

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ

Т. В. Шман, Т. И. Ермилова, Ю. В. Лебедева, А. В. Клыч, А. С. Мухаметшина, Е. И. Горбач, Е. П. Вашкевич

ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Беларусь

Преимуществами использования естественных киллерных (ЕК) клеток в онкологии является их врождённая высокая противоопухолевая активность и безопасность для пациента. Успешное применение ЕК-иммунотерапии ограничивается непродолжительной персистенцией ЕК клеток в организме реципиента и способностью опухолевых клеток избегать распознавания ЕК клетками. Решение этих проблем возможно путем генетической модификации исходных свойств ЕК-клеток. Однако, существуют методологические сложности доставки генетического материала в эти клетки, что затрудняет разработку иммунотерапии на основе ЕК клеток.

Цель работы – проанализировать эффективность модификации ЕК клеток человека *in vitro* методом лентивирусной трансдукции с использованием различных псевдотипированных лентивирусных частиц и условий трансдукции.

Материалы и методы. Сборку вирусных частиц проводили с применением ко-трансфекции пакующей клеточной линии НЕК293Т. Тестировали два варианта лентивирусных частиц – VSV-G- и BaEV-псевдотипированные. В качестве трансфер-плазмиды использовали рWPXL, в составе которой закодирован флуоресцентный белок eGFP. Исследовали три варианта трансдукции: двойная спинокуляция (осаждение части вируса, после чего клетки смешивали со второй частью вируса и проводили второе осаждение); однократная спинокуляция (клетки смешивали с вирусом и осаждали); суспензионный вариант (клетки смешивали с вирусом с добавлением вектофузина). Уровень трансдукции оценивали по экспрессии eGFP в ЕК клетках через 72 часа – 10 сут. после трансдукции методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. При использовании VSV-G-псевдотипированных частиц уровень трансдукции ЕК клеток не превышает 5% даже при использовании MOI (множественность инфекции) 5. При использовании BaEV-псевдотипированных частиц уровень трансдукции был выше 30% при MOI 1 и повышался при увеличении множественности инфекции. При MOI 10 уровень инфекции ЕК клеток достигал 70%. Уровень трансдукции при использовании VSV-G-псевдотипированных лентивирусных частиц был низким при всех вариантах проведения трансдукции. При использовании BaEV-псевдотипированных лентивирусных частиц уровень трансдукции был достоверно выше по сравнению с VSV-G, однако достоверно не отличался между вариантами проведения трансдукции – количество трансдуцированных ЕК клеток находилось в диапазоне от 30% до 35% при всех тестируемых вариантах при MOI 1. При этом дальнейшее культивирование трансдуцированных клеток на протяжении 10 дней не приводит к достоверному снижению количества модифицированных ЕК клеток при использовании различных вариантов проведения трансдукции.

Заключение. Метод трансдукции с использованием BaEV-псевдотипированных лентивирусных частиц при пятикратной множественности инфекции позволяет получить до 70% генно-модифицированных ЕК клеток с высоким уровнем жизнеспособности и стабильностью экспрессии трансгена не менее 10 дней.