

ИНТЕГРАЦИЯ ТРАНСГЕНОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ПРОДУЦЕНТА AAV

Григорьев Я.А. (ИТМО)

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

Введение. Генная терапия – это совокупность биотехнологических и медицинских методов, направленных на достижение терапевтического эффекта путем внесения изменений в геном соматических клеток человека для исправления мутаций в структуре ДНК. Доставка терапевтического гена может осуществляться различными методами, которые можно разделить на 2 большие группы невирусные и вирусные системы доставки. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, для невирусных систем характерна кратковременная экспрессия, отсутствие иммуногенности, отсутствие тканеспецифичности, масштабируемость процесса и др, в то время как для вирусных систем эти характеристики противоположны. И на сегодняшний день самым используемым и перспективным методом доставки является рекомбинантные аденоассоциированные вирусные вектора (rAAV, recombinant adeno-associated virus) [1].

Для наработки rAAV, несущих терапевтический ген, применяется метод транзientной трансфекции, где используются три генетические конструкции, несущие гены хелперного вируса, гены *REP/CAP* и *GOI* (Gene of Interest). Такой метод получения rAAV наиболее популярен так, как является более гибким в оптимизации, но дорогостоящий и трудно масштабируемый. Поэтому на данный момент существует потребность в создании стабильных клеточных линий, в которые интегрированы все гены необходимые для наработки вирусных частиц.

Для успешной наработки rAAV необходимо обеспечить высококопийную встройку генов *GOI* в геном клеточной линии, что и являлось целью данной работы. Поэтому такие методы встройки как нуклеофекция и использование систем CRISPR/Cas не были рассмотрены в данной работе, а основное внимание было уделено методам обеспечивающим высокую копияность встройки - лентивирусным векторам (rLV) и системе транспозонов Sleeping Beauty [2,3].

Основная часть. Сначала рестриктазно-лигазным способом были получены необходимые генетические конструкции: для сборки rLV трансферная плаزمида с *GOI*, донорная плаزمида с *GOI* для системы Sleeping Beauty. Затем с полученными плазмидами проводили трансфекцию клеточной линии HEK293 (Human Embryonic Kidney 293), в случае использовании системы транспозонов. С плазмидами для rLV сначала провели наработку вирусных части и потом поставили трансдукцию клеточной линии HEK293. Ввиду того, что в качестве гена интереса был использован зеленый флуоресцентный белок (GFP, green fluorescent protein) наличие встройки проверяли при помощи методов проточной цитометрии. После отобранную популяцию клеток обогащали при помощи клеточного сортирования.

Полученные клеточные пулы оценивали в наработке rAAV с помощью qPCR. По результатам клеточные пулы, полученные методом rLV показали низкий титр rAAV. Предположительно это связано с особенностями строения трансферной кассеты rAAV, которая включает в себя повторяющиеся GC-насыщенные последовательности в области ITR. Вероятно, эти структуры препятствуют упаковке rLV частицы. В связи с чем было принято решение остановить работы с rLV и продолжить работу с клеточным пулом, полученным при помощи системы транспозонов.

Клеточный пул, полученный путем двойной трансфекции (донорная плазмиды с *GOI* и плазмиды кодирующая ген транспозазы), был моноклонирован по наличию флуоресценции. Полученные моноклоны были проверены в наработке rAAV с помощью qPCR. По полученным данным были выбраны моноклоны, где титр вирусных частиц в 6 раз превышал титр в общем

пуле. Для проверки стабильности были отобраны 15 лидерных моноклонов. По результатам qPCR на 30 пассаже только 2 моноклона показали стабильную наработку гAAV. Для этих моноклонов будет проведена дополнительная оценка на экспрессию и копийность.

Выводы. В ходе работы был получен ряд генетических конструкций для интегрирования GFP и по результатам использования двух методов наибольшую эффективность показала система транспозонов Sleeping Beauty. С помощью этого метода удалось получить 2 моноклона, способных нарабатывать гAAV в течении 30 пассажей. Для повышения эффективности наработки гAAV рассматривается возможность дополнительных раундов встройки GOI в лидерные моноклоны с помощью системы Sleeping Beauty.

Список использованных источников:

1. Northington M.W., Rice S.E., Holmes A.L., Watts Alexander C.S. Gene-ius at work: Hemophilia B treatment enters a new era // American Journal of Health-Systems Pharmacy. – 2025. – Vol 72. p. 3241–3247.
2. Yin H., Wei X., The design of retroviral vectors used in the CAR-T products, risk management, and future perspective // MedComm. – 2025. – Vol. 6. – Issue 2. – p. 250-272.
3. Leal AF, Herreno-Pachón AM, Benincore-Flórez E, Karunathilaka A, Tomatsu S. Current Strategies for Increasing Knock-In Efficiency in CRISPR/Cas9-Based Approaches. // International Journal of Molecular Science. – 2024. – Vol. 25. – Issue 5. – p. 2456.