

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ CAR-РЕЦЕПТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ CAR-ЕК КЛЕТОК

Ю. В. Лебедева^{1,2}, А. В. Клыч², Е. П. Вашкевич², Т. В. Шман²

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Республика Беларусь

В настоящий момент клеточная иммунотерапия с применением генетически модифицированных естественных киллерных (ЕК) клеток – CAR-ЕК клеток, является одним из перспективных, но малоизученных направлений терапии гематологических опухолей.

Выбор ЕК-клеток в качестве объекта модификации обусловлен наличием существенных преимуществ, в сравнении с Т-лимфоцитами: безопасность (отсутствие побочных эффектов), усиленная цитотоксичность, возможность амбулаторного наблюдения за пациентом и создание банка клеток [1]. Помимо когнатных клеточных взаимодействий обязательным компонентом иммунного ответа является присутствие гуморальных факторов. Одним из ключевых цитокинов, обуславливающих продолжительную экспансию ЕК-клеток, является ИЛ-15. Было предположено, что получение модифицированных ЕК-клеток, экспрессирующих на своей поверхности мембраносвязанный ИЛ-15, позволит продлить период высокой функциональной активности этих клеток.

Целью данной работы являлось создание рекомбинантной плазмиды, содержащей последовательности, кодирующие antiCD19 химерный антигенный рецептор (CAR) и мембранный ИЛ-15 (*mIL15*).

В соответствии с целью работы были поставлены и выполнены следующие задачи:

- 1) Получение вектора на основе *pULTRA*, содержащего в конструкции последовательность *mIL15*;
- 2) Получение вектора на основе *pULTRA_mIL15*, содержащего в конструкции последовательность *antiCD19CAR*.

Объекты и методы исследования. В работе использовали штамм *E. coli NEB Stable*. Антибиотик ампициллин для селекции трансформированных клонов добавляли на среду в концентрации 100 мкг/мл. Для получения фрагментов ДНК с навешанными рестрикционными сайтами *NheI* и *EcoRI* (*mIL15*) и *AsiGI* и *BamHI* (*antiCD19CAR*) использовали ПЦР с разработанными для данной цели прямыми и обратными праймерами. Помимо этого, использовали такие молекулярно-биологические методы как рестрикция и лигирование (лигаза фага Т4). В качестве метода визуализации фрагментов ДНК использовали электрофорез. Трансформацию проводили с использованием хлорида кальция. Плазмидную ДНК из бактерий *E. coli NEB Stable* выделяли с помощью набора Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Midi. Для проверки полученных генетических конструкций использовали метод секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение. В результате выполнения работы получили конструкцию на основе вектора *pULTRA* – *pULTRA_antiCD19CAR_mIL15*. В дальнейшем с использованием данной конструкции в составе лентивирусного вектора будут получены antiCD19 CAR-ЕК клетки, экспрессирующие mIL15 и исследованы их функциональные свойства.

Библиографические ссылки

1. Wang X., Zhao X. Y. Transcription factors associated with IL-15 cytokine signaling during NK cell development // Cell Development. Frontiers in immunology. 2021. Vol. 12. P. 3389.