

СОЗДАНИЕ СТАБИЛЬНОЙ ПРЕПАКУЮЩЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ НЕК293 ДЛЯ НАРАБОТКИ rAAV

Шайтанова К.А. (Университет ИТМО, АО «БИОКАД»)

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Перепелкина М.П. (АО «БИОКАД», Университет ИТМО)

Введение. С точки зрения генной терапии аденоассоциированный вирусный вектор является одним из наиболее привлекательных для доставки терапевтического гена [1]. Используется несколько стратегий наработки rAAV, среди которых можно выделить ко-транسخуцию вирусом-хелпером, трехплазмидную транسخуцию, а также создание стабильной клеточной линии-продуцента, в которой все необходимые для наработки гены интегрированы в клетку [2]. При ко-транسخуции вирусом хелпером также используются плазмида, содержащая ген интереса, и плазмида, несущая гены *rep* и *cap*. Главная отличительная характеристика метода транзгентной транسخуции заключается в том, что нативный вирус в целях повышения безопасности заменен на рекомбинантную плазмиду, содержащую гены вируса-хелпера. Несмотря на частоту использования этого метода наработки rAAV, у него есть ряд недостатков, таких как сложность масштабирования, отсутствие хорошего уровня воспроизводимости при наработке и высокая стоимость материалов. Использование стабильной линии продуцента минимизирует вышеперечисленные риски. Получение линии продуцента состоит из нескольких этапов: (I) получение препакующей линии, содержащей гены вируса-хелпера и/или гены *rep*; (II) пакующей линии, содержащей гены *cap*; (III) линии продуцента, способной нарабатывать рекомбинантные AAV препараты. Однако данные гены токсичны для клеток, поэтому для регулирования их экспрессии необходимо использование систем индукции.

Основная часть. Основой для получения препакующей клеточной линии послужили клетки линии эмбриональной почки человека НЕК293. В ходе выполнения работы была проведена интеграция целевых генов индуцибельной системы путем транسخуции лентивирусными препаратами. По истечении 72 часов после проведения транسخуции провели моноклонирование полученного пула на клеточном сортере с дальнейшей экспансией и постепенным переводом клеток в планшеты с большей площадью поверхности. По достижении формата 6-луночного планшета моноклоны проверяли в транسخуции плазмидой, содержащей последовательность GFP, на наличие встройки и индукции исследуемого белка с помощью проточной цитометрии.

Для дальнейшей проверки стабильности были выбраны 2 лучших по оцениваемым параметрам моноклона, которые велись до 30 пассажа. Затем был поставлен повторный эксперимент по транسخуции плазмидой, содержащей последовательность GFP.

По результатам сравнительного эксперимента был выбран и заложен в клеточный банк лидерный моноклон, который послужил основой создания препакующей клеточной линии для наработки аденоассоциированных вирусных векторов.

С целью интеграции генов хелперного вируса и *rep* были проведены серии транسخуций лидерной моноклональной линии лентивирусными препаратами. Далее полученный пул был моноклонирован и на данный момент продолжаются работы по характеристике моноклонов-кандидатов в наработке аденоассоциированных вирусных векторов.

Выводы. В ходе выполнения работы была получена стабильная клеточная линия с интеграцией генов системы индукции, которая послужила основой для создания препакующей линии для наработки аденоассоциированных вирусных векторов. Продолжаются дальнейшие работы по оценке продуктивности полученных кандидатных моноклонов, содержащих гены хелперного вируса и *rep*, в наработке rAAV.

Список использованных источников:

1. Iglesias CF Jr, Ristovski M, Bolic M, Cuperlovic-Culf M. rAAV Manufacturing: The Challenges of Soft Sensing during Upstream Processing // *Bioengineering (Basel)*. – 2023. – №10 (2). – P. 229. Doi: 10.3390/bioengineering10020229.

2. Lee Z, Lu M, Irfanullah E, Soukup M, Hu WS. Construction of an rAAV Producer Cell Line through Synthetic Biology // *ACS Synth Biol*. – 2022. – №11 (10). – P. 3285-3295. Doi: 10.1021/acssynbio.2c00207.

Автор _____ Шайтанова К.А.

Научный руководитель _____ Перепелкина М.П.