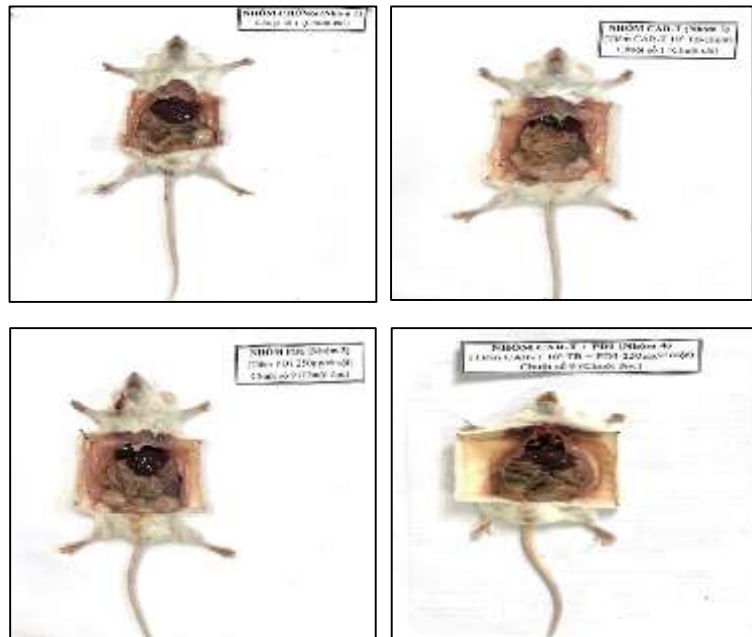
Trước thí nghiệm, khối lượng trung bình cả 4 nhóm chuột thí nghiệm tương đương nhau, không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$ . Chuột thí nghiệm được cân 2 lần mỗi tuần để đánh giá sự thay đổi trọng lượng của từng nhóm chuột.



Hình 3. 3. Ảnh hưởng của tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đến trọng lượng chuột

Theo dõi trong quá trình thí nghiệm thấy trọng lượng chuột ở các nhóm đều tăng so với trước thí nghiệm. Trọng lượng chuột tại các thời điểm ngày 0, ngày 7, ngày 14, ngày 21 và ngày 28 ở các nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp PD-1 Ab tương tự như ở nhóm chứng, không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với  $p > 0,05$  (Hình 3.3).

- Quan sát đại thể cơ quan của các nhóm chuột sau khi kết thúc thí nghiệm:

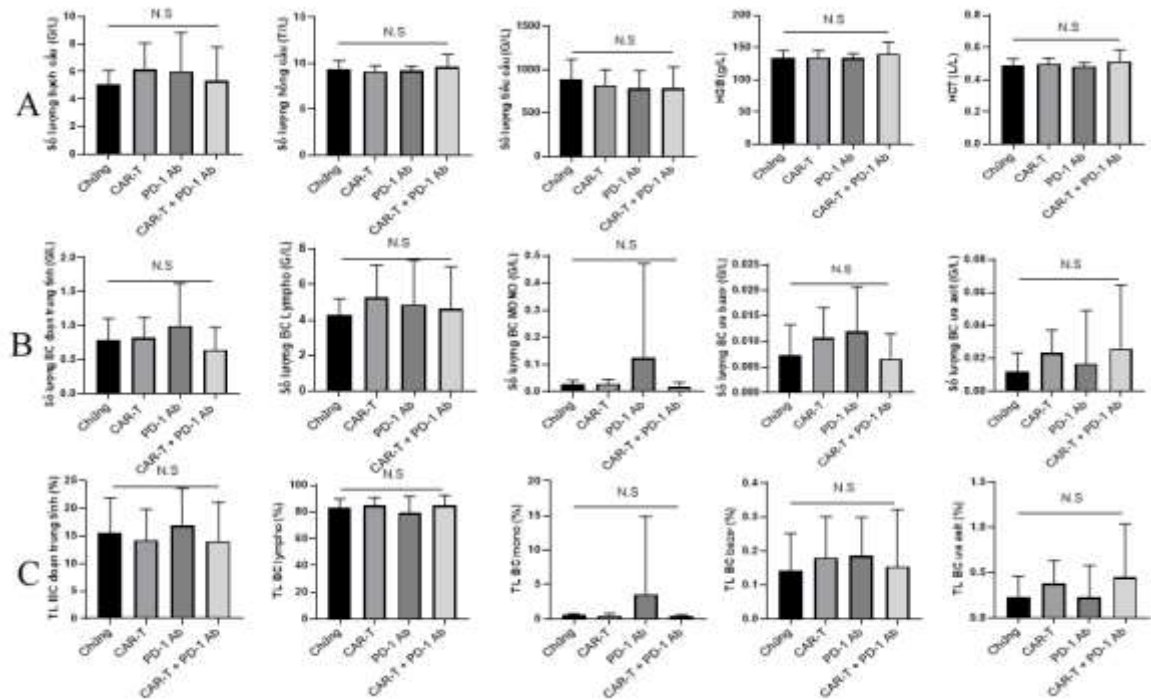


Hình 3. 4. Hình ảnh đại thể các cơ quan ở các nhóm chuột

\* Nguồn: hình ảnh chụp chuột 1.1; 2.1; 3.9 và 4.9 khi kết thúc thí nghiệm

Trên cả 4 nhóm không quan sát thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

### 3.1.2.2. Ảnh hưởng đến chức năng tạo máu của chuột



Hình 3. 5. Ảnh hưởng đối với hệ thống tạo máu ở chuột

(N.S:  $p > 0,05$ )

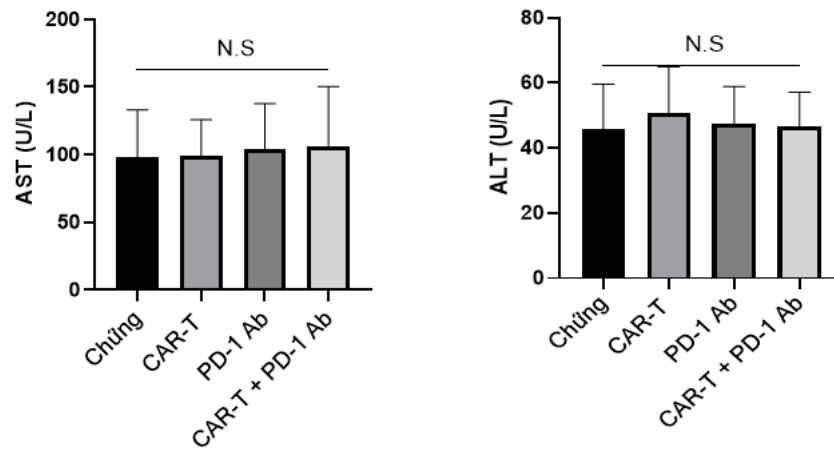
A : So sánh số lượng bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu, HGB và HCT 4 nhóm

B : So sánh số lượng các thành phần bạch cầu 4 nhóm

C : So sánh tỷ lệ phần trăm các thành phần bạch cầu 4 nhóm

Hình 3.5 A, B, C cho thấy sau 4 tuần tiêm tế bào CAR-T và PD-1 Ab, các xét nghiệm chỉ số dòng hồng cầu (số lượng HC, nồng độ hemoglobin - HGB, HCT, số lượng bạch cầu, số lượng và tỷ lệ phần trăm các thành phần bạch cầu, số lượng tiểu cầu) ở cả 3 nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T + PD-1 Ab không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p > 0,05$ ). Các nhóm tiêm CAR-T, PD-1 Ab cũng không có sự khác biệt về các chỉ số trên so với nhóm tiêm kết hợp CAR-T và PD-1 Ab.

### 3.1.2.3. Ảnh hưởng đến các chỉ số AST, ALT và mô bệnh học gan của chuột



Hình 3. 6. Đặc điểm chỉ số AST, ALT giữa các nhóm

(ns:  $p > 0,05$ )

Kết quả hình 3.6 cho thấy sau 4 tuần thì các xét nghiệm đánh giá mức độ hủy hoại tế bào gan qua chỉ số AST và ALT ở cả 3 nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chứng ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3. 4.** So sánh tương đối hoạt độ AST và ALT với giá trị tham chiếu ở chuột

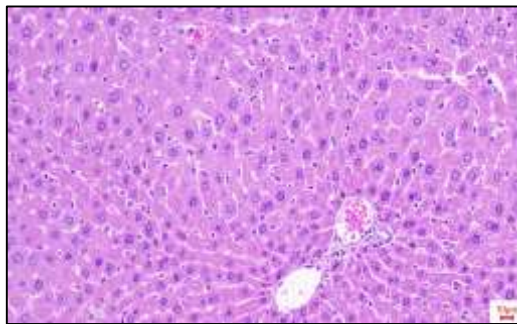
| Chỉ số       |             | Nhóm 1<br>(chứng,<br>n = 15) |      | Nhóm 2<br>(CAR-T,<br>n = 15) |      | Nhóm 3<br>(PD-1 Ab,<br>n = 15) |      | Nhóm 4<br>(CAR-T+PD-<br>1 Ab, n = 15) |      | p <sup>#</sup> |
|--------------|-------------|------------------------------|------|------------------------------|------|--------------------------------|------|---------------------------------------|------|----------------|
|              |             | n                            | %    | n                            | %    | n                              | %    | n                                     | %    |                |
| AST<br>(U/L) | Giảm        | 2                            | 13,3 | 1                            | 6,7  | 1                              | 6,7  | 3                                     | 20   | ><br>0,05      |
|              | Bình thường | 13                           | 86,7 | 14                           | 93,3 | 14                             | 93,3 | 11                                    | 73,3 |                |
|              | Tăng        | 0                            | 0    | 0                            | 0    | 0                              | 0    | 1                                     | 6,7  |                |
| ALT<br>(U/L) | Giảm        | 0                            | 0    | 0                            | 0    | 0                              | 0    | 0                                     | 0    |                |
|              | Bình thường | 15                           | 100  | 15                           | 100  | 15                             | 100  | 15                                    | 100  |                |
|              | Tăng        | 0                            | 0    | 0                            | 0    | 0                              | 0    | 0                                     | 0    |                |

# Fisher's exact test

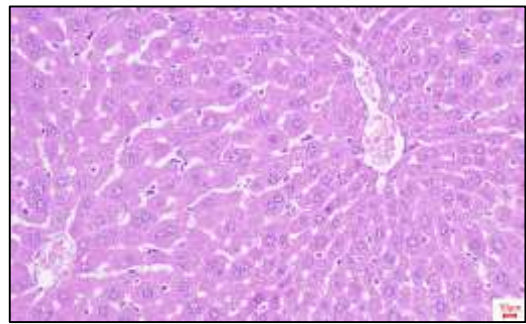


Kết quả cho thấy so với khoảng tham chiếu của Silva-Santana G. và cộng sự đã báo cáo, không có con chuột nào có hoạt độ AST và ALT huyết thanh tăng được báo cáo trong 3 nhóm PBMC, CAR-T và PD-1 Ab [114]. Nhóm PD-1 Ab chỉ có 1/15 chuột có tăng hoạt độ AST tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nhóm còn lại.

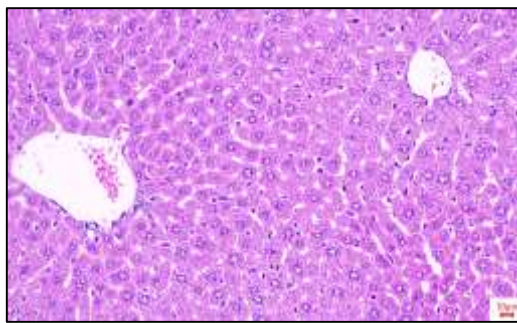
\* Vi thể:



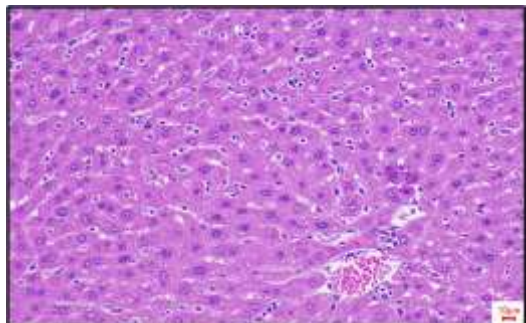
**Nhóm chứng**



**Nhóm CAR-T**



**Nhóm PD-1 Ab**



**Nhóm CAR-T + PD-1 Ab**

Hình 3. 7. Hình thái vi thể gan chuột ở các nhóm (HE vật kính 20X)

\* Nguồn: hình ảnh mô bệnh học gan chuột số 1.1; 2.9; 3.4; 4.2

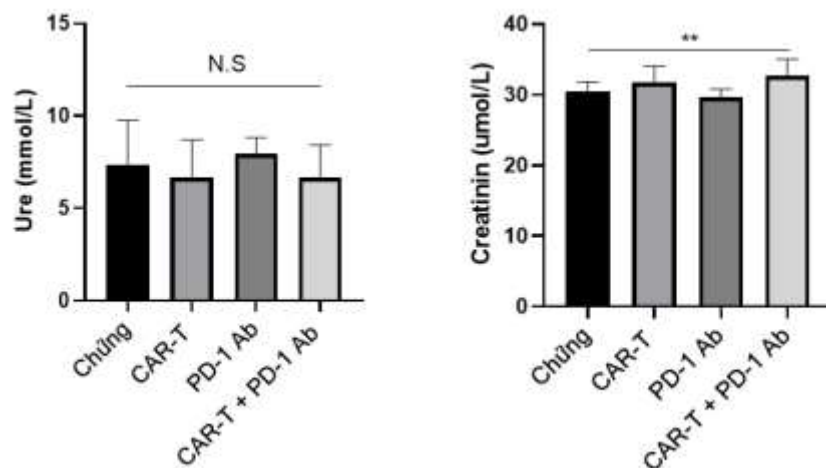
Hình thái vi thể gan ở các nhóm không có sự khác biệt, nhu mô gan bình thường: Các tế bào gan sắp xếp thành dải, thành bè, giữa các dải, các bè gan có xoang mạch. Các tế bào gan không bị thoái hóa. Các tĩnh mạch khoảng cửa bị sung huyết nhẹ.

**Bảng 3. 5.** Tỷ lệ thoái hóa hạt giữa bốn nhóm

| Nhóm<br><br>(n = 15)   | Thoái hóa hạt            |      |                          |      | Tổn<br>thương<br>khác |
|------------------------|--------------------------|------|--------------------------|------|-----------------------|
|                        | Chuột cái<br><br>(n = 8) |      | Chuột đực<br><br>(n = 7) |      |                       |
|                        | n                        | %    | n                        | %    |                       |
| Nhóm chứng             | 0                        | 0    | 0                        | 0    | 0                     |
| Nhóm 2 (CAR-T)         | 5                        | 62,5 | 0                        | 0    | 0                     |
| Nhóm 3 (PD-1 Ab)       | 3                        | 37,5 | 3                        | 42,9 | 0                     |
| Nhóm 4 (CAR-T+PD-1 Ab) | 3                        | 37,5 | 0                        | 0    | 0                     |

Chuột cái có tỷ lệ thoái hóa hạt cao hơn 34,4% so với 10,7% của chuột đực. Thoái hóa hạt được phát hiện ở 62,5% chuột cái được tiêm tế bào CAR-T so với 0% chuột đực được tiêm tế bào CAR-T; 37,5% chuột cái sử dụng kháng thể kháng PD-1 so với 42,9% chuột đực sử dụng kháng thể kháng PD-1; 37,5% chuột cái nhóm kết hợp so với chuột đực nhóm kết hợp là 0%. Không có tổn thương khác nào được phát hiện.

#### 3.1.2.4. Ảnh hưởng đến chỉ số Creatinin, Urê và mô bệnh học thận của chuột



Hình 3. 8. Kết quả chỉ số Urê, Creatinin giữa các nhóm

( $p(1)(4) < 0,05$ ;  $p(3)(4) < 0,001$ ) (ns:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ )

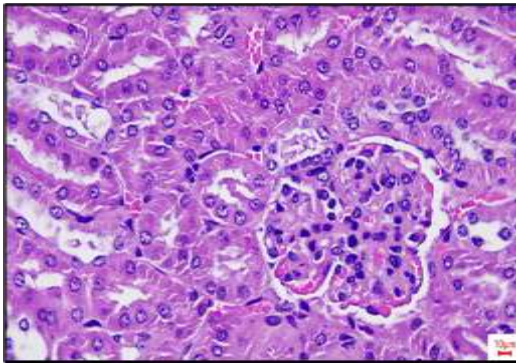
Nồng độ Urê ở cả 3 nhóm CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đều không có sự khác biệt có ý nghĩa so với nhóm chứng ( $p > 0,05$ ). Có sự khác biệt về nồng độ Creatinin của nhóm CAR-T kết hợp với PD-1 Ab so với nhóm chứng và nhóm PD-1 Ab với  $p < 0,05$ . Tuy nhiên chỉ số Creatinin của các nhóm vẫn nằm trong mức giới hạn bình thường.

**Bảng 3. 6.** So sánh tương đối nồng độ Creatinin và Urê với giá trị tham chiếu ở chuột

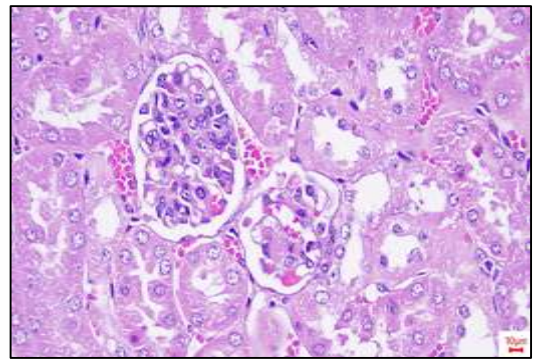
| Chỉ số    |            | Nhóm 1<br>(chứng,<br>n = 15) |     | Nhóm 2<br>(CAR-T,<br>n = 15) |     | Nhóm 3<br>(PD-1 Ab,<br>n = 15) |     | Nhóm 4<br>(CAR-T +<br>PD-1 Ab,<br>n = 15) |     |
|-----------|------------|------------------------------|-----|------------------------------|-----|--------------------------------|-----|-------------------------------------------|-----|
|           |            | n                            | %   | n                            | %   | n                              | %   | n                                         | %   |
| Urê       | Không tăng | 15                           | 100 | 15                           | 100 | 15                             | 100 | 15                                        | 100 |
|           | Tăng       | 0                            | 0   | 0                            | 0   | 0                              | 0   | 0                                         | 0   |
| Creatinin | Không tăng | 15                           | 100 | 15                           | 100 | 15                             | 100 | 15                                        | 100 |
|           | Tăng       | 0                            | 0   | 0                            | 0   | 0                              | 0   | 0                                         | 0   |

Nồng độ Creatinin huyết thanh của tất cả chuột trong các nhóm nghiên cứu đều nằm trong khoảng giới hạn của chuột chuột ( $35,37 \pm 8,84 \mu\text{mol/L}$ ) theo nghiên cứu của Stephen và cộng sự năm 2004 [115].

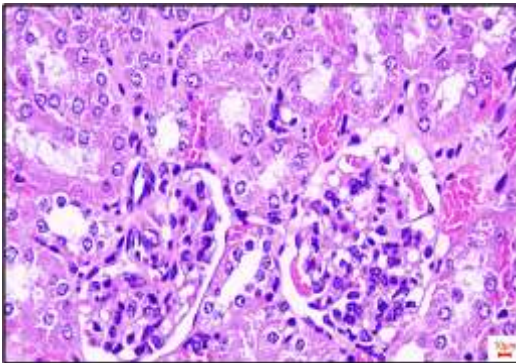
- Vi thể:



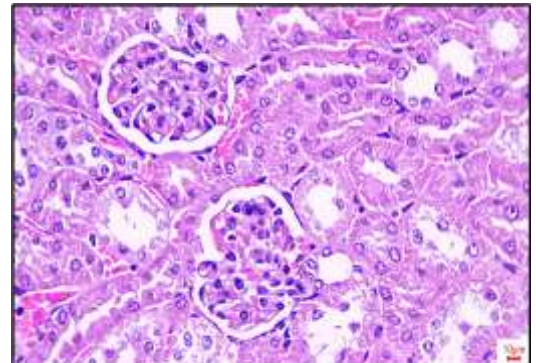
**Nhóm chứng**



**Nhóm CAR-T**



**Nhóm PD-1 Ab**



**Nhóm CAR-T + PD-1 Ab**

Hình 3. 9. Hình thái vi thể thận chuột ở các nhóm (HE vật kính 20X)

*\* Nguồn: hình ảnh mô bệnh học thận chuột số 1.1; 2.9; 3.4; 4.2*

Hình thái vi thể thận ở các nhóm không có sự khác biệt, nhu mô thận bình thường: Vỏ thận có các cầu thận, các ống thận và các mạch máu giữa các ống thận. Các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa. Các mạch máu cầu thận sung huyết nhẹ.

### 3.1.2.5. Ảnh hưởng đến nồng độ các cytokin

**Bảng 3. 7.** Nồng độ cytokin IL-6 của các nhóm nghiên cứu

| Chỉ số<br>Nhóm            | n  | IL-6 (pg/mL)               | p <sup>#</sup>                                                                                                    |
|---------------------------|----|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           |    | Trung vị (Tứ phân vị)      |                                                                                                                   |
| Nhóm 1<br>(chứng)         | 15 | 129,01<br>(93,52 - 158,32) | p (1)(2) > 0,05<br><b>p (1)(3) &lt; 0,001</b><br><b>p (1)(4) &lt; 0,005</b><br>p (2)(4) > 0,05<br>p (3)(4) > 0,05 |
| Nhóm 2<br>(CAR-T)         | 15 | 97,32<br>(86,03 - 141,41)  |                                                                                                                   |
| Nhóm 3<br>(PD-1 Ab)       | 15 | 86,03<br>(82,34 - 93,52)   |                                                                                                                   |
| Nhóm 4<br>(CAR-T+PD-1 Ab) | 15 | 89,75<br>(86,03 - 97,32)   |                                                                                                                   |

# Mann-Whitney U test

Kết quả ở bảng 3.7 cho thấy sau 4 tuần nồng độ IL-6 trong máu chuột ở nhóm CAR-T không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Nồng độ IL-6 của nhóm PD-1 và nhóm CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p < 0,05$ ).

**Bảng 3.8.** Nồng độ cytokin IL-2 của các nhóm nghiên cứu

| Chỉ số<br>Nhóm            | n  | IL-2 (pg/mL)             | p <sup>#</sup>                                                                                                            |
|---------------------------|----|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           |    | Trung vị (Tứ phân vị)    |                                                                                                                           |
| Nhóm 1<br>(chứng)         | 15 | 39,84<br>(35,70 - 52,96) | p (1)(2) > 0,05<br>p (1)(3) > 0,05<br><b>p (1)(4) &lt; 0,01</b><br><b>p (2)(4) &lt; 0,01</b><br><b>p (3)(4) &lt; 0,01</b> |
| Nhóm 2<br>(CAR-T)         | 15 | 38,79<br>(35,70 - 43,02) |                                                                                                                           |
| Nhóm 3<br>(PD-1 Ab)       | 15 | 44,10<br>(35,70 - 52,39) |                                                                                                                           |
| Nhóm 4<br>(CAR-T+PD-1 Ab) | 15 | 33,67<br>(31,68 - 38,27) |                                                                                                                           |

# Mann-Whitney U test

Nồng độ IL-2 của nhóm CAR-T và kháng thể kháng PD-1 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, nhóm kết hợp CAR-T và kháng thể kháng PD-1 có nồng độ IL-2 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các nhóm chứng, CAR-T và kháng thể kháng PD-1 ( $p < 0,01$ ).

**Bảng 3.9.** Nồng độ cytokin TNF- $\alpha$  của các nhóm nghiên cứu

| Chỉ số<br>Nhóm            | n  | TNF- $\alpha$ (pg/mL)       | p <sup>#</sup>                                                                                                                                    |
|---------------------------|----|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           |    | Trung vị (Tứ phân vị)       |                                                                                                                                                   |
| Nhóm 1<br>(chứng)         | 15 | 127,29<br>(110,26 - 185,68) | <p>p (1)(2) &gt; 0,05<br/> p (1)(3) &gt; 0,05<br/> <b>p (1)(4) &lt; 0,001</b><br/> <b>p (2)(4) &lt; 0,001</b><br/> <b>p (3)(4) &lt; 0,001</b></p> |
| Nhóm 2<br>(CAR-T)         | 15 | 183,58<br>(117,76 - 255,48) |                                                                                                                                                   |
| Nhóm 3<br>(PD-1 Ab)       | 15 | 83,22<br>(74,62 - 226,50)   |                                                                                                                                                   |
| Nhóm 4<br>(CAR-T+PD-1 Ab) | 15 | 383,76<br>(278,30-418,89)   |                                                                                                                                                   |

# *Mann-Whitney U test*

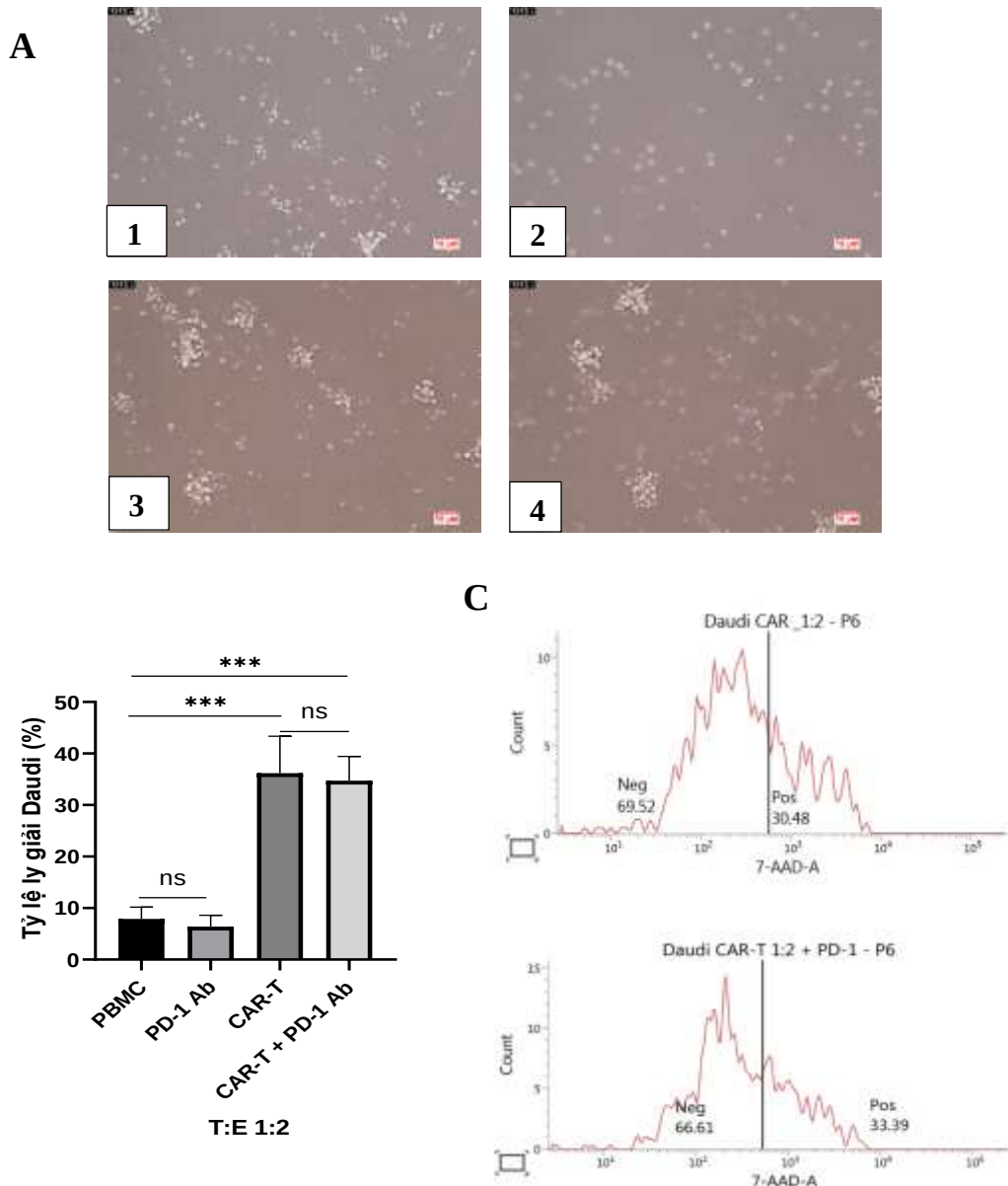
Nhóm CAR-T và kháng thể kháng PD-1 có nồng độ cytokin TNF- $\alpha$  không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên, nhóm kết hợp tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 có nồng độ TNF- $\alpha$  cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, nhóm CAR-T và nhóm PD-1 Ab ( $p < 0,001$ ).



## 3.2. TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO DÒNG UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1

### 3.2.1. Kết quả đánh giá tác dụng ly giải tế bào *in vitro*

#### 3.2.1.1. Tác dụng ly giải tế bào Daudi (CD19+)



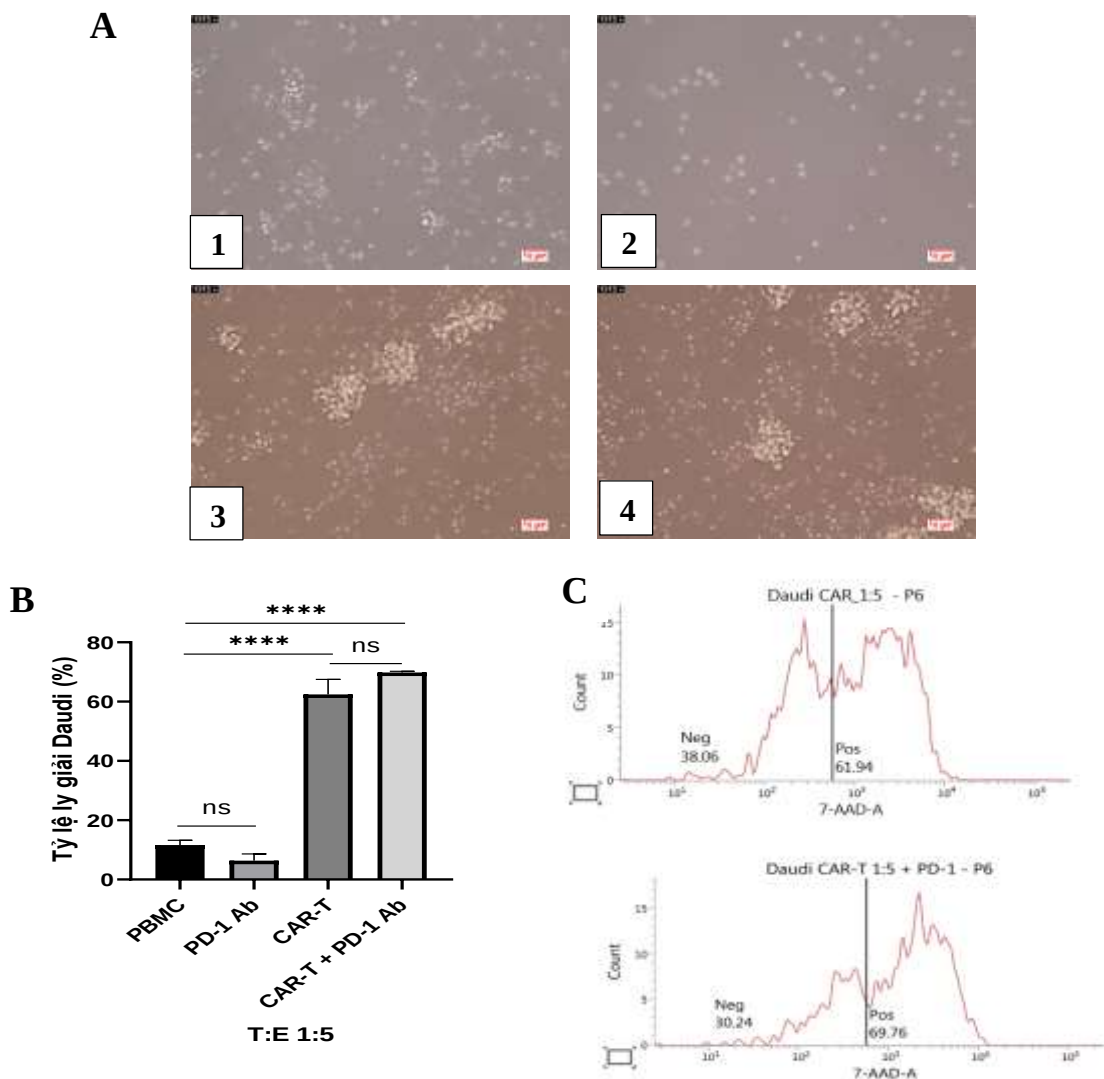
Hình 3. 10. Ly giải tế bào Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:2

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

**B:** Tỷ lệ tế bào Daudi bị ly giải (*ns*:  $p > 0,05$ ; *\*\*\**:  $p < 0,001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB Daudi của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Ở tỷ lệ T:E = 1:2 kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào Daudi bị ly giải khi đồng nuôi cấy với của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 lần lượt là 36,19% và 34,73%. Tỷ lệ này cao hơn so với nhóm đồng nuôi cấy với tế bào PBMC và kháng thể kháng PD-1 có ý nghĩa thống kê với ( $p < 0,001$ ). Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ ly giải giữa nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1, nhóm đồng nuôi cấy với tế bào PBMC và nhóm kháng thể kháng PD-1 ( $p > 0,05$ ).



Hình 3. 11. Ly giải tế bào Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:5

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

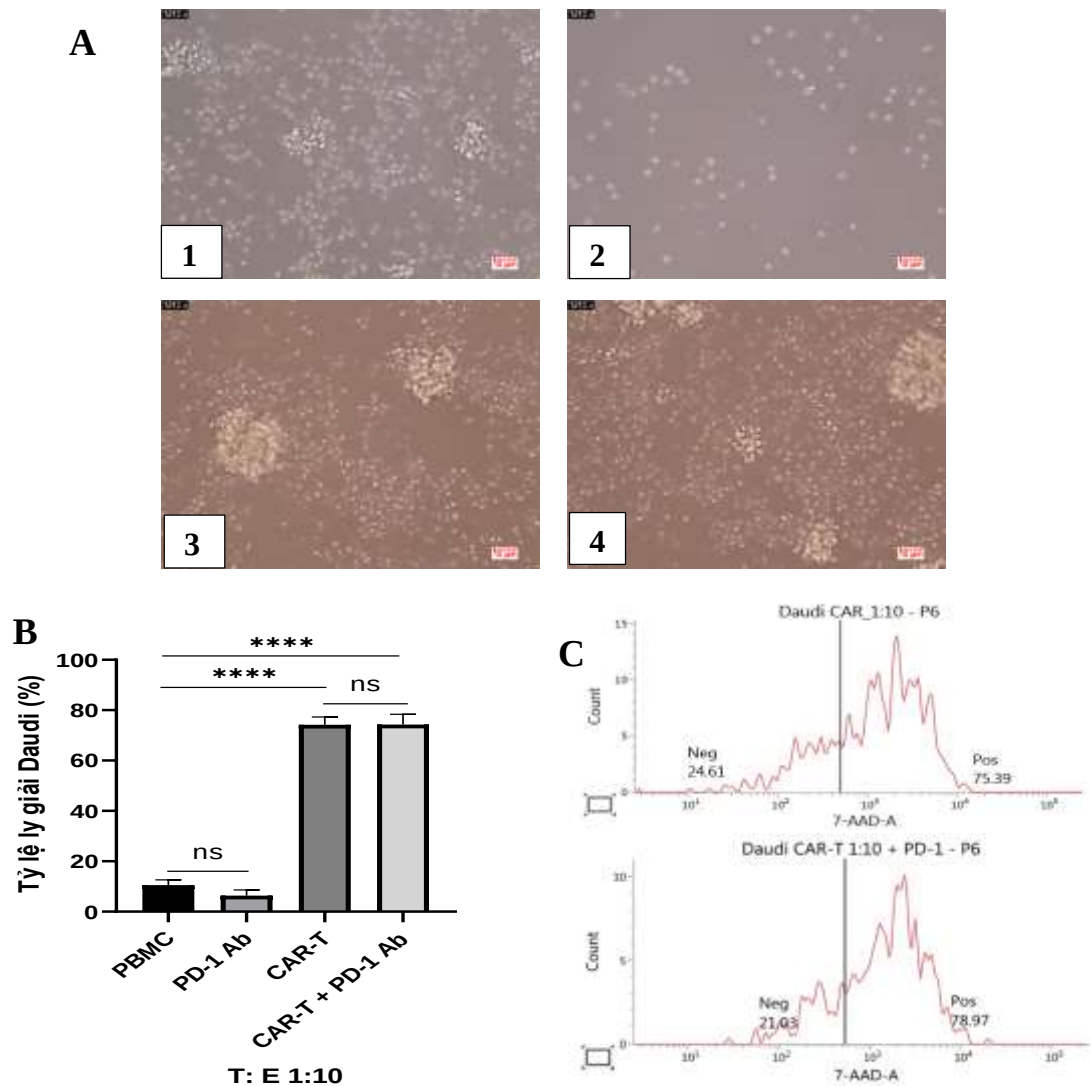
**B:** Tỷ lệ tế bào Daudi bị ly giải (*ns*:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB Daudi của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.



Tỷ lệ ly giải tế bào Daudi của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm PBMC và nhóm kháng thể kháng PD-1 ở tỷ lệ T:E = 1:5 ( $p < 0,001$ ).

Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ ly giải giữa nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1; nhóm đồng nuôi cấy với tế bào PBMC và nhóm kháng thể kháng PD-1 ở tỷ lệ T:E = 1:5 ( $p > 0,05$ ).



Hình 3. 12. Ly giải tế bào Daudi ở 4 nhóm với T:E = 1:10

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

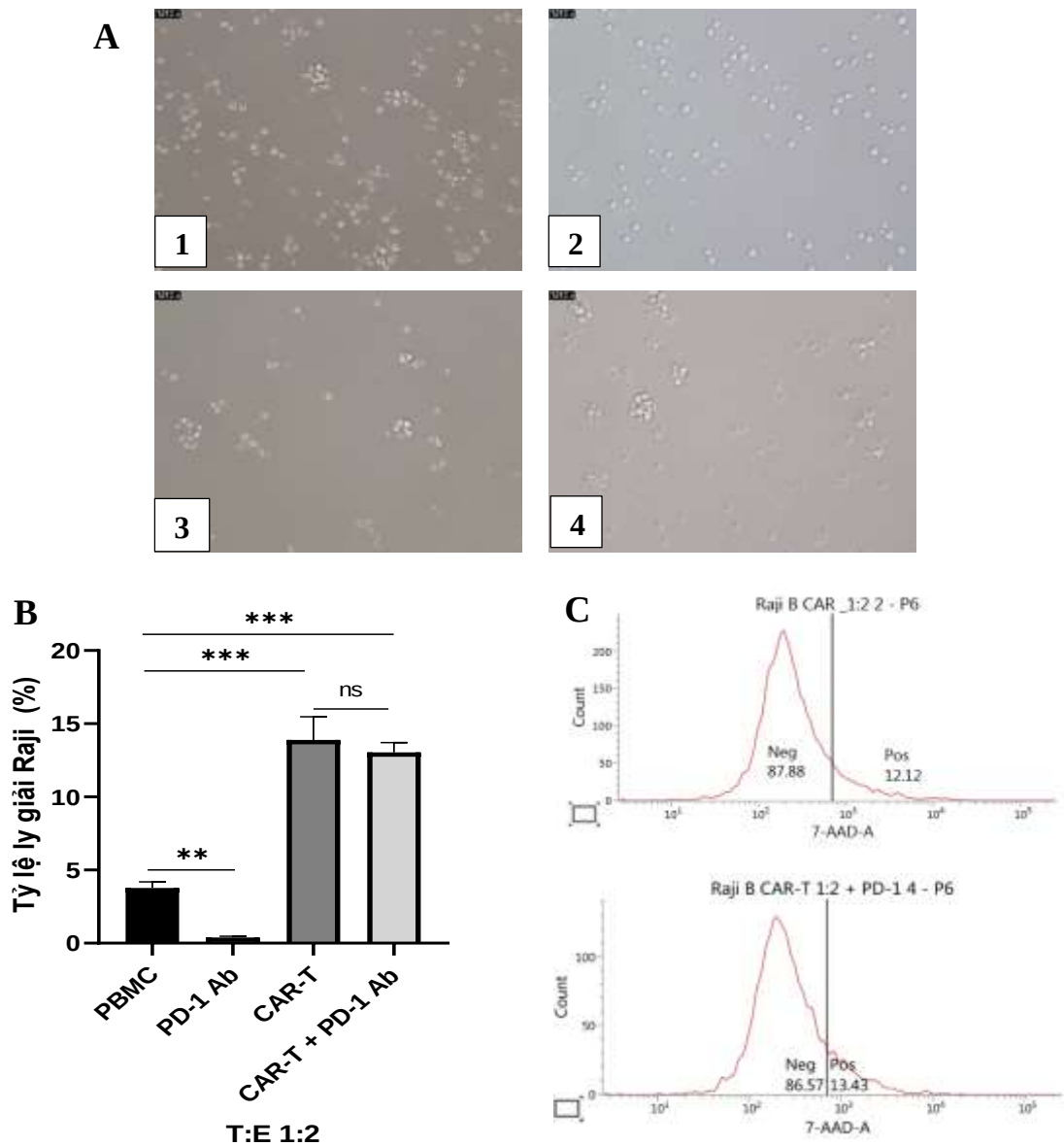
**B:** Tỷ lệ tế bào Daudi bị ly giải ( $ns: p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB Daudi của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Ở tỷ lệ T:E = 1:10 tỷ lệ tế bào Daudi ly giải ở khi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T là 74,21%, tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 đạt tỷ lệ ly giải 74,28%, tỷ lệ này cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,001$ ). Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ ly giải giữa nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1, nhóm PD-1 so với nhóm chứng PBMC ( $p > 0,05$ ).

Quan sát dưới kính hiển vi tại thời điểm 6 giờ có thể thấy giết tế bào nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab có tỷ lệ tế bào Daudi sống thấp hơn nhóm chứng PBMC và nhóm PD-1 Ab, màng tế bào Daudi bị vỡ ra, mất tính tiên tục, xuất hiện nhiều mảnh tế bào chết (Hình 3.10 A, 3.11 A, 3.12 A).

### 3.2.1.2. Tác dụng ly giải tế bào Raji (CD19+)



Hình 3. 13. Ly giải tế bào Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:2

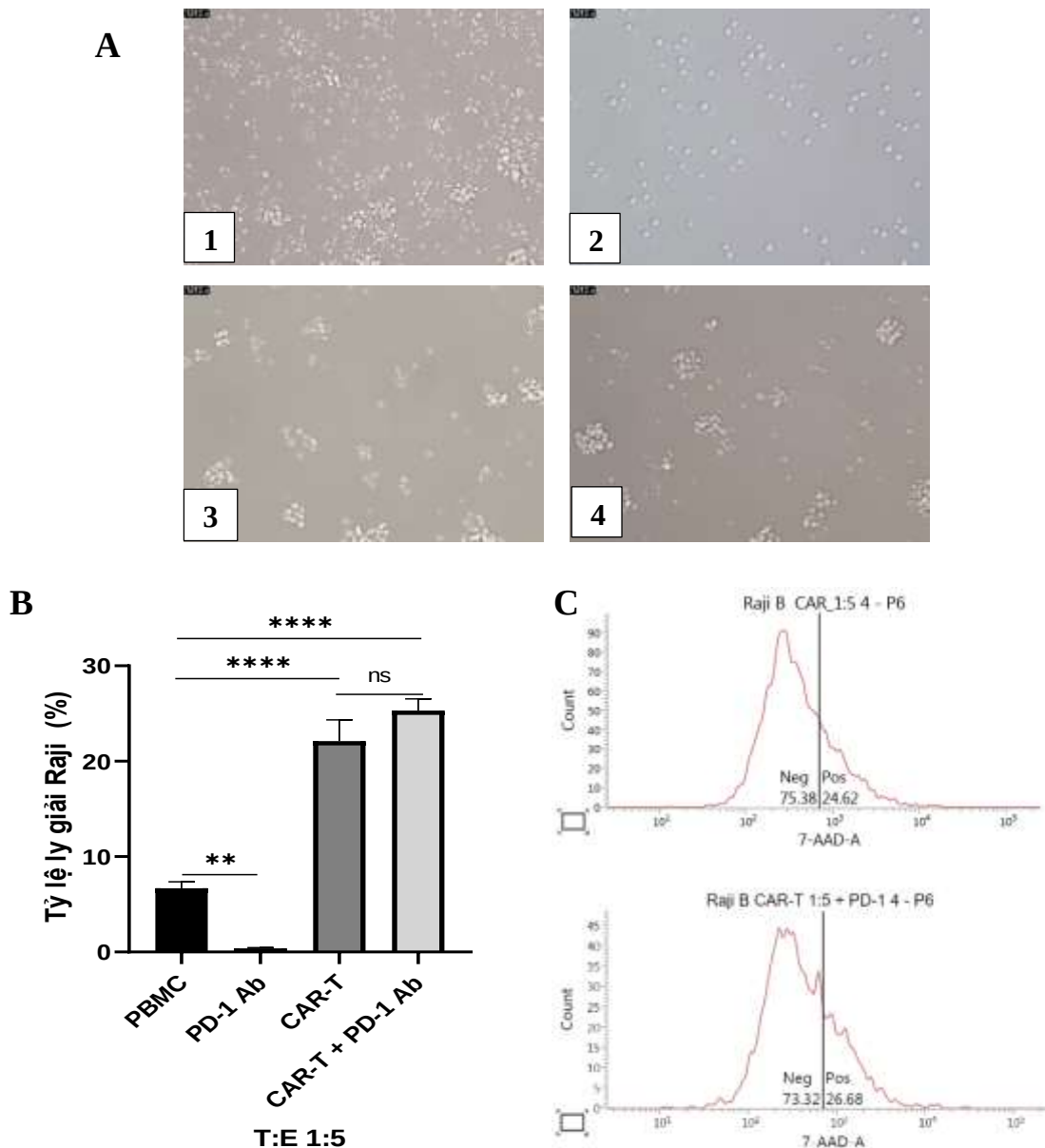
**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

**B:** Tỷ lệ tế bào Raji bị ly giải (*ns*:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB Raji của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Ở tỷ lệ T:E = 1:2 nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab có tỷ lệ ly giải tế bào Raji cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,001$ ). Tỷ lệ tế bào Raji bị ly giải ở nhóm CAR-T là 13,89% và nhóm kết hợp

CAR-T với kháng thể kháng PD-1 đạt tỷ lệ 13,04%, không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 2 nhóm này ( $p > 0,05$ ). Tỷ lệ ly giải của nhóm PD-1 Ab thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,05$ ).



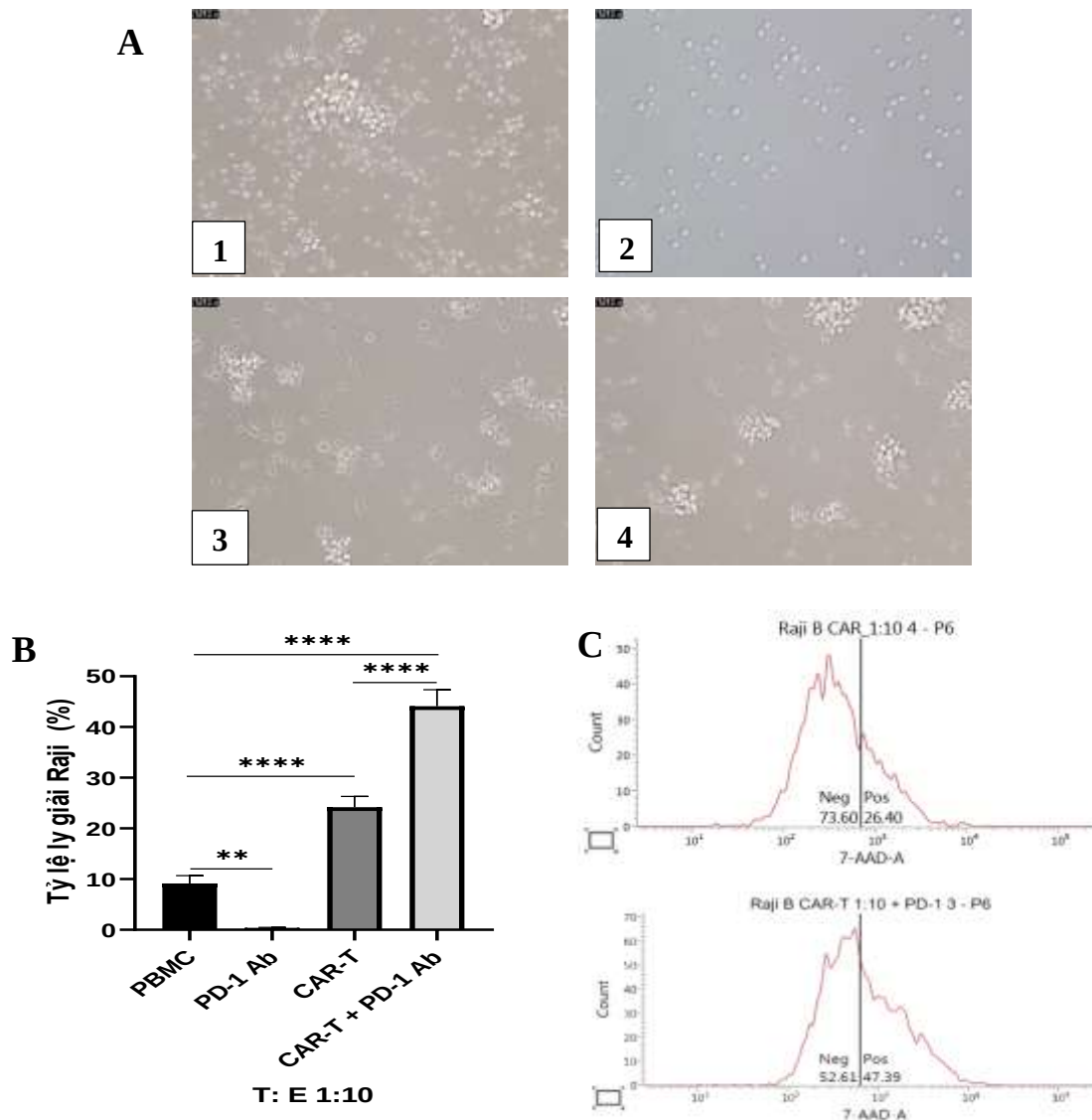
Hình 3. 14. Ly giải tế bào Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:5

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

**B:** Tỷ lệ tế bào Raji bị ly giải ( $ns: p > 0,05$ ;  $**$ :  $p < 0,01$ ;  $****$ :  $p < 0,0001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB Raji của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Ở tỷ lệ T:E = 1:5 cũng có thể thấy tỷ lệ ly giải tế bào Raji của CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 tương đối tốt. Tỷ lệ này cao khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm PBMC ( $p < 0,001$ ). Tỷ lệ ly giải của nhóm PD-1 Ab thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p < 0,05$ ). Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ ly giải tế bào Raji giữa nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab ( $p > 0,05$ ).



Hình 3. 15. Ly giải tế bào Raji ở 4 nhóm với T:E = 1:10

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

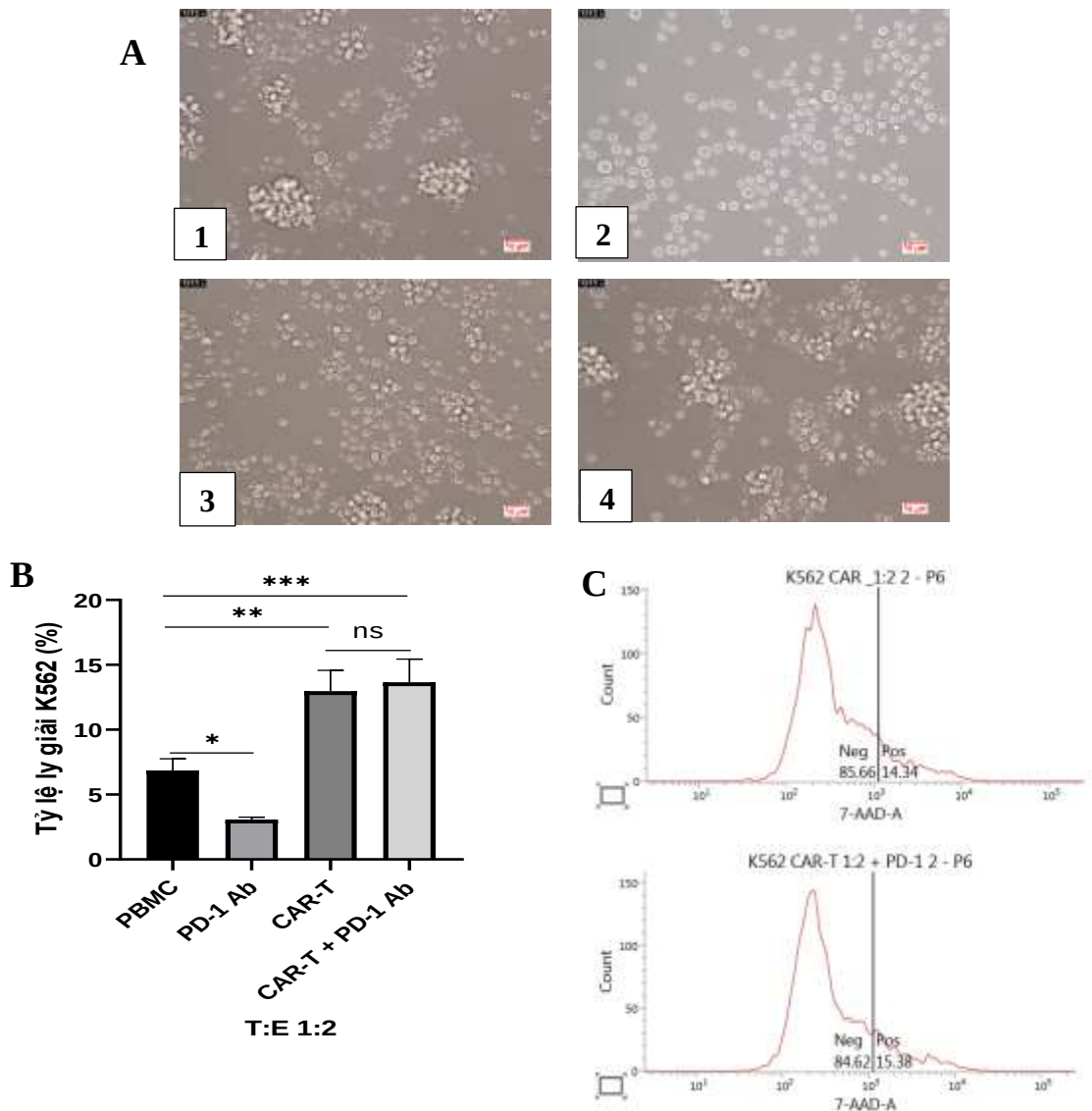
**B:** Tỷ lệ tế bào Raji bị ly giải (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB Raji của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Hình 3.15 cho thấy ở tỷ lệ T:E = 1:10 tế bào CAR-T cũng thể hiện khả năng ly giải tốt đối với tế bào Raji. Tỷ lệ tế bào ly giải ở nhóm CAR-T là 24,2% và nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1 đạt tỷ lệ 44,11%, tương đương tăng hiệu quả 1,82 lần. Tỷ lệ ly giải của nhóm CAR-T và nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,001$ ). Tỷ lệ ly giải của nhóm PD-1 Ab thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,05$ ).

Ở các hình 3.13 A, 3.14 A, 3.15 A có thể thấy khi quan sát dưới vật kính 20 tỷ lệ tế bào Raji bị ly giải ở nhóm PD-1 rất thấp, các tế bào Daudi vẫn tròn đều và sáng. Tỷ lệ tế bào Raji bị ly giải ở nhóm CAR-T và nhóm kết hợp cao hơn; màng các tế bào Raji bị vỡ ra, mất tính tiên tục, xuất hiện nhiều mảnh tế bào chết.

### 3.2.1.3. Tác dụng ly giải tế bào K562 (CD19-)



Hình 3. 16. Ly giải tế bào K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:2

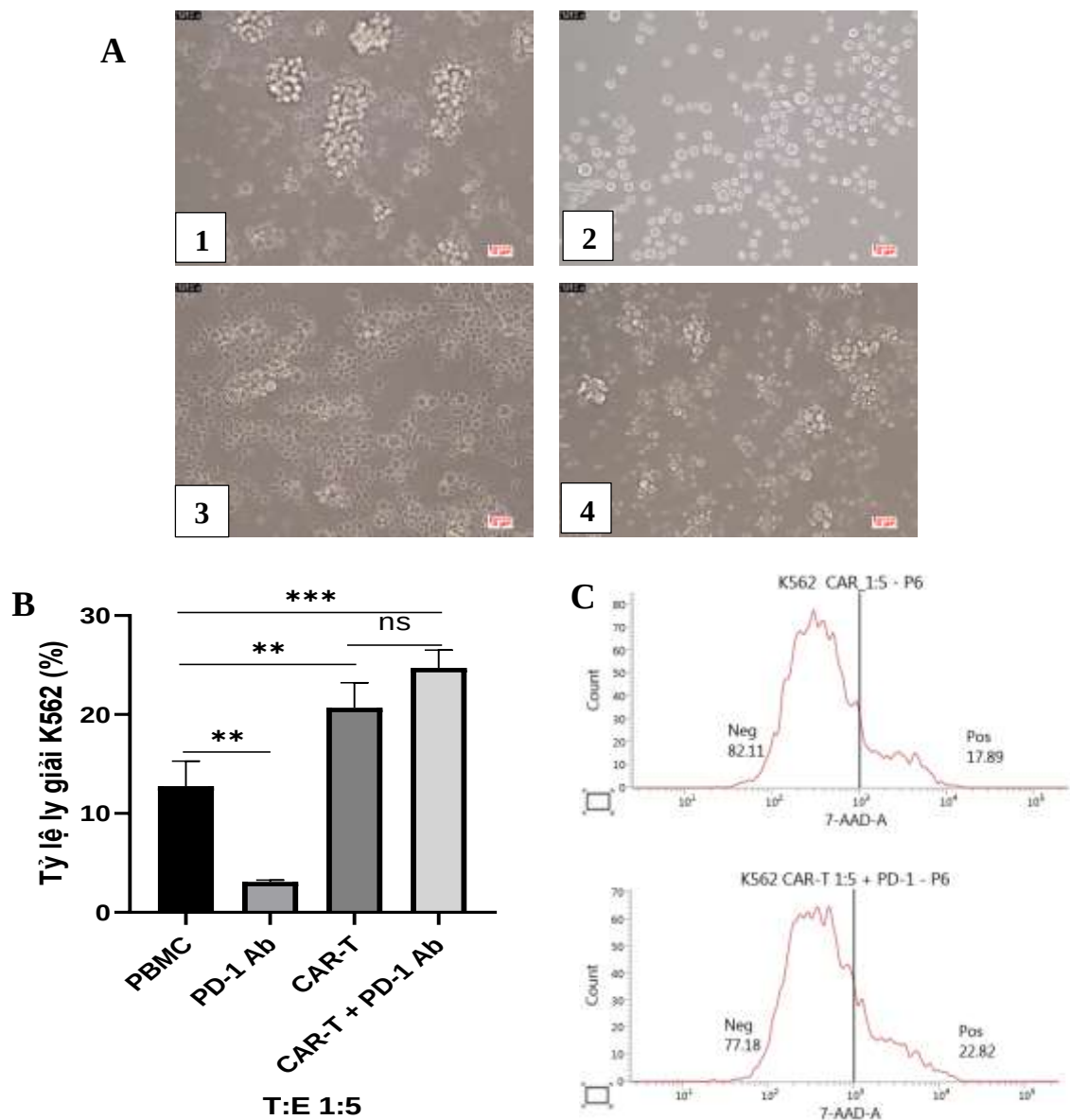
**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

**B:** Tỷ lệ tế bào K562 bị ly giải (*ns*:  $p > 0,05$ ;  $*$   $p < 0,05$ ;  $**$ :  $p < 0,01$ ;  $***$ :  $p < 0,001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB K562 của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Ở tỷ lệ T:E = 1:2 có thể thấy tỷ lệ ly giải tế bào K562 (CD19-) của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,01$ ), tuy nhiên tỷ lệ này rất thấp chỉ đạt 12,98% ở nhóm CAR-T và 13,66% ở nhóm kết hợp. Nhóm PD-1 Ab tỷ lệ ly giải thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,05$ ).

Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đơn trị liệu tế bào CAR-T và kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 ( $p > 0,05$ ).



Hình 3. 17. Ly giải tế bào K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:5

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

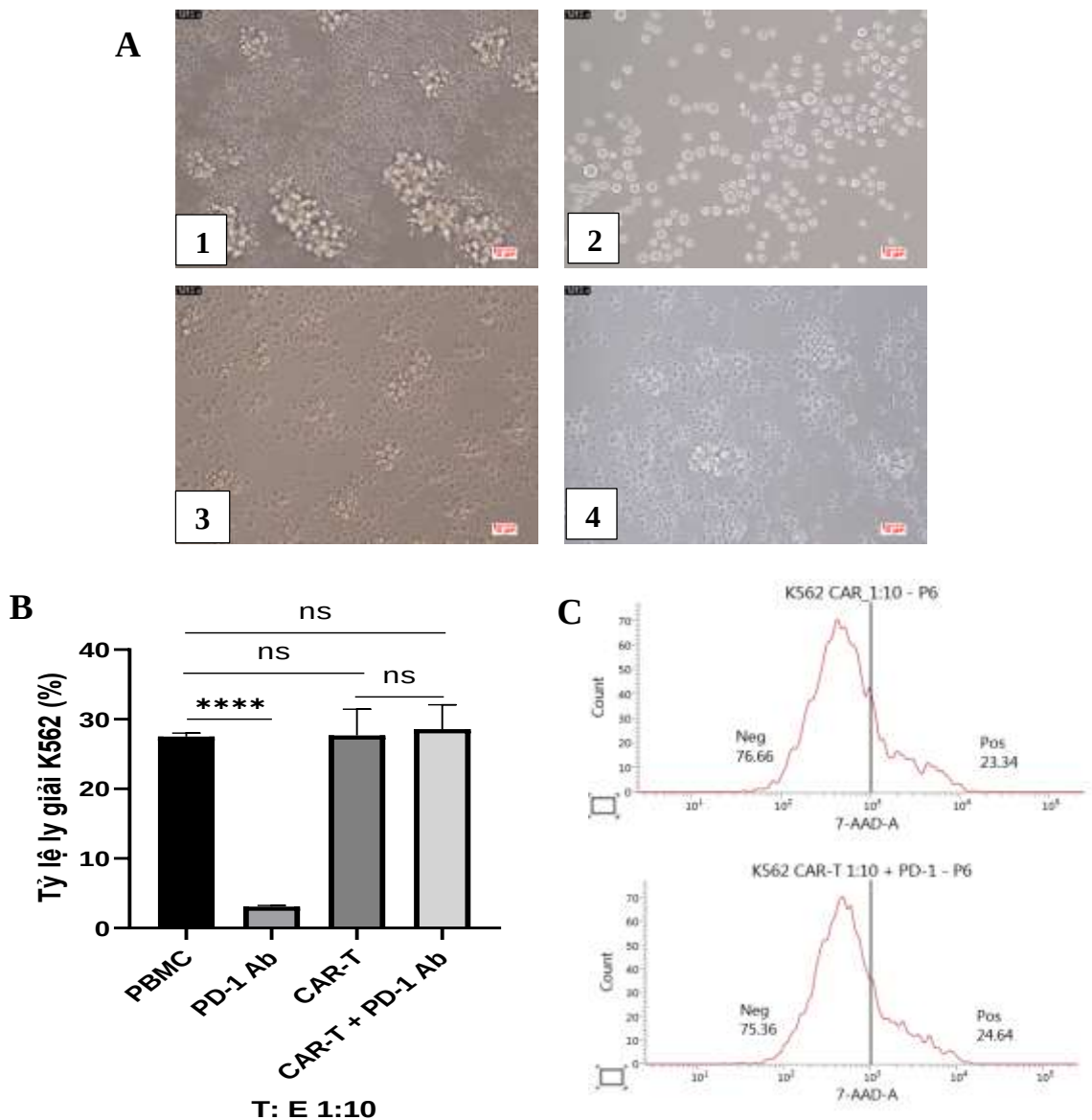
**B:** Tỷ lệ tế bào K562 bị ly giải ( $ns: p > 0,05$ ;  $**$ :  $p < 0,01$ ;  $***$ :  $p < 0,001$ ).

**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB K562 của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Hình 3.17 cho thấy ở tỷ lệ T:E 1:5 thì tỷ lệ ly giải tế bào K562 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,01$ ), tuy nhiên tỷ lệ này chỉ đạt



20,7% ở nhóm CAR-T và 24,71% ở nhóm kết hợp trong khi nhóm chứng PBMC đạt 12,77%. Nhóm PD-1 Ab tỷ lệ ly giải thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ( $p < 0,01$ ). Không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và đồng nuôi cấy kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 ( $p > 0,05$ ).



Hình 3. 18. Ly giải tế bào K562 ở 4 nhóm với T:E = 1:10

**A:** Hình ảnh tế bào ở 4 nhóm nghiên cứu (vật kính 20): (1) nhóm PBMC, (2) nhóm PD-1 Ab, (3) nhóm CAR-T, (4) nhóm CAR-T + PD-1 Ab.

**B:** Tỷ lệ tế bào K562 bị ly giải ( $ns: p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

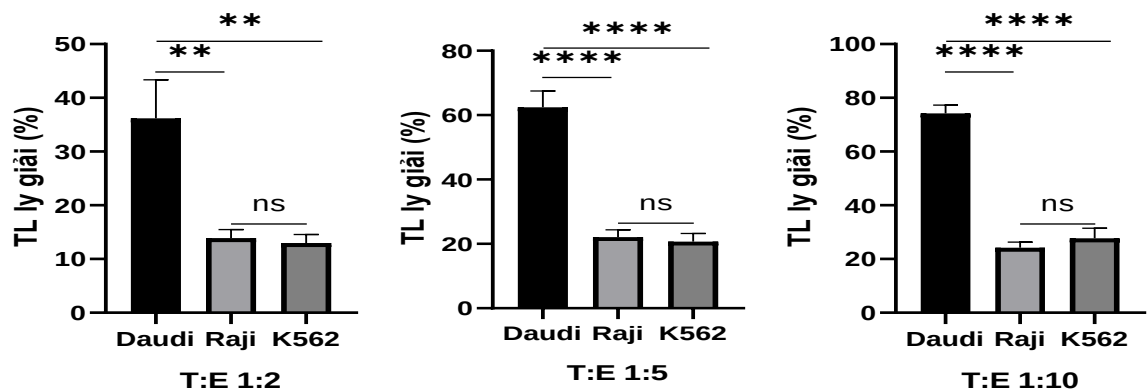
**C:** Hình ảnh kết quả ly giải TB K562 của TB CAR-T và CAR-T + PD-1 Ab phân tích trên Flow cytometry.

Với tỷ lệ K562/CAR-T = 1:10, kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào K562 (CD19-) bị ly giải khi đồng nuôi cấy với PBMC 27,52%, CAR-T 27,67% và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 28,59% là tương đồng nhau, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Nhóm PD-1 có tỷ lệ ly giải thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng PBMC ( $p < 0,001$ ).

Quan sát hình 3.16 A, 3.17 A, 3.18 có thể thấy dưới kính hiển vi tỷ lệ tế bào K562 bị ly giải ở nhóm PD-1 rất thấp, các tế bào K562 vẫn tròn đều và sáng. Tỷ lệ tế bào K562 bị ly giải ở nhóm CAR-T và nhóm kết hợp cao hơn so với nhóm chứng PBMC, tuy nhiên có thể thấy tỷ lệ tế bào K562 sống qua hình ảnh trên kính hiển vi ở các giếng đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab vẫn cao.

#### 3.2.1.4. So sánh khả năng ly giải ba dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1

- Khả năng ly giải tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T:

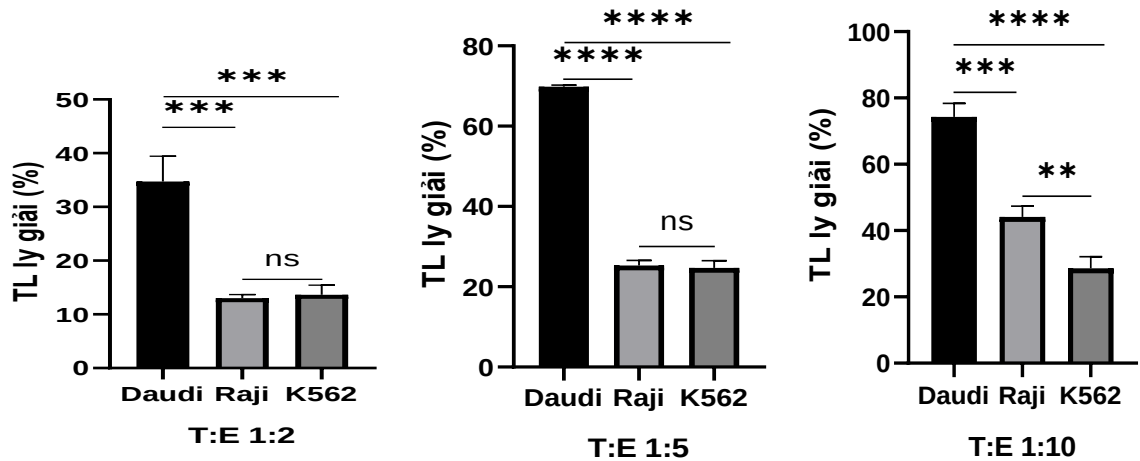


Hình 3.19. So sánh tỷ lệ ly giải 3 dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Kết quả hình 3.19 cho thấy ở cả 3 tỷ lệ T:E = 1:2, 1:5, 1:10 tỷ lệ ly giải tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ ly giải tế bào Raji và K562. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ ly giải tế bào Raji và K562 ( $p > 0,05$ ).

**- Khả năng ly giải tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T kết hợp với PD-1 Ab:**



Hình 3.20. So sánh tỷ lệ ly giải 3 dòng tế bào ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1

(*ns*:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Hình 3.20 cho thấy ở cả 3 tỷ lệ T:E = 1:2, 1:5, 1:10 tỷ lệ ly giải tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ ly giải tế bào Raji và K562. Không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ ly giải tế bào Raji và K562 ở tỷ lệ T:E 1:2 và 1:5 ( $p > 0,05$ ). Tỷ lệ T:E 1:10 thì tỷ lệ ly giải tế bào Raji của liệu pháp kết hợp cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tỷ lệ ly giải tế bào K562 (CD19-) ( $p < 0,01$ ).

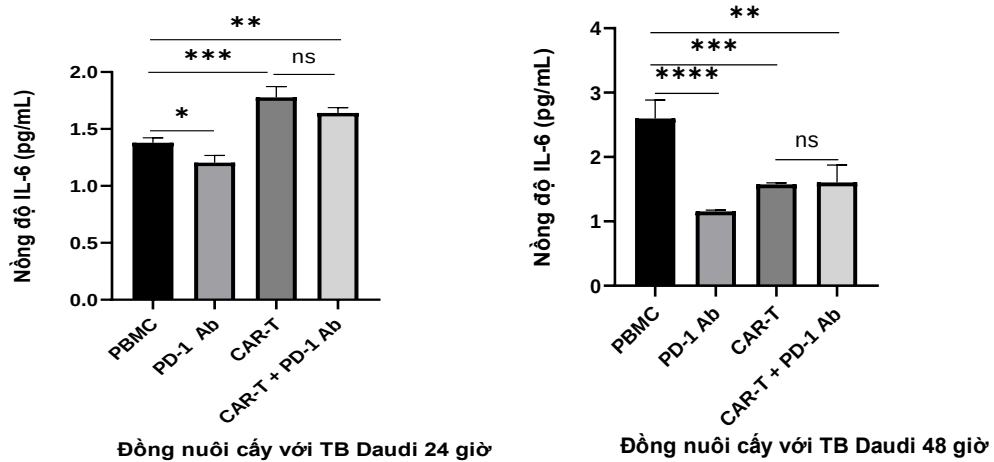
### 3.2.2. Thay đổi nồng độ cytokin được giải phóng ở môi trường nuôi cấy tế bào

#### \* Nồng độ IL-6:

**Bảng 3. 10.** Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Daudi

| Nhóm                     | Nồng độ IL-6 (pg/mL) |             | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|----------------------|-------------|----------------|
|                          | 24 giờ               | 48 giờ      |                |
| <b>PBMC</b>              | 1,37 ± 0,04          | 2,59 ± 0,28 | 0,019          |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 1,2 ± 0,06           | 1,15 ± 0,02 | 0,272          |
| <b>CAR-T</b>             | 1,77 ± 0,09          | 1,57 ± 0,02 | 0,082          |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 1,64 ± 0,04          | 1,6 ± 0,27  | 0,861          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | < 0,001              | < 0,001     |                |

# *paired-sample T test*; &*ANOVA test*



**Hình 3. 21.** So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ )

Bảng 3.10 cho thấy nồng độ IL-6 không có sự khác biệt giữa 2 thời điểm 24 giờ và 48 giờ ở các nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab ( $p > 0,05$ ). Nhóm PBMC có nồng độ IL-6 sau 48 giờ tăng có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 24 giờ ( $p = 0,019$ ).

So sánh nồng độ IL-6 của 4 nhóm kết quả hình 3.21 cho thấy tại thời điểm 24 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào Daudi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ) so với nhóm PBMC (nhóm chứng) và nhóm PD-1 Ab. Nhóm PD-1 Ab có nồng độ IL-6 thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm PBMC ( $p < 0,001$ ).

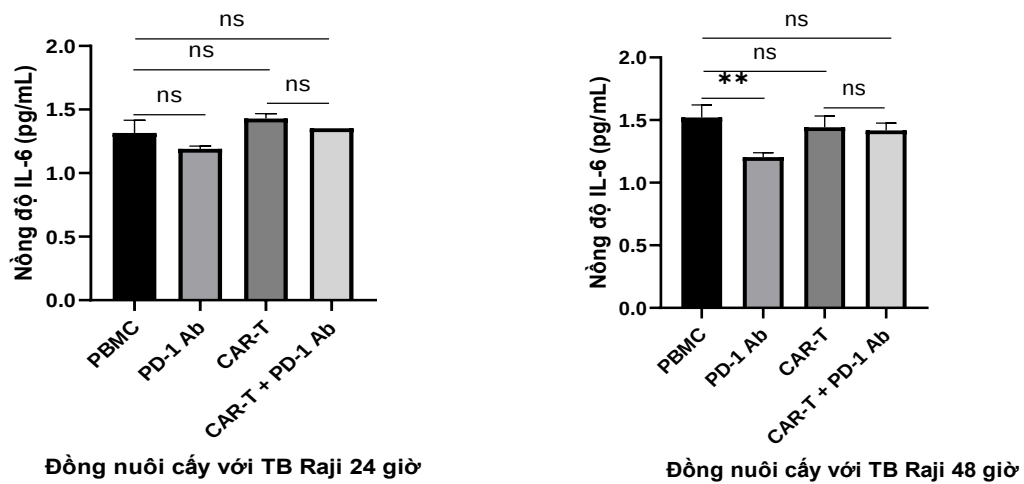
Sau 48 giờ nồng độ IL-6 trong dịch khi đồng nuôi cấy với tế bào ung thư Daudi có CD19+ với tế bào CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nhóm tế bào PBMC (nhóm chứng).

Cả 2 thời điểm đều không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nồng độ IL-6 giữa nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3. 11.** Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Raji

| Nhóm                     | Nồng độ IL-6 (pg/mL) |             | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|----------------------|-------------|----------------|
|                          | 24 giờ               | 48 giờ      |                |
| <b>PBMC</b>              | 1,31 ± 0,1           | 1,52 ± 0,09 | 0,208          |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 1,19 ± 0,02          | 1,2 ± 0,03  | 0,423          |
| <b>CAR-T</b>             | 1,42 ± 0,03          | 1,44 ± 0,09 | 0,738          |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 1,35 ± 0,001         | 1,41 ± 0,05 | 0,199          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | 0,005                | 0,005       |                |

# *paired-sample T test*; & *ANOVA test*



Hình 3.22. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB Raji ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ )

Khi đồng nuôi cấy TB Raji với 4 nhóm TB PBMC, PD-1 Ab, CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp với PD-1 Ab thì nồng độ IL-6 không có sự khác biệt giữa 2 thời điểm 24 giờ và 48 giờ (Bảng 3.11).

Kết quả hình 3.22 cho thấy tại thời điểm 24 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Raji đều cao hơn nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của nhóm tế bào PBMC. Nồng độ IL-6 nhóm PD-1 Ab giảm so với nhóm PBMC nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

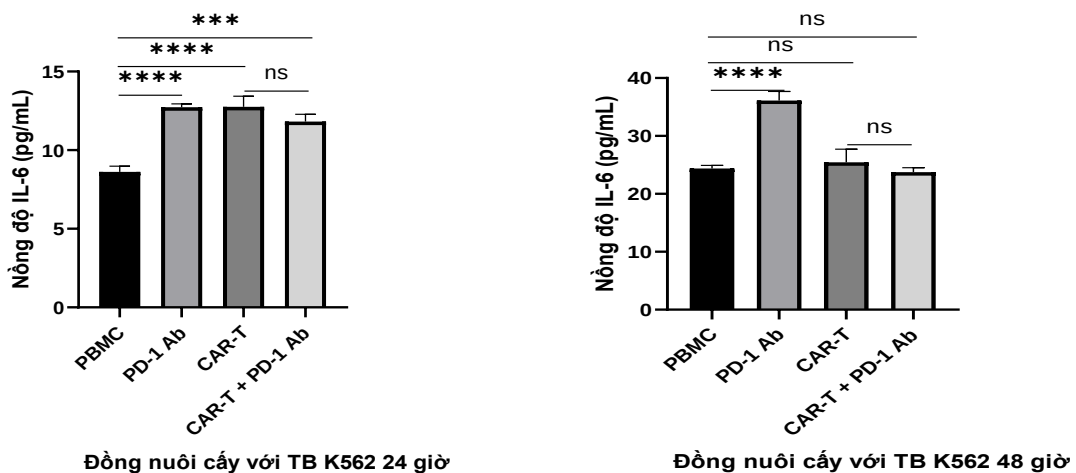
Tại thời điểm 48 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Raji không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của nhóm tế bào PBMC.

Cả hai thời điểm đều không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê nồng độ IL-6 giữa nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3. 12.** Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào K562

| Nhóm                     | Nồng độ IL-6 (pg/mL) |              | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|----------------------|--------------|----------------|
|                          | 24 giờ               | 48 giờ       |                |
| <b>PBMC</b>              | 8,61 ± 0,36          | 24,39 ± 0,5  | < 0,001        |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 12,73 ± 0,2          | 36,12 ± 1,54 | 0,002          |
| <b>CAR-T</b>             | 12,76 ± 0,66         | 25,43 ± 2,28 | 0,006          |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 11,81 ± 0,46         | 23,76 ± 0,76 | 0,003          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | < 0,001              | < 0,001      |                |

# *paired-sample T test*; & *ANOVA test*



Hình 3.23. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-6 khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

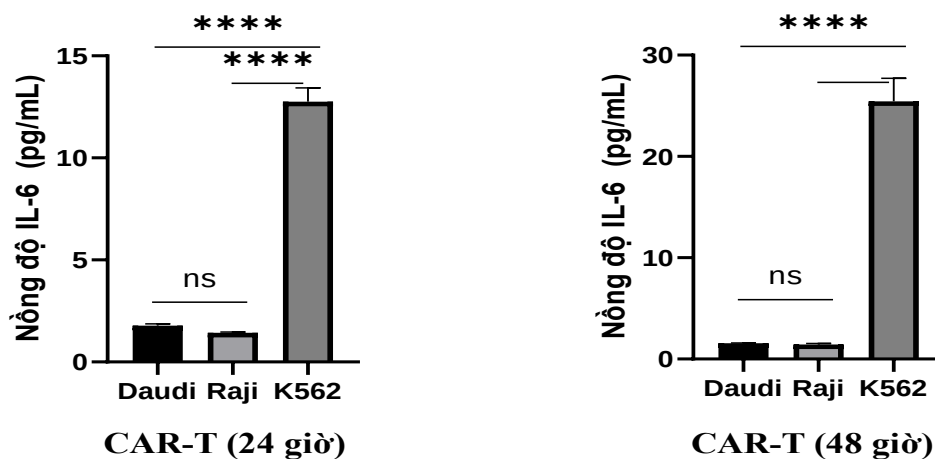
(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Bảng 3.12 cho thấy khi đồng nuôi cấy TB K562 với 4 nhóm thì nồng độ IL-6 ở thời điểm 48 giờ tăng có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 24 giờ ( $p < 0,01$ ).

Hình 3.23 cho thấy tại thời điểm 24 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T, PD-1 Ab và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ

IL-6 trong dịch nuôi cấy của nhóm PBMC. Và tại thời điểm 48 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của nhóm chứng tế bào PBMC.

Cả hai thời điểm 24 và 48 giờ thì nồng độ IL-6 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

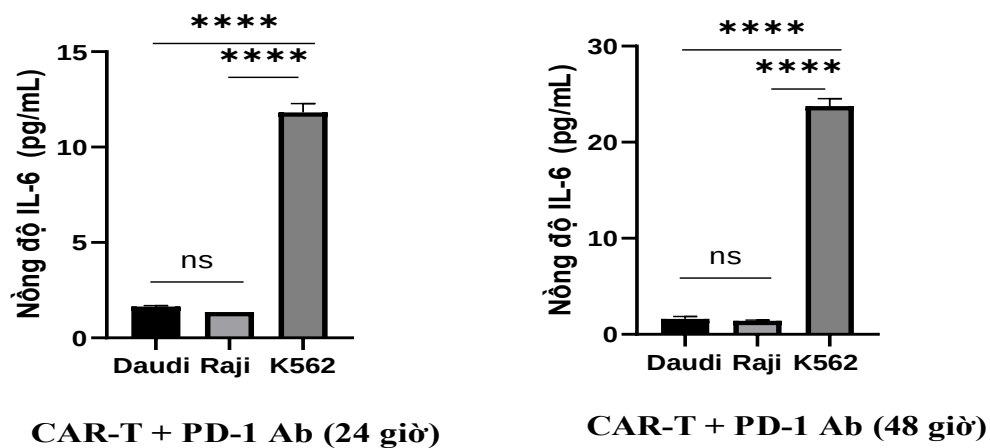


Hình 3. 24. So sánh khả năng bài tiết IL-6 của TB CAR-T đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19<sup>+</sup> (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với tế bào CD19<sup>-</sup> (K562).





Hình 3. 25. So sánh khả năng bài tiết IL-6 của TB CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ  
(*ns*:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

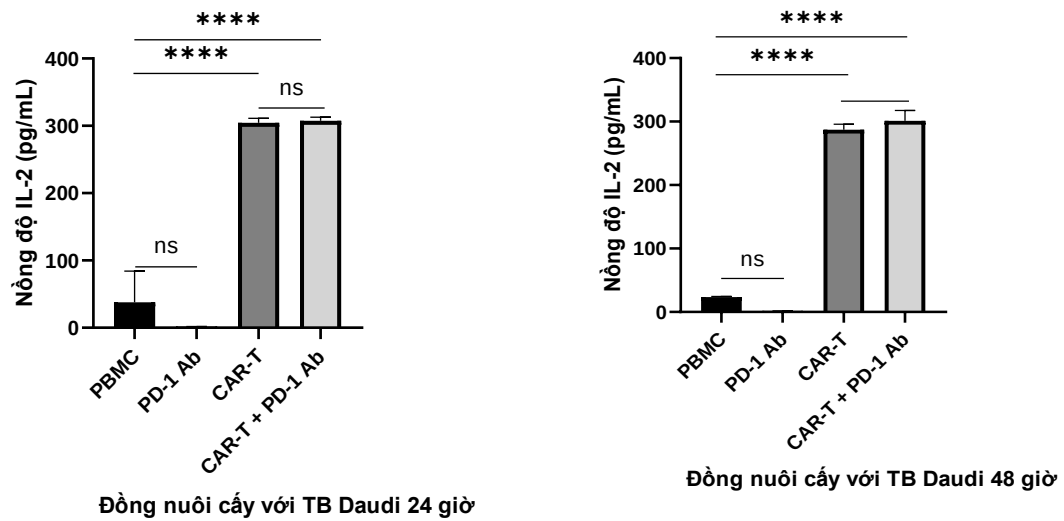
Nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với tế bào CD19- (K562).

#### \* Nồng độ IL-2:

**Bảng 3. 13.** Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm NC đồng nuôi cấy với tế bào Daudi

| Nhóm                     | Nồng độ IL-2 (pg/mL) |                | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|----------------------|----------------|----------------|
|                          | 24 giờ               | 48 giờ         |                |
| <b>PBMC</b>              | 37,74 ± 46,55        | 23,56 ± 0,86   | 0,645          |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 1,73 ± 0,11          | 1,68 ± 0,07    | 0,685          |
| <b>CAR-T</b>             | 304,53 ± 6,69        | 287,17 ± 8,7   | 0,06           |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 307,51 ± 5,42        | 301,01 ± 16,51 | 0,658          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | < 0,001              | < 0,001        |                |

# *paired-sample T test*; & *ANOVA test*



Hình 3.26. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ  
(*ns*:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Khi đồng nuôi cấy TB Daudi với 4 nhóm thì nồng độ IL-2 không có sự khác biệt giữa 2 thời điểm 24 giờ và 48 giờ (Bảng 3.13).

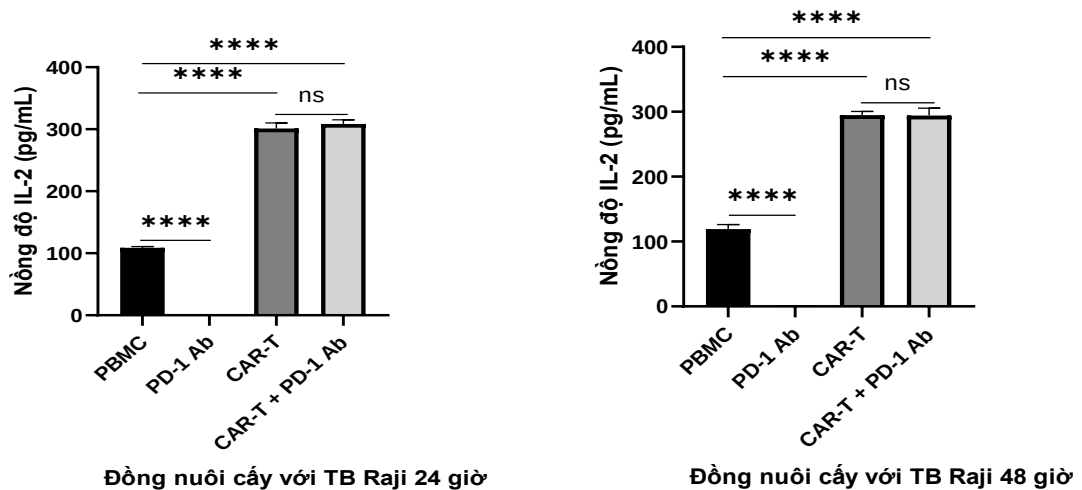
Hình 3.26 cho thấy tại 2 thời điểm 24 và 48 giờ nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của nhóm tế bào PBMC.

Nồng độ IL-2 của nhóm PBMC cao hơn nhóm PD-1 Ab nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở cả 2 thời điểm ( $p > 0,05$ ). Và cả 2 thời điểm 24 và 48 giờ thì nồng độ IL-2 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab cũng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3.14.** Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Raji

| Nhóm                     | Nồng độ IL-2 (pg/mL) |                | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|----------------------|----------------|----------------|
|                          | 24 giờ               | 48 giờ         |                |
| <b>PBMC</b>              | 108,72 ± 2,19        | 119,07 ± 6,97  | 0,126          |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 1,91 ± 0,02          | 1,71 ± 0,04    | 0,023          |
| <b>CAR-T</b>             | 301,2 ± 8,86         | 294,84 ± 5,82  | 0,397          |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 308,47 ± 6,76        | 294,18 ± 11,35 | 0,299          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | < 0,001              | < 0,001        |                |

# *paired-sample T test*; & *ANOVA test*



Hình 3.27. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB Raji ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Bảng 3.14 cho kết quả khi đồng nuôi cấy TB Raji với 3 nhóm PBMC, CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab thì nồng độ IL-2 không có sự khác biệt giữa hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Nhóm bổ sung kháng thể kháng PD-1 thời điểm 48 giờ giảm có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 24 giờ ( $p = 0,023$ ).

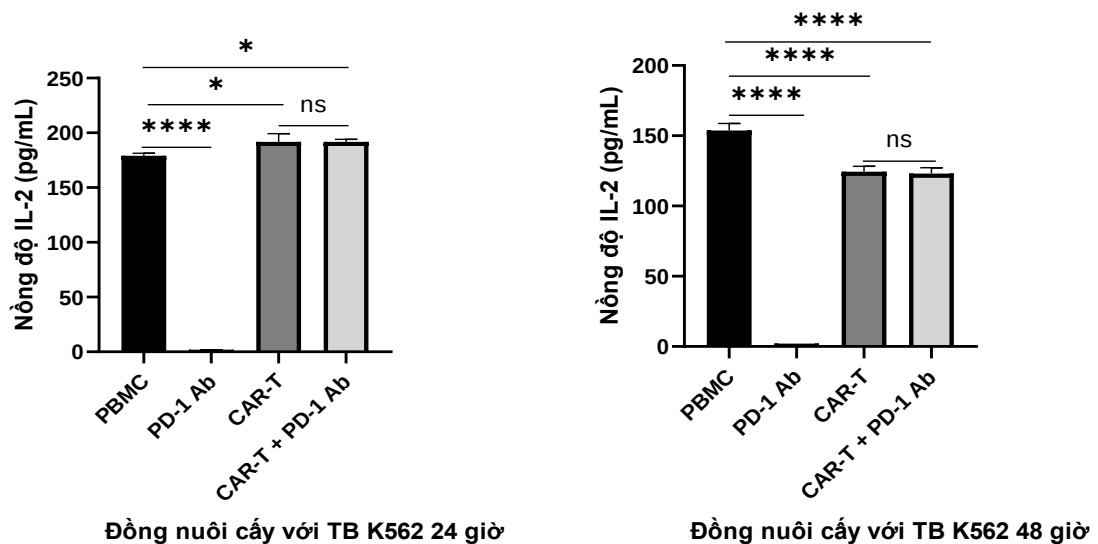
Hình 3.27 cho thấy tại thời điểm 24 và 48 giờ nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Raji đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của nhóm tế bào PBMC.

Có sự khác biệt giữa nồng độ IL-2 của nhóm PBMC so với nhóm PD-1 Ab ( $p < 0,0001$ ). Và cả hai thời điểm 24 và 48 giờ thì nồng độ IL-2 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab cũng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3. 15.** Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm NC đồng nuôi cấy với tế bào K562

| Nhóm                     | Nồng độ IL-2 (pg/mL) |               | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|----------------------|---------------|----------------|
|                          | 24 giờ               | 48 giờ        |                |
| <b>PBMC</b>              | 179,0 ± 2,26         | 153,82 ± 4,90 | 0,007          |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 1,95 ± 0,11          | 2,05 ± 0,03   | 0,251          |
| <b>CAR-T</b>             | 191,76 ± 7,56        | 124,38 ± 3,95 | 0,001          |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 191,83 ± 2,16        | 123,06 ± 4,25 | 0,002          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | < 0,001              | < 0,001       |                |

# *paired-sample T test*; & *ANOVA test*



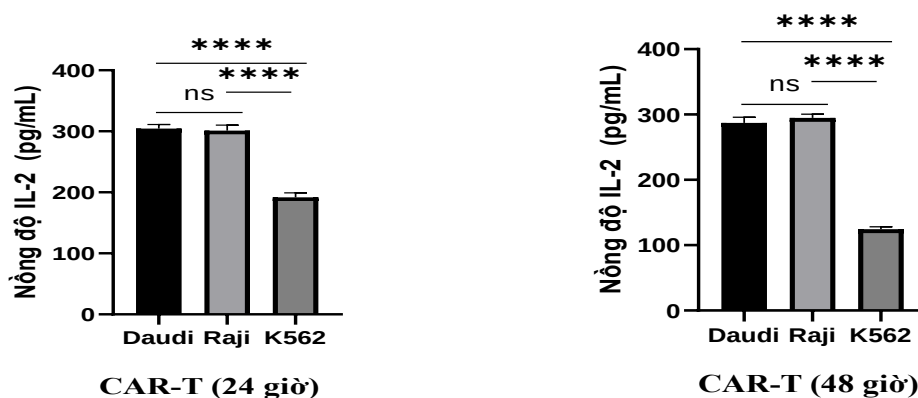
Hình 3.28. So sánh khả năng bài tiết cytokin IL-2 khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Khi đồng nuôi cấy TB K562 với 3 nhóm PBMC, CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab thì nồng độ IL-2 thời điểm 48 giờ giảm so với thời điểm 24 giờ, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,01$ ). Nhóm bổ sung kháng thể kháng PD-1 thì nồng độ IL-2 không có sự khác biệt giữa hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ ( $p = 0,251$ ) (Bảng 3.15).

Thời điểm 24 giờ nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của nhóm tế bào PBMC. Ngược lại tại thời điểm 48 giờ thì nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 giảm thấp hơn rõ rệt so với nồng độ IL-2 trong dịch đồng nuôi cấy với tế bào PBMC ( $p < 0,0001$ ).

Nồng độ IL-2 của nhóm PBMC cao hơn nhóm PD-1 Ab có ý nghĩa thống kê ở cả hai thời điểm ( $p < 0,0001$ ). Và cả hai thời điểm 24 và 48 giờ thì nồng độ IL-2 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab cũng khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

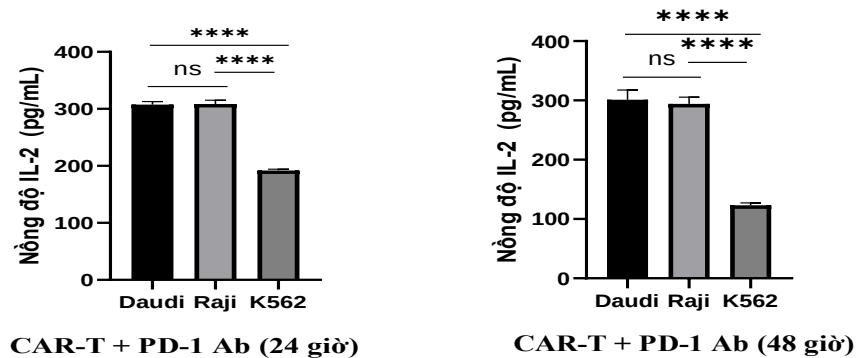


Hình 3. 29. So sánh khả năng bài tiết IL-2 của TB CAR-T đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều

cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với tế bào CD19- (K562).



Hình 3.30. So sánh khả năng bài tiết IL-2 của TB CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

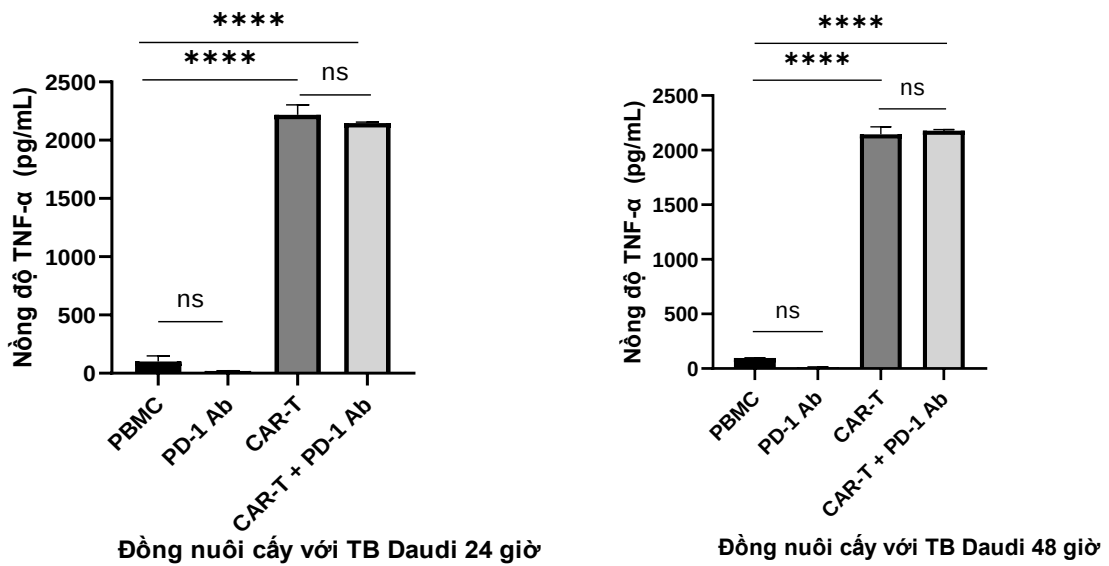
Nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ IL-2 trong dịch đồng nuôi cấy tế bào CAR-T với tế bào CD19- (K562).

#### \* Nồng độ TNF- $\alpha$ :

**Bảng 3. 16.** Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm NC đồng nuôi cấy với tế bào Daudi

| Nhóm               | Nồng độ TNF- $\alpha$ (pg/mL) |                     | p <sup>#</sup> |
|--------------------|-------------------------------|---------------------|----------------|
|                    | 24 giờ                        | 48 giờ              |                |
| PBMC               | 101,11 $\pm$ 48,11            | 97,19 $\pm$ 1,35    | 0,902          |
| PD-1 Ab            | 20,82 $\pm$ 1,24              | 12,29 $\pm$ 2,49    | 0,192          |
| CAR-T              | 2218,56 $\pm$ 84,72           | 2145,43 $\pm$ 69,09 | 0,349          |
| CAR-T + PD-1 Ab    | 2147,0 $\pm$ 7,95             | 2178,56 $\pm$ 9,84  | 0,085          |
| p <sup>&amp;</sup> | < 0,001                       | < 0,001             |                |

# paired-sample T test; &ANOVA test



Hình 3.31. So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- $\alpha$  khi đồng nuôi cấy với TB Daudi ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Kết quả bảng 3.16 cho thấy khi đồng nuôi cấy TB Daudi với 4 nhóm thì nồng độ TNF- $\alpha$  không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 thời điểm 24 giờ và 48 giờ ( $p > 0,05$ ).

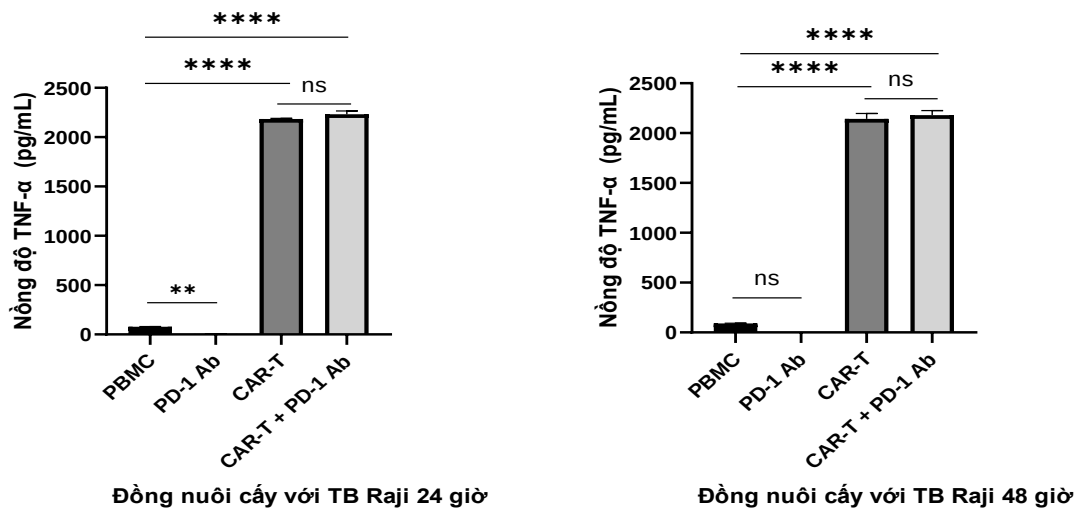
Sau cả hai thời điểm 24 và 48 giờ kết quả cho thấy nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào Daudi đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của nhóm chứng tế bào PBMC.

Nồng độ TNF- $\alpha$  của nhóm PBMC cao hơn nhóm PD-1 Ab tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở cả hai thời điểm. Và cả hai thời điểm 24 và 48 giờ thì nồng độ IL-2 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab cũng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3. 17.** Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào Raji

| Nhóm                     | Nồng độ TNF- $\alpha$ (pg/mL) |                     | p <sup>#</sup> |
|--------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------|
|                          | 24 giờ                        | 48 giờ              |                |
| <b>PBMC</b>              | 77,78 $\pm$ 2,37              | 90,13 $\pm$ 2,44    | 0,04           |
| <b>PD-1 Ab</b>           | 5,23 $\pm$ 1,17               | 3,27 $\pm$ 0,67     | 0,199          |
| <b>CAR-T</b>             | 2184,64 $\pm$ 6,78            | 2142,09 $\pm$ 53,88 | 0,31           |
| <b>CAR-T + PD-1 Ab</b>   | 2232,88 $\pm$ 33,33           | 2179,74 $\pm$ 45,29 | 0,317          |
| <b>p<sup>&amp;</sup></b> | < 0,001                       | < 0,001             |                |

# *paired-sample T test*; & *ANOVA test*



Hình 3.32. So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- $\alpha$  khi đồng nuôi cấy với TB Raji ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Khi đồng nuôi cấy TB Raji với 3 nhóm TB CAR-T, kháng thể kháng PD-1 và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 thì nồng độ TNF- $\alpha$  không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ ( $p > 0,05$ ). Nhóm PBMC có nồng độ TNF- $\alpha$  thời điểm 48 giờ tăng có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 24 giờ ( $p = 0,04$ ) (Bảng 3.17).

Kết quả cho thấy tại thời điểm 24 và 48 giờ nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy



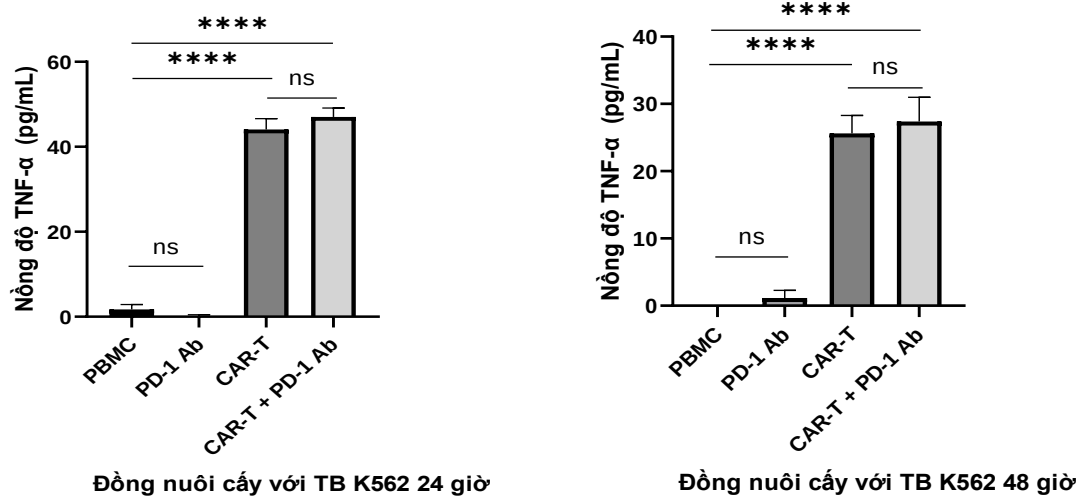
với tế bào Raji đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch đồng nuôi cấy với tế bào PBMC.

Cả hai thời điểm 24 và 48 giờ thì nồng độ IL-6 của nhóm CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).

**Bảng 3. 18.** Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy tế bào của 4 nhóm nghiên cứu đồng nuôi cấy với tế bào K562

| Nhóm               | Nồng độ TNF- $\alpha$ (pg/mL) |                  | p <sup>#</sup> |
|--------------------|-------------------------------|------------------|----------------|
|                    | 24 giờ                        | 48 giờ           |                |
| PBMC               | 1,70 $\pm$ 1,17               | 0                | 0,129          |
| PD-1 Ab            | 0,17 $\pm$ 0,3                | 1,13 $\pm$ 1,14  | 0,361          |
| CAR-T              | 44,05 $\pm$ 2,56              | 25,62 $\pm$ 2,65 | 0,014          |
| CAR-T + PD-1 Ab    | 47,0 $\pm$ 2,12               | 27,39 $\pm$ 3,59 | 0,002          |
| p <sup>&amp;</sup> | < 0,001                       | < 0,001          |                |

# paired-sample T test; & ANOVA test



Hình 3. 33. So sánh khả năng bài tiết cytokin TNF- $\alpha$  khi đồng nuôi cấy với TB K562 ở 4 nhóm sau 24 và 48 giờ

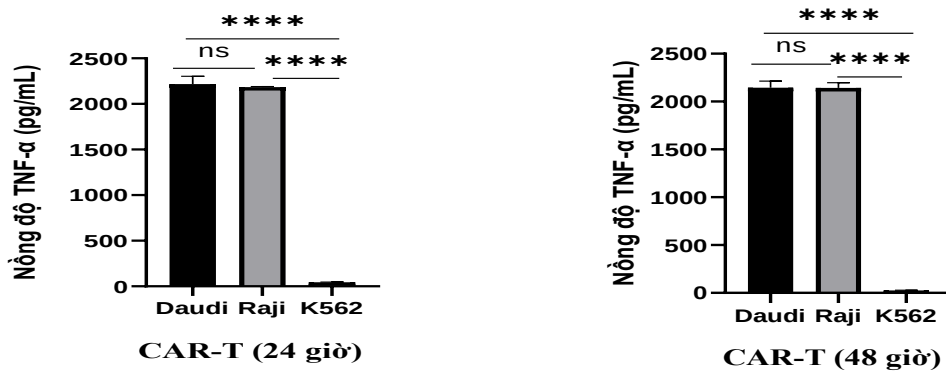
(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Bảng 3.18 cho thấy khi đồng nuôi cấy TB K562 với TB PBMC và kháng thể kháng PD-1 thì nồng độ TNF- $\alpha$  không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ ( $p > 0,05$ ). Tuy nhiên nồng độ TNF- $\alpha$  có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai thời điểm ở hai nhóm

đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 ( $p < 0,05$ ).

Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với tế bào K562 tại cả hai thời điểm đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của nhóm chứng PBMC. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nồng độ TNF- $\alpha$  của nhóm PBMC và nhóm PD-1 Ab ( $p > 0,05$ ).

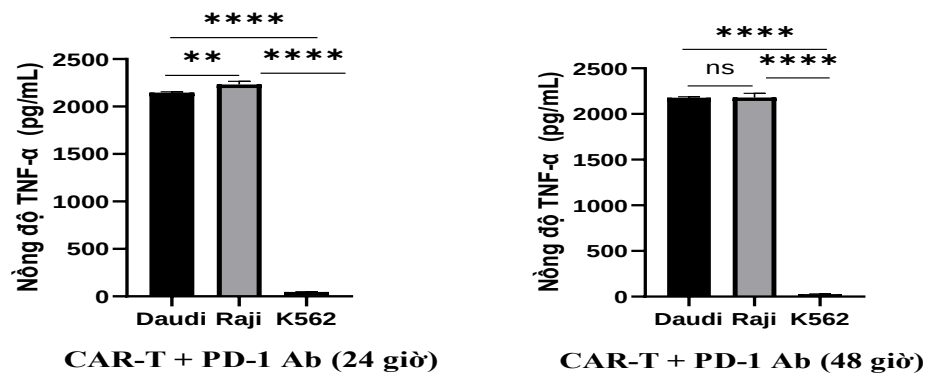
- Kết quả so sánh khả năng bài tiết TNF- $\alpha$  của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 với ba nhóm tế bào ung thư bạch cầu ở thời điểm 24 và 48 giờ:



Hình 3. 34. So sánh khả năng bài tiết TNF- $\alpha$  của TB CAR-T đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ )

Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ) so với nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với tế bào CD19- (K562). Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ là Raji và Daudi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ).



Hình 3. 35. So sánh khả năng bài tiết TNF- $\alpha$  của TB CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đồng nuôi cấy với TB ung thư bạch cầu sau 24 và 48 giờ

(ns:  $p > 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )

Nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 và 48 giờ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ TNF- $\alpha$  khi đồng nuôi cấy tế bào CAR-T với tế bào CD19- (K562).

## **Chương 4**

### **BÀN LUẬN**

#### **4.1. CHẤT LƯỢNG KHỐI TẾ BÀO CAR-T VÀ TÍNH AN TOÀN CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1**

##### **4.1.1. Chất lượng của tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1**

Quy trình sản xuất trực tiếp tác động đến không chỉ tác dụng/chất lượng mà còn sự an toàn/độc tính của tất cả liệu pháp/liệu trình/được chất, trong đó bao gồm liệu pháp tế bào CAR-T. Tế bào CAR-T phải đạt các tiêu chuẩn GMP (Good Manufacturing Practices) là tiêu chuẩn thực hành sản xuất tốt, với quy trình sản xuất, chế tạo có kiểm soát để có khả năng ứng dụng được trong điều trị lâm sàng. Do có sự khác biệt trong thiết kế CAR, chuyển gen, nuôi cấy tế bào và công nghệ tinh chế tế bào từ mỗi nhà sản xuất, nên việc kiểm soát chất lượng tế bào CAR-T phải tính đến quy trình sản xuất cụ thể và đặc tính sản phẩm. Là một “loại thuốc” sống, tế bào CAR-T có quy trình chuẩn bị phức tạp và yêu cầu kiểm soát chất lượng trong toàn bộ quy trình [116]. FDA hiện đang yêu cầu phải kiểm soát chất lượng của tế bào CAR-T tại các chỉ tiêu sau: độc tính, tính tiết trùng, độ tinh sạch. Các tiêu chí về tính tiết trùng và độ tinh sạch có thể được đánh giá dựa trên các phương pháp tiêu chuẩn đã được công bố [117]. Riêng liệu pháp tế bào CAR-T là sản phẩm được tạo mới trước khi sử dụng, vì vậy, chất lượng sản phẩm phụ thuộc trực tiếp vào quy trình sản xuất và chế tạo. Tuy nhiên, trong giới hạn nghiên cứu này của chúng tôi, các đặc điểm/chất lượng của khối tế bào được đánh giá giới ở mức độ thực nghiệm bước đầu.

Trong liệu pháp tế bào CAR-T, tế bào T được tách ra từ máu ngoại vi sau đó được chuyển các cấu trúc gen để tạo thành tế bào CAR-T, tế bào sau đó được tăng sinh và truyền ngược trở lại vào trong máu của bệnh nhân để tiêu

diệt các tế bào ung thư. Quá trình tách tế bào, chuyển gen và tăng sinh chúng luôn đòi hỏi phải bảo đảm độ tinh sạch, không nhiễm khuẩn, tạp chất để có thể an toàn khi truyền trở lại cơ thể bệnh nhân [118]. Ngoài ra trong quá trình chuyển nạp gen để biến tế bào T thành tế bào CAR-T có sử dụng các sản phẩm của công nghệ sinh học phân tử như các plasmid, minicircle, mRNA và quá trình sản xuất các nguyên liệu này cần phải thực hiện trên vi khuẩn *E.Coli*. Do đó sản phẩm cuối là các tế bào CAR-T luôn phải đảm bảo là không có các độc tố và không có bị nhiễm khuẩn, mRNA của *E.Coli* [119].

Kết quả nghiên cứu thực nghiệm của chúng tôi về môi trường tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đều có nồng độ nội độc tố  $< 0,1$  EU/ml. Kết quả cấy môi trường nuôi cấy chúng, nuôi cấy tế bào PBMC, tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 không có nhiễm vi khuẩn kị khí, hiếu khí. Điều này cho thấy quy trình nuôi cấy và thí nghiệm trong phòng thí nghiệm của chúng tôi đảm bảo tiêu chuẩn và thực hiện đúng kỹ thuật. Kết quả này là thỏa mãn được yêu cầu về chất lượng cho các sản phẩm thuộc dạng tiêm truyền cũng như phù hợp với các nghiên cứu trước đây về chất lượng của tế bào CAR-T [47]. Đây cũng là một bước quan trọng trước khi tiến hành thử nghiệm trên lâm sàng để đảm bảo an toàn trong quá trình điều trị.

Ngoài ra, sau quá trình chuyển nạp và nuôi cấy chúng tôi tiến hành đánh giá tỷ lệ biểu hiện của tế bào CAR- T bằng kỹ thuật Flow cytometry và biểu lộ của CAR trong tế bào T bằng kỹ thuật realtime PCR. Kết quả Flow cho thấy khoảng 26,13% tế bào T có biểu hiện CAR trên bề mặt của chúng, kết quả realtime PCR mẫu PBMC và nước không có biểu hiện nhưng mẫu tế bào CAR-T thì biểu hiện ở tất cả các cặp môi. Tế bào CAR-T được tăng sinh và lưu trữ cho những thí nghiệm tiếp theo.

#### **4.1.2. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T và CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm**

An toàn là điều quan trọng hàng đầu đối với mỗi phương pháp điều trị được áp dụng trên lâm sàng đặc biệt là đối với các bệnh nhân ung thư thì hầu hết đều có thể trạng rất yếu. Liệu pháp tế bào T thụ thể kháng nguyên chimeric (CAR) gần đây đã nổi lên như một tiêu chuẩn điều trị chăm sóc cho những bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu lympho cấp tính tái phát hoặc khó chữa (ALL) và một số phân nhóm của bệnh ung thư hạch không Hodgkin tế bào B (NHL). Tuy nhiên, việc sử dụng nó vẫn còn hạn chế ở các trung tâm chuyên môn cao, do sự phức tạp trong quản lý và các độc tính liên quan. Năm 2022 một nghiên cứu của Singh. H và cộng sự cho thấy không có tác dụng phụ nghiêm trọng nào được quy trực tiếp cho việc điều trị trong nghiên cứu. Ba bệnh nhân phát triển hội chứng giải phóng cytokin độ 1-2 và không có bệnh nhân nào trong nghiên cứu bị nhiễm độc thần kinh. Tất cả các mức liều đều được dung nạp tốt và không có độc tính giới hạn liều nào được báo cáo [120].

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành theo dõi đánh giá tính an toàn trên 4 nhóm chuột được tiêm một liều duy nhất PBS ở nhóm chứng, tế bào CAR-T với nồng độ  $10^6$  TB/chuột, kháng thể kháng PD-1 liều 250 $\mu$ g/chuột và  $10^6$  tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 liều 250 $\mu$ g/chuột. Cả 4 nhóm chuột trên đều được theo dõi, chăm sóc, vệ sinh và cho ăn uống với cùng một điều kiện như nhau. Sau tiêm, tiến hành theo dõi chuột hàng ngày thấy 100% số chuột ở các nhóm đều ăn uống, vận động bình thường, nhanh nhẹn, lông mượt, mắt trong, hậu môn khô, không thấy biểu hiện đi lỏng. Tại vị trí tiêm da chuột bình thường, không chảy máu, không nhiễm trùng. Tỷ lệ chuột sống ở 4 nhóm là 100% cho đến ngày cuối cùng của thí nghiệm.

Trước thí nghiệm, khối lượng trung bình cả 4 nhóm chuột thí nghiệm tương đương nhau. Sau đó chuột được cân 2 lần mỗi tuần để đánh giá sự thay đổi trọng lượng của từng nhóm. Theo dõi sau 4 tuần chúng tôi thấy trọng

lượng chuột ở các nhóm đều tăng so với trước thí nghiệm. Điều này cho thấy không thấy tác hại tổng thể của tế bào CAR-T và liệu pháp CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 trong thí nghiệm của chúng tôi. Trọng lượng chuột tại các thời điểm ngày 0, ngày 7, ngày 14, ngày 21 và ngày 28 ở các nhóm sử dụng tế bào CAR-T, kháng thể kháng PD-1 và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 tương tự như ở nhóm chứng.

Kết thúc thí nghiệm chúng tôi đã tiến hành mổ 100% chuột các nhóm và quan sát đại thể cơ quan không thấy có thay đổi bệnh lý nào về mặt đại thể của các cơ quan tim, phổi, gan, lách, tụy, thận và hệ thống tiêu hoá của chuột.

Như vậy, có thể nói sau 4 tuần nghiên cứu chúng tôi thấy liệu pháp tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 của chúng tôi không gây ảnh hưởng đến toàn trạng chung cũng như trọng lượng của các nhóm chuột nghiên cứu, chuột vẫn khỏe mạnh đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

Mặc dù liệu pháp tế bào CAR-T đã chứng minh được tính khả thi trong lâm sàng nhưng đôi khi liệu pháp này cũng gây nhiều độc tính có thể đe dọa tính mạng, như hội chứng giải phóng cytokin, gây độc thần kinh, tấn công nhằm đích và hội chứng suy hô hấp cấp. Và độc tính về huyết học vẫn là một vấn đề khó khăn trong điều trị. Liệu pháp CAR-T có thể gây giảm bạch cầu, giảm tiểu cầu và thiếu máu [121], [122]. Thường có khó khăn trong việc xác định nguyên nhân gây giảm tế bào máu xảy ra sau khi truyền tế bào CAR-T, vì hóa trị liệu gây giảm tế bào máu thường được thực hiện trước khi truyền tế bào CAR-T. Những bệnh nhân không được hóa trị liệu điều hòa cũng bị giảm tế bào máu sau khi truyền tế bào CAR-T, chứng tỏ rằng tế bào CAR-T gây ức chế tủy bằng cơ chế qua trung gian cytokin hoặc một số cơ chế khác [123]. Tần suất giảm bạch cầu trung tính, giảm tiểu cầu và thiếu máu sau khi truyền tế bào CAR-T lần lượt là 94%, 80% và 51%. Độc tính huyết học kéo dài, bao gồm giảm bạch cầu trung tính hoặc giảm tiểu cầu xảy ra không thể đoán trước ở 58% bệnh nhân sau  $\geq 30$  ngày được tiêm liệu pháp tế bào CAR-T [121]. Liệu pháp tế bào CAR-T gây ra 80%, 61%

và 68% giảm bạch cầu trung tính, giảm tiểu cầu và thiếu máu tương ứng [124]. Ngoài ra, thiếu máu, giảm tiểu cầu, giảm bạch cầu và giảm bạch cầu lympho cũng thường xuyên được báo cáo trong các nghiên cứu [123].

Một nghiên cứu của Li H. và cộng sự năm 2022 về độc tính huyết học kéo dài ở những bệnh nhân được điều trị bằng tế bào CAR-T BCMA/CD19 cho bệnh đa u tủy tái phát hoặc khó chữa (R/R MM - Relapsed or Refractory Multiple Myeloma) trên 54 bệnh nhân mắc bệnh R/R MM sau khi truyền kết hợp tế bào CAR-T kháng CD19 và tế bào CAR-T kháng BCMA. Kết quả cho thấy tỷ lệ giảm tế bào máu nặng rất cao, bao gồm giảm bạch cầu trung tính nặng (28/54, 52%), thiếu máu nặng (15/54, 28%) và giảm tiểu cầu nặng (18/54, 33%). Hơn nữa, tỷ lệ mắc độc tính huyết học kéo dài vào ngày thứ 28 sau truyền là 52% (28/54), bao gồm 46% đối với giảm bạch cầu trung tính nghiêm trọng, 30% đối với thiếu máu nặng và 31% đối với giảm tiểu cầu nặng. Bệnh nhân mắc độc tính huyết học kéo dài có tỷ lệ sống sót không tiến triển trung bình (PFS) và tỷ lệ sống sót chung (OS) kém hơn so với bệnh nhân không mắc độc tính huyết học kéo dài ( $p = 0,011$ ;  $p = 0,007$ ) [125]. Do vậy, độc tính huyết học kéo dài có liên quan đến kết quả kém sau điều trị tế bào CAR-T ở bệnh nhân đa u tủy. Việc phát hiện và quản lý sớm độc tính huyết học kéo dài sẽ có lợi cho việc ngăn ngừa các biến chứng đe dọa tính mạng và cải thiện khả năng sống sót của bệnh nhân sau khi điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T cũng như liệu pháp tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1.

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu của chuột một lần tại thời điểm sau 4 tuần khi kết thúc thí nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của các liệu pháp đến hệ thống tạo máu của chuột qua các chỉ số của dòng hồng cầu, dòng bạch cầu và dòng tiểu cầu. Tuy nhiên, sau quá trình xét nghiệm và tổng hợp kết quả để đánh giá chúng tôi không quan sát thấy bất thường nào về các chỉ số huyết học sau 4 tuần sử dụng liệu pháp tế bào CAR-T và liệu pháp kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1. Các kết



quả trên cho thấy sự an toàn của tế bào CAR-T trong thiết kế của chúng tôi và liệu pháp kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 trên hệ thống tạo máu ở chuột.

Mức độ tăng cao của hoạt tính AST, ALT và nồng độ Bilirubin đã được báo cáo sau khi truyền tế bào CAR-T, đặc biệt là ở những bệnh nhân mắc CRS. Tuy nhiên, những bất thường này nhanh chóng trở lại mức bình thường sau khi được can thiệp y tế [123]. Sự gia tăng của AST và ALT cũng được báo cáo sau khi điều trị bằng kháng thể kháng PD-1, nhưng với tỷ lệ thấp và mức độ nghiêm trọng hạn chế [126]. Hoạt tính của AST và ALT có thể so sánh được giữa nhóm đối chứng và nhóm điều trị, để đánh giá có tổn thương tế bào gan hay không được quan sát thấy sau điều trị. Để đánh giá độc tính của phương pháp điều trị trên gan chuột, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra hoạt tính AST và ALT trong huyết thanh chuột khi kết thúc thí nghiệm và xử lý phân tích mẫu mô bệnh học gan bằng phương pháp nhuộm H.E. Chúng tôi so sánh kết quả của mình so với khoảng tham chiếu của Silva-Santana G. và cộng sự đã báo cáo thì không thấy có sự thay đổi có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tăng, giảm hoạt tính AST và ALT huyết thanh của các nhóm điều trị so với nhóm chứng [114]. Như vậy có thể thấy rằng tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 không gây tổn thương tế bào gan. Tuy nhiên, chúng tôi thấy tỷ lệ thoái hóa hạt trên một số con chuột được điều trị và chủ yếu là chuột cái. Cụ thể, chuột cái có tỷ lệ thoái hóa hạt cao hơn 34,4% so với 10,7% của chuột đực. Ngoài ra, thoái hóa hạt được phát hiện ở 62,5% chuột cái được dùng liệu pháp tế bào CAR-T so với 0% chuột đực được dùng liệu pháp tế bào CAR-T, 37,5% chuột cái được sử dụng kháng thể kháng PD-1 so với 42,9% chuột đực được sử dụng kháng thể kháng PD-1, 37,5% chuột cái nhóm kết hợp so với chuột đực nhóm kết hợp là 0%. Không có tổn thương khác nào được phát hiện trên hình ảnh vi thể của gan chuột trong thí nghiệm của chúng tôi.

Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sử dụng liệu pháp tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 không làm thay đổi hoạt tính AST và ALT huyết thanh nhưng gây thoái hóa hạt ở gan chuột với ưu thế là ở chuột cái. Tuy nhiên, với thiết kế nghiên cứu này chúng tôi chưa kiểm tra được quá trình phục hồi sau đó. Do đó, việc theo dõi lâu dài hơn có thể sẽ rất hữu ích để làm rõ tiến trình của thoái hóa hạt ở gan chuột và có phương pháp loại bỏ độc tính trên gan chuột trong quá trình điều trị. Như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi chưa thấy tế bào CAR-T mang thụ thể kháng CD19 cũng như liệu pháp tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 gây độc cho gan của các nhóm chuột nghiên cứu.

Tổn thương thận cấp tính sau khi truyền tế bào CAR-T là do nhiều yếu tố và hầu như luôn hồi phục. Giảm tưới máu thận thường là nguyên nhân quan trọng nhất gây tổn thương thận. Giảm tưới máu thận có thể do giãn mạch qua trung gian cytokin, giảm cung lượng tim hoặc mất nước trong lòng mạch do sốt cao [123]. Kháng thể kháng PD-1 thúc đẩy độc tính trên thận và độc tính trên thận của nó càng trầm trọng hơn trong hóa trị liệu kết hợp. Viêm thận kẽ đã được báo cáo với cả liệu pháp kháng PD-1 đơn độc và kết hợp với Ipilimumab. Ba trường hợp suy thận cấp độ 3 đã được báo cáo trong nghiên cứu pha I về Nivolumab kết hợp với hóa trị liệu song song trong ung thư phổi không phải tế bào nhỏ giai đoạn tiến triển. Diễn biến lâm sàng thường không có triệu chứng, nồng độ Creatinin máu tăng dần và hầu hết bệnh nhân đều cải thiện khi sử dụng Corticosteroid [126]. Một nghiên cứu theo dõi 8 tháng sau khi điều trị bằng tế bào CAR-T cho thấy 30% người nhận đang phát triển bất thường ở thận cấp tính, trong đó, 74% là độ I và tất cả đều hồi phục hoàn toàn trong vòng 30 ngày [127]. Như vậy, có thể thấy tổn thương thận cấp sau truyền tế bào CAR-T xảy ra với tỷ lệ mắc cao nhưng ở mức độ nhẹ và có khả năng hồi phục tốt.

Để kiểm tra độc tính của phương pháp điều trị trên thận chuột, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra nồng độ Urê và Creatinin trong huyết thanh chuột khi kết

thức thí nghiệm và xử lý phân tích mẫu mô bệnh học thận bằng phương pháp nhuộm H.E sau đó tiến hành đọc, phân tích hình thái mô bệnh học thận chuột. Kết quả của chúng tôi cho thấy không có bất thường về nồng độ Urê và Creatinin sau khi điều trị cũng như hình ảnh mô bệnh học thận của 100% số chuột của các nhóm nghiên cứu đều bình thường. Mặc dù giá trị trung bình của nồng độ Creatinin tăng ở nhóm CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng nhưng các chỉ số này vẫn trong giới hạn bình thường. Nồng độ Creatinin huyết thanh của tất cả chuột trong các nhóm nghiên cứu đều nằm trong khoảng giới hạn của chuột ( $35,37 \pm 8,84 \mu\text{mol/L}$ ) theo nghiên cứu của Stephen và cộng sự năm 2004 [115]. Kết quả mô bệnh học các nhóm chuột trong thí nghiệm của chúng tôi cũng cho thấy hình thái vi thể thận ở các nhóm điều trị không có sự khác biệt so với nhóm chứng, nhu mô thận bình thường, các tế bào biểu mô ống thận không bị thoái hóa. Như vậy cũng có thể thấy liệu pháp tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 trong nghiên cứu của chúng tôi không gây độc tính và tổn thương thận cấp trên các nhóm chuột nghiên cứu.

Các tế bào lympho T sở hữu thụ thể tế bào T đặc hiệu, nhạy cảm và liên tục tìm kiếm các tín hiệu ung thư, qua đó kích thích đáp ứng miễn dịch liên tiếp khi xác định được các kháng nguyên ung thư. Tuy nhiên, tế bào T thông thường chỉ có thể tấn công yếu ớt hoặc không thể chống lại tế bào ung thư đã bị biến đổi do: tính sinh kháng nguyên nghèo nàn, không biểu hiện kiểu hình rõ ràng và khả năng tương tác và ức chế đáp ứng miễn dịch cao của các tế bào biến đổi [37]. Do vậy thụ thể kháng nguyên dạng khảm (Chimeric Antigen Receptors, CARs) đã được phát triển để kích thích và hoạt hoá đáp ứng của tế bào T chống lại tế bào ung thư [37], [128]. Tế bào T biểu hiện CARs (CAR-T cells) có tiềm năng chống lại các bệnh ung thư máu. Hàng loạt các thử nghiệm lâm sàng sử dụng CAR-T CD19 cho thấy tỷ lệ đáp ứng từ 50 - 90% đối với ung thư tế bào lympho B không kiểm soát được bằng các liệu pháp thông thường

[38], [39], [40], [129]. Cơ chế tác động chính của tế bào CAR-T là do CAR chuyển các tín hiệu nhận dạng kháng nguyên thành một thác truyền tín hiệu tác động lên các chức năng đáp ứng của tế bào T như: tiết các nhân tố gây độc, các cytokin tiền viêm.

Viêm hệ thống là tác dụng không mong muốn phổ biến, thường gặp của liệu pháp tế bào CAR-T. Hội chứng đáp ứng viêm hệ thống là các dấu hiệu lâm sàng tạo ra do kích hoạt toàn bộ hệ thống miễn dịch của cơ thể. Nói cách khác, nó là một phản ứng viêm thông thường, là một đáp ứng của cơ thể đối với các tổn thương không đặc hiệu như kích thích hoá học, chấn thương hoặc là nhiễm trùng. Tiến trình viêm là một tiến trình phức tạp liên quan đến các đáp ứng thể dịch và tế bào, bỏ thể, sản xuất các cytokin. Phản ứng viêm trong cơ thể được khởi phát, điều hòa bởi cytokin tiền viêm như IL-6 và TNF- $\alpha$  [130]. IL-6 là một cytokin đa chức năng, đóng cả vai trò gây viêm và chống viêm ở người [131]. IL-6 được sản xuất trong nhiều loại mô, bao gồm bạch cầu hoạt hóa, các tế bào nội mô và tế bào mỡ, nó giúp điều chỉnh các phản ứng miễn dịch. Tiến hành xét nghiệm đo nồng độ IL-6 trong máu rất hữu ích cho việc chẩn đoán một dấu hiệu kích hoạt hệ thống miễn dịch.

Kết quả trong nghiên cứu này của chúng tôi, sau 4 tuần tiêm tế bào CAR-T, kháng thể kháng PD-1 thì xét nghiệm nồng độ IL-2 và IL-6 trong máu chuột ở nhóm CAR-T không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Nhóm CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 nồng độ IL-2 và IL-6 giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng. Nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận sự khác biệt nồng độ TNF- $\alpha$  huyết tương ở nhóm chuột điều trị đơn liệu pháp bằng CAR-T hoặc kháng thể kháng PD-1, gợi ý sự an toàn của tế bào CAR-T được phát triển trong labo nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên, điều trị phối hợp CAR-T và kháng thể kháng PD-1 gây tăng cao nồng độ TNF- $\alpha$  so với các nhóm chứng và điều trị đơn liệu pháp tế bào CAR-T, kháng thể kháng PD-1. Kết quả gợi ý về nguy cơ xảy ra hội chứng giải phóng cytokin quá mức khi ứng dụng liệu pháp

miễn dịch kết hợp kích hoạt các tế bào T và kháng thể kháng PD-1. Những liệu pháp này kích hoạt một phản ứng viêm miễn dịch quá mức do sự giải phóng các cytokin. TNF- $\alpha$  được sản xuất bởi nhiều loại tế bào khác nhau bao gồm đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính, tế bào T và tế bào NK [68]. Bên cạnh đó sự hoạt hóa tế bào T dẫn đến việc giải phóng TNF- $\alpha$  chịu trách nhiệm kích hoạt hệ thống bạch cầu đơn nhân / đại thực bào và liên quan đến sự gia tăng đáng kể hội chứng giải phóng cytokin cấp. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi thấy sau quá trình điều trị theo dõi chuột 4 tuần thì toàn bộ chuột vẫn ăn uống, hoạt động bình thường, khỏe mạnh đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

Do vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tế bào CAR-T với nồng độ  $10^6$  TB/chuột và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 liều 250 $\mu$ g/chuột không gây tác dụng phụ trên động vật thực nghiệm sau 4 tuần theo dõi. Tuy nhiên, có thể cần phải theo dõi lâu hơn để đánh giá tác dụng của chúng đối với gan để đưa ra hướng điều trị phù hợp đối với tác dụng phụ của liệu pháp điều trị này.

## **4.2. TÁC DỤNG KHÁNG TẾ BÀO DÒNG UNG THƯ BẠCH CẦU CỦA KHỐI TẾ BÀO CAR-T PHỐI HỢP VỚI KHÁNG THỂ KHÁNG PD-1**

### **4.2.1. Đánh giá tác dụng ly giải tế bào *in vitro***

Bệnh bạch cầu cấp dòng lympho là bệnh ung thư nhi khoa phổ biến nhất với khoảng 6.000 trường hợp được chẩn đoán hàng năm ở Hoa Kỳ, chiếm gần 25% số ca chẩn đoán ung thư ở trẻ em. Dựa trên đặc điểm kiểu hình miễn dịch, bệnh bạch cầu cấp dòng lympho được phân loại thành là bệnh bạch cầu cấp dòng lympho B hoặc lympho T, trong đó bệnh bạch cầu cấp dòng lympho chiếm khoảng 85% trường hợp. Trong nửa thế kỷ qua, tỷ lệ sống sót toàn bộ (OS) 5 năm đã được cải thiện đáng kể lên trên 90% ở các nước có thu nhập cao nhờ việc triển khai các phương pháp theo dõi bệnh và chẩn đoán cải tiến, tối ưu hóa các phác đồ hóa trị liệu phân tầng nguy cơ đa tác nhân và chăm sóc hỗ trợ tốt hơn. Tuy nhiên, khoảng 10 - 15% bệnh nhân vẫn tái phát và 2% không

đáp ứng với liệu pháp tấn công. Mục tiêu trong thập kỷ tới là cải thiện khả năng sống sót hơn nữa lên 100% và giảm thiểu tác dụng phụ liên quan đến điều trị [132], [133]. Do đó, các phương pháp điều trị mới là cần thiết để cải thiện khả năng sống sót ở những bệnh nhân mắc bệnh tái phát hoặc khó chữa. Điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T CD19 có tỷ lệ thuyên giảm cao, ngay cả ở những bệnh nhân đã thất bại trong việc ghép tế bào gốc và đã quan sát thấy tình trạng thuyên giảm kéo dài lên đến 24 tháng [129]. CD19 là một glycoprotein xuyên màng cần thiết cho sự phát triển tế bào lympho B bình thường ở người và được biểu hiện trên bề mặt tế bào trong tất cả các giai đoạn biệt hóa tế bào lympho B. CD19 là mục tiêu điều trị hấp dẫn vì nó được biểu hiện ở trên 95% khối u ác tính của tế bào lympho B bao gồm bệnh bạch cầu cấp dòng lympho B, bệnh bạch cầu mạn tính dòng lympho và u lympho không Hodgkin tế bào B. Trong những năm qua, đã có rất nhiều bằng chứng tiền lâm sàng thuyết phục chỉ ra rằng biểu hiện của thụ thể kháng nguyên khảm (CAR) nhắm mục tiêu CD19 trong tế bào lympho T máu ngoại vi phát huy hiệu quả điều trị trong các mô hình ác tính tế bào lympho B khác nhau. Do vậy hiện nay các nghiên cứu lâm sàng đang được tiến hành ở một số trung tâm trong đó các tế bào CAR-T đặc hiệu CD19 tự thân đang được đánh giá ở những bệnh nhân mắc bạch cầu cấp và mạn tính dòng lympho và ung thư hạch khó chữa [54]. Vì vậy cho đến nay hầu hết các thử nghiệm lâm sàng liệu pháp tế bào CAR-T điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho đều tập trung nhắm đích là thụ thể CD19.

Vào năm 2009, quy trình công nghệ sản xuất tế bào CAR-T nhắm đích kháng nguyên CD19 lần đầu tiên được công bố; dựa vào đó, thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 1 đã được tiến hành trên các bệnh nhân mắc bệnh bạch cầu mạn dòng lympho và bệnh bạch cầu cấp dòng lympho. Kết quả của cuộc thử nghiệm lâm sàng này lần đầu được công bố vào năm 2013, chỉ ra sự thuyên giảm bệnh đáng kể của những bệnh nhân tham gia, đặc biệt là trên những bệnh nhân trưởng thành mắc bệnh bạch cầu cấp dòng lympho [33]. Nguyên tắc của liệu pháp tế

bào CAR-T trong điều trị ung thư là nhằm tạo ra các tế bào T mang các thụ thể khả năng nhận biết các kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt tế bào ung thư từ đó kích hoạt khả năng phân giải tế bào ung thư của tế bào T [134]. Đặc biệt, tế bào CAR-T có thể tự tăng sinh và tồn tại lâu dài trong cơ thể để diệt các tế bào ung thư tái phát - một trong những nguyên nhân chính khiến điều trị thất bại. Dựa vào những kết quả nghiên cứu trên, liệu pháp sử dụng tế bào CAR-T nhắm đích CD19 được Cục Quản lý Dược phẩm và Thực phẩm Mỹ FDA công nhận là một bước đột phá, mở đường cho nhiều nghiên cứu và tiến bộ trong lĩnh vực này. Đến năm 2017, FDA đã cho phép dùng liệu pháp tế bào CAR-T trong chữa trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho ở người lớn và trẻ em [135]. Sau đó, FDA tiếp tục cấp phép cho liệu pháp tế bào CAR-T là Kymrial của hãng Novartis cho điều trị u lympho không Hodgkin ở người lớn vào tháng 5/2018 [136]. Kể từ tháng 10 năm 2021, có bốn sản phẩm CAR-T hiện đã được phê duyệt dành cho bệnh u lympho không Hodgkin, hai sản phẩm dành cho bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính tế bào B và một sản phẩm dành cho bệnh đa u tủy. Nhiều loại khác hiện đang trong quá trình phát triển lâm sàng cho những bệnh này và các khối u ác tính khác [41]. Với hiệu quả kháng ung thư ấn tượng, liệu pháp CAR-T cần được nghiên cứu, phát triển tại từng cơ sở y tế để ứng dụng rộng rãi và đưa lại lợi ích cho bệnh nhân.

Năm 2020 nghiên cứu của Wang M. và cộng sự về liệu pháp sử dụng tế bào CAR-T KTE-X19 cho 68 bệnh nhân u lympho tế bào vỏ tái phát hoặc khó điều trị thì thấy 57% bệnh nhân phân tích hiệu quả ban đầu đã thuyên giảm lâu dài. Sau 12 tháng, ước tính tỷ lệ sống không tiến triển bệnh 61%. Tuy nhiên, hội chứng giải phóng cytokin độ 3 trở lên và các biến chứng thần kinh xảy ra lần lượt ở 15% và 31% bệnh nhân; không có trường hợp nào tử vong [56]. Ramos C.A. và cộng sự đã nghiên cứu điều trị liệu pháp tế bào CAR-T CD30 trên 41 bệnh nhân u lympho Hodgkin với thời gian theo dõi trung bình là 533 ngày, tỷ lệ sống không bệnh tiến triển trong 1 năm và tỷ lệ sống toàn bộ cho tất cả các bệnh nhân được đánh giá lần lượt là 36% và 94% [57].

Năm 2021, nghiên cứu của Mei H. và cộng sự đã xây dựng một liệu pháp CAR-T BM38 đặc hiệu kép được nhân bản hóa nhắm mục tiêu BCMA và CD38 ở 23 bệnh nhân bị đa u tủy xương tái phát và kháng trị được truyền CAR-T BM38 trong thử nghiệm giai đoạn I. Kết quả cho thấy CAR-T BM38 đặc hiệu kép là khả thi, an toàn và hiệu quả ở bệnh nhân đa u tủy xương tái phát và kháng trị. Thời gian sống không bệnh tiến triển trung bình là 17,2 tháng. Đáng chú ý, các tế bào CAR-T BM38 có thể được phát hiện ở 77,8% bệnh nhân được đánh giá sau 9 tháng và 62,2% sau 12 tháng [58].

Năm 2022, một nghiên cứu về liệu pháp tế bào CAR-T kháng CD19 có tiềm năng cho các ứng dụng lâm sàng rộng rãi. Nghiên cứu này cho thấy hiệu quả và độ an toàn của nó trong điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho tái phát hoặc kháng trị và u lympho không Hodgkin. Tỷ lệ lui bệnh hoàn toàn là 80% và tỷ lệ sống sót sau 1 năm là 51%. Đối với liệu pháp tế bào CAR-T có sẵn, tỷ lệ lui bệnh hoàn toàn đối với bệnh bạch cầu cấp dòng lympho là 70% và đối với u lympho không Hodgkin là 52% [59].

Năm 2023, một nghiên cứu tổng hợp của Yu M. và cộng sự về hiệu quả của liệu pháp CAR-T kháng CD19 ở những bệnh nhân mắc bệnh u lympho không Hodgkin tế bào B (B-NHL) và bệnh bạch cầu cấp tế bào B (B-ALL). Trong số 260 bệnh nhân mắc B-NHL, tỷ lệ đáp ứng và lui bệnh hoàn toàn tốt nhất gộp chung lần lượt là 77% và 52%. Trong 159 bệnh nhân mắc B-ALL, tỷ lệ lui bệnh hoàn toàn là 92% và tỷ lệ sống sót sau 12 tháng và tỷ lệ sống sót không tiến triển gộp chung là 65,0% và 73,0% tương ứng. Nghiên cứu này chứng minh tính an toàn và hiệu quả lâm sàng của các liệu pháp tế bào CAR-T nhắm mục tiêu kép trong các khối u ác tính của tế bào B. Hơn nữa, cần có các thử nghiệm ngẫu nhiên có đối chứng được thiết kế tốt để thiết lập vai trò của liệu pháp tế bào CAR-T nhắm mục tiêu kép ở những bệnh nhân có khối u ác tính tế bào B [60].



Liệu pháp CAR-T thường bao gồm nhiều bước như: tách tế bào lympho T từ máu ngoại vi, biến đổi gen tế bào T để biểu hiện các thụ thể nhân tạo có khả năng nhận biết các kháng nguyên đặc trưng của tế bào ung thư; nuôi cấy tăng sinh tế bào CAR-T; đưa các tế bào CAR-T ngược trở lại người bệnh. Trong quá trình thực hiện liệu pháp có nhiều yếu tố làm thay đổi biểu hiện CAR và sự tăng sinh của tế bào CAR-T từ đó ảnh hưởng đến chức năng của tế bào CAR-T. Quá trình đánh giá khả năng ly giải trên *in vitro* cũng cho thấy được tính đặc hiệu của khối tế bào CAR-T khi hướng tới, có ái lực cao với các dòng tế bào ung thư khác nhau theo như thiết kế ban đầu của cấu trúc CAR-T [137], [138].

Trước khi áp dụng trong điều trị lâm sàng thì vấn đề cần đánh giá là khả năng ly giải các tế bào ung thư của khối tế bào CAR-T, CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 như thế nào. Điều này có thể khẳng định được trong nghiên cứu *in vitro* và làm nền tảng cho các nghiên cứu tiếp theo cũng như khả năng ứng dụng lâm sàng của khối tế bào CAR-T được tạo ra cũng như liệu pháp kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 [138]. Chúng tôi sử dụng kỹ thuật Flow Cytometry để đánh giá tỷ lệ chết của tế bào (tỷ lệ ly giải tế bào ung thư) bằng cách dùng chất nhuộm nhân tế bào phát huỳnh quang là 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) để kiểm tra tỷ lệ tế bào ung thư bị ly giải trên quần thể tế bào ung thư bạch cầu dương tính với Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Sử dụng chất nhuộm tế bào huỳnh quang CFSE để đánh dấu tế bào ung thư bạch cầu, đây là một chất nhuộm có liên kết ổn định khi tích hợp vào trong tế bào và giữ lại ở tế bào trong thời gian dài, thuốc nhuộm sẽ không được chuyển sang các tế bào lân cận. 7-AAD là loại thuốc nhuộm nhân phát huỳnh quang, chúng có khả năng liên kết rất mạnh với ADN của nhân tế bào. Khi tế bào ở trạng thái bình thường, chất này không thể xâm nhập vào bên trong để gắn với ADN của nhân tế bào sống. Chỉ khi màng tế bào bị tổn thương 7-AAD mới có thể đi vào trong tế bào và liên kết với ADN nhân tế bào. Do đó, sử dụng chất nhuộm nhân 7-AAD dễ dàng phát hiện màng tế bào bị tổn thương từ đó đánh giá tỷ lệ tế bào bị ly giải.

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành trên *in vitro* đánh giá tác dụng ly giải 2 dòng tế bào ung thư CD19+ là Daudi và Raji, 1 dòng tế bào ung thư CD19- là K562 với 3 tỷ lệ target : effector T:E = 1:2, 1:5, 1:10 (Effector : PBMC, CAR-T và Target : Daudi, Raji, K562). Kháng thể kháng PD-1 bổ sung vào giếng với nồng độ 20µg/mL và giếng điều trị kết hợp với với CAR-T theo các tỷ lệ target : effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10 (Effector : PBMC, CAR-T và Target : Daudi, Raji, K562). Kết quả cho thấy tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 thể hiện khả năng ly giải tốt đối với tế bào Daudi CD19+, tỷ lệ ly giải của 2 nhóm này cao hơn so với nhóm tế bào PBMC. Tế bào CAR-T trong nghiên cứu của chúng tôi có khả năng nhắm đích kháng nguyên CD19, liên kết với tế bào thông qua thụ thể này và gây ly giải rõ các tế bào ung thư có biểu hiện CD19+ là tế bào Daudi. Khả năng ly giải của liệu pháp tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 cũng tăng theo sự tăng của tỷ lệ CAR-T khi được đồng nuôi cấy với tế bào ung thư. Điều này cho thấy tế bào CAR-T được tạo ra trong nghiên cứu này có tác dụng ly giải tế bào ung thư và đặc biệt là có tính chọn lọc với tế bào ung thư CD19+ đúng như cơ chế tác dụng của nó. Kết quả này là phù hợp với thiết kế của thí nghiệm và cũng tương tự như các nghiên cứu khác khi tạo ra tế bào CAR-T để tiêu diệt tế bào ung thư CD19+ [139]. Đây cũng là bước đầu cho những nghiên cứu tiếp theo về tác dụng ly giải và gây chết tế bào ung thư của liệu pháp tế bào CAR-T.

Đối với tế bào Daudi có CD19+, tế bào CAR-T và CAR-T kết với với kháng thể kháng PD-1 thể hiện khả năng ly giải tốt. Tỷ lệ tế bào ly giải tăng khi tỷ lệ đồng nuôi cấy tăng, tỷ lệ đạt từ 36,19% - 74,21%; tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 đạt từ 34,73 - 74,28%. Trong khi đó, PBMC kích hoạt thể hiện hoạt tính ly giải tế bào không đáng kể (< 12%). Tuy nhiên, chúng tôi chưa thấy khả năng ly giải tế bào Daudi có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các tỷ lệ giữa nhóm điều trị CAR-T và nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1.

Điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 đã cho thấy thành công đáng kể trong thử nghiệm lâm sàng [95], [140]. Tuy nhiên, hầu hết các bệnh nhân không cho thấy sự thuyên giảm ổn định sau điều trị liệu pháp kháng PD-1. Hệ miễn dịch có khả năng chiến đấu với các tế bào ung thư, nhưng một số tế bào của hệ miễn dịch lại kích thích sự chuyển hóa và tăng trưởng của khối u [141]. Vì cả khối u và xâm nhập miễn dịch đều ảnh hưởng đến các đáp ứng trong điều trị, nên cần phải cân nhắc cả hai yếu tố này khi phát triển các liệu pháp điều trị kết hợp. Những nỗ lực đáng kể đang được tiến hành để xác định các dấu ấn sinh học để dự đoán bệnh nhân nào sẽ được chỉ định ức chế con đường PD-1 khi sử dụng nó như một liệu pháp điều trị đơn lẻ và phát triển các liệu pháp kết hợp hiệu quả. Khi điều trị chỉ nhắm vào việc ức chế PD-1, sự có mặt của các tế bào T CD8+ ở viền xung quanh khối u xâm lấn và biểu hiện của PD-L1 trong khối u ở mức độ cao có liên quan đến đáp ứng điều trị với tỷ lệ tốt hơn [98], [99]. Tuy nhiên, biểu hiện của PD-L1 không phải lúc nào cũng có liên quan đến kết quả điều trị: một số khối u dương tính với PD-L1 đáp ứng kém với ức chế PD-1, trong khi đó một số khối u âm tính với PD-L1 lại cho thấy đáp ứng điều trị tốt [142], [143].

Chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng ly giải tế bào Raji CD19+ tương tự tế bào Daudi. Kết quả cũng cho thấy tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 thể hiện khả năng ly giải tương đối tốt đối với tế bào Raji CD19+, tỷ lệ ly giải của 2 nhóm này cao hơn so có ý nghĩa thống kê so với nhóm tế bào PBMC. Tế bào CAR-T trong nghiên cứu của chúng tôi có khả năng nhắm đích kháng nguyên CD19, liên kết với tế bào thông qua thụ thể này và gây ly giải rõ các tế bào ung thư có biểu hiện CD19+ là tế bào Raji. Khả năng ly giải của liệu pháp tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 cũng tăng theo sự tăng của tỷ lệ CAR-T khi được đồng nuôi cấy với tế bào ung thư. Mặc dù tỷ lệ ly giải thấp hơn so với tế bào Daudi, tuy nhiên ở nhóm kết hợp CAR-T với kháng thể kháng PD-1, có xu hướng tăng hiệu quả

ly giải rõ rệt khi tăng tỷ lệ CAR-T/Raji. Đặc biệt, với tỷ lệ Raji/CAR-T = 1:10, hiệu quả ly giải tăng từ 24,2% lên 44,11%, tương đương tăng hiệu quả 1,82 lần. Trong khi đó, PBMC kích hoạt thể hiện hoạt tính ly giải tế bào Raji khoảng < 9%. Như vậy, kết hợp kháng thể đơn dòng kháng PD-1 với CAR-T làm tăng hiệu quả ly giải tế bào Raji.

CD19 là thụ thể hướng đích phổ biến nhất trong phát triển CAR-T. CD19 biểu hiện với mức độ và tỷ lệ cao ở các tế bào tạo máu ác tính. CAR-T thế hệ thứ hai cho thấy hiệu quả điều trị bệnh bạch cầu tốt nhất. Tuy nhiên, hiệu quả của liệu pháp tế bào CAR-T phụ thuộc lớn tỷ lệ tế bào CAR-T trong chế phẩm. Vì vậy, tối ưu quy trình để đạt được tỷ lệ tế bào CAR-T cao trong chế phẩm được chuẩn bị mới quyết định hiệu quả của liệu pháp điều trị này. Bên cạnh đó PD-1, một protein trên bề mặt của tế bào T, có vai trò hoạt hóa tế bào T để chống lại khối u. PD-1 thúc đẩy quá trình chết theo chương trình của các tế bào T đặc hiệu với kháng nguyên và làm giảm quá trình chết theo chương trình của các tế bào T điều hòa [4]. Ức chế PD-1 là một liệu pháp miễn dịch khác có hiệu quả trong điều trị ung thư và đã phát triển nhanh chóng. Sự hiện diện của PD-1 trên bề mặt tế bào CAR-T được cho là góp phần làm giảm chức năng của liệu pháp CAR-T, đặc biệt là trong khối u rắn. Sự phong tỏa PD-1 trên tế bào CAR-T bằng chất ức chế hoặc kháng thể loại trừ PD-1 giúp tăng cường hiệu quả tiêu diệt khối u của tế bào CAR-T [5]. Kháng thể kháng PD-1 sẽ kích hoạt tế bào CAR-T từ đó giúp tăng cường hiệu quả, nâng cao chức năng của tế bào CAR-T và ở một mức độ nào đó sẽ cải thiện tiên lượng cũng như hiệu quả điều trị. Do đó, sự kết hợp giữa phong tỏa PD-1 và tế bào CAR-T sẽ là một liệu pháp đầy hứa hẹn, có tiềm năng đưa lại hiệu quả điều trị tốt. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu kết hợp hai liệu pháp trên và có hiệu quả tốt hơn so với điều trị đơn lẻ. Năm 2017, một nghiên cứu của Li S. và cộng sự đã thiết kế các tế bào CAR-T tiết ra các kháng thể kháng PD-1 (CAR. $\alpha$ PD-1-T) và đánh giá hiệu quả của chúng trong mô hình chuột xenograft ung thư biểu mô phổi thì thấy hiệu

quả hơn so với TB CAR-T đơn thuần [110]. Năm 2019, cũng đã có một trường hợp được báo cáo sử dụng CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 liều thấp trên bệnh nhân ung thư hạch không Hodgkin tế bào B giúp thuyên giảm hơn 10 tháng và giảm tác dụng phụ [111]. Đã có thử nghiệm giai đoạn I của liệu pháp tế bào CAR-T ở bệnh nhân mắc bệnh màng phổi ác tính (MPM) kết hợp với Pembrolizumab, kháng thể kháng PD-1 vào năm 2021 của Adusumilli P. S và cộng sự. Tế bào CAR-T được phát hiện trong máu ngoại vi trong > 100 ngày ở 39% bệnh nhân. Sau khi chứng minh rằng phong tỏa PD-1 giúp tăng cường chức năng tế bào CAR-T ở chuột thì 18 bệnh nhân mắc MPM cũng đã nhận được pembrolizumab một cách an toàn. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống trung bình là 23,9 tháng, bệnh ổn định được duy trì trong 6 tháng ở 8/18 bệnh nhân [113]. Liệu pháp miễn dịch kết hợp với tế bào CAR-T và thuốc phong tỏa PD-1 nên được đánh giá thêm ở những bệnh nhân có khối u rắn. Tuy nhiên ở Việt Nam chưa có công bố nào về nghiên cứu đánh giá hiệu quả khi kết hợp hai liệu pháp trên.

Để chứng minh được hiệu quả tác dụng của tế bào CAR-T CD19 theo đúng cơ chế có tính chọn lọc với tế bào ung thư CD19+ chúng tôi tiến hành đánh giá tác dụng ly giải tế bào K562 (CD19-). Trên *in vitro* chúng tôi đánh giá tác dụng ly giải dòng tế bào ung thư K562 (CD19-) với 3 tỷ lệ target:effector (T:E) 1:2, 1:5, 1:10. Đối với tỷ lệ K562/CAR-T 1:2 và 1:5, CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 có tác dụng ly giải tế bào tốt hơn PBMC nhưng đều ở mức thấp. Với tỷ lệ K562/CAR-T = 1:10, kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào K562 (CD19-) bị ly giải khi đồng nuôi cấy với PBMC 27,52%, CAR-T 27,67% và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 28,59% là tương đồng nhau. Như vậy có thể thấy đối với tế bào K562 CD19- tế bào CAR-T CD19 trong nghiên cứu của chúng tôi chưa thể hiện rõ khả năng ly giải. Khả năng ly giải tương đương với tế bào PBMC chứng ở tỷ lệ 1:10. Đối với tỷ lệ K562/CAR-T = 1:2 và 1:5, CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng

PD-1 có tác dụng ly giải tế bào tốt hơn PBMC tuy nhiên đều ở mức thấp. Điều này cũng phù hợp với cơ chế tác dụng của tế bào CAR-T CD19+. Nghiên cứu của Picanço-Castro V. và cộng sự năm 2020 cho thấy sau 24 giờ đồng nuôi cấy, tế bào CAR-T CD19 đã loại bỏ 87% tế bào Sup-B15 CD19+. Trong quá trình đồng nuôi cấy tế bào lympho không chuyển gen với tế bào Sup-B15, không thấy sự khác biệt. Tương tự như vậy, không có tế bào CD19- nào chết (K562) sau khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19-CAR-T, chúng tỏ tính đặc hiệu của CAR đối với kháng nguyên CD19 [139].

Nghiên cứu của chúng tôi được tiến hành trong khuôn khổ đánh giá tác dụng trên *in vitro* đối với tế bào ung thư bạch cầu CD19+, CD19- và 1 liều kháng thể kháng PD-1. Các dòng tế bào ung thư bạch cầu gồm Daudi, Raji, K562 được nuôi cấy trong môi trường có kháng thể kháng PD-1 với liều 20 $\mu$ g/ml. Kết quả cho thấy tỷ lệ ly giải tế bào ung thư có CD19+ và CD19- khi đồng nuôi cấy với kháng thể kháng PD-1 đều không có sự khác biệt so với nhóm chứng. Điều này cũng hoàn toàn phù hợp với cơ chế cũng như các ứng dụng hiện nay của kháng thể kháng PD-1 chủ yếu trên khối u rắn và có biểu hiện PD-L1 dương tính. Đối với các bệnh lý ung thư huyết học như u lympho cũng đang được áp dụng điều trị bằng kháng thể kháng PD-1 [144]. Do vậy, cần có thêm các nghiên cứu đánh giá trên thực nghiệm về nồng độ kháng thể kháng PD-1 trên các bệnh lý ung thư huyết học, từ đó tiến tới sử dụng liệu pháp kết hợp với tế bào CAR-T.

Những kết quả trên của chúng tôi cho thấy phù hợp với cơ chế tác dụng của tế bào CAR-T. Bước đầu chúng tôi thấy liệu pháp CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 làm tăng 1,82 lần hiệu quả ly giải trên tế bào Raji ở tỷ lệ T:E = 1:10.

Các nghiên cứu về liệu pháp kết hợp này trên thế giới đã được báo cáo cũng chủ yếu trên các bệnh lý ung thư thể rắn. Do vậy đối với các ung thư máu cần thêm có nhiều nghiên cứu để đánh giá hiệu quả của liệu pháp kết hợp này từ đó có ứng dụng hiệu quả hơn nữa trên thực tế lâm sàng mang lại lợi ích cho bệnh nhân.

#### 4.2.2. Thay đổi nồng độ cytokin được giải phóng ở môi trường nuôi cấy tế bào

Tế bào CAR-T ngoài khả năng diệt khối u theo cách tiếp xúc trực tiếp còn có khả năng tiêu diệt gián tiếp thông qua giải phóng cytokin hoặc bằng cách tác động lên các tế bào khác (tiêu diệt gián tiếp) [66]. Khi nhận ra các kháng nguyên khối u, tế bào CAR-T tiết ra các cytokin gây viêm, bao gồm IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$ , để gây ra hiện tượng chết của tế bào khối u, kích thích đại thực bào sản xuất cytokin. Ngoài ra, các đại thực bào có thể được kích hoạt bởi các cytokin do tế bào CAR-T sản xuất, chẳng hạn như TNF- $\alpha$ , IL-2, GM-CSF và IFN- $\gamma$  [46]. Một trong những nguồn chính của các cytokin gây viêm là các tế bào tủy được kích hoạt trong quá trình trị liệu bằng tế bào CAR-T. Sau khi truyền và nhận dạng tế bào đích, các tế bào CAR-T được kích hoạt và tiết ra nhiều yếu tố gây viêm khác nhau, chẳng hạn như GM-CSF, có thể kích hoạt các tế bào tủy và thúc đẩy sản xuất và bài tiết nhanh chóng các cytokin gây viêm như IL-6 và IL-1 $\beta$  góp phần gây độc tính gây viêm [145]. Để điều hòa các chức năng tác động tiêu diệt tế bào, tế bào T chủ yếu sử dụng hai con đường chính: xuất bào của các hạt gây độc tế bào có chứa perforin và granzyme, và sự biểu hiện của các phối tử họ yếu tố hoại tử khối u gắn màng (TNF), gây ra hiện tượng apoptosis của tế bào đích khi gắn kết với thụ thể tương ứng của chúng [69]. Trong khi thiết kế tế bào CAR-T dựa trên việc đạt được sự ly giải khối u thông qua tương tác trực tiếp giữa tế bào T và tế bào khối u, thì việc sản xuất cytokin bằng tế bào CAR-T được kích hoạt có thể tăng cường hơn nữa khả năng chống khối u của chúng [69]. Trong nghiên cứu này, khả năng bài tiết cytokin của khối tế bào CAR-T của chúng tôi được đánh giá bằng xét nghiệm ELISA định lượng nồng độ 3 cytokin IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$  trong dịch đồng nuôi cấy tế bào sau 24 giờ và 48 giờ.

IL-6 là nhân tố trung tâm trong đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Tuy nhiên, sự bài tiết kéo dài, tăng và quá mức IL-6 liên quan đến bệnh sinh nhiều bệnh lý,

trong đó có ung thư, đặc biệt là ung thư bạch cầu [73]. Vai trò quan trọng trong sự sống của tế bào ung thư bạch cầu của IL-6 và hiệu quả kháng ung thư khi ức chế tín hiệu IL-6 đã được báo cáo, đặc biệt là trên ung thư bạch cầu [73]. Nồng độ của IL-6 trong dịch đồng nuôi cấy PBMC với các tế bào ung thư sau 24 và 48 giờ cho thấy nồng độ IL-6 khi đồng nuôi cấy với 2 dòng tế bào ung thư bạch cầu CD19+ Raji và Daudi là tương đương nhau. Ngược lại, nồng độ IL-6 cao hơn đáng kể trong dịch đồng nuôi cấy tế bào PBMC và tế bào ung thư bạch cầu K562 có CD19-. Điều này gợi ý về khả năng tiết IL-6 cao hơn ở tế bào K562 có CD19- so với tế bào Raji và Daudi có CD19+. Có thể vai trò thúc đẩy ung thư của IL-6 trên các tế bào ung thư bạch cầu Raji và Daudi có CD19+ là không đáng kể, so với tế bào ung thư bạch cầu K562 có CD19-.

Tín hiệu PD-1 được hoạt hoá khi protein PD-1 tương tác với phối tử của nó PD-1 L1 hoặc PD-1 L2 trên bề mặt tế bào đích. Qua đó, ức chế sự tăng sinh và thúc đẩy tế bào lympho T chết theo chương trình, ức chế sản xuất cytokin và chức năng tiêu diệt tế bào [146]. Kết quả là, miễn dịch loại bỏ tế bào ung thư bị ngăn chặn và hỗ trợ tế bào ung thư trốn thoát miễn dịch. Vì thế, nhiều thuốc ức chế tín hiệu PD-1 đã được cấp phép điều trị các bệnh lý ung thư, trong đó có ung thư bạch cầu. Ức chế gắn kết PD-1/PD-L1 kích thích đại thực bào sản xuất IL-6 và điều trị bằng PD-1 Ab tăng nồng độ IL-6 [147]. Kết hợp kháng IL-6 và PD-1 đưa lại hiệu quả điều trị hiệp lực [147], [148]. Kết quả của chúng tôi phù hợp trên tế bào K562 có CD19- rằng, đồng nuôi cấy có bổ sung PD-1 Ab làm tăng nồng độ IL-6. Ngược lại, giảm nồng độ IL-6 ở tế bào CD19+ (Daudi và Raji). Đây là phát hiện mới, gợi ý về sự liên quan chưa được báo cáo giữa biểu hiện CD19 và sự tương tác của giữa tín hiệu IL-6 và PD-1. Phát hiện này là gợi ý cho các đánh giá phân tích cơ bản tiếp theo về vai trò của các tín hiệu này.

Đến nay, chưa có bằng chứng trực tiếp về việc tế bào T hoặc tế bào CAR-T là nguồn sản xuất đáng kể IL-6, nhưng tăng nồng độ cytokin IL-6 liên quan



chặt chẽ đến hội chứng giải phóng cytokin sau điều trị bằng liệu pháp CAR-T [149]. Nguồn gốc của các cytokin tiền viêm được cho là từ các tế bào tủy được kích hoạt trong quá trình trị liệu bằng tế bào CAR-T [145]. Bên cạnh tác động thúc đẩy viêm trong đáp ứng viêm hệ thống, tín hiệu IL-6 thúc đẩy tăng trưởng và hoạt động chống ung thư của tế bào CAR-T [150].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy khi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T hoặc CAR-T kết hợp với PD-1 Ab làm tăng nồng độ IL-6 sau 24 giờ đồng nuôi cấy so với nhóm chứng PBMC, nhưng tác động này giảm hoặc mất đi sau 48 giờ đồng nuôi cấy. Có thể, ngay sau đồng nuôi cấy và tương tác với tế bào đích, CAR-T gián tiếp thúc đẩy các tế bào như tế bào tủy và tế bào ung thư bạch cầu tiết IL-6 như cơ chế đã được chứng minh. IL-6 được tiết ra thúc đẩy hoạt hoá ngược lên CAR-T và sau thời gian dài hơn, sự tăng nhanh của IL-6 có thể gây ra sự kiệt sức của các tế bào tiết ra nó. Tế bào K562 có CD19- tiết IL-6 nhiều hơn đáng kể so với tế bào Raji và Daudi có CD19+. Kháng thể kháng PD-1 làm tăng nồng độ IL-6 trên tế bào K562 (CD19-) nhưng giảm nồng độ IL-6 ở tế bào Daudi và Raji (CD19+), gợi ý về sự liên quan chưa được báo cáo giữa biểu hiện CD19 và sự tương tác của giữa tín hiệu IL-6 và PD-1.

IL-2 được biết đến là một yếu tố có vai trò trong kích thích sự tăng sinh các tế bào miễn dịch như lympho T làm tăng khả năng tiêu diệt các tế bào ung thư. IL-2 là dưỡng chất quan trọng trong nuôi dưỡng tế bào miễn dịch như tế bào Lympho xâm nhập khối u (TIL), tế bào CAR-T, và NK [74]. Chuyển gen biểu hiện các cytokin và/hoặc các thụ thể cytokin hứa hẹn thúc đẩy sự phát triển/sự tồn tại của tế bào CAR-T và khả năng hoạt động của các cytokin trong sự ức chế miễn dịch của vi môi trường khối u [75]. Để tiêu diệt tế bào ung thư, tế bào CAR-T hoạt động theo cơ chế tiêu diệt trực tiếp phụ thuộc vào tiếp xúc hoặc cơ chế gây độc gián tiếp, thông qua giải phóng các cytokin tiền viêm hoặc bằng cách tác động lên các tế bào khác [66].

Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy, sau khi tương tác gắn kết với kháng nguyên đích trên bề mặt khối u, tế bào CAR-T kích hoạt tiết ra các cytokin gây viêm, bao gồm IFN- $\gamma$  và TNF- $\alpha$ . Bên cạnh đó, các cytokin do tế bào CAR-T sản xuất như TNF- $\alpha$ , IL-2, GM-CSF và IFN- $\gamma$  kích hoạt đại thực bào tiết các cytokin tiền viêm [46]. Tế bào T tiêu diệt tế bào chủ yếu sử dụng hai con đường chính: xuất bào của các hạt gây độc tế bào có chứa perforin và granzyme, và sự biểu hiện của yếu tố hoại tử khối u (TNF), thúc đẩy sự chết theo chu trình (apoptosis) của tế bào đích [69].

Suy giảm và thiếu hụt IL-2 thường gặp trong vi môi trường ung thư rắn và việc bổ sung IL-2 có thể dẫn tới làm tăng hiệu quả của các liệu pháp tế bào lympho T khác nhau đối với các khối u rắn [75]. Kết quả nghiên cứu này chỉ ra nồng độ IL-2 cao hơn khi đồng nuôi cấy PBMC với tế bào K562 và Raji, so với tế bào Daudi. Bên cạnh đó, ở tế bào CD19+ là Daudi và Raji, khi đồng nuôi cấy với CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab, nồng độ IL-2 tăng lên so với nhóm PBMC ở cả thời điểm 24 và 48h. Ngược lại, ở tế bào K562 có CD19-, sự khác biệt không rõ giữa nhóm tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp PD-1 Ab so với nhóm chứng PBMC. Như vậy, nồng độ IL-2 tăng lên khi có sự tương tác giữa CAR-T mang thụ thể CD19 và kháng nguyên CD19 trên bề mặt tế bào ung thư bạch cầu đích (tế bào Daudi và Raji). Nguyên nhân có thể cho sự thay đổi không rõ nồng độ IL-2 ở tế bào K562, là thiếu sự tương tác đích của thụ thể khảm và kháng nguyên đích trên tế bào K562. Điều này được thể hiện, khi đồng nuôi cấy tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp PD-1 Ab, tế bào CD19+ có nồng độ IL-2 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tế bào CD19-. Ngoài ra, đồng nuôi cấy có bổ sung kháng thể kháng PD-1 giảm đáng kể nồng độ IL-2 ở cả 3 dòng tế bào ung thư. Tuy nhiên, đồng nuôi cấy kết hợp CAR-T có bổ sung PD-1 Ab không làm giảm nồng độ IL-2 so với đồng nuôi cấy đơn lẻ với tế bào CAR-T ở cả 3 dòng tế bào ung thư. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ IL-2 tăng lên đáng kể khi đồng nuôi cấy tế bào ung thư bạch cầu CD19+ với

CAR-T mang thụ thể CD19, nghi do có sự tương tác đặc hiệu giữa thụ thể CD19 trên CAR-T và kháng nguyên CD19 trên tế bào đích. Tác dụng này thể hiện không đáng kể ở tế bào CD19-.

Bên cạnh tác dụng kháng ung thư tốt, các liệu pháp CAR-T hiện dùng cũng gây ra nhiều quan ngại về các tác dụng không mong muốn. Một trong những biến chứng đáng ngại chính là đáp ứng viêm hệ thống liên quan đến hội chứng giải phóng cytokin [151]. Hội chứng giải phóng cytokin là biến chứng nghiêm trọng, xảy ra phổ biến sau khi truyền liệu pháp CAR-T với tỷ lệ được báo cáo là từ 37% đến 93% trong các nghiên cứu khác nhau [149]. CRS là yếu tố nguy cơ của nhiều biến chứng nghiêm trọng, như hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác động miễn dịch cũng như nhiều độc tính nghiêm trọng lên tim mạch, huyết học, gan, da, phổi và đường tiêu hóa [152]. CRS là kết quả trực tiếp của quá trình kích hoạt đồng bộ các tế bào CAR-T gặp các tế bào bạch cầu lympho B biểu hiện CD19 và dòng thác tín hiệu cytokin được kích hoạt đầu ra bởi các tế bào phản ứng của hệ thống miễn dịch bẩm sinh [67]. Vì vậy, việc đánh giá, kiểm soát và xử trí các biến chứng gây ra do giải phóng cytokin là không thể thiếu, từ mô hình thực nghiệm đến theo dõi trên lâm sàng. Hội chứng giải phóng cytokin khi điều trị bằng liệu pháp CAR-T liên quan chặt chẽ đến các cytokin tiền viêm như IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ .

Mặc dù, chưa có bằng chứng trực tiếp về việc tế bào T hoặc tế bào CAR-T là nguồn sản xuất đáng kể IL-6, tăng nồng độ cytokin IL-6 được coi là nguyên nhân, tác nhân thúc đẩy và là chất chỉ điểm của các hội chứng giải phóng cytokin [149]. Nồng độ IL-6 tăng cao hơn ở những bệnh nhân mắc CRS so với những bệnh nhân không mắc, tương quan với sự khởi phát của các triệu chứng CRS nghiêm trọng và đóng một vai trò quan trọng trong sinh lý bệnh của CRS [149]. Vai trò của IL-6 trong các biến chứng liên quan đến CRS được thể hiện thông qua tác dụng điều trị CRS của các dược chất ức chế tín hiệu IL-6. Tocilizumab, kháng thể kháng thụ cảm thể IL-6, là liệu pháp ức chế miễn dịch

hàng đầu của CRS [149]. Hiệu quả điều trị CRS của Tocilizumab đã được chứng minh, đặc biệt là bệnh nhân với CRS nặng và/hoặc đe dọa tính mạng. Đáng chú ý, bệnh nhân mắc CRS phản ứng nhanh với Tocilizumab, sốt và hạ huyết áp thường hết trong vòng vài giờ [149]. Tocilizumab được cân nhắc sử dụng trước liệu pháp CAR-T để dự phòng, bởi vì ngăn chặn IL-6 bằng Tocilizumab không làm giảm đáng kể hiệu quả điều trị của tế bào CAR-T, và không ảnh hưởng tiêu cực đến tiên lượng của người nhận tế bào CAR-T [149]. Siltuximab là kháng thể kháng IL-6, trực tiếp gắn kết với IL-6 và ngăn IL-6 tương tác với thụ cảm thể của nó, cũng có tác dụng tương tự Tocilizumab. Siltuximab có tiềm năng trong điều trị CRS và được cho là có thể ưu thế hơn Tocilizumab trong hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác động miễn dịch [149].

Như vậy, CRS liên quan trực tiếp và chặt chẽ đến tăng giải phóng IL-6. Kết quả của chúng tôi không tương đồng với các báo cáo bệnh sinh đi trước về tăng IL-6 của liệu pháp tế bào CAR-T. Cụ thể, tại thời điểm 48 giờ nồng độ IL-6 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với tế bào ung thư bạch cầu Daudi có CD19+ thấp hơn so với nhóm PBMC và với tế bào Raji thời điểm 48 giờ cũng thấp hơn so với nhóm PBMC. Một nghiên cứu về trường hợp một bệnh nhân có sCRS cho thấy tế bào nội mô là một trong những nguồn chính của IL-6, do đó cho thấy có mối liên hệ trực tiếp giữa nội mô được kích hoạt với quá trình sản xuất IL-6 tổng thể [153]. Đáng chú ý, cho đến nay không có bằng chứng nào cho thấy tế bào T hoặc tế bào CAR-T có thể là nguồn cung cấp IL-6 đáng kể [154].

Điều này có lẽ chúng tôi cần thêm các nghiên cứu trên mô hình *in vivo* để đánh giá khả năng bài tiết IL-6 của hai liệu pháp này từ đó nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng của liệu pháp tế bào CAR-T cũng như tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1. Hơn nữa, nồng độ IL-6 không khác biệt ở nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể

kháng PD-1. Sự tương đồng nồng độ IL-6 giữa đơn liệu và kết hợp không gợi ý về tăng nguy cơ mắc CRS sau điều trị kết hợp so với điều trị đơn liệu pháp tế bào CAR-T.

Bên cạnh đó, ngoài CRS có thể thấy nồng độ IL-2 tăng gấp trong hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác động miễn dịch (ICANS). Trở ngại quan trọng nhất trong việc xác định các cytokin đặc hiệu gây độc thần kinh và CRS do chúng thường xuất hiện đồng thời. Trong một nghiên cứu nhi khoa về tế bào CAR-T CD19, có 28 trong số 43 cytokin có liên quan đến ICANS. Tuy nhiên, chỉ IL-2, thụ thể IL-4 hòa tan, yếu tố tăng trưởng tế bào gan và IL-15 tăng cao ở những bệnh nhân bị nhiễm độc thần kinh, chứ không phải ở những bệnh nhân chỉ mắc CRS [155]. Ibrutinib là chất ức chế tyrosine kinase của Bruton được FDA phê chuẩn để điều trị bệnh bạch cầu lympho mạn tính. Ibrutinib cũng có thể ức chế con đường tyrosine kinase do IL-2 gây ra, điều chỉnh sự giải phóng cytokin của các tế bào miễn dịch khác nhau, chẳng hạn như tế bào T, bạch cầu đơn nhân và tế bào khối u. Một số thử nghiệm đã chứng minh rằng việc sử dụng đồng thời Ibrutinib và tế bào CAR-T cho bệnh bạch cầu lympho mạn tính có thể mang lại hiệu quả chống ung thư tổng hợp và cải thiện CRS [46]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đồng thuận so với các báo cáo về cơ chế bệnh sinh đi trước về tăng của IL-2 của liệu pháp tế bào CAR-T. Tại cả hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ nồng độ IL-2 trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với các tế bào ung thư bạch cầu Daudi và Raji có CD19+ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm PBMC. Kết quả này là phù hợp với các báo cáo trước đây về sự tăng nồng độ IL-2 sau liệu pháp tế bào CAR-T và phù hợp với cơ chế tác dụng của liệu pháp tế bào CAR-T. Không có sự khác biệt về nồng độ IL-2 giữa nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 cho thấy không tăng nguy cơ mắc CRS sau điều trị liệu pháp kết hợp so với điều trị đơn liệu pháp tế bào CAR-T.

TNF- $\alpha$  là yếu tố hoại tử khối u và là một trong những cytokin dồi dào nhất được tiết ra bởi các tế bào CAR-T khi xâm nhập khối u. TNF- $\alpha$  là chất trung gian chính của quá trình kích hoạt nội mô do tế bào CAR-T gây ra. Mức độ TNF- $\alpha$  tăng cao đã được báo cáo ở những bệnh nhân điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T, điều này có liên quan đến độc tính của tế bào CAR-T như hội chứng giải phóng cytokin CRS, hội chứng nhiễm độc thần kinh liên quan đến tế bào tác động miễn dịch ICANS [70]. Tuy nhiên, nồng độ cytokin không phải lúc nào cũng tương quan với mức độ nghiêm trọng của CRS và việc theo dõi kịp thời chúng là một thách thức trong điều trị. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy ở cả hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với các tế bào ung thư bạch cầu Daudi và Raji có CD19+ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với tế bào PBMC (nhóm chứng). Kết quả này phù hợp với các báo cáo trước đây về sự tăng nồng độ TNF- $\alpha$  sau liệu pháp tế bào CAR-T. Dựa vào cơ chế tác dụng của liệu pháp tế bào CAR-T có thể thấy điều này là hoàn toàn phù hợp. Tuy nhiên, không thấy có sự khác biệt về nồng độ cytokin này ở nhóm đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1. Điều này cho thấy khi đồng nuôi cấy kết hợp hai liệu pháp khả năng bài tiết cytokin không tăng nên nguy cơ xảy ra tác dụng phụ mạnh hơn so với đơn liệu pháp tế bào CAR-T là chưa thấy trong nghiên cứu của chúng tôi.

Nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi đồng nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ (Raji và Daudi) ở cả thời điểm 24 giờ và 48 giờ đều cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nồng độ TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19- (K562). Kết quả này phù hợp với cơ chế tác dụng của liệu pháp tế bào CAR-T CD19 đặc hiệu trên tế bào CD19+. Kết quả này gợi ý cho thấy khi điều trị kết hợp

trên tế bào CD19<sup>+</sup> có sự tương tác kích thích làm tăng khả năng bài tiết TNF- $\alpha$  của tế bào CAR-T.

Như vậy có thể thấy kết quả nghiên cứu của chúng tôi tại cả hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ nồng độ các cytokin IL-2, TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với kháng thể kháng PD-1 khi nuôi cấy với các tế bào ung thư bạch cầu Daudi và Raji có CD19<sup>+</sup> đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nồng độ IL-2, TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào trên với tế bào PBMC (nhóm chứng). Tuy nhiên, không thấy có sự khác biệt về các nồng độ cytokin này ở nhóm tế bào CAR-T và kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1. Điều này cho thấy khi đồng nuôi cấy kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1 thì khả năng bài tiết cytokin không tăng hơn so với đồng nuôi cấy đơn lẻ với tế bào CAR-T là chưa thấy trong nghiên cứu của chúng tôi.

So sánh giữa hai thời điểm 24 giờ và 48 giờ đồng nuôi cấy của liệu pháp tế bào CAR-T và tế bào CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 với 2 tế bào ung thư bạch cầu có CD19<sup>+</sup> thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ các cytokin IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$  đều không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa 2 thời điểm này. Tuy nhiên, khi đồng nuôi cấy với tế bào ung thư CD19<sup>-</sup> kết quả của chúng tôi lại cho thấy nồng độ các cytokin IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$  lại khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa thời điểm 24 giờ và 48 giờ. Nồng độ IL-2 và TNF- $\alpha$  thì thời điểm 48 giờ giảm có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 24 giờ. Điều này có thể gợi ý khi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và đồng nuôi cấy kết hợp tế bào CAR-T có bổ sung kháng thể kháng PD-1 trong nghiên cứu của chúng tôi với tế bào ung thư bạch cầu CD19<sup>-</sup> không có khả năng kích thích tăng bài tiết thêm IL-2 và TNF- $\alpha$  sau 24 giờ.

Mặc dù liệu pháp tế bào CAR-T là một liệu pháp tế bào chống ung thư có triển vọng lớn, đã chứng minh được tính khả thi trong điều trị các khối u rắn và các ung thư ác tính về huyết học tuy nhiên đôi khi liệu pháp này cũng gây nhiều độc tính có thể đe dọa tính mạng, như hội chứng giải phóng cytokin hay bão

cytokin, gây độc thần kinh, nhiễm độc huyết học, tấn công nhằm đích và hội chứng suy hô hấp cấp. Những hiệu ứng bất lợi này dẫn tới nỗ lực phát triển các nghiên cứu tối ưu hóa liệu pháp tế bào CAR-T an toàn hơn, dễ kiểm soát hơn nhằm mở rộng cơ hội điều trị và cải thiện hiệu quả của liệu pháp miễn dịch ung thư mới nổi này [156]. Rất nhiều phương pháp đã được đưa ra và phát triển để nâng cao hiệu quả và tính an toàn bằng cách tận dụng những tiến bộ gần đây trong sinh học tổng hợp.

Sự tiến bộ nhanh chóng của sinh học tổng hợp đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của nhiều cảm biến và mạch gen có thể điều khiển được để chế tạo và tăng cường chức năng tế bào miễn dịch vượt quá khả năng của hệ thống miễn dịch tự nhiên. Trên cơ sở các đặc tính kỹ thuật, mô-đun và hệ thống, sinh học tổng hợp chắc chắn có giá trị lớn trong việc nâng cao tính an toàn của liệu pháp tế bào CAR-T. Các chiến lược này bao gồm: công tắc kiểm soát, các hệ thống CAR cảm ứng có thể dễ dàng bật tắt CAR theo mong muốn và hệ thống CAR nhạy cảm môi trường khối u để tăng cường khả năng diệt tế bào ung thư và làm giảm tấn công các tế bào khỏe mạnh [157], [158]. Khi sinh học tổng hợp và công nghệ tiếp tục phát triển, chúng tôi dự đoán sẽ có những ứng dụng lâm sàng rộng rãi hơn trong những năm tới.

### **4.3. HẠN CHẾ CỦA ĐỀ TÀI**

Trong nghiên cứu này chúng tôi mới chỉ tiến hành thử nghiệm được một nồng độ kháng thể kháng PD-1 khi kết hợp với một nồng độ tế bào CAR-T, một thời điểm 6 giờ và hai loại tế bào ung thư bạch cầu có CD19+, một loại tế bào ung thư bạch cầu có CD19- do vậy đó cũng có thể là nguyên nhân mà kết quả nghiên cứu của chúng tôi chưa thấy rõ được hiệu quả khác biệt giữa phương pháp điều trị đơn tế bào CAR-T và liệu pháp điều trị kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể kháng PD-1. Ngoài ra chúng tôi cũng chỉ nghiên cứu tác dụng ly giải trên *in vitro* mà chưa thực hiện được đánh giá tác dụng trên mô hình gây bệnh bạch cầu trên chuột. Điều này mở ra hướng nghiên cứu tiếp theo sử dụng thêm



các nồng độ kháng thể kháng PD-1, các thời điểm đánh giá tác dụng như 12 giờ, 24 giờ; trên các dòng tế bào ung thư khác và nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng kháng ung thư khi sử dụng phối hợp hai liệu pháp trên đặc biệt với các bệnh lý ung thư huyết học.

## KẾT LUẬN

### 1. Tính an toàn của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

\* Chất lượng của tế bào CAR-T:

- Môi trường nuôi tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab đảm bảo tiêu chuẩn về nồng độ nội độc tố, không nhiễm khuẩn.

- Tỷ lệ biểu hiện của CAR trên bề mặt tế bào T được phân tích bằng phương pháp tế bào dòng chảy là 26,13% và kỹ thuật Realtime PCR cho thấy CAR biểu hiện trên các tế bào T được chuyển nạp.

\* Tính an toàn của tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên động vật thực nghiệm

Tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab không ảnh hưởng lên sự sống sót, cân nặng, chức năng tạo máu, chức năng gan, chức năng thận và mô bệnh học gan, thận của động vật thí nghiệm sau 4 tuần theo dõi.

### 2. Tác dụng kháng tế bào dòng ung thư bạch cầu của khối tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể kháng PD-1 trên thực nghiệm

- Tế bào CAR-T và CAR-T kết hợp với PD-1 Ab có khả năng ly giải các dòng tế bào ung thư có CD19+ (Daudi, Raji) cao hơn so với tế bào PBMC nhóm chứng ( $p < 0,05$ ).

- Liệu pháp CAR-T kết hợp kháng thể kháng PD-1 làm tăng 1,82 lần hiệu quả ly giải trên tế bào Raji ở tỷ lệ T:E = 1:10 ( $p < 0,001$ ).

- Không có sự khác biệt tỷ lệ ly giải tế bào ung thư Daudi CD19+ khi đồng nuôi cấy với tế bào CAR-T và kết hợp CAR-T với PD-1 Ab ( $p > 0,05$ ).

- Nồng độ cytokin IL-2, TNF- $\alpha$  trong dịch nuôi cấy của tế bào CAR-T và CAR- T kết hợp với PD-1 Ab khi đồng nuôi cấy với các tế bào ung thư có CD19+ đều cao hơn so với khi đồng nuôi cấy với tế bào CD19-. Không thấy có sự khác biệt về các nồng độ IL-2 và TNF- $\alpha$  ở nhóm đồng nuôi cấy cùng tế bào CAR-T và kết hợp CAR-T với PD-1 Ab với  $p > 0,05$ .

## **KIẾN NGHỊ**

Dựa trên các kết quả thu được từ nghiên cứu này chúng tôi đưa ra kiến nghị sau:

- Tiến hành các thí nghiệm khảo sát nồng độ PD-1 Ab đánh giá hiệu quả đối với các dòng tế bào ung thư trong nghiên cứu. Từ đó tiến hành thêm các thử nghiệm kết hợp khối tế bào CAR-T với PD-1 Ab ở các liều PD-1 Ab, tỷ lệ tế bào và thời gian khác nhau.

- Tiến hành thử nghiệm liệu pháp kết hợp tế bào CAR-T kết hợp với PD-1 Ab trên mô hình chuột gây bệnh bạch cầu.

- Xem xét tiến hành các thử nghiệm lâm sàng sử dụng kết hợp khối tế bào CAR-T và kháng thể kháng PD-1 để điều trị bệnh bạch cầu trên người.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU  
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Nguyen Hien Hanh**, Bui Khac Cuong, Nguyen Thi Mai Ly, Pham Chi, Nham Thi Phuong Linh, Ngo Thu Hang, Ho Viet Hoanh, Ta Viet Hung, Przemyslaw Bozko, Nguyen Linh Toan, Can Van Mao (2023). The safety of CAR-T cells and PD-1 antibody combination on an experimental model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 649: 25-31.
2. **Nguyễn Thị Hiền Hạnh**, Cán Văn Mão, Bùi Khắc Cường (2023). Đặc điểm một số chỉ số bạch cầu và nồng độ IL-6 sau điều trị bằng liệu pháp tế bào CAR-T phối hợp với kháng thể đơn dòng ức chế PD-1 trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 530(1): 111-115.
3. **Nguyễn Thị Hiền Hạnh**, Cán Văn Mão, Ngô Thu Hằng, Đặng Thùy Linh, Bùi Khắc Cường (2024). Đánh giá khả năng ly giải các dòng tế bào ung thư CD19(+) của liệu pháp điều trị kết hợp tế bào CAR-T với kháng thể đơn dòng ức chế PD-1 trên thực nghiệm. *Tạp chí Y học Việt Nam*, 535(1B): 265-269.
4. **Nguyễn Thị Hiền Hạnh**, Cán Văn Mão, Bùi Khắc Cường (2024). Khảo sát nồng độ TNF- $\alpha$  và mối tương quan với các chỉ số bạch cầu trên chuột điều trị kết hợp ức chế PD-1 và tế bào CAR-T. *Tạp chí Nghiên cứu Y học*, 175(2): 164-171.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., et al. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries74(3): 229-263.
2. Blüm P., Kayser S. (2024). Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Therapy in Hematologic Malignancies: Clinical Implications and Limitations16(8): 1599.
3. Zhou Y., Mu W., Wang C., et al. (2023). Ray of dawn: Anti-PD-1 immunotherapy enhances the chimeric antigen receptor T-cell therapy in Lymphoma patients. *BMC Cancer*, 23(1): 1019.
4. Han Y., Liu D., Li L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*, 10(3): 727-742.
5. Wang Z., Li N., Feng K., et al. (2021). Phase I study of CAR-T cells with PD-1 and TCR disruption in mesothelin-positive solid tumors. *Cell Mol Immunol*, 18(9): 2188-2198.
6. Bispo J. A. B., Pinheiro P. S., Kobetz E. K. (2020). Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 10(6).
7. Đỗ Trung Phần (2019), *Tăng sinh tủy thể cấp-ác tính* in *Tế bào gốc và bệnh lý tế bào gốc tạo máu*Nhà xuất bản y học: Hà Nội, 279-312.
8. Đỗ Trung Phần (2019), *Leukemia mạn dòng hạt* in *Tế bào gốc và bệnh lý tế bào gốc tạo máu*Nhà xuất bản y học: Hà Nội, 340-351.
9. Globocan (2022). Number of new cases in 2022 in Viet Nam. *International agency for research on cancer*.
10. Tebbi C. K. (2021). Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers (Basel)*, 13(9).
11. Zeeb H., Blettner M. (1998). Adult leukaemia: what is the role of currently known risk factors? *Radiat Environ Biophys*, 36(4): 217-28.

12. Jin M. W., Xu S. M., An Q., et al. (2016). A review of risk factors for childhood leukemia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20(18): 3760-3764.
13. Belson M., Kingsley B., Holmes A. (2007). Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environ Health Perspect*, 115(1): 138-45.
14. Phạm Quang Vinh, Nguyễn Hà Thanh (2019), *Quá trình sinh máu trong cơ thể*, in *Bài giảng sau đại học Huyết học - Truyền máu* Nhà xuất bản y học: Trường đại học Y Hà Nội, 7-22.
15. Phạm Quang Vinh, Nguyễn Hà Thanh (2019), *Bệnh lơ xê mi cấp*, in *Bài giảng sau đại học Huyết học - Truyền máu* Nhà xuất bản Y học: Trường Đại học Y Hà Nội, 248-272.
16. Phạm Quang Vinh, Nguyễn Hà Thanh (2019), *Bệnh lơ xê mi tủy kinh*, in *Bài giảng sau đại học Huyết học - Truyền máu* Nhà xuất bản Y học: Hà Nội, 273-280.
17. Alhmoud J. F., Mustafa A. G., Malki M. I. (2020). Targeting DNA Repair Pathways in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci*, 21(19).
18. Granatowicz A., Piatek C. I., Moschiano E., et al. (2015). An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. *Korean J Fam Med*, 36(5): 197-202.
19. Burd C. E., Liu W., Huynh M. V., et al. (2014). Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discov*, 4(12): 1418-29.
20. Jones L., Wei G., Sevcikova S., et al. (2010). Gain of MYC underlies recurrent trisomy of the MYC chromosome in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med*, 207(12): 2581-94.
21. Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20): 2391-405.
22. Ashkan Emadi Jennie York Law (2023). Overview of Leukemia. *MSD Manual*.

23. Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R. P., et al. (2022). International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*, 140(11): 1200-1228.
24. Đỗ Trung Phần (2006), *Lơ-xê-mi cấp* in *Bài giảng Huyết học - Truyền máu sau đại học* Nhà xuất bản y học: Trường Đại học Y Hà Nội.
25. Khaddour K., Hana C. K., Mewawalla P. (2023), *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*, in *StatPearls* StatPearls Publishing: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Caroline Hana declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Perna Mewawalla declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
26. Papaioannou N. E., Beniata O. V., Vitsos P., et al. (2016). Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann Transl Med*, 4(14): 261.
27. Lorentzen C. L., Straten P. T. (2015). CD19-Chimeric Antigen Receptor T Cells for Treatment of Chronic Lymphocytic Leukaemia and Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Scand J Immunol*, 82(4): 307-19.
28. Rohit R. S., Llukmani A., Hashim A., et al. (2021). The Role of Chimeric Antigen Receptor-T Cell Therapy in the Treatment of Hematological Malignancies: Advantages, Trials, and Tribulations, and the Road Ahead. *Cureus*, 13(2): e13552.
29. Porter D. L., Hwang W. T., Frey N. V., et al. (2015). Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*, 7(303): 303ra139.
30. Magnani C. F., Gaipa G., Lussana F., et al. (2020). Sleeping Beauty-engineered CAR T cells achieve antileukemic activity without severe toxicities. *J Clin Invest*, 130(11): 6021-6033.
31. Pang Y., Hou X., Yang C., et al. (2018). Advances on chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy for oncotherapy. *Mol Cancer*, 17(1): 91.

32. Brentjens R. J., Latouche J. B., Santos E., et al. (2003). Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 9(3): 279-86.
33. Brentjens R. J., Davila M. L., Riviere I., et al. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*, 5(177): 177ra38.
34. FDA (2017). *FDA approval brings first gene therapy to the United States*.
35. FDA (2017). *FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma*.
36. Pandya P. H., Murray M. E., Pollok K. E., et al. (2016). The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res*, 2016: 4273943.
37. D'Aloia M. M., Zizzari I. G., Sacchetti B., et al. (2018). CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis*, 9(3): 282.
38. Kochenderfer J. N., Dudley M. E., Kassim S. H., et al. (2015). Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol*, 33(6): 540-9.
39. Gardner R. A., Finney O., Annesley C. (2017). Intent-to-treat leukemia remission by CD19 CAR T cells of defined formulation and dose in children and young adults. *N Engl J Med*, 376(25): 3322-3331.
40. Turtle C. J., Hanafi L. A., Berger C., et al. (2016). Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med*, 8(355): 355ra116.
41. Sengsayadeth S., Savani B. N., Oluwole O., et al. (2022). Overview of approved CAR-T therapies, ongoing clinical trials, and its impact on clinical practice. *EJHaem*, 3(Suppl 1): 6-10.



42. Wang V., Gauthier M., Decot V., et al. (2023). Systematic Review on CAR-T Cell Clinical Trials Up to 2022: Academic Center Input. *Cancers (Basel)*, 15(4).
43. Zhang Q., Ping J., Huang Z., et al. (2020). CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead. *J Immunol Res*, 2020: 1924379.
44. Asmamaw D. T., Tiruneh G. Medhin M., Dessie Terefe G., et al. (2022). Current updates on generations, approvals, and clinical trials of CAR T-cell therapy. *Hum Vaccin Immunother*, 18(6): 2114254.
45. Chen L., Chen F., Niu H., et al. (2022). Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cell Immunotherapy Against Thoracic Malignancies: Challenges and Opportunities. *Front Immunol*, 13: 871661.
46. Xiao X., Huang S., Chen S., et al. (2021). Mechanisms of cytokine release syndrome and neurotoxicity of CAR T-cell therapy and associated prevention and management strategies. *J Exp Clin Cancer Res*, 40(1): 367.
47. Hirayama A. V., Turtle C. J. (2019). Toxicities of CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Am J Hematol*, 94(S1): S42-s49.
48. Zhang Y., Qin D., Shou A. C., et al. (2023). Exploring CAR-T Cell Therapy Side Effects: Mechanisms and Management Strategies. *J Clin Med*, 12(19).
49. Khan A. N., Chowdhury A., Karulkar A., et al. (2022). Immunogenicity of CAR-T Cell Therapeutics: Evidence, Mechanism and Mitigation. *Front Immunol*, 13: 886546.
50. Gorovits B., Koren E. (2019). Immunogenicity of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapeutics. *BioDrugs*, 33(3): 275-284.
51. Wang X., Rivière I. (2016). Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics*, 3: 16015.
52. Coppola C., Hopkins B., Huhn S., et al. (2020). Investigation of the Impact from IL-2, IL-7, and IL-15 on the Growth and Signaling of Activated CD4(+) T Cells. *Int J Mol Sci*, 21(21).

53. Tallantyre E., Evans N., Parry-Jones J., et al. (2021). Neurological updates: neurological complications of CAR-T therapy. *Journal of Neurology*, 268: 1-11.
54. Maher J. (2014). Clinical immunotherapy of B-cell malignancy using CD19-targeted CAR T-cells. *Curr Gene Ther*, 14(1): 35-43.
55. Zheng P. P., Kros J. M., Li J. (2018). Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov Today*, 23(6): 1175-1182.
56. Wang M., Munoz J., Goy A., et al. (2020). KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*, 382(14): 1331-1342.
57. Ramos C. A., Grover N. S., Beaven A. W., et al. (2020). Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol*, 38(32): 3794-3804.
58. Mei H., Li C., Jiang H., et al. (2021). A bispecific CAR-T cell therapy targeting BCMA and CD38 in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol*, 14(1): 161.
59. Chen S., Zhang Y., Fang C., et al. (2022). Donor-derived and off-the-shelf allogeneic anti-CD19 CAR T-cell therapy for R/R ALL and NHL: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*, 179: 103807.
60. Yu M., Zhang Q., Kong F., et al. (2023). Efficacy and Safety of Dual-Targeting Chimeric Antigen Receptor-T Therapy for Relapsed or Refractory B Cell Lymphoid Malignancies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Hum Gene Ther*, 34(5-6): 192-202.
61. Nijmeijer B. A., Willemze R., Falkenburg J. H. (2002). An animal model for human cellular immunotherapy: specific eradication of human acute lymphoblastic leukemia by cytotoxic T lymphocytes in NOD/scid mice. *Blood*, 100(2): 654-60.

62. Furuhashi Y., Sakai A., Murakami T., et al. (2020). Bioluminescent imaging of *Arabidopsis thaliana* using an enhanced Nano-lantern luminescence reporter system. *PLoS One*, 15(1): e0227477.
63. Kumari R., Ouyang X., Wang J., et al. (2021). Preclinical pharmacology modeling of chimeric antigen receptor T therapies. *Curr Opin Pharmacol*, 61: 49-61.
64. Han X., Wang Y., Wei J., et al. (2019). Multi-antigen-targeted chimeric antigen receptor T cells for cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 12(1): 128.
65. Wagner D. L., Fritsche E., Pulsipher M. A., et al. (2021). Immunogenicity of CAR T cells in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 18(6): 379-393.
66. Boulch M., Cazaux M., Loe-Mie Y., et al. (2021). A cross-talk between CAR T cell subsets and the tumor microenvironment is essential for sustained cytotoxic activity. *Sci Immunol*, 6(57).
67. Gardner R. A., Ceppi F., Rivers J., et al. (2019). Preemptive mitigation of CD19 CAR T-cell cytokine release syndrome without attenuation of antileukemic efficacy. *Blood*, 134(24): 2149-2158.
68. El-Tahan R. R., Ghoneim A. M., El-Mashad N. (2016). TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and expression. *Springerplus*, 5(1): 1508.
69. Meiraz A., Garber O. G., Harari S., et al. (2009). Switch from perforin-expressing to perforin-deficient CD8(+) T cells accounts for two distinct types of effector cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunology*, 128(1): 69-82.
70. Chen Y., Li R., Shang S., et al. (2021). Therapeutic Potential of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  Blockade for CRS/ICANS in CAR-T Therapy via Ameliorating Endothelial Activation. *Front Immunol*, 12: 623610.
71. Hodge D. R., Hurt E. M., Farrar W. L. (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*, 41(16): 2502-12.

72. Frey N., Porter D. (2019). Cytokine Release Syndrome with Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*, 25(4): e123-e127.
73. Burger R. (2013). Impact of interleukin-6 in hematological malignancies. *Transfus Med Hemother*, 40(5): 336-43.
74. Zhang Q., Hresko M. E., Picton L. K., et al. (2021). A human orthogonal IL-2 and IL-2R $\beta$  system enhances CAR T cell expansion and antitumor activity in a murine model of leukemia. *Sci Transl Med*, 13(625): eabg6986.
75. Bell M., Gottschalk S. (2021). Engineered Cytokine Signaling to Improve CAR T Cell Effector Function. *Front Immunol*, 12: 684642.
76. Celis-Gutierrez J., Blattmann P., Zhai Y., et al. (2019). Quantitative Interactomics in Primary T Cells Provides a Rationale for Concomitant PD-1 and BTLA Coinhibitor Blockade in Cancer Immunotherapy. *Cell Rep*, 27(11): 3315-3330.e7.
77. Zhang J., Somani A. K., Siminovitch K. A. (2000). Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin Immunol*, 12(4): 361-78.
78. Nguyen T. V., Ke Y., Zhang E. E., et al. (2006). Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. *J Immunol*, 177(9): 5990-6.
79. Presotto D., Erdes E., Duong M. N., et al. (2017). Fine-Tuning of Optimal TCR Signaling in Tumor-Redirected CD8 T Cells by Distinct TCR Affinity-Mediated Mechanisms. *Front Immunol*, 8: 1564.
80. Kwon J., Qu C. K., Maeng J. S., et al. (2005). Receptor-stimulated oxidation of SHP-2 promotes T-cell adhesion through SLP-76-ADAP. *Embo j*, 24(13): 2331-41.
81. Choi S., Warzecha C., Zvezdova E., et al. (2017). THEMIS enhances TCR signaling and enables positive selection by selective inhibition of the phosphatase SHP-1. *Nat Immunol*, 18(4): 433-441.

82. Awadasseid A., Zhou Y., Zhang K., et al. (2023). Current studies and future promises of PD-1 signal inhibitors in cervical cancer therapy. *Biomed Pharmacother*, 157: 114057.
83. Kleffel S., Posch C., Barthel S. R., et al. (2015). Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell*, 162(6): 1242-56.
84. Ghosh C., Luong G., Sun Y. (2021). A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*, 12(9): 2735-2746.
85. Tang H., Liang Y., Anders R. A., et al. (2018). PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*, 128(2): 580-588.
86. Ostrand-Rosenberg S., Horn L. A., Haile S. T. (2014). The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol*, 193(8): 3835-41.
87. Clark C. A., Gupta H. B., Sareddy G., et al. (2016). Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth, Pathogenesis, and Autophagy in Ovarian Cancer and Melanoma. *Cancer Res*, 76(23): 6964-6974.
88. Butte M. J., Keir M. E., Phamduy T. B., et al. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27(1): 111-22.
89. Guo Z. S. (2018). The 2018 Nobel Prize in medicine goes to cancer immunotherapy (editorial for BMC cancer). *BMC Cancer*, 18(1): 1086.
90. Jiang Y., Chen M., Nie H., et al. (2019). PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*, 15(5): 1111-1122.
91. Oiseth S. J., Aziz M. S. (2017). Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 3: 250-261.
92. Bartolović N., Zujic P. V., Božanić A. (2023). P296 Can MRI detect PD-L1 expression as accurately as a patohistological specimen?68: S133.

93. Hirata S., Senju S., Matsuyoshi H., et al. (2005). Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide along with TRAIL or programmed death-1 ligand. *J Immunol*, 174(4): 1888-97.
94. Ding H., Wu X., Wu J., et al. (2006). Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. *Clin Immunol*, 118(2-3): 258-67.
95. Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366(26): 2443-54.
96. Guo L., Wei R., Lin Y., et al. (2020). Clinical and Recent Patents Applications of PD-1/PD-L1 Targeting Immunotherapy in Cancer Treatment-Current Progress, Strategy, and Future Perspective. *Front Immunol*, 11: 1508.
97. Kim S. I., Cassella C. R., Byrne K. T. (2020). Tumor Burden and Immunotherapy: Impact on Immune Infiltration and Therapeutic Outcomes. *Front Immunol*, 11: 629722.
98. Tumeh P. C., Harview C. L., Yearley J. H., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515(7528): 568-71.
99. Herbst R. S., Soria J. C., Kowanetz M., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515(7528): 563-7.
100. Grossman J. E., Vasudevan D., Joyce C. E., et al. (2021). Is PD-L1 a consistent biomarker for anti-PD-1 therapy? The model of balstilimab in a virally-driven tumor. *Oncogene*, 40(8): 1393-1395.

101. Hugo W., Zaretsky J. M., Sun L., et al. (2016). Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*, 165(1): 35-44.
102. Roh W., Chen P. L., Reuben A., et al. (2017). Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Sci Transl Med*, 9(379).
103. Rizvi N. A., Hellmann M. D., Snyder A., et al. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230): 124-8.
104. Van Allen E. M., Miao D., Schilling B., et al. (2015). Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*, 350(6257): 207-211.
105. Yadav M., Jhunjunwala S., Phung Q. T., et al. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*, 515(7528): 572-6.
106. Kon E., Benhar I. (2019). Immune checkpoint inhibitor combinations: Current efforts and important aspects for success. *Drug Resist Updat*, 45: 13-29.
107. Yang W., Bai Y., Xiong Y., et al. (2016). Potentiating the antitumour response of CD8(+) T cells by modulating cholesterol metabolism. *Nature*, 531(7596): 651-5.
108. Song W., Zhang M. (2020). Use of CAR-T cell therapy, PD-1 blockade, and their combination for the treatment of hematological malignancies. *Clin Immunol*, 214: 108382.
109. Hirayama A. V., Kimble E. L., Wright J. H., et al. (2024). Timing of anti-PD-L1 antibody initiation affects efficacy/toxicity of CD19 CAR T-cell therapy for large B-cell lymphoma. *Blood Adv*, 8(2): 453-467.

110. Li S., Siriwon N., Zhang X., et al. (2017). Enhanced Cancer Immunotherapy by Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells Engineered to Secrete Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 23(22): 6982-6992.
111. Wang J., Deng Q., Jiang Y. Y., et al. (2019). CAR-T 19 combined with reduced-dose PD-1 blockade therapy for treatment of refractory follicular lymphoma: A case report. *Oncol Lett*, 18(5): 4415-4420.
112. Hou B., Tang Y., Li W., et al. (2019). Efficiency of CAR-T Therapy for Treatment of Solid Tumor in Clinical Trials: A Meta-Analysis. *Dis Markers*, 2019: 3425291.
113. Adusumilli P. S., Zauderer M. G., Rivière I., et al. (2021). A Phase I Trial of Regional Mesothelin-Targeted CAR T-cell Therapy in Patients with Malignant Pleural Disease, in Combination with the Anti-PD-1 Agent Pembrolizumab. *Cancer Discov*, 11(11): 2748-2763.
114. Silva-Santana G., Bax J. C., Fernandes D. C. S., et al. (2020). Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 Mus musculus. *Animal Model Exp Med*, 3(4): 304-315.
115. Dunn S. R., Qi Z., Bottinger E. P., et al. (2004). Utility of endogenous creatinine clearance as a measure of renal function in mice. *Kidney Int*, 65(5): 1959-67.
116. Li Y., Huo Y., Yu L., et al. (2019). Quality Control and Nonclinical Research on CAR-T Cell Products: General Principles and Key Issues. *Engineering*, 5(1): 122-131.
117. Wang X., Rivière I. (2015). Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies. *Cancer Gene Ther*, 22(2): 85-94.
118. Lukjanov V., Koutná I., Šimara P. (2021). CAR T-Cell Production Using Nonviral Approaches. *J Immunol Res*, 2021: 6644685.



119. Valente J. F. A., Queiroz J. A., Sousa F. (2021). Dilemma on plasmid DNA purification: binding capacity vs selectivity. *Journal of Chromatography A*, 1637: 461848.
120. Singh H., Srour S. A., Milton D. R., et al. (2022). Sleeping beauty generated CD19 CAR T-Cell therapy for advanced B-Cell hematological malignancies. *Front Immunol*, 13: 1032397.
121. Fried S., Avigdor A., Bielorai B., et al. (2019). Early and late hematologic toxicity following CD19 CAR-T cells. *Bone Marrow Transplant*, 54(10): 1643-1650.
122. Nagle S. J., Murphree C., Raess P. W., et al. (2021). Prolonged hematologic toxicity following treatment with chimeric antigen receptor T cells in patients with hematologic malignancies. *Am J Hematol*, 96(4): 455-461.
123. Brudno J. N., Kochenderfer J. N. (2016). Toxicities of chimeric antigen receptor T cells: recognition and management. *Blood*, 127(26): 3321-30.
124. Luo W., Li C., Zhang Y., et al. (2022). Adverse effects in hematologic malignancies treated with chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy: a systematic review and Meta-analysis. *BMC Cancer*, 22(1): 98.
125. Li H., Zhao L., Sun Z., et al. (2022). Prolonged hematological toxicity in patients receiving BCMA/CD19 CAR-T-cell therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *Front Immunol*, 13: 1019548.
126. Naidoo J., Page D. B., Li B. T., et al. (2015). Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol*, 26(12): 2375-91.
127. Gutgarts V., Jain T., Zheng J., et al. (2020). Renal Effects and Recovery in Patients Receiving Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 26(3, Supplement): S267.
128. Dai H., Wang Y., Lu X., et al. (2016). Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst*, 108(7).

129. Maude S. L., Frey N., Shaw P. A., et al. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med*, 371(16): 1507-17.
130. Zhang J. M., An J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45(2): 27-37.
131. Kaur S., Bansal Y., Kumar R., et al. (2020). A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 28(5): 115327.
132. Muller B. J., Inaba H. (2023). Chimeric antigen receptor T-cells in B-acute lymphoblastic leukemia: history, current situation, and future. *Transl Pediatr*, 12(10): 1900-1907.
133. Inaba H., Pui C. H. (2021). Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med*, 10(9).
134. Jayaraman J., Mellody M. P., Hou A. J., et al. (2020). CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine*, 58: 102931.
135. Boettcher M., Joechner A., Li Z., et al. (2022). Development of CAR T Cell Therapy in Children-A Comprehensive Overview. *J Clin Med*, 11(8).
136. Seimetz D., Heller K., Richter J. (2019). Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Med*, 11: 2155179018822781.
137. Iyer R. K., Bowles P. A., Kim H., et al. (2018). Industrializing Autologous Adoptive Immunotherapies: Manufacturing Advances and Challenges. *Front Med (Lausanne)*, 5: 150.
138. Stock S., Übelhart R., Schubert M. L., et al. (2019). Idelalisib for optimized CD19-specific chimeric antigen receptor T cells in chronic lymphocytic leukemia patients. *Int J Cancer*, 145(5): 1312-1324.
139. Picanço-Castro V. , Moço P. D., Mizukami A., et al. (2020). Establishment of a simple and efficient platform for car-t cell generation and expansion: from lentiviral production to *in vivo* studies. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 42(2): 150-158.

140. Hamid O., Robert C., Daud A., et al. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 369(2): 134-44.
141. Hanahan D., Coussens L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3): 309-22.
142. Robert C., Long G. V., Brady B., et al. (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*, 372(4): 320-30.
143. Ribas A., Hu-Lieskovan S. (2016). What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med*, 213(13): 2835-2840.
144. Geng Z., Xiao Y., Zhu X. J., et al. (2018). Anti-PD-1 therapy for clinical treatment of lymphoma: a single-arm meta-analysis. *Oncotarget*, 9(82): 35343-35355.
145. Fischer J. W., Bhattarai N. (2021). CAR-T Cell Therapy: Mechanism, Management, and Mitigation of Inflammatory Toxicities. *Front Immunol*, 12: 693016.
146. Riley J. L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*, 229(1): 114-25.
147. Tsukamoto H., Fujieda K., Miyashita A., et al. (2018). Combined Blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 Signaling Abrogates Mutual Regulation of Their Immunosuppressive Effects in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res*, 78(17): 5011-5022.
148. Huseni M. A., Wang L., Klementowicz J. E., et al. (2023). CD8(+) T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy. *Cell Rep Med*, 4(1): 100878.
149. Messmer A. S., Que Y. A., Schankin C., et al. (2021). CAR T-cell therapy and critical care : A survival guide for medical emergency teams. *Wien Klin Wochenschr*, 133(23-24): 1318-1325.
150. Jiang Z., Liao R., Lv J., et al. (2021). IL-6 trans-signaling promotes the expansion and anti-tumor activity of CAR T cells. *Leukemia*, 35(5): 1380-1391.

151. Bellal M., Malherbe J., Damaj G., et al. (2024). Toxicities, intensive care management, and outcome of chimeric antigen receptor T cells in adults: an update. *Crit Care*, 28(1): 69.
152. Li Y., Ming Y., Fu R., et al. (2022). The pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment of CAR-T cell therapy-related adverse reactions. *Front Pharmacol*, 13: 950923.
153. Obstfeld A. E., Frey N. V., Mansfield K., et al. (2017). Cytokine release syndrome associated with chimeric-antigen receptor T-cell therapy: clinicopathological insights. *Blood*, 130(23): 2569-2572.
154. Titov A., Petukhov A., Staliarova A., et al. (2018). The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities. *Cell Death Dis*, 9(9): 897.
155. Gust J., Ponce R., Liles W. C., et al. (2020). Cytokines in CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Front Immunol*, 11: 577027.
156. Liu Q., Liu Z., Wan R., et al. (2022). Clinical Strategies for Enhancing the Efficacy of CAR T-Cell Therapy for Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*, 14(18).
157. Labanieh L., Majzner R. G., Mackall C. L. (2018). Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nat Biomed Eng*, 2(6): 377-391.
158. Lu L., Xie M., Yang B., et al. (2024). Enhancing the safety of CAR-T cell therapy: Synthetic genetic switch for spatiotemporal control. *Sci Adv*, 10(8): eadj6251.