

УДК 578.226

DOI: 10.14427/jipai.2025.3.29

Оптимизация метода лентивирусной трансдукции с целью получения CAR-лимфоцитов

П.О. Фёдорова^{1,3,4}, И.О. Чикилева¹, Н.А. Персиянцева², М.А. Замкова², М.В. Киселевский¹

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

² Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва

⁴ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва

Optimization of lentiviral transduction for car lymphocytes

P. Fedorova^{1,3,4}, I. Chikileva¹, N. Persiyantseva², M. Zamkova², M. Kiselevskiy¹

¹ Research Institute of Tumor Experimental Therapy and Diagnosis, NN Blokhin National Medical Center of Oncology, Moscow, Russia

² Research Institute of Carcinogenesis, NN Blokhin National Medical Center of Oncology, Moscow, Russia

³ Il Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Аннотация

Эффективность проводимой CAR-терапии тесно связана с количеством иммунных клеток, экспрессирующих CAR. Для внедрения CAR-последовательности в геном лимфоцитов используются как вирусы, так и невирусные векторы, среди которых отдаётся предпочтение лентивирусному способу доставки генов. Однако эффективность лентивирусной трансдукции первичной культуры лимфоцитов остаётся существенно ниже по сравнению с аналогичным показателем при работе с перевиваемыми клеточными линиями. Целью данной работы являлась оптимизация метода трансфекции для получения лентивирусных частиц, а также повышение эффективности лентивирусной трансдукции. В данном исследовании получали лентивирусы, кодирующие последовательность белка GFP или CAR, проводили их концентрирование. Далее осуществляли трансдукцию перевиваемых культур клеток (HEK293T и Jurkat), первичной культуры лимфоцитов человека, а также фракции CD4+, CD8+ лимфоцитов, полученных из первичной лимфоцитарной культуры. Оценивали уровень экспрессии GFP-белка или CAR, а также проводили селекцию лимфоцитов. Было установлено, что оптимальным вариантом концентрирования лентивирусов является центрифугирование с использованием PEG8000, а повышению эффективности трансдукции способствует использование липофектамина вместо кальций-фосфатного метода. Несмотря на высокие показатели трансдукции клеточной линии Jurkat, эффективность трансдукции лимфоцитов человека остаётся невысокой. Для увеличения экспрессии CAR (до 75-88%) были проведены,

Summary

The efficacy of CAR therapy is associated with the number of immune cells expressing CAR. Both viruses and non-viral vectors are used to introduce the CAR sequence into the lymphocyte genome, among which the lentiviral method of gene delivery is preferred. However, the effectiveness of lentiviral transduction of the primary lymphocyte culture remains significantly lower compared to working with transplantable cell lines. The aim of this study was to optimize the transfection method for obtaining lentiviral particles, and to increase lentiviral transduction efficiency. In this study, lentiviruses encoding the GFP or CAR protein sequence were obtained by transfection of HEK293T cell cultures; the viruses were subsequently concentrated. Then, transduction of transplantable cell cultures (HEK293T and Jurkat), primary human lymphocyte culture, and CD4+, CD8+ lymphocyte fractions obtained from primary lymphocyte culture were performed. The expression of GFP or CAR was assessed, and lymphocytes were selected. It was found that the optimal option for concentrating lentiviruses was centrifugation using PEG8000, while the use of lipofectamine instead of the calcium phosphate method contributed to an increase in the transduction efficiency. Despite the high transduction rates of the Jurkat cell line, the transduction efficiency of human lymphocytes remains low. In order to obtain more significant CAR expression (up to 75-88%), magnetic separation or selection of CAR lymphocytes with blasticidin were performed in independent experiments. Although these approaches have allowed enrichment of the CAR lymphocyte population, further improvement of the

в независимых экспериментах, магнитная сепарация Т-клеток или селекция CAR-лимфоцитов бластицидином. Хотя данные подходы и позволили обогатить популяцию CAR-лимфоцитов, дальнейшее повышение эффективности генетической модификации лимфоцитов человека является приоритетной и требующей большого внимания задачей при получении CAR-клеток.

Ключевые слова

Лентивирусы, трансдукция, CAR-лимфоциты, PEG8000, полибрен.

Введение

Адоптивная иммунотерапия произвела прорыв в лечении онкологических заболеваний. Первоначально иммунотерапевтический подход базировался на использовании лимфокин-активированных киллеров (ЛАК) – иммунных клеток пациента, активированных цитокинами и обладающих высокой цитотоксической активностью [1]. Однако ЛАК способны распознавать только антигены, презентированные в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), поэтому экспрессия опухолевыми клетками антигенов «здоровых» тканей не приводит к их распознаванию и уничтожению [2]. Данное обстоятельство привело к созданию адоптивной клеточной терапии на основе лимфоцитов с химерным рецептором антигена (CAR), который обеспечивает распознавание антигена без участия МНС-рецепторов.

CAR – это синтетический рецептор, состоящий из двух частей: из внеклеточного домена распознавания антигена (одноцепочечный вариабельный фрагмент моноклонального антитела (МАТ)) и внутриклеточного сигнального домена, обеспечивающего проведение активационного сигнала внутрь клетки. Одним из направлений исследований является разработка универсального CAR-рецептора, внеклеточным доменом которого является CD16-рецептор. Клетка, экспрессирующая такой CAR, способна взаимодействовать с любой клеткой-мишенью через МАТ [3].

Несмотря на разнообразие существующих дизайнов CAR, эффективность CAR-терапии существенным образом зависит от полноценной экспрессии данного рецептора на поверхности клетки. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CAR, доставляются в клетку с помощью вирусных (лентивирус, γ -ретровирус и рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV)) и невирусных (ДНК-транспозоны, система коротких палиндромных повторов, регу-

effectiveness of genetic modification of human lymphocytes is a priority and requires great attention in obtaining CAR cells.

Keywords

Lentiviruses, transduction, CAR lymphocytes, PEG8000, polybrene.

лярно расположенных группами (CRISPR/Cas9), и мРНК) векторов. На сегодняшний день предпочтение отдаётся вирусным способам доставки, в частности лентивирусам и γ -ретровирусам, поскольку они способны эффективно встраиваться в геном и вызывать стойкую экспрессию трансгена [4]. Тем не менее, использование вирусных векторов не лишено недостатков. Так, например, при встраивании лентивирусов в геном иммунной клетки участок инсерции выбирается случайным образом, что может вызывать мутации, ингибирование или активацию определённых генов, снижая тем самым безопасность CAR-терапии [5]. Вследствие ограниченной транскрипционной ёмкости лентивирусных векторов, они не способны экспрессировать сложную CAR-конструкцию и регуляторные элементы [6]. Более безопасным вирусным вектором для доставки CAR является rAAV, поскольку он встраивается в клеточный геном с меньшей частотой [7]. Тем не менее, эффективность rAAV-трансдукции остаётся существенно ниже, чем при использовании лентивирусных и γ -ретровирусных векторов [8]. Среди способов доставки невирусных векторов чаще всего применяют электропорацию, позволяющую формировать временную генетическую модификацию клетки. Однако такой метод нередко приводит к апоптозу подвергнутых электропорации клеток [9].

Эффективность трансдукции первичной культуры лимфоцитов, описанная в разных литературных источниках, может существенно варьировать, достигая в лучшем случае 80%-ой экспрессии CAR в зависимости от используемого протокола и вектора [10]. Одним из факторов, негативно влияющих на экспрессию генов CAR в иммунных клетках, может быть наличие большого количества внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов (особенно в цитоплазме натуральных киллеров (НК)), при контакте которых с вирусными патоген-ассоциированными антигенами запускается процесс апоптоза [11-12].

В целях повышения эффективности встраивания CAR в мембрану лимфоцитов предлагаются различные варианты, например, повышение множественности инфекции, снижение потерь вируса при его сборке во время трансфекции, использование катионных полимеров для уменьшения числа отрицательных зарядов на вирусной и клеточной оболочках [13]. Также на экспрессию трансгена влияет состояние самой иммунной клетки. Для успешного проникновения лентивирусного вектора клетка должна быть активирована [14]. Тем не менее, на данный момент существует достаточно мало стандартизированных протоколов по трансдукции лимфоцитов: так применяемые методы могут существенно отличаться у различных исследовательских групп, что не позволяет определить сравнительные преимущества и недостатки используемых подходов теоретически.

Целью данного исследования является оптимизация метода трансфекции для получения лентивирусных частиц, а также повышение эффективности лентивирусной трансдукции, проводимой как на опухолевой линии Jurkat, так и на первичной культуре лимфоцитов.

Материалы и методы

Характеристика плазмид

В работе использовали следующие плазмиды: pLenti-PGK-GFP (L-GFP) (<<https://www.addgene.org/19069/>>), pLenti-PGK-CD16-CAR (L-CAR) (последовательность CD16-CAR была клонирована вместо GFP в pLenti-PGK-GFP), pCMV-deltaR8.2 (Addgene #8455, США), pCMV-VSV-G (Addgene #8454, США). Lenti-PGK-GFP-Blast – лентивирусная плазида, содержащая репортерный ген зелёного флуоресцентного белка (GFP) под контролем промотора фосфолицераткиназы (PGK) и гена устойчивости к антибиотику бластицидину С. Плазмиды CMV-VSV-G и CMV-deltaR8.2 необходимы для сборки лентивируса.

Трансформация бактерий и выращивание ночной культуры

Для наработки плазмид и генетических конструкций использовали компетентные клетки бактерии *E.coli* штамма XL1blue. 10 нг ДНК смешивали с клетками *E.coli*, инкубировали на льду 20 мин, затем смесь подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 30 сек и снова инкубировали 5 мин на льду. Затем к смеси добавляли 0,5 мл среды LB (AppliChem GmbH, Германия) и инкубировали 30 мин при 37°C. Далее бактериальные клетки наносили в чашку с LB-агаром (AppliChem GmbH, Германия) и инкубировали в термостате

при температуре 37°C в течение ночи. Выросшие одиночные колонии переносили в среду LB и культивировали в течение 16-18 ч на термошейкере при 150-200 RPM и 37°C.

Наработка плазмид и анализ плазмидных ДНК

Выделение плазмидной ДНК при помощи коммерческого набора реактивов Endo Free QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, США) проводилось согласно протоколу производителя. Концентрацию ДНК измеряли на приборе NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, США).

Анализ плазмидных ДНК

Оценку качества плазмиды проводили с помощью электрофореза в агарозном геле. Готовили 1% гель агарозы на TAE-буфере (40 мМ Трис-ацетат, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0) путём расплавления навески агарозы в микроволновой печи. После остывания до умеренно горячего состояния добавляли 0,25 мкг/мл бромистого этидия (Sigma-Aldrich, США) и заливали гель в форму. Наносили 1 мкл полученного препарата в лунки приготовленного 1% геля агарозы. Образцы перед нанесением смешивали с буфером для нанесения 6X Loading Dye (Thermo Fisher, США) и электрофорезным буфером так, чтобы наносимый объём составил 10-15 мкл, для равномерного распределения ДНК по толщине геля. Проводили электрофорез в течение 30 мин при напряжении 100В. С помощью системы видеодокументации получали фотографию геля в проходящем УФ-свете при длине волны 260 нм.

Трансфекция клеток НЕК293Т

В работе использовали клеточную линию НЕК 293Т, полученную из коллекции клеточных культур ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина». Клетки пакующей линии НЕК 293Т культивировали в ростовой среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 4 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 250 Ед пенициллина (ПанЭко, Россия), 250 мкг стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Южная Америка) при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Трансфекцию клеточной линии проводили двумя различными способами: с применением кальций-фосфатного метода или с помощью липофектамина.

Кальций-фосфатный метод. За 24 ч до трансфекции на чашку Петри диаметром 6 см высевали НЕК293Т в концентрации 4×10^5 клеток/см². В день трансфекции в стерильной воде смешивали плазмиды L-GFP или L-CAR, pCMV-deltaR8.2, pCMV-VSV-G в соотношении 1:2:1 (3:6:3 мкг соответ-

ственно). К смеси добавляли эквивалентный объём 0,5 М CaCl₂ и вносили при перемешивании в двукратный объём 2X буфера HeBS, pH=7,02. Общий объём не превышал 10% от объёма среды роста. Полученную смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре и по каплям вносили к клеткам линии НЕК293Т. Через 24 ч меняли модифицированную ростовую среду, содержащую плазмиды, на свежую. Через 48 и 72 ч после трансфекции клеток линии НЕК 293Т проводили сбор среды роста клеток. Для трансдукции и концентрирования использовали осветлённый фильтрацией (0,45 мкм) и центрифугированием (5 мин при 640 g) супернатант. Эффективность трансфекции определяли через 48 ч после смены модифицированной среды с помощью проточной цитометрии.

Трансфекция с помощью липофектамина. В 0,4 мл Opti MEM (Gibco, США) смешивали плазмиды L-GFP или L-CAR, pCMV-deltaR8.2, pCMV-VSV-G. Готовили смесь №1 из плазмид в соотношении 1:1:2 (6 мкг: 6 мкг: 12 мкг) и 24 мкл реагента для трансфекции P3000 (Lipofectamine 3000, Thermo Fisher, США) и инкубировали при 25°C 5 мин. Готовили смесь №2, состоящую из 0,4 мл Opti MEM и 24 мкл реагента для трансфекции Lipofectamine. Далее смеси соединяли, пипетировали и инкубировали при 25°C 30 мин. Затем смесь по каплям при помешивании вносили на клетки пакующей линии НЕК293Т, выращенные в культуральном флаконе площадью 25 см² (Costar, США) в 15 мл полной среды роста DMEM, до конфлюэнтности 60-80%. Трансфекцию клеток НЕК293Т проводили в течение 24 ч, после чего удаляли модифицированную ростовую среду, содержащую плазмиды, заменяя её на стандартную среду роста DMEM. Через 48 и 72 ч после заражения клеток НЕК293Т проводили сбор среды роста клеток. Полученную таким образом вирусосодержащую среду использовали в свежем виде или замораживали для последующей трансдукции клеток.

Концентрирование лентивирусов

Концентрирование лентивирусов проводили двумя способами: центрифугированием 90 мин при 20 000 g и 4°C после 30 мин инкубации с 16 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, США) при 37°C и 5% CO₂ или с PEG8000 (AppliChem, Германия). Для этого смешивали вирусосодержащую среду в соотношении 1 к 3 с 24% раствором PEG8000 в фосфатном буферном солевом растворе (ФСБ) и перемешивали ночь при 60 об/мин и 4°C. Далее центрифугировали 1 ч при 1600 g и 4°C. В обоих случаях растворяли осадок в объёме полной ро-

стовой среды, необходимой для получения пятикратного или десятикратного концентрирования. Вирусосодержащую среду хранили при -86°C.

Определение функционального титра лентивирусов

Концентрированную вирусосодержащую среду разбавляли полной средой роста в 5 или 10 раз (для 5× и 10× концентрирования соответственно) и вносили в объёме 10-100 мкл к 3×10⁴ НЕК293Т, которые были высеяны в 12-луночный планшет за 2 ч до функционального теста, и добавляли 8 мкг/мл полибрена. Через 24 ч инкубации при 37°C с 5% CO₂ среда роста заменялась на свежую и через 48 ч проводился анализ уровня флуоресценции GFP на проточном цитофлуориметре. Для определения титра лентивируса брали среднее значение триплетов из лунок, в которых доля GFP+ клеток не превышала 20%. Титр рассчитывали по формуле:

$$TE/мл = \{(GFP+ \times Cn) / (100 \times V)\} \times DF,$$

где: TE – трансдуцирующие единицы; GFP+ – доля GFP-положительных клеток в процентах; Cn – общее количество инфицированных клеток НЕК293Т; V – объём инокулята. DF – фактор разбавления вируса.

Сорбция МАТ для последующей активации мононуклеарных клеток

Для активации мононуклеарных клеток (МНК) использовали МАТ к CD3- и CD28-рецепторам (BioLegend, США) в концентрации 2,5 мкг/мл анти-CD3 антител и 5 мкг/мл анти-CD28 антител. Для достижения заданной концентрации антител готовили их растворы в стерильном ФСБ и добавляли по 1 мл/лунку в стерильный 12-ти луночный культуральный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея). Затем проводили инкубацию в течение 5 ч с последующей трёхкратной отмыжкой от несвязавшихся антител с помощью 1%-раствора бычьего сывороточного альбумина (Sigma, Roedermark, Germany) в ФСБ.

Выделение МНК из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата

Выделение МНК из периферической крови и лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата проводили с использованием метода седиментации в одноступенчатом градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Кровь из пробирок, содержащих ЭДТА, разводили в два раза раствором Хенкса (ПанЭко, Россия). При выделении клеток из лейкоцитарно-тромбоцитарного концентрата его центрифугировали в течение 10 мин при 1500 g и температуре +23°C, отбирали лейкоцитарный слой и разводили его средой или раствором Хенк-

са в три раза. Затем независимо от источника МНК образцы наслаивали на 1,5 мл фиколла (FICOLL RAQUE, GE HEALTHCARE, США) и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 g и температуре +23°C. Далее отбирали слой мононуклеарных клеток и проводили трёхкратную отмывку раствором Хенкса, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g, +23°C и каждый раз отбирая после этого надосадочную жидкость. После этого проводили подсчёт живых клеток с использованием красителя трипанового синего (ПанЭко, Россия), окрашивающего нежизнеспособные клетки с повреждённой мембраной, в автоматическом счётчике клеток Luna II (Logos biosystems, Республика Корея). Показатель жизнеспособности >90%, определяемый автоматически как отношение живых клеток к общему количеству клеток, выраженное в процентах, считали удовлетворительным. Клетки доводили до рабочей концентрации $3,5-4 \times 10^6$ /мл с помощью питательной среды ДМЕМ, содержащей 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия) и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия). После этого свежевыделенные МНК подвергали активации или магнитной сепарации.

Активация общей популяции МНК

В данной работе использовались различные подходы к активации МНК. При активации МАТ суспензию свежевыделенных МНК вносили к сорбированным антителам в концентрации $3,5-4 \times 10^6$ /мл и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе модели SCO5A (Sheldon Manufacturing Inc, США). При активации L-фитогемагглютинином (L-ФГА) (Sigma, США) или Конканавалином А (КонА) (Sigma, США) данные вещества добавляли к суспензии свежевыделенных МНК в концентрации 5 мкг/мл для L-ФГА и 5 мкг/мл для КонА. Соинкубацию проводили в стерильных 12-луночных культуральных планшетах (SPL life Sciences, Республика Корея) в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C.

Магнитная сепарация

Для магнитной сепарации использовали разделительные колонки очистки LS Separation Columns (Miltenyi Biotec, США), магнитный сепаратор MidiMACS (Miltenyi Biotec, США), магнитные наносферы для позитивной селекции CD4+клеток (GenScript, США) и CD8+клеток (GenScript, США), которые перед началом сепарации смешивались в равных долях. Также готовили буфер для сепарации: ФСБ с 2 мл ЭДТА и 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Магнитную сепарацию проводили сразу после выделения

МНК на градиенте фиколла согласно протоколу производителя магнитного сепаратора и разделительных колонок.

Активация CD4+ и CD8+ лимфоцитов

Фракция CD4+ и CD8+ лимфоцитов, которая была получена в результате магнитной сепарации, была активирована с помощью набора Enceed™ T Cell Activation, human (GenScript, США) и комбинации интерлейкинов: 500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 (Xuri, Китай), 500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-7 (Xuri, Китай), 500 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-15 (Xuri, Китай). Набор для активации представляет собой биodeградируемые наночастицы, покрытые матриксом и антителами к CD3 и CD28. Длительность активации составляла 40 ч.

Трансдукция лимфоцитов и клеточной линии Jurcat

После этапа активации подсчитывали количество живых клеток с помощью автоматического счётчика клеток в присутствии красителя трипанового синего, доводили до концентрации 5×10^5 клеток/мл и переносили по 1 мл клеточной суспензии на лунку в 24-луночный планшет (SPL life Sciences, Республика Корея). Затем добавляли вируссодержащий материал из расчёта 0,5-1 мл среды на одну лунку. Соотношение лимфоцитов и вирусных частиц составляло от 1:5 до 1:20. Конечный общий объём среды в каждой лунке составлял 2 мл. В лунки планшета также вносили ИЛ-2 (250 IU/мл) и, в качестве энхансера, использовали полибрен до конечной концентрации 8 мкг/мл. После этого проводили спинокуляцию клеток в присутствии полибрена при 1500 g, 90 мин, 32°C. Затем клетки тщательно ресуспендировали и помещали в CO₂-инкубатор. Через 24 ч из лунок удаляли всю вируссодержащую среду и заменяли её на свежую полную культуральную среду ДМЕМ, содержащую 250 IU/мл ИЛ-2. После этого клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C с периодической заменой питательной среды. Часть клеток, используемых в качестве отрицательного контроля, не подвергали трансдукции и культивировали в среде роста в присутствии ИЛ-2.

Культивирование CAR-лимфоцитов

Культивирование лимфоцитов проводили в 12-луночных и 6-луночных культуральных планшетах в присутствии питательной среды ДМЕМ с 4,5 г/л глюкозы, 10% FBS, 250 IU/мл человеческого рекомбинантного ИЛ-2 при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе. Каждые 1-2 дня с помощью световой микроскопии производили контроль фенотипических характеристик лимфоцитов и визуальный контроль отсутствия микробной

контаминации. С использованием трипанового синего и автоматического счётчика клеток проводили оценку жизнеспособности и количества культивируемых клеток. Показатель жизнеспособности >90% считали удовлетворительным. Концентрацию клеток при культивировании поддерживали в диапазоне от 3×10^5 /мл до 1×10^6 /мл.

Селекция CAR-лимфоцитов

Поскольку лентивирусная генетическая конструкция содержала ген устойчивости к антибиотику бластицидину, то отбор CAR-экспрессирующих клеток проводили путём периодического добавления в питательную ростовую среду 10 мкг/мл антибиотика бластицидина (InvivoGen, США). От погибших лимфоцитов избавлялись путём удаления надосадочной жидкости после центрифугирования клеточной суспензии при 1500 g 5 мин 23°C. Селекцию CAR-лимфоцитов начинали проводить через 5-7 дней после трансдукции.

Культивирование культур клеток

В работе использовали опухолевую линию клеток Jurkat, которая была получена из коллекции клеточных культур ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Jurkat культивировали на среде RPMI 1640 (Панэко, Россия), содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 20 мМ HEPES (ПанЭко, Россия), пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C.

Проточная цитофлуориметрия

Методом проточной цитофлуориметрии производили анализ экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и флуоресцентного белка GFP. На этапе пробоподготовки жизнеспособные клетки подсчитывали и доводили до концентрации 1×10^6 /мл. К 100 мкл суспензии клеток заданной концентрации добавляли меченые флуорохромом МАТ в концентрациях, рекомендованных производителем. Инкубировали в течение 30 мин при температуре 4°C в холодильнике (Hitachi, Япония). Затем проводили трёхкратную отмывку раствором ФСБ от несвязавшихся антител, центрифугируя в течение 5 мин при 1500 g и температуре +23°C и удаляя надосадочную жидкость. К осадку прибавляли 200 мкл ФСБ и раствор пропидия йодида (PI) до конечной концентрации 30 нг/мл (Sigma, США). Изучение экспрессии поверхностных маркеров осуществляли при использовании следующих МАТ: анти-CD3-PerCP (BD Pharmingen, США), анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США), анти-CD56-PE (Life Technologies,

США), анти-CD(56+16)-PE (Beckman Coulter, США), анти-CD16-FITC (BD Pharmingen, США). Комбинацию меченных флуорохромами антител для обработки проб подбирали с учётом особенности диапазона детекции длины волны каждого флуорохрома. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Novocyte (ACEA Biosciences Inc, США) с использованием программного обеспечения Novo-Express 1.5.0. Погибшие клетки исключали из анализа по окрашиванию PI и по показателям рассеивания. Анализировали не менее 10 тыс. живых клеток.

Статистическая обработка данных

Данные экспериментов представлены как среднее значение \pm SD. Результаты проанализированы с использованием Statistica 10. Тест ANOVA с критерием Tukey HSD использовался для оценки различий. Достоверными считали значения $p < 0,05$.

Результаты

Оптимизация методики трансфекции и концентрирования лентивирусов

Для достижения оптимальной эффективности трансфекции в данной работе оценивали две методики: с применением кальций-фосфата и липофектамина. При сравнительном анализе было установлено, что в среднем эффективность трансфекции, оцениваемая по экспрессии GFP или CAR на поверхности пакующей линии НЕК293Т, была выше на 20% при использовании липофектамина, чем при проведении трансфекции по кальций-фосфатному методу. В дальнейших экспериментах на первичной культуре лимфоцитов использовались вирусы, полученные путём трансфекции с применением липофектамина.

С целью определения оптимального способа концентрирования лентивирусов было предложено три различных варианта: концентрирование с помощью ультрацентрифугирования, добавление полибрена или использование PEG8000. Для оценки эффективности трансдукции и определения функционального титра лентивируса использовались показатели уровня флуоресценции GFP в культуре клеток НЕК293Т.

Был собран вирусосодержащий супернатант, сконцентрированный с помощью ленти-концентратора PEG8000 25%, и получен вирус с 10-кратной концентрацией. Для анализа эффективности концентрирования была проведена трансдукция клеток НЕК293Т вирусом L-GFP. Количество GFP+ клеток в пробе с 10-кратным концентратом статистически достоверно увеличивалось примерно на 30%, по сравнению с 1-кратным вирусом,

однозначно заметен сдвиг клеток в сторону более высоких значений флуоресценции GFP, чем при использовании вирусодержащего материала без концентрирования. Это свидетельствует о том, что при использовании 10-кратного вируса на одну клетку приходилось более 1 вирусной частицы, в результате появилось значительное количество клеток с высоким уровнем экспрессии GFP.

Другим методом концентрирования среды, содержащей лентивирус, является центрифугирование при высоких оборотах. Были получены концентраты вируса после осаждения в течение 90 мин на 20 000 g. Количество GFP+ клеток после трансдукции 1-кратным вирусом и таким же количеством вирусных частиц, сконцентрированных в 10 раз, в среднем отличалось менее чем на 10%, что говорит о том, что при центрифугировании не произошло потери количества и функциональности вирусных частиц. При увеличении титра вируса в 10 раз возросла не только доля GFP+ клеток (с $54 \pm 6\%$ до $79 \pm 7\%$), но и уровень экспрессии GFP в клетках, о чём свидетельствует смещение клеток с высокой интенсивностью флуоресценции вправо на графике зависимости количества клеток от интенсивности флуоресценции. Через 72 ч после трансдукции жизнеспособность клеток не отличалась от контрольной. Следовательно, в дальнейшем можно использовать оба описанных способа концентрирования среды с вирусными частицами.

Для проверки функциональности вируса после заморозки и определения титра и множественности инфекции (MOI) была поставлена трансдукция в диапазоне объёмов неконцентрированного вируса 60-500 мкл. Через 72 ч эффективность трансдукции после добавления 60 мкл вируса составила в среднем 22% (рис. 1Д), что даёт основания полагать, что на клетку приходилось не больше одной вирусной частицы. Это дало возможность определить титр вируса по формуле:

$$\text{Титр (НЕК293Т)} = \frac{\text{количество клеток} \times \text{доля GFP}}{\text{объём вирусодержащей среды}}$$

Из графика зависимости эффективности трансфекции от количества вирусных частиц (рис. 1Е) видно, что до 50% зависимость линейная, таким образом, можно определить титр вируса в образцах с уровнем GFP+ менее 50%. В результате анализа данных было показано, что после заморозки количество функциональных частиц вируса уменьшается в 3-4 раза.

В другой серии экспериментов, посвящённых сравнению полибрана и PEG8000, титр неконцентрированного вируса составил $0,77 \pm 0,25 \times 10^6$ ТЕ/мл. При концентрировании с

помощью полибрана титр 10-кратного вируса увеличился в среднем до 7×10^6 ТЕ/мл, но терялось до 20% функциональных частиц вируса по сравнению с неконцентрированной вирусодержащей средой. В случае с PEG8000 потери доходили до 50%.

Оптимальный способ концентрирования оценивался также по эффективности трансдукции, проводимой на фракции активированных CD4+, CD8+ лимфоцитов. В данных экспериментах вместо плазмиды L-GFP использовали плазмиду L-CAR. Титр вируса после концентрирования с полибраном в среднем составил 1×10^6 ТЕ/мл, а с PEG8000 – $0,5 \times 10^6$ ТЕ/мл. Экспрессия CAR-рецептора после концентрирования с помощью полибрана составила в среднем 31%, а после концентрирования с PEG8000 – в среднем 41%. Количество клеток и их жизнеспособность после трансдукции при концентрировании вируса с помощью полибрана оказались ниже, чем аналогичные показатели после трансдукции вирусом, сконцентрированным с использованием PEG8000: в среднем, на 4-й день после трансдукции количество клеток при использовании полибрана возросло в 9 раз (жизнеспособность 53%), в то время как при использовании PEG8000 количество клеток увеличивалось в 13 раз (жизнеспособность 72%). Таким образом, в качестве оптимального способа концентрирования лентивирусов был выбран PEG8000, он использовался при решении дальнейших экспериментальных задач.

Трансдукция иммортализованной клеточной линии

В целях оптимизации условий взаимодействия лентивирусов и человеческих клеток крови была поставлена трансдукция на культуре клеток Jurkat. Поскольку клеточная линия Jurkat происходит из злокачественно трансформированного клона Т-хелперов, её можно использовать в качестве аналога Т-лимфоцитов. 10-кратное PEG8000-концентрирование лентивируса, имеющего ген белка GFP, позволило добиться увеличения экспрессии GFP до 86%, в то время как доля GFP+клеток Jurkat после трансдукции с неконцентрированным вирусом составила всего 14%. Однако в данном эксперименте жизнеспособность клеток через 48 ч после спинокуляции с 10-кратным вирусом снижалась с 86% до 43%, что может быть следствием токсичного действия переизбытка вирусных частиц.

Получение CAR-лимфоцитов

Дальнейшим этапом исследования являлось получение CAR-лимфоцитов. Для этого использовались различные подходы к активации клеток,

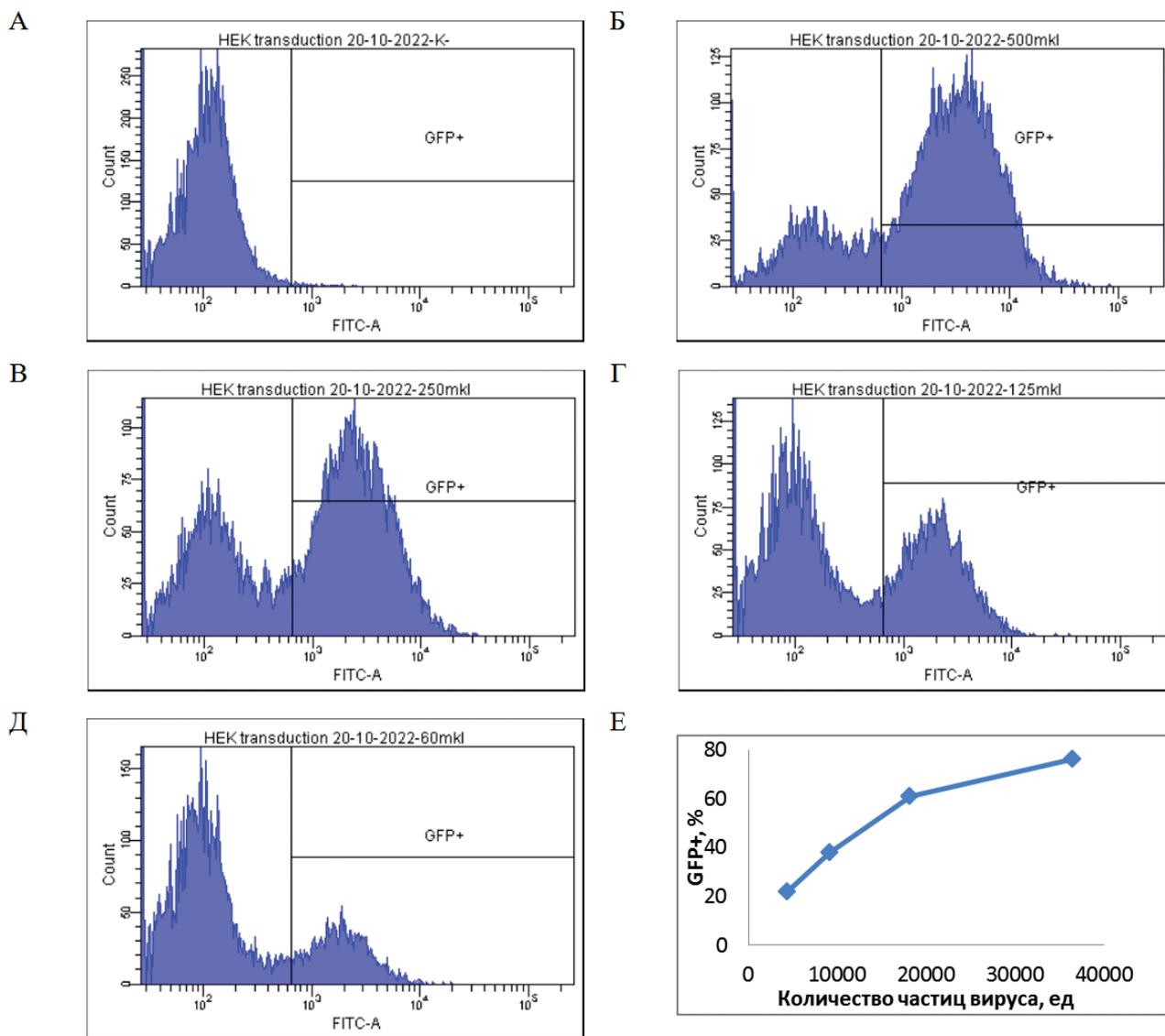


Рис. 1. Анализ количества GFP+ клеток HEK293T на проточном цитофлуориметре через 72 ч после трансдукции. Клетки в количестве 2×10^4 были трансдуцированы размороженной вирус-содержащей средой (6 мес при -70°C)

Примечания: А – нетрансдуцированный контроль (GFP+клеток 0%); Б – добавление 500 мкл вирусосодержащего материала (GFP+клеток 76%); В – добавление 250 мкл вирусосодержащего материала (GFP+клеток 61%); Г – добавление 125 мкл вирусосодержащего материала (GFP+клеток 38%); Д – добавление 60 мкл вирусосодержащего материала (GFP+клеток 22%); Е – график зависимости эффективности трансфекции от количества вирусных частиц. Данные репрезентативного эксперимента.

представляющих собой либо первичную культуру лимфоцитов, либо фракции CD4+ и CD8+ лимфоцитов.

При получении CAR-лимфоцитов без разделения популяций было изучено три активатора деления иммунных клеток: МАТ, L-ФГА и КонА. Как видно из табл. 1, данные активаторы практически не влияли на эффективность трансдукции. Так, экспрессия CD16-рецептора на 5-е сутки после проведения трансдукции с помощью полибрана на первичной культуре лимфоцитов без разделения популяций варьировала от 9,4% до 19,7%, а экспрессия белка GFP – от 9,4% до 21,3%.

Уровень трансдукции на первичной культуре лимфоцитов человека вне зависимости от изменяемых параметров концентрирования вирусов или проведения предшествующей трансфекции всегда был ниже, чем экспрессия CAR или GFP на клеточной линии Jurkat.

Однако, согласно нашим ранее полученным данным (в данной работе не представлены), относительно наибольшую пролиферацию первичной культуры лимфоцитов вызывает активация с использованием МАТ. Поэтому далее было решено использовать в качестве активации первичной культуры лимфоцитов именно этот вариант.

Поскольку в данной серии экспериментов мы проводили трансдукцию без разделения клеточных популяций, было необходимо изучить распределение CAR-трангена среди популяций лимфоцитов в культуре. Так было установлено, что доля CD3+клеток, экспрессирующих GFP или CD16-рецептор, была статистически достоверно больше (на 3-5%), чем доля CD56+лимфоцитов, экспрессирующих трансген.

Тем не менее, процент CAR-лимфоцитов в первичной культуре клеток являлся недостаточно высоким, а со временем культивирования и вовсе снижался. Для обогащения популяции CAR-лимфоцитов проводилась селекция с помощью бластицидина – антибиотика, ген устойчивости к которому входил в состав лентивирусного вектора. Культивирование CAR-лимфоцитов в питательной среде, содержащей бластицидин, позволило добиться экспрессии CD16-CAR-рецептора на 88% клеток к 21-му дню культивирования (табл. 2).

Проведение магнитной сепарации, активация полученных фракций CD4+, CD8+лимфоцитов посредством биодegradуемых наночастиц по-

зволили добиться высокого уровня трансдукции CD4+, CD8+клеток: экспрессия CD16-трангена увеличилась до 45-75% (рис. 2).

Обсуждение

Согласно полученным результатам, использование PEG8000 для концентрирования лентивирусов является оптимальным вариантом из представленных в данной работе, поскольку в данном случае вирусосодержащий материал оказывается низкотоксичным для первичной культуры лимфоцитов. Концентрирование лентивирусов представляет собой обязательный этап многих методик для получения лентивирусного вектора, поскольку позволяет увеличить титр вируса и, как следствие, множественность инфекции [15]. Кроме того, при сравнительном анализе было установлено, что для повышения эффективности трансфекции на клеточной линии HEK293T предпочтительнее использовать липофектамин, что согласуется с исследованиями зарубежных коллег [16].

Уровень трансдукции на первичной культуре лимфоцитов человека вне зависимости от изменяемых параметров концентрирования вирусов, проведения предшествующей трансфекции или использования определённого активатора пролиферации всегда был ниже, чем экспрессия CAR или GFP на клеточной линии Jurkat. Вероятно, это связано с большим количеством противовирусных рецепторов на поверхности клеток иммунной системы и в их цитозоле [17], а также с гибелью лимфоцитов при контакте с токсичными компонентами вирусосодержащей жидкости. Так как при спинокуляции контакт вируса с конкретной клеткой происходит случайным образом, трансдукция первичной культуры лимфоцитов, полученной из периферической крови, приводит к распределению CAR-трангена на различных популяциях, в первую очередь, это Т-лимфоциты и НК-клетки. Клетки нецелевой популяции, например, НК-клетки или Т-регуляторные лимфоциты, могут провзаимодействовать с вирусом, но не трансдуцироваться: так, НК-клетки обладают способностью к ограничению внутриклеточной активности вируса [18], а Т-регуляторы характеризуются слабой активацией пролиферации, что также влияет на эффективность встраивания CAR-трангена [19]. Для улучшения экспрессии CAR предлагается разделение клеточных популяций перед проведением трансдукции, что позволило увеличить вероятность контакта вирусной частицы с «целевой» клеткой, например, Т-лимфоцитом. Кроме того, согласно литературным данным, этап сепарации запускает процесс активации лимфоцитов, а такое

Таблица 1. Экспрессия CD16-CAR на поверхности активированных клеток первичной культуры лимфоцитов после трансдукции, $p < 0,05$

Способ активации клеток	Доля CD16+лимфоцитов, %%
МАТ (нетрансдуцированный контроль)	5,33±4
МАТ	16,5±3
L-ФГА	15,7±4
КонА	12,44±3

Таблица 2. Экспрессия CD16-CAR после проведения селекции, $p < 0,05$

Наличие/отсутствие селекции	Доля лимфоцитов, %%
Доля CD16+лимфоцитов на 5-е сутки после трансдукции	13±4
Доля CD16+лимфоцитов к 21-му дню без селекции	2±1,7
Доля CD16+лимфоцитов к 21-му дню после селекции	88,5±7
Доля CD3+CD16+лимфоцитов к 21-му дню после селекции	67±10
Доля CD56+CD16+лимфоцитов к 21-му дню после селекции	38±7

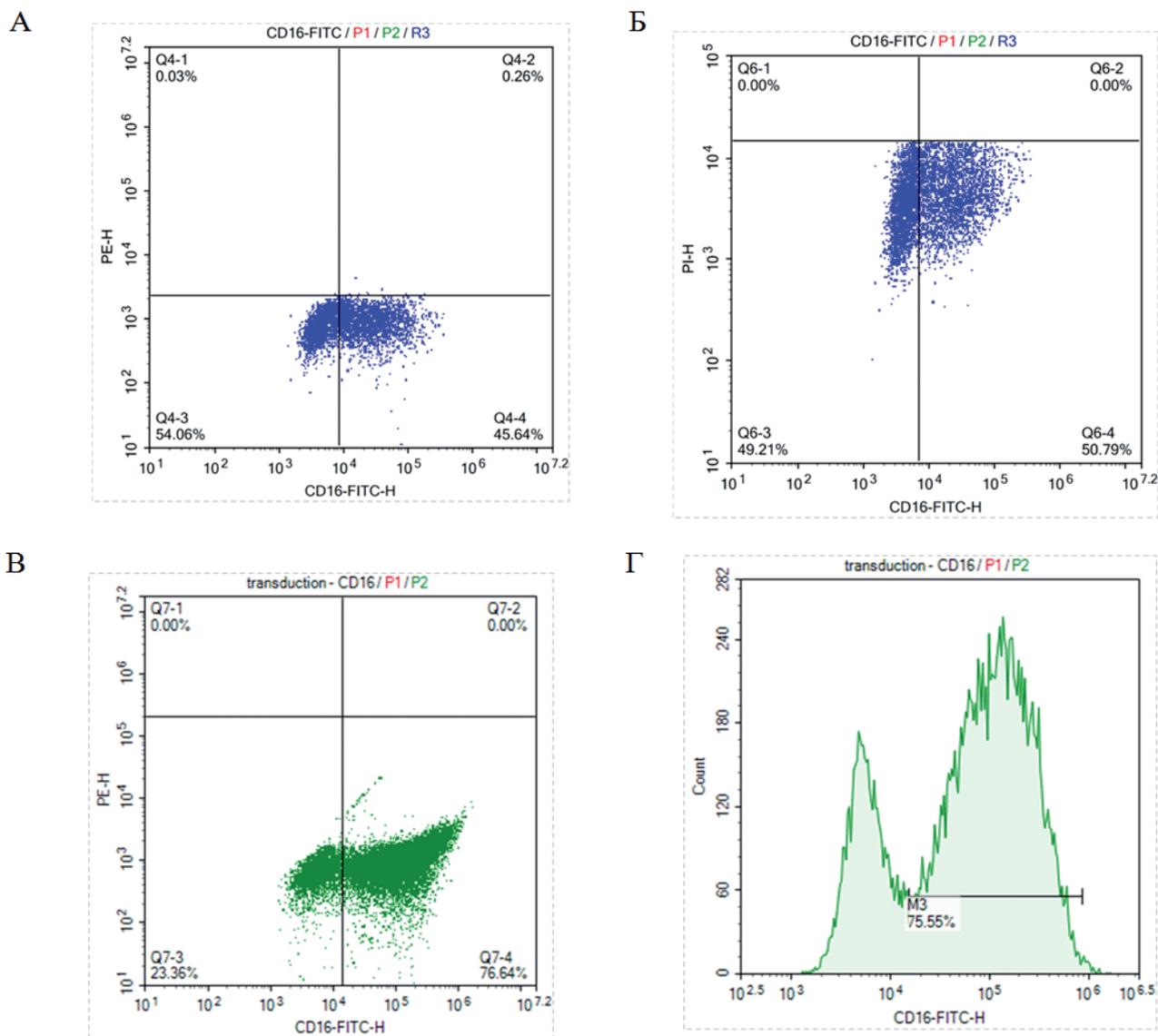


Рис. 2. Распределения флуоресценции лимфоцитов в координатах логарифма флуоресценции флуоресцеинизотиоцианата (FITC), связанного с антителами к CD16, окрашивающими рецепторный домен CAR и пропидий йодида (PI)

состояние клетки является крайне важным для успешной генетической модификации [20].

В качестве улучшения получения CAR-лимфоцитов предполагается также использование других катионных полимеров, уменьшающих количество отрицательных зарядов на клеточной и вирусной мембранах. Кроме описанного в данной работе полибрена, ряд исследователей используют протамин сульфат [21], декстран [22] или ретро-нектин [23], а также их комбинации [13].

Помимо изначально невысокой экспрессии CAR на поверхности иммунных клеток, существует ещё одна проблема – это постепенное снижение экспрессии данного рецептора в ре-

зультате культивирования клеток. Необходимым инструментом для поддержания стабильности генной экспрессии является селекция антибиотиком, при которой не только выживают клетки со стабильной экспрессией, но и уничтожаются нетрансдуцированные лимфоциты.

В заключение следует отметить, что трансдукция первичной культуры лимфоцитов человека является одним из самых главных этапов разработки биомедицинского клеточного продукта на основе CAR-лимфоцитов, на внесении генетических модификаций в иммунные клетки основывается сам принцип использования таргетной противоопухолевой терапии. В то же

время внедрение CAR-трансгена на сегодняшний день представляет собой и самую сложную стадию разработки ввиду недостаточной мощности современных методов модификации. Поэтому

необходимо совершенствовать уже ранее разработанные протоколы, а также изучать новые перспективные подходы с целью повышения эффективности трансдукции лимфоцитов.

Литература

1. Грицай А.Н., Барановский Д.А., Киселевский М.В., и др. Адоптивная иммунотерапия интерлейкином-2 и лимфокин-активированными киллерами у больных злокачественными новообразованиями женской репродуктивной системы (обзор литературы). Опухоли женской репродуктивной системы. 2014;(4):71-73. doi:10.17650/1994-4098-2014-0-4-71-73.
2. Hamdan F, Cerullo V. Cancer immunotherapies: A hope for the incurable? *Front Mol Med.* 2023 Feb 17;3:1140977. doi:10.3389/fmmed.2023.1140977. PMID: 39086690; PMCID: PMC11285639.
3. Zhao H, Zhou Z, Li G, et al. An NK cell line (NK92-41BB) expressing high levels of granzyme is engineered to express the high affinity chimeric genes CD16/CAR. *Cytotechnology.* 2021 Aug;73(4):539-553. doi: 10.1007/s10616-021-00476-1.
4. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol.* 2018 Oct;53:164-181. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.025.
5. Odak A, Yuan H, Feucht J, et al. Novel extragenic genomic safe harbors for precise therapeutic T-cell engineering. *Blood.* 2023 Jun 1;141(22):2698-2712. doi: 10.1182/blood.2022018924.
6. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Feb 8;6(1):53. doi: 10.1038/s41392-021-00487-6.
7. Asaad W, Volos P, Maksimov D, et al. AAV genome modification for efficient AAV production. *Heliyon.* 2023 Apr 1;9(4):e15071. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e15071.
8. Wang D, Zhou Q, Qiu X, et al. Optimizing rAAV6 transduction of primary T cells for the generation of anti-CD19 AAV-CAR-T cells. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jun;150:113027. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113027.
9. Ingegner T, Mariotti FR, Pelosi A, et al. Human CAR NK Cells: A New Non-viral Method Allowing High Efficient Transfection and Strong Tumor Cell Killing. *Front Immunol.* 2019 Apr 30;10:957. doi: 10.3389/fimmu.2019.00957.
10. Remley VA, Jin J, Sarkar S, et al. High efficiency closed-system gene transfer using automated spinoculation. *J Transl Med.* 2021 Nov 24;19(1):474. doi: 10.1186/s12967-021-03126-4.
11. Carlsten M, Childs RW. Genetic manipulation of NK cells for cancer immunotherapy: techniques and clinical implications. *Front Immunol.* (2015) 6:266. doi: 10.3389/fimmu.2015.00266
12. Wang Y, Shao W. Innate Immune Response to Viral Vectors in Gene Therapy. *Viruses.* 2023 Aug 24;15(9):1801. doi: 10.3390/v15091801. PMID: 37766208; PMCID: PMC10536768.
13. Rajabzadeh, A., Hamidieh, A.A. & Rahbarizadeh, F. Spinoculation and retronectin highly enhance the gene transduction efficiency of Mucin-1-specific chimeric antigen receptor (CAR) in human primary T cells. *BMC Mol and Cell Biol.* 2021;22:57. doi: 10.1186/s12860-021-00397-z.
14. Dan L, Kang-Zheng L. Optimizing viral transduction in immune cell therapy manufacturing: key process design considerations. *J Transl Med.* 2025 May 2;23(1):501. doi: 10.1186/s12967-025-06524-0.
15. Jiang W, Hua R, Wei M, et al. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation. *Sci Rep.* 2015 Sep 8;5:13875. doi: 10.1038/srep13875.
16. Hasan MM, Ragnarsson L, Cardoso FC, et al. Transfection methods for high-throughput cellular assays of voltage-gated calcium and sodium channels involved in pain. *PLoS One.* 2021 Mar 5;16(3):e0243645. doi: 10.1371/journal.pone.0243645.
17. Coroadinha AS. Host Cell Restriction Factors Blocking Efficient Vector Transduction: Challenges in Lentiviral and Adeno-Associated Vector Based Gene Therapies. *Cells.* 2023 Feb 24;12(5):732. doi: 10.3390/cells12050732.
18. Dan L., Kang-Zheng L. Optimizing viral transduction in immune cell therapy manufacturing: key process design considerations. *J Transl Med* 2025;23:501. doi: 10.1186/s12967-025-06524-0.
19. Yan D., Farache J., Mingueneau M., et al. Imbalanced signal transduction in regulatory T cells expressing the transcription factor FoxP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015;112(48):14942-14947. doi: 10.1073/pnas.1520393112.
20. Su X, Ditlev JA, Hui E, et al. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. *Science.* 2016 Apr 29;352(6285):595-599. doi: 10.1126/science.aad9964.
21. Ellison S, Buckland K, Learmonth Y, et al. Design and validation of a GMP stem cell manufacturing protocol for MPSII hematopoietic stem cell gene therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2024 May 21;32(2):101271. doi: 10.1016/j.omtm.2024.101271.
22. Nanbakhsh A, Best B, Riese M, et al. Dextran enhances the lentiviral transduction efficiency of murine and human primary NK cells. *J Vis Exp.* 2018;131(131):55063.
23. Okuma A. Generation of CAR-T Cells by Lentiviral Transduction. *Methods Mol Biol.* 2021;2312:3-14. doi: 10.1007/978-1-0716-1441-9_1.

Сведения об авторах

Федорова Полина Олеговна – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГЛОУ НО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова; лаборант-исследователь лаборатории клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ORCID: 0000-0001-7478-8783.

Чикилева Ирина Олеговна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ORCID: 0000-0003-0769-1695. Персиянцва Надежда Александровна – к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ORCID: 0000-0002-2097-5986.

Замкова Мария Анатольевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ORCID ID: 0000-0002-4687-7444.

Киселевский Михаил Валентинович – д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-0132P67X.

Поступила 23.07.2025.