

## Оптимизация условий трансдукции при использовании рекомбинантных лентивирусных векторов для генетической модификации Т-лимфоцитов человека

Научный руководитель – Стрекаловский Иван Вадимович

Парфенов Д.Ф.<sup>1</sup>, Орлова А.В.<sup>2</sup>, Звягина А.К.<sup>3</sup>, Левчук К.А.<sup>4</sup>

1 - Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: dmitrij.parfenov@sprpu.ru*; 2 - Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: orlova5455@yandex.ru*; 3 - Ставропольский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Ставрополь, Россия, *E-mail: aliana.zviagina@yandex.ru*; 4 - Санкт-Петербургский государственный университет, Биологический факультет, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: ksenialevchuk2@gmail.com*

Проблема онкогематологических заболеваний является одной из приоритетных для современной медицины. Так, в 2018 году смертность по причине злокачественных новообразований составила 200,3 случая на 100 тыс. населения, причем 5,6 % приходятся на опухоли лимфотической и кроветворной ткани [1]. В связи с этим, разработка технологии получения CAR Т-лимфоцитов (от англ. *chimeric antigen receptor*), как одного из подходов лечения онкогематологических заболеваний, является актуальной задачей.

Цель исследования — оптимизация условий трансдукции при использовании рекомбинантных лентивирусных векторов (рЛВ), несущих последовательности CAR и репортерного белка GFP (от англ. *green fluorescent protein*), для генетической модификации Т-лимфоцитов человека.

Процесс трансдукции Т-клеток производили на CD3+ лимфоцитах при добавлении рЛВ в клеточную суспензию в присутствии трансдуцирующего агента — протамин сульфата.

Варьируемые параметры — концентрация протамин сульфата, начальная плотность Т-лимфоцитов, доля лентивирусного препарата от общего объема трансдуцируемой суспензии.

Дизайн эксперимента составили при помощи программного обеспечения Umetrix MODDE, выбрав 28 вариантов, в которых исследуемые факторы имели следующие заданные значения:

- начальная плотность Т-клеток:  $2,5 \times 10^5$ ,  $26,25 \times 10^5$  и  $50 \times 10^5$  кл/мл;
- концентрация протамин сульфата: 10, 30, 50 мкг/мл;
- объем ЛП: 30, 50 и 70 % от объема трансдуцируемой суспензии.

На 3 день после постановки эксперимента измеряли эффективность трансдукции Т-лимфоцитов по флуоресценции GFP-репортера методом проточной цитометрии. В результате исследования были построены поверхности отклика целевых параметров (жизнеспособность клеток и эффективность трансдукции) при варьировании условий эксперимента с заданными значениями (рис. 1). Установлено, что с увеличением доли лентивирусного препарата и концентрации протамин сульфата, снижается эффективность трансдукции — доля GFP+ популяции при добавлении более 50 % рЛВ от общего объема трансдуцируемой суспензии падает с 16 % до 6 %. Экспозиция клеток с трансдуцирующим агентом в концентрации выше 30 мкг/мл приводит к снижению числа модифицированных Т-лимфоцитов, что свидетельствует о наличии цитотоксического эффекта на клетки. На всех

поверхностях отклика наблюдается тенденция к уменьшению эффективности трансдукции при модификации Т-клеток с численностью более  $10 \times 10^5$  кл/мл. Оптимальная начальная плотность —  $5-10 \times 10^5$  кл/мл.

Таким образом, в результате исследования установлено:

- 1) Оптимальная концентрация протамина сульфата — 20-30 мкг/мл;
- 2) Для проведения трансдукции предпочтительна начальная плотность Т-лимфоцитов —  $5-10 \times 10^5$  кл/мл;
- 3) Увеличение объемной доли лентивирусного препарата ведет к уменьшению численности Т-клеток, максимально возможная — 50 % от объема трансдуцируемой суспензии.

### Источники и литература

- 1) Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность) / Под редакцией А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена. 2019.

### Иллюстрации

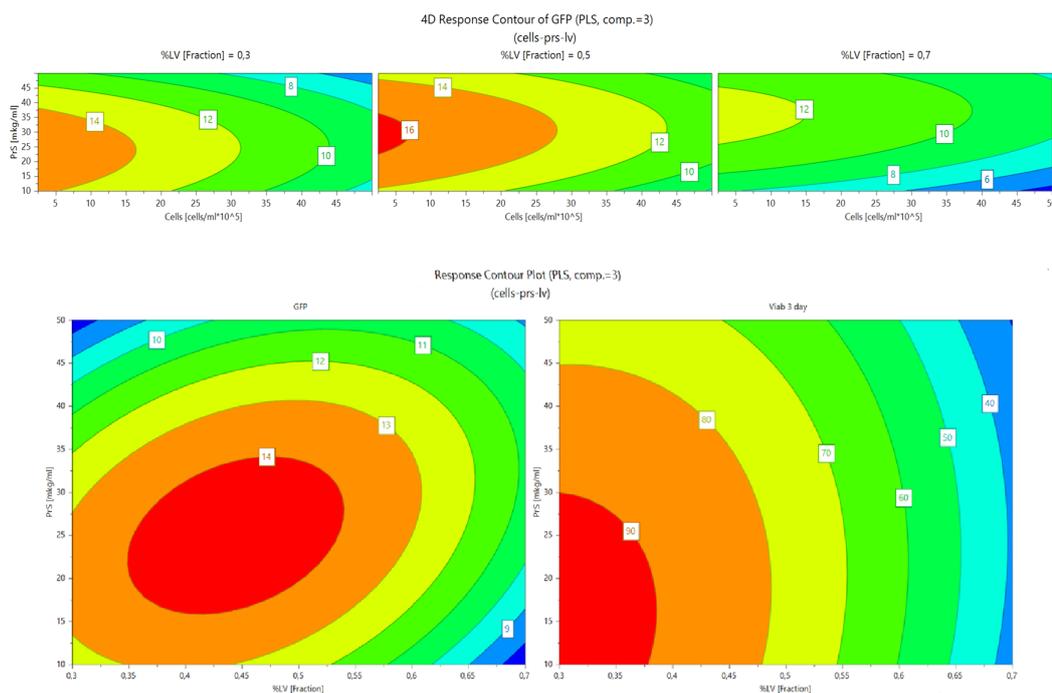


Рис. 1. Поверхности отклика целевых параметров, полученные при помощи Umetrix MODDE.