

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях

Efficient Transduction of T-Lymphocytes by Lentiviral Particles in Oncoimmunological Studies

Е.К. Зайкова^{1,2}, К.А. Левчук¹, Д.Ю. Поздняков¹,
А.А. Дакс², А.Ю. Зарицкий¹, А.В. Петухов^{1,2,3}

EK Zaikova^{1,2}, KA Levchuk¹, DYU Pozdnyakov¹, AA Daks²,
AYu Zaritskey¹, AV Petukhov^{1,2,3}

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

¹ VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

² Институт цитологии РАН, Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

² Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

³ Научно-технологический университет «Сириус», Олимпийский пр-т, д. 1, Сочи, Российская Федерация, 354340

³ Sirius University of Science and Technology, 1 Olimpiiskii pr-t, Sochi, Russian Federation, 354340

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Цель. Сравнить разные методы концентрации лентивирусных частиц для выбора оптимального способа, обеспечивающего высокий уровень трансдукции для получения CAR Т-клеток в лабораторных условиях.

Aim. To compare different methods of lentivirus concentration in order to select the best way of providing high-level transduction for generating laboratory CAR-T cells.

Материалы и методы. Концентрирование лентивирусного супернатанта проводилось 4 способами: ультрафильтрацией, ультрацентрифугированием, осаждением водорастворимым неионным полимером полиэтиленгликолем (ПЭГ) и ионообменной хроматографией. Функциональный вирусный титр определяли как по экспрессии репортерного белка mCherry в трансдуцированной линии HeLa, так и экспресс-тестами, основанными на иммунохроматографическом анализе (ИХА). Физический титр определяли методом ELISA. Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов здорового донора оценивали методом проточной цитометрии по интенсивности сигнала репортерного белка FusionRed. Функциональную активность полученных CAR Т-клеток анти-CD19 оценивали с помощью микроскопии после совместного культивирования с клеточной линией CD19-HeLa, а также последующего проведения теста на цитокины.

Materials & Methods. Concentration of lentiviral supernatant was carried out by 4 methods: ultrafiltration, ultracentrifugation, polyethylene glycol (PEG), water-soluble non-ionic polymer, precipitation method, and ion-exchange chromatography. Functional viral titer was determined by mCherry reporter protein expression in the transduced HeLa cell line as well as by rapid immunochromatographic (IC) tests. Physical titer was determined by ELISA. Transduction efficiency of healthy donor's T-lymphocytes was assessed by flow cytometry with respect to signal intensity of reporter protein FusionRed. Functional activity of generated anti-CD19 CAR-T was evaluated by microscopy after co-cultivation with CD19-HeLa cell line as well as subsequent cytokine testing.

Результаты. Очистка и концентрирование лентивируса ультрафильтрацией позволили получить наивысшее число трансдуцированных клеток — 84,7 %. Методы ультрацентрифугирования, применения ПЭГ и ионообменной хроматографии продемонстрировали 56,08, 74,22 и 21,05 % трансдукции Т-клеток соответственно. Использование экспресс-тестов ИХА показало хорошую сопоставимость ($r = 0,91$) с данными, полученными титрованием на клеточной линии. Эффективность трансдукции Т-клеток в среднем составляла $59,55 \pm 2,94$ %, а максимальное значение достигало 76,26 %.

Results. Lentivirus purification and concentration by ultrafiltration provided the greatest number of transduced cells, i.e. 84.7 %. Methods of ultracentrifugation, PEG precipitation, and ion-exchange chromatography yielded 56.08 %, 74.22 %, and 21.05 % of T-cell transduction, respectively. Results of rapid IC tests were comparable ($r = 0.91$) with cell line titer data. The mean T-cell transduction efficiency was 59.55 ± 2.94 %, and its maximum reached 76.26 %.

Заключение. В работе проведена оптимизация продукции CAR Т-клеток на этапе получения лентивирусных

векторов и их очистки. Метод ультрафильтрации был выбран как наиболее оптимальный способ концентрирования лентивирусного супернатанта, позволяющий осуществлять эффективную трансдукцию Т-лимфоцитов и генерировать функционально активную популяцию CAR Т-клеток.

Ключевые слова: CAR Т-лимфоциты, CD19, рекомбинантный лентивирус, концентрирование лентивирусного препарата.

Получено: 29 апреля 2020 г.

Принято в печать: 25 июня 2020 г.

Для переписки: Екатерина Константиновна Зайкова, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; e-mail: Catherine3452@yandex.ru

Для цитирования: Зайкова Е.К., Левчук К.А., Поздняков Д.Ю. и др. Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях. Клиническая онкогематология. 2020;13(3):295–306.

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-3-295-306

Conclusion. The focus was laid on optimization of CAR-T cell production during the generation of lentiviral vectors and their purification. Ultrafiltration was selected as the best method of lentiviral supernatant concentration to efficiently transduce T-lymphocytes and to generate functional CAR-T cell population.

Keywords: CAR-T lymphocytes, CD19, recombinant lentivirus, lentivirus concentration.

Received: April 29, 2020

Accepted: June 25, 2020

For correspondence: Ekaterina Konstantinovna Zaikova, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; e-mail: Catherine3452@yandex.ru

For citation: Zaikova EK, Levchuk KA, Pozdnyakov DYU, et al. Efficient Transduction of T-Lymphocytes by Lentiviral Particles in Oncoimmunological Studies. Clinical oncohematology. 2020;13(3):295–306 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-3-295-306

ВВЕДЕНИЕ

Адоптивная CAR Т-клеточная терапия обладает большим потенциалом в лечении онкологических заболеваний. Иммунотерапевтическая стратегия CAR-T заключается в нацеливании Т-клеток пациентов на распознавание специфических антигенов, презентруемых на поверхности опухолевых клеток. Процесс редактирования Т-клеточного генома для экспрессии трансгена характеризуется рядом сложностей, однако благодаря успехам генной инженерии технология доставки генетического материала преобразовалась из простых физико-химических лабораторных методов, применявшихся в 1970-е годы, в вирусные и невирусные способы, одобряемые для клинического применения. В настоящее время для получения CAR Т-клеток в научно-исследовательской лаборатории широко известны и наиболее эффективны 4 способа доставки трансгена.

Хронологически γ -ретровирусная система доставки была наиболее ранним методом, используемым в контексте адоптивной терапии и создания CAR Т-клеток [1, 2]. С помощью продукции вирусных частиц в линии-продуценте PG13 получали высокие титры вируса, обеспечивающего стабильно высокий уровень экспрессии CAR в получаемой популяции модифицированных Т-лимфоцитов [3–6]. Популяции CAR Т-клеток анти-CD19, полученные в результате γ -ретровирусной трансдукции, демонстрировали значительные противоопухолевые свойства как в случае аутологичного [6, 7], так и аллогенного [8, 9] происхождения. Лентивирусная система доставки структурно сходна с γ -ретровирусной и получила широкое распространение благодаря стабильности экспрессии CAR-трансгена и безопасности [10, 11].

Альтернативой вирусным системам трансгенной доставки служат системы на основе транспозонов (участков генома с непостоянной локализацией) *PiggyBac* (PB) и *Sleeping Beauty* (SB), интегрирующих длинные последовательности ДНК в геном клетки благодаря транспозонному механизму встраивания по типу «cut and paste». Эту платформу выгодно отличает трансдукция с помощью нуклеофекции, простота реализации, меньшая стоимость и снижение регуляторных норм. Однако существенным недостатком доставки ДНК с помощью транспозонов является низкая эффективность трансдукции по сравнению с таковой у ленти- и ретровирусных векторов [12]. Кроме того, следует отметить, что в случае использования транспозонов существует опасность инсерционного мутагенеза, хотя по сравнению с вирусными векторами она снижена [13, 14]. С помощью транспозиции *PiggyBac* были успешно получены CAR Т-клетки, специфичные в отношении CD19 и HER-2 [15, 16].

Еще одним невирусным методом доставки трансгена является электропорация мРНК, однако ввиду транзientного (преходящего, нестабильного) характера экспрессии и необходимости проведения дополнительных раундов переноса трансгена она не столь эффективна, как вирусные технологии [17]. Известны также системы доставки CAR-трансгена на основе адено-ассоциированных вирусных векторов, открывающие новые возможности в получении CAR Т-клеток [18].

Несмотря на вариативность методов доставки, лентивирусные векторы занимают лидирующую позицию. Первый одобренный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) CAR Т-клеточный препарат компании «Новартис» для терапии В-клеточного острого лимфобластного лейкоза тисагенле-

клеисел (CTL-019) основан на технологии доставки трансгена с помощью именно лентивирусных частиц.

Наиболее изученным представителем лентивирусов остается ВИЧ подтипа 1, поражающий главным образом делящиеся Т-хелперные лимфоциты через взаимодействие с CD4 и CCR5, которое инициирует слияние мембран. Впервые как вектор доставки генов ретровирусы были адаптированы в 1983 г. [19]. Несмотря на дальнейшее использование онкоретровирусных систем в терапии, они имели существенные недостатки в виде низкой стабильности вирусных частиц, низких титров и неспособности к трансдукции покоящихся клеток [20, 21]. Для решения этих проблем позднее лентивирусы на основе ВИЧ-1 были целенаправленно адаптированы как векторы доставки трансгена, способные уже теперь трансдуцировать различные ткани *in vivo*, в т. ч. нейроны, гепатоциты, миоциты, клетки крови и сетчатки [22]. Главное преимущество лентивирусной доставки трансгена заключается в способности лентивируса инфици-

ровать как делящиеся, так и неделящиеся клетки (за исключением клеток в фазе G0 клеточного цикла) и обеспечивать стабильную экспрессию трансгена в геноме трансдуцируемых клеточных популяций. Помимо этого лентивирусные векторы обладают рядом других преимуществ: стабильная интеграция в геном клетки-хозяина, широкий тканевой тропизм, включая клеточные и тканевые мишени для терапии, отсутствие экспрессии вирусных белков после трансдукции вектора, возможность доставлять сложные генетические конструкции, например полицистронные или несущие интроны последовательности [23]. Благодаря перечисленным свойствам лентивирусы широко применяются в фундаментальных и трансляционных исследованиях. Кроме того, они используются в клинических исследованиях.

В настоящее время выделяют три поколения лентивирусных векторов (рис. 1), которые различаются числом плазмид, уменьшением количества генов аксессуарных белков, наличием дополнительных

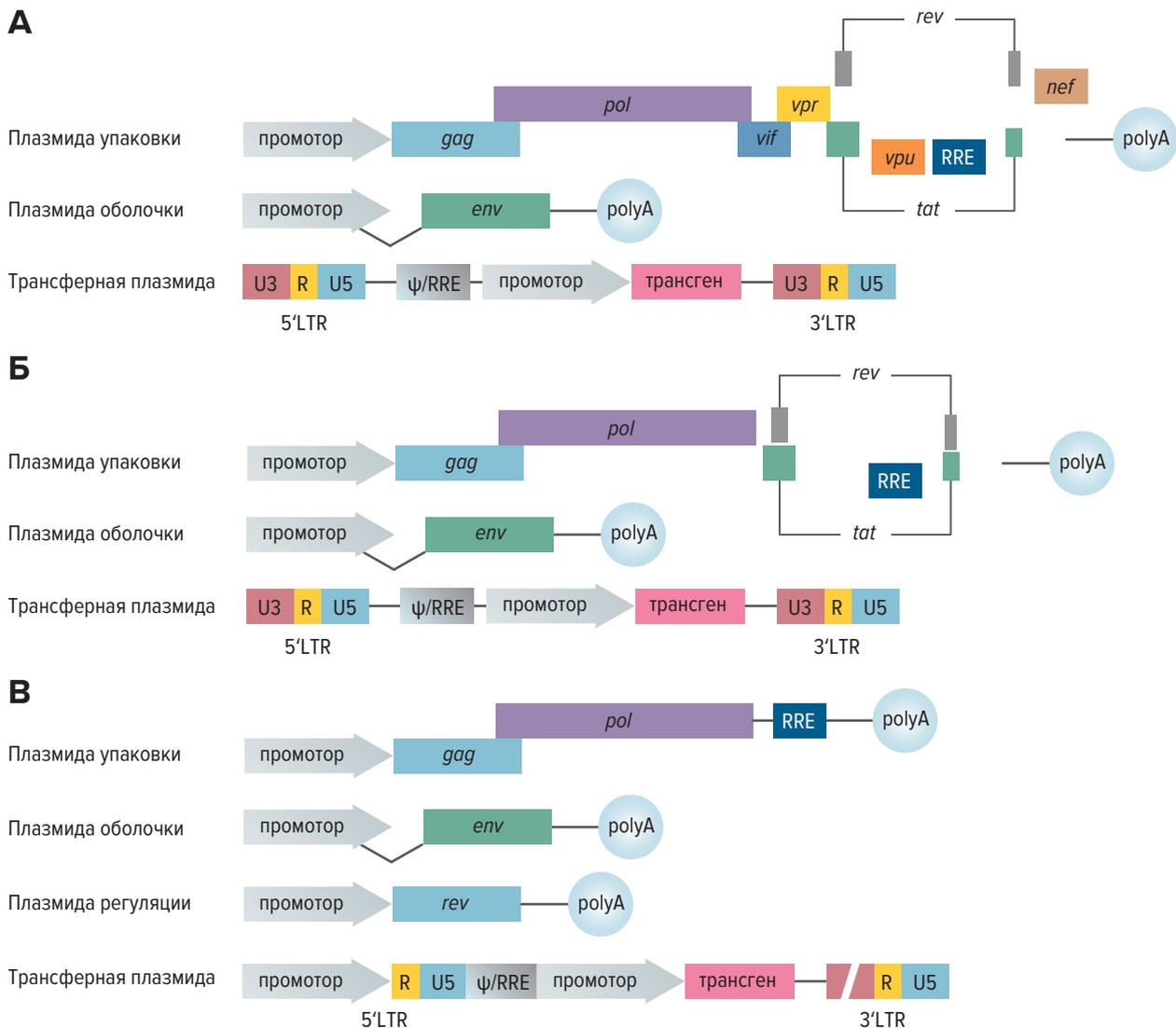


Рис. 1. Структура поколений рекомбинантных лентивирусных векторов: А — первое поколение; Б — второе поколение; В — третье поколение LTR — длинный концевой повтор; polyA — полимеразы альфа; RRE — элемент ответа Rev.

Fig. 1. Structure of recombinant lentiviral vector generations: А — first generation; Б — second generation; В — third generation LTR — long terminal repeat; polyA — polymerase alpha; RRE — Rev response element.

делеций в длинном концевом повторе (3'LTR) для создания самоинактивирующегося вектора (SIN) [24].

Первое поколение лентивирусных векторов содержит значительную часть генома ВИЧ, включая гены *gag* и *pol* (рис. 1, А). В попытке создать безопасную для лабораторного применения систему первое поколение включает 3 плазмиды. Пакующая плазида содержит гены упаковки частиц *gag*, *pol* и регуляторные белки под контролем CMV-промотора. Плазида вирусной оболочки Env экспрессирует гликопротеид VSV-G. Трансферная плазида кодирует сигналы LTR, ψ-сигнал упаковки и элемент ответа Rev (RRE), необходимые для упаковки, обратной транскрипции и интеграции. На смену этим конструкциям пришли усовершенствованные системы. Еще более безопасные векторы второго поколения (рис. 1, Б) не содержат гены аксессуарных факторов вирулентности *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* [25]. Такие конструкции несут только 4 из 9 генов ВИЧ: *gag*, *pol*, *tat*, *rev*. С целью обеспечить безопасность геном лентивируса третьего поколения разнесен на четыре плазмиды (рис. 1, В). Гены *gag* и *pol* кодируются отдельно от *rev* на разных пакующих плазидах. Env (VSV-G) также выделен в отдельную плазмиду вирусной оболочки. Делеции в U3-участке 3'LTR позволяют получить SIN, предотвращающий энхансерную активность этих участков, снижая вероятность активации протоонкогенов при интеграции трансгена в геном, а также иницируя трансляционную инактивацию потенциально пакующихся вирусных геномов в трансдуцированной клетке. В сравнительном анализе с γ-ретровирусными системами SIN лентивирусные векторы показали меньший риск спонтанной рекомбинации [26].

Несмотря на безопасность поколений рекомбинантных лентивирусных векторов, отсутствие репликативно-компетентного лентивируса (РКЛ) строго оценивается в рамках генной терапии. Присутствие РКЛ определяется с помощью количественной ПЦР гена обратной транскриптазы, а также трансдуцированием линии Т-клеточной лейкемии С8166 с последующим твердофазным иммуоферментным анализом (ELISA) р24 в кондиционных средах пассажируемой культуры [27, 28]. FDA и большинство регуляторных государственных структур обязуют проводить тщательный анализ наличия РКЛ не только в генотерапевтических препаратах, но и у пациентов. Согласно FDA, пациенты должны проходить мониторинг каждые 3 мес. в течение 1-го года после введения препарата.

Для характеристики вирусной нагрузки или дозы обычно вводят понятие множественности инфекции (МИ). МИ отражает соотношение числа частиц вируса к числу трансдуцируемых клеток. Поскольку способность лентивируса к трансдукции варьирует для клеточных линий, значение МИ также варьирует для разных клеточных линий. Для того чтобы добиться оптимальной трансдукции, необходимо экспериментально тестировать диапазон МИ для конкретной линии. Формула МИ:

$$MI = \frac{\text{Титр вируса (ТЕ/мл)} \times \text{Объем вируса (мл)}}{\text{Число клеток}}$$

Вирусный титр в формуле выражен в виде концентрации трансдуцирующих единиц (ТЕ) на 1 мл. Величина ТЕ отражает функциональный титр вируса,

т. е. содержание в добавленном вирусном препарате частиц, способных эффективно трансдуцировать клетки-мишени. ТЕ вируса определяют в результате титрования частиц, несущих репортерный ген флюоресцентного белка, на клеточной линии. Наиболее часто используют такие эталонные клеточные линии, как НЕК293Т, HeLa и HT-1080, или же суспензионные линии [29]. С помощью проточной цитофлуориметрии вычисляют процент несущих флюоресцирующий белок клеток и рассчитывают ТЕ по формуле:

$$TE = \frac{\text{Число клеток} \times \text{Доля трансдуцированных клеток}}{\text{Объем вируса (мл)}}.$$

Для оценки физического титра вирусных частиц используют метод ELISA капсидного белка р24, по содержанию которого рассчитывают физическое число частиц в аликвоте (чЛВ/мл).

Продукция вирусных векторов предполагает большие затраты ввиду трудоемкости производства, требований к инфраструктуре и классу безопасности помещений, тестированию безопасности выпускаемого продукта. Масштабную продукцию лентивирусных частиц обычно осуществляют в линии-производителе, чаще всего используют клеточную линию НЕК293Т человека. В целом совокупность манипуляций по продукции и упаковке вирусных частиц называют ранним процессом получения рекомбинантного вектора, несущего целевой трансген, который затем вступает в процессы, направленные на очистку от примесей и получение вирусного препарата.

После кратковременного культивирования клеточной линии-производителя осуществляют ее котрансфекцию плазидами, несущими последовательности белков вирусной оболочки, белков упаковки капсида и последовательность трансгена. Спустя 48–72 ч экспансии проводят сбор и осветление кондиционной среды, содержащей лентивирусные частицы, с помощью осаждения клеточных фрагментов или же самой линии при условии продукции вектора в суспензионной культуре. Процесс концентрирования вирусных частиц направлен на снижение объема супернатанта, содержащего частицы с пропорциональным увеличением концентрации чЛВ/мл. Концентрирование ультрафильтрацией заключается в удержании частиц вируса на мембране, содержащей поры, через которые элиминируется жидкость при центрифугировании. Ультрацентрифугирование — продолжительное осаждение частиц вируса при высокой скорости — 72 000 g. Использование полиэтиленгликоля как метода концентрирования также эффективно ввиду возможности преципитации частиц вируса и поэтому часто используется в коммерческих наборах. В лабораторных условиях для концентрирования и очистки обычно используют комбинации центрифугирования и хроматографии. Так, с помощью ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы и последующей анионообменной хроматографии удалось добиться значений функционального титра 10^{10} ТЕ/мл для VSV-G псевдотипированных рекомбинантных лентивирусных частиц [30].

В промышленном процессе концентрирование и очистка большого объема вирусных частиц осу-

ществляются также путем комбинации мембранных способов: системы тангенциальной фильтрации (СТФ) и хроматографии, ионообменной и аффинной с использованием гепарина в колонке, а также стадии эксклюзионной хроматографии. Наиболее часто для VSV-G псевдотипированных частиц применяют колоночную хроматографию низкого давления и ионообменную хроматографию [31]. СТФ обеспечивает концентрирование большого объема вирусных частиц и позволяет осуществить диафильтрацию для замены буфера. СТФ также применяют для концентрирования частиц лентивируса с псевдотипированием другими белками вирусной оболочки [32, 33]. В целом очистка вирусного препарата в промышленном масштабе представляет сложный многостадийный процесс со множеством точек оптимизации процесса. К примеру, для поддержания функционального титра вирусных частиц состав и pH диализирующего буфера должны быть тщательно отрегулированы в процессе получения препарата.

После стадий хроматографической очистки элюат (раствор, выходящий из хроматографической колонки) проходит серию стерилизующих фильтраций для удаления остатков клеточных фрагментов. Чистота продукта особенно критична ввиду возможной иммуногенности остаточных примесей *in vitro* или *in vivo* [34]. О чистоте лентивирусного супернатанта судят по результатам содержания остаточных белков линии-продуцента, плазмидной ДНК. Несмотря на одинаковые этапы продукции рекомбинантных лентивирусных частиц, промышленный формат получения лентивирусного препарата имеет в большинстве случаев ряд отличий от лабораторного (табл. 1).

Основной задачей промышленного получения рекомбинантных лентивирусов является достижение необходимых титров лентивирусных частиц. Минимальное приемлемое значение — 10^{10} чЛВ/мл. Для получения высоких титров в настоящий момент актуальна разработка стабильных пакующих линий-продуцентов рекомбинантных частиц, одобренных для клинического применения [35].

Вопрос эффективной лентивирусной доставки трансгена в Т-клеточный геном актуален как для биотехнологического получения CAR Т-продукта для клинического применения, так и для научно-иссле-

довательских работ. В настоящей работе проводится сравнение и оценка эффективности нескольких способов концентрирования лентивирусного препарата для выбора наиболее эффективного пути подготовки собранных рекомбинантных лентивирусных частиц для трансдукции первичных Т-клеток донора и создания функциональной популяции CAR Т-клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточное культивирование

Клеточные линии HEK293T и HeLa культивировали в ростовой среде DMEM, содержащей глутамин («ПанЭко», Россия) с 10 % FBS (Hyclone, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клеточные линии были любезно предоставлены лабораторией регуляции экспрессии генов Института цитологии РАН. Т-лимфоциты периферической крови человека выделяли и активировали в соответствии с протоколом, описанным ранее [36]. Их культивировали в среде RPMI-1640, содержащей глутамин («ПанЭко», Россия) с 10 % FBS (Hyclone, США) и 300 ед. акт./мл человеческого рекомбинантного интерлейкина-2 («Биотех», Россия).

Создание генетической конструкции, несущей CD19-специфический CAR

Последовательность химерного антигенного рецептора FMC63–28ZCAR, специфически распознающего CD19 [2], была синтезирована ранее и уже использовалась нами в предыдущих исследованиях [37]. Плазмида lentiCRISPR v2 (Addgene plasmid #52961), любезно предоставленная д-ром Feng Zhang, использовалась в качестве лентивирусного вектора для клонирования последовательностей CAR. Кассета, состоящая из промотора EF-1a и последовательностей CAR в общей рамке считывания с последовательностями пептида T2A и белка FusionRed, была заклонирована по сайтам рестрикции AgeI и MluI, при этом предварительно из вектора была удалена кассета, кодирующая sgRNA (направляющую РНК).

Другие лентивирусные конструкции, используемые в работе

Для тестирования методов вирусной очистки и концентрирования использовали коммерческий

Таблица 1. Отличия лабораторного и промышленного форматов продукции рекомбинантных лентивирусных частиц

Параметр	Лабораторный формат	Промышленный формат
Пакующая клеточная линия	Адгезионные линии (HEK293, HEK293T)	Суспензионные линии (HEK293, HEK293T, 293SF-3F6)
Концентрирование	Ультрацентрифугирование/ультрафильтрация	Система тангенциальной фильтрации
Способ сборки	Транзиентная трансфекция	Транзиентная трансфекция/стабильный пакующий продуцент
Способ очистки	–	Ионообменная хроматография
Наличие антибиотика в питательной среде	+	–
Использование бессывороточных сред	Опционально	+
Оценка содержания плазмидной ДНК	–	+
Оценка наличия белков линии-продуцента	–	+
Оценка репликативной компетентности вируса	–	+
Формат культивирования	Бутылки Т-75, чашки Петри	Колбы Эрленмейера; биореактор WAVE
Условия культивирования	Статические	Динамические

вектор pUltra-hot (Addgene plasmid #24130, любезно предоставлен д-ром Malcolm Moore), кодирующий флуоресцентный белок mCherry. Кроме того, на основе плазмиды pUltra-hot были созданы 2 конструкции, несущие кДНК генов CD19 и LNGFR соответственно. Конструкции были получены удалением репортерного белка mCherry и клонированием кассеты CD19_p2A_PuroR или LNGFR_p2A_PuroR по сайтам рестрикции AgeI и NheI. Полученные конструкции использовались для создания клеточных линий CD19-HeLa и LNGFR-HeLa.

Получение рекомбинантных лентивирусных частиц

Клетки HEK293T отсеивали на 150-мм культуральные чашки Петри (TPP, Швейцария) в количестве 5×10^6 на чашку. На следующий день, по достижении конфлюэнтности, равной 50–70 %, приступали к трансфекции. В стерильной конической пробирке типа Falcon в необходимом объеме среды Opti-MEM (Gibco, США) смешивали 3 плазмидных ДНК: 30 мкг psPAX2 (Plasmid #12260), 30 мкг целевой плазмидной ДНК, 10 мкг pMD2.G (Plasmid #12259), после чего интенсивно перемешивали на мешалке Vortex и добавляли 100 мкл PEI (1 мг/мл) (Polysciences, США). Перемешав смесь ДНК с PEI на Vortex, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, после чего добавляли к клеткам по каплям. Через 5–6 ч проводили смену среды на бессывороточную Opti-MEM (Gibco, США), содержащую 5 ммоль NaB (Sigma-Aldrich, США). Для 150-мм чашки объем вносимой среды составлял 13 мл. По прошествии 24 ч осуществляли сбор супернатанта, центрифугировали при 2000 g в течение 5–7 мин для осаждения клеток и переносили осветленный супернатант в чистую пробирку Falcon. Супернатант разделили на равный объем по 30 мл для дальнейшего концентрирования.

Концентрирование и очистка псевдотипированных лентивирусных частиц

Концентрирование лентивирусных частиц осуществляли 4 различными методами.

1. Ультрафильтрация. Осветленный супернатант переносили в центрифужные модули Amicon Ultra 100 kDa (Millipore, США) и центрифугировали при скорости 3000 g в течение 15 мин.
2. Ультрацентрифугирование. Супернатант с вирусными частицами осаждали центрифугированием при скорости 72 000 g, температуре 4 °C в течение 2 ч. Осадок растворяли в PBS при температуре 4 °C в течение суток.
3. Осаждение посредством полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для данной цели использовали коммерческий реагент Lenti-X™ Concentrator (Takara, Япония). Осветленный супернатант, содержащий лентивирусные частицы, смешивали с реагентом в соотношении 3:1, пипетировали и инкубировали при температуре 4 °C в течение 1 ч. Полученную суспензию центрифугировали при скорости 1500 g, температуре 4 °C в течение 45 мин, супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в PBS.
4. Ионообменная хроматография. Концентрирование и очистку данным методом проводили

набором Lenti-X™ Maxi Purification Kit (Takara Bio Inc., Япония), следуя инструкции производителя. Вкратце: вносили в колонку уравнивающий буфер, позволяли стечь под действием силы тяжести, затем вносили смесь 10X связывающего буфера с вирусным супернатантом, после чего промывали и элюировали 3 мл элюирующего буфера. Поскольку элюирующий раствор содержит высокую концентрацию солей, проводили обессоливание, промывая концентрат раствором PBS и центрифугируя в модулях Amicon-15.

Таким образом, с помощью перечисленных методов равные аликвоты вируса были сконцентрированы в 10 раз и полученные 3 мл вируса использовали для трансдукции.

Определение титра вирусных частиц

Определение функционального титра вируса методом проточной цитометрии

Для определения ТЕ/мл (функционального титра) лентивирусных частиц проводили трансдукцию клеточной линии HeLa в возрастающем объеме вирусного супернатанта. Линия HeLa использовалась в соответствии с рекомендациями CSH Protocols [29].

В первый день рассеяли 100 000 клеток HeLa на лунку 6-луночного планшета в 2 мл полной среды DMEM (Gibco, США), инкубировали в течение 6 ч до полного прикрепления клеток, после чего добавляли протамина сульфат («Эллара», Россия) до конечной концентрации 50 мкг/мл и вносили очищенные вирусные частицы в двух повторностях в следующих количествах: 0,1, 1, 5, 10, 20, 50 и 100 мкл. Спустя 24 ч проводили смену среды (без протамина сульфата). Через 72 ч выполняли цитофлуориметрический анализ накопления репортера mCherry. Значение ТЕ рассчитывали по формуле:

$$TE = \frac{\text{Число клеток} \times \text{Доля трансдуцированных клеток}}{\text{Объем вируса (мл)}}$$

Измерение общей концентрации вирусных частиц в супернатанте

Определение титра капсидного белка p24 методом ELISA. ELISA проводили коммерческим набором Lenti-X p24 Rapid Titer Kit (Takara Bio Inc., Япония) в соответствии с протоколом производителя. По полученным данным строили калибровочную кривую, на основе полученных концентраций p24 рассчитывали относительный вирусный титр.

Определение титра иммунохроматографическим экспресс-тестом Lenti-X GoStix Plus. Действуя в соответствии с рекомендациями производителя, наносили 20 мкл вирусного концентрата, предварительно разведенного в 10 раз раствором PBS, на экспресс-тест. Затем вносили 3 капли буфера Chase и анализировали результат по прошествии 10 мин с помощью мобильного приложения Lenti-X GoStix Plus. Анализ вирусного титра с помощью экспресс-тестов проводится по денситометрическим значениям окрашенных контрольной и тест-полос. За контроль принимают степень окрашивания стандарта белка p24.

Экспериментальные значения получали в единицах GV (GoStix Value), сравнимые с содержанием p24.

Получение CAR Т-клеток

Трансдукцию осуществляли спустя 48 ч после активации Т-клеток условно здорового донора. Для этого к клеткам добавляли очищенный и сконцентрированный препарат лентивирусных частиц в количестве 50 МИ, а также 50 мкг/мл протамина сульфата. По прошествии 6 ч разбавляли первоначальный объем полной средой RPMI-1640 для снижения токсичного действия препарата. Через 48 ч после трансдукции проводили анализ на экспрессию трансгена, используя проточную цитометрию. Гейтировали популяцию живых Т-клеток, эффективность трансдукции оценивали по интенсивности флуоресценции репортерного белка FusionRed.

Цитометрическое определение уровня цитокинов

Функциональная активность полученных CAR Т-клеток была оценена методом проточной цитометрии с помощью набора BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (BD, США), позволяющего определять одновременно 6 цитокинов: интерлейкин (ИЛ)-2 (ИЛ-2), ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, фактор некроза опухолей α (ФНО- α) и интерферон- γ (ИФН- γ). После 24-часовой совместной инкубации CAR Т-клеток с клетками-мишенями в соотношении 1:1 собирали супернатант, центрифугировали при скорости 200 g в течение 7 мин для осаждения CAR Т-клеток, переносили осветленный супернатант в чистую пробирку, после чего определяли уровень цитокинов согласно инструкции производителя.

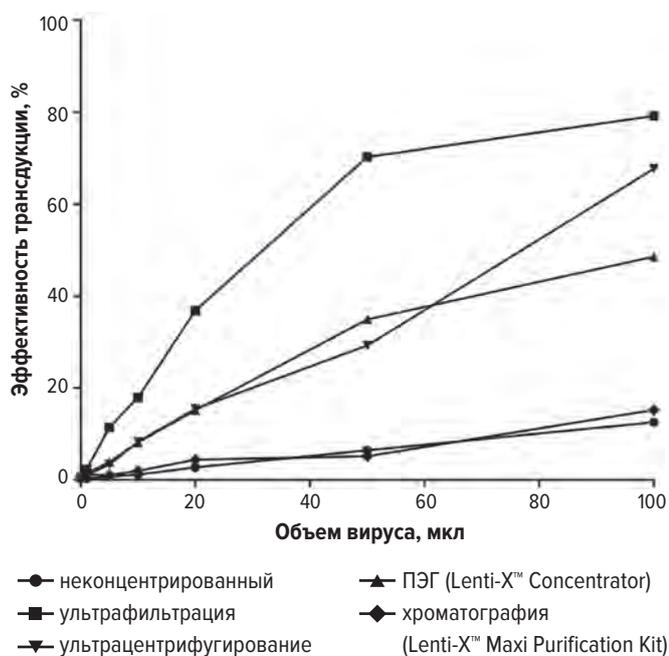


Рис. 2. Цитофлуориметрическая оценка трансдукции клеточной линии HeLa при разных способах концентрирования вирусных частиц после продукции и сбора
ПЭГ — полиэтиленгликоль.

Fig. 2. Flow cytometry analysis of HeLa cell line transduction in different methods of virus concentration after their production and collection

ПЭГ — polyethylene glycol.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение титра рекомбинантных лентивирусных частиц

Определение ТЕ лентивируса титрованием на клеточной линии HeLa

Эффективность трансдукции клеточной линии HeLa препаратами лентивирусных частиц, концентрированными 4 разными способами, оценивали по интенсивности флуоресценции репортера mCherry. Увеличение интенсивности флуоресценции репортера при возрастании объема лентивируса наблюдали при трансдукции всеми исследуемыми вариантами концентрирования (рис. 2 и 3). Наименьшая величина трансдукции была обнаружена у вируса, сконцентрированного набором Lenti-X™ Maxi Purification Kit, и составила 17,05 %. Наибольшая трансдукция наблюдалась у вируса, прошедшего ультрафильтрацию на центрифужных модулях Amicon, и составила 84,7 %.

Проанализировав флуоресценцию репортера mCherry, мы сравнили значения функционального вирусного титра (ТЕ/мл) каждого способа концентрирования, чтобы обнаружить вариант с наивысшей трансдуцирующей эффективностью (рис. 4). Для более корректной оценки ТЕ использовали значения по флуоресценции mCherry при добавлении аликвот 5, 10 и 20 мкл вируса.

Мы обнаружили значимые различия для неконцентрированного вируса ($0,2 \times 10^6$), обладавшего наименьшим значением ТЕ по сравнению со всеми вариантами, кроме ионообменной хроматографии Lenti-X™ Maxi Purification Kit ($0,5 \times 10^6$). Наивысшим показателем ТЕ обладал лентивирус после ультрафильтрации — $2,6 \times 10^6$ ТЕ/мл, превысив значения ТЕ при концентрировании с помощью Lenti-X™ Maxi Purification Kit и неконцентрированного лентивируса.

Определение титра лентивирусных частиц по содержанию капсидного белка p24

Для определения физического титра вирусных частиц применяли следующие методы: ELISA (Lenti-X p24 Rapid Titer Kit) и специальные иммунохроматографические экспресс-тесты Lenti-X GoStix Plus. Оба указанных способа основаны на детекции белка капсида ВИЧ-1 p24, их преимуществом является получение быстрого результата. Следует отметить, что экспресс-тесты Lenti-X GoStix Plus позволяют также оценить функциональный титр при наличии референсного вируса с известным содержанием ТЕ/мл.

В полученных препаратах лентивирусных частиц концентрация белка p24 была наивысшей при использовании ультрацентрифугирования и составила 126,66 нг/мл. Немного меньше была концентрация p24 при ультрафильтрации на модулях Amicon — 125,97 нг/мл, а наименьшее значение наблюдалось после концентрирования набором Lenti-X™ Maxi Purification Kit и составляло 70,85 нг/мл (рис. 5). Подсчет относительного физического вирусного титра проводили, исходя из литературных данных о том, что 1 нг p24 эквивалентен приблизительно $1,25 \times 10^7$ лентивирусных частиц.

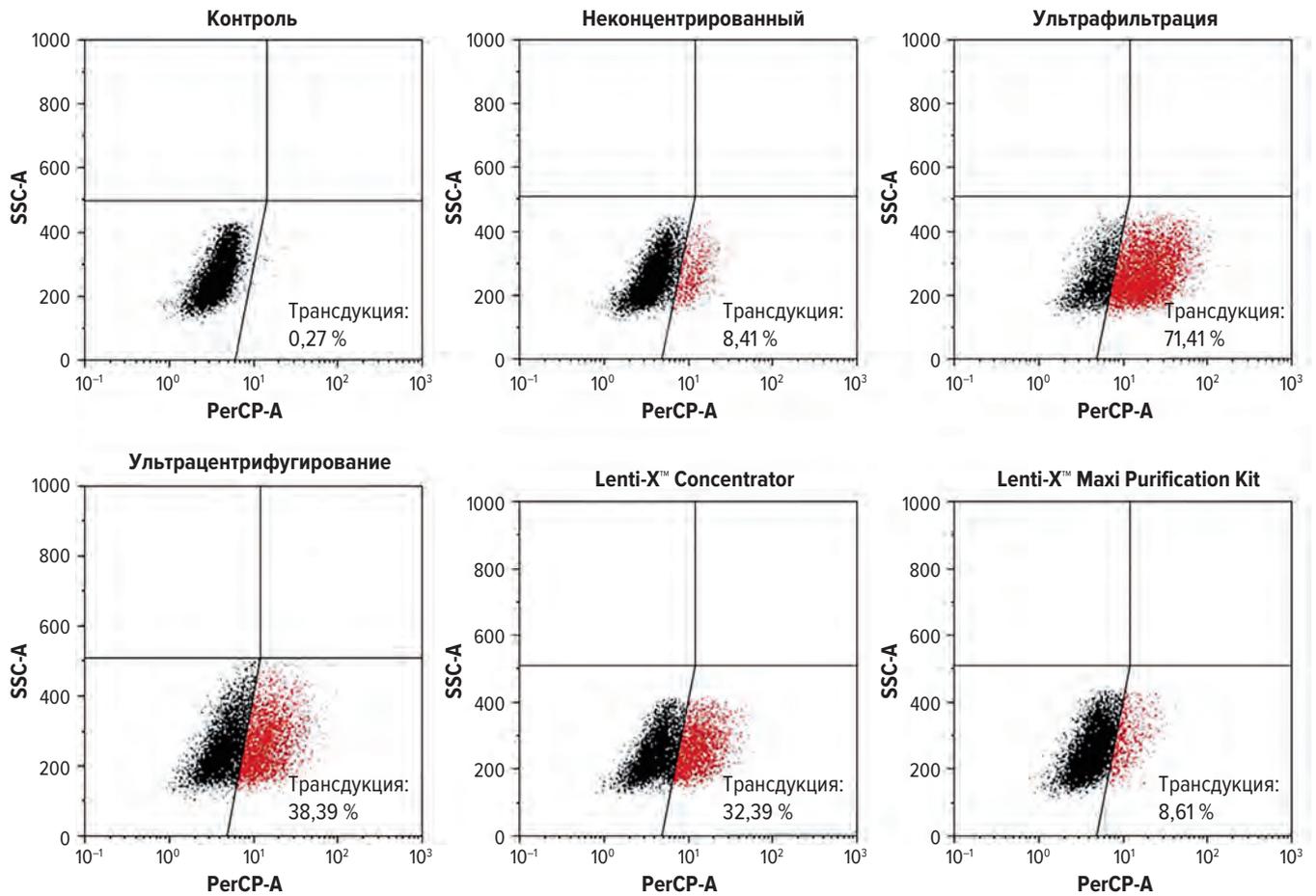


Рис. 3. Цитофлуориметрический анализ интенсивности mCherry в клеточной линии HeLa после трансдукции 50 мкл супернатанта лентивирусного вектора с разными вариантами концентрирования
SSC — боковое светорассеивание.

Fig. 3. Flow cytometry analysis of mCherry intensity in HeLa cell line after transduction of 50 µL lentiviral vector supernatant with different concentration methods
SSC — side scattering.

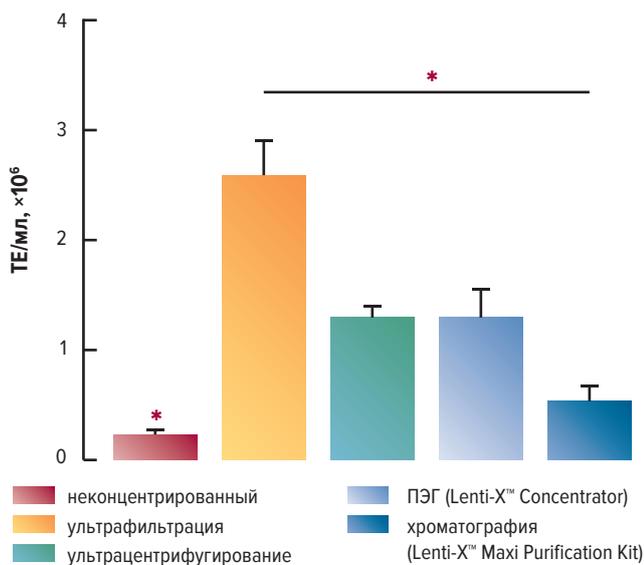


Рис. 4. Оценка содержания вирусного титра (ТЕ/мл) в супернатанте рекомбинантных лентивирусных частиц после титрования препаратов на клеточной линии HeLa (* $p = 0,0357$; $n = 3$ для каждого варианта)
ПЭГ — полиэтиленгликоль.

Fig. 4. Viral titer estimation (TU/ml) in supernatant of recombinant lentiviral particles after titration of specimens on HeLa cell line (* $p = 0.0357$; $n = 3$ for each method)
ПЭГ — polyethylene glycol.

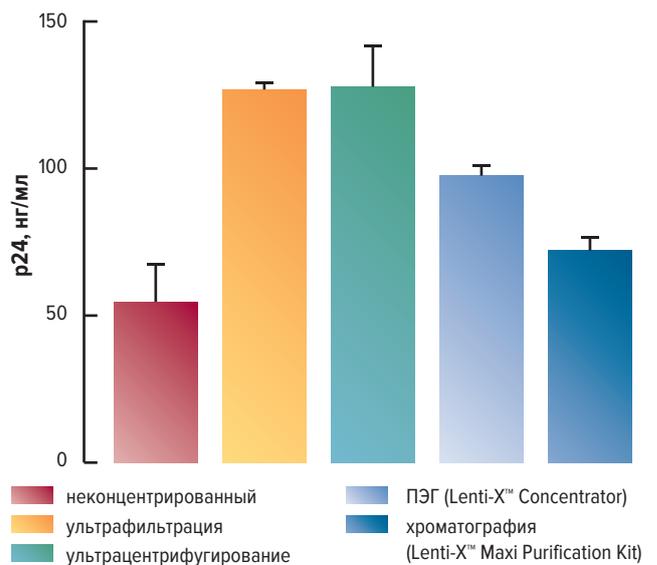


Рис. 5. Гистограмма уровней белка p24 при разных способах концентрирования вирусного препарата, оцененных методом ELISA
ПЭГ — полиэтиленгликоль.

Fig. 5. Histogram of p24 protein levels in different virus concentration methods measured by ELISA
ПЭГ — polyethylene glycol.

Определяя титр тест-полосками Lenti-X GoStix Plus, наносили как сконцентрированные, так и разбавленные в 10 раз препараты лентивирусных частиц. При этом в первом случае все полученные значения превышали максимально определяемые, а во втором случае удалось установить все значения, кроме таковых у неконцентрированного вируса (рис. 6).

Для определения титра тест-полосками Lenti-X GoStix Plus необходим референсный вирус с известным количеством ТЕ/мл. В качестве контроля использовали 1 из 4 полученных и сконцентрированных лентивирусных препаратов — вирус после концентрирования набором Lenti-X™ Maxi Purification Kit. Полученные значения приведены в табл. 2.

Получение популяций CAR Т-клеток и продукция цитокинов

Поскольку самое высокое значение ТЕ/мл наблюдали у лентивируса после ультрафильтрации, то для получения CAR Т-клеток использовали вирус, сконцентрированный таким методом. Эффективность трансдукции Т-лимфоцитов и оценку получения CAR Т-клеток визуально оценивали с помощью проточной цитометрии (рис. 7, А). За контроль принимали активированные нетрансдуцированные Т-клетки донора, об эффективности получения CAR Т-клеток судили по интенсивности флюоресценции репортерного белка FusionRed. Мы проанализировали 11 CAR Т-клеточных популяций одного донора со средней эффективностью трансдукции 59,55 % (рис. 7, Б).

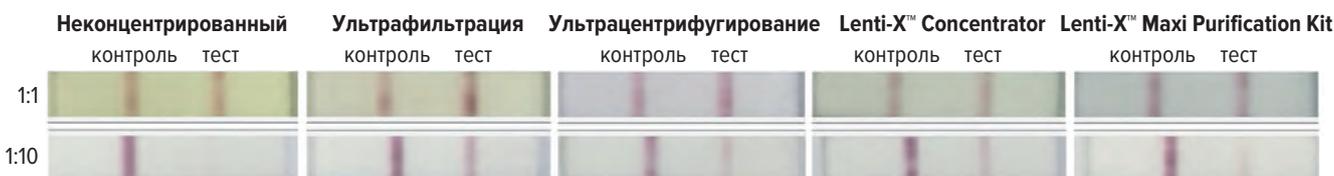


Рис. 6. Фотографии экспресс-тестов иммунохроматографического анализа Lenti-X GoStix Plus после нанесения вирусного супернатанта, полученного разными способами концентрирования

Fig. 6. Images of rapid immunochromatographic tests Lenti-X GoStix Plus after application of viral supernatant produced with different concentration methods

Таблица 2. Значения вирусного титра, полученные разными способами титрования и концентрирования

Способ титрования	Метод концентрирования лентивируса				
	Неконцентрированный	Ультрафильтрация	Ультрацентрифугирование	Lenti-X™ Concentrator	Lenti-X™ Maxi Purification Kit
Трансдукция HeLa, ТЕ/мл	1.65E+05	3.24E+06	1.08E+06	1.03E+06	2.11E+05
ELISA, чЛВ/мл	3.32E+06	7.87E+06	7.92E+06	6.06E+06	4.43E+06
ИХА (Lenti-X GoStix Plus)	< ПО	2.30E+06	1.61E+06	1.05E+06	2.11E+05

ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ; ИХА — иммунохроматографический анализ; ПО — порог определения; ТЕ — трансдуцирующие единицы; чЛВ — лентивирусные частицы.

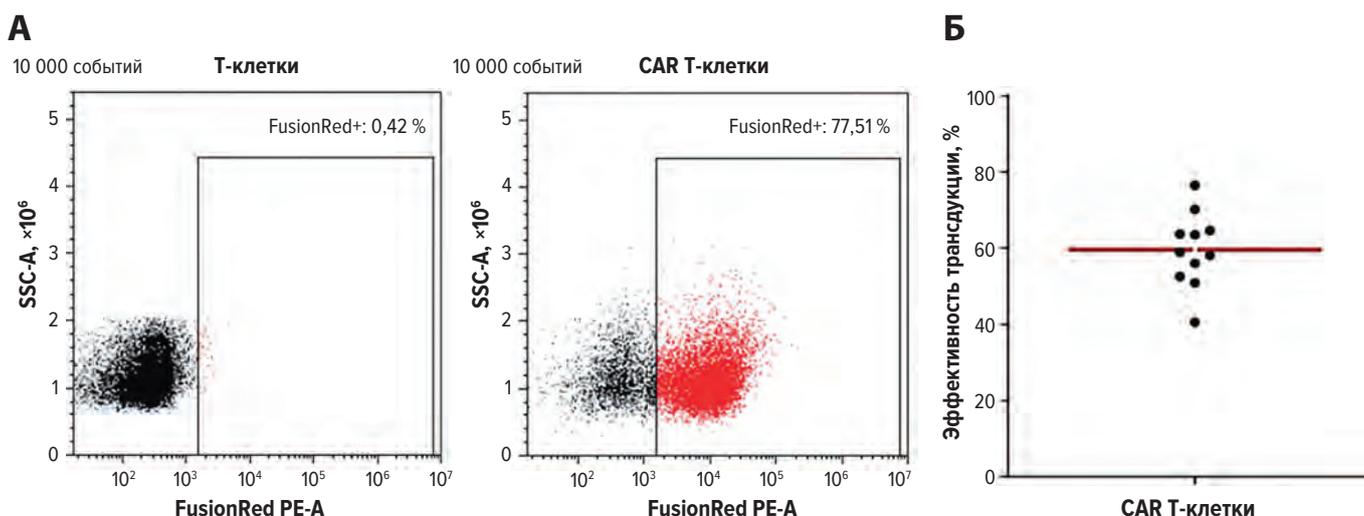


Рис. 7. Анализ эффективности трансдукции и получения CAR Т-клеточных популяций: А — оценка трансдукции лентивирусным вектором по флюоресценции репортерного белка FusionRed; Б — оценка трансдукции популяций CAR Т-клеток (n = 11, среднее 59,55 %, стандартная ошибка 2,94) SSC — боковое светорассеивание.

Fig. 7. Analysis of transduction efficiency and CAR-T cell production: А — estimation of transduction by lentiviral vector with respect to fluorescence of reporter protein FusionRed; Б — estimation of CAR-T cell populations (n = 11, mean 59.55 %, standard error 2.94) SSC — side scattering.

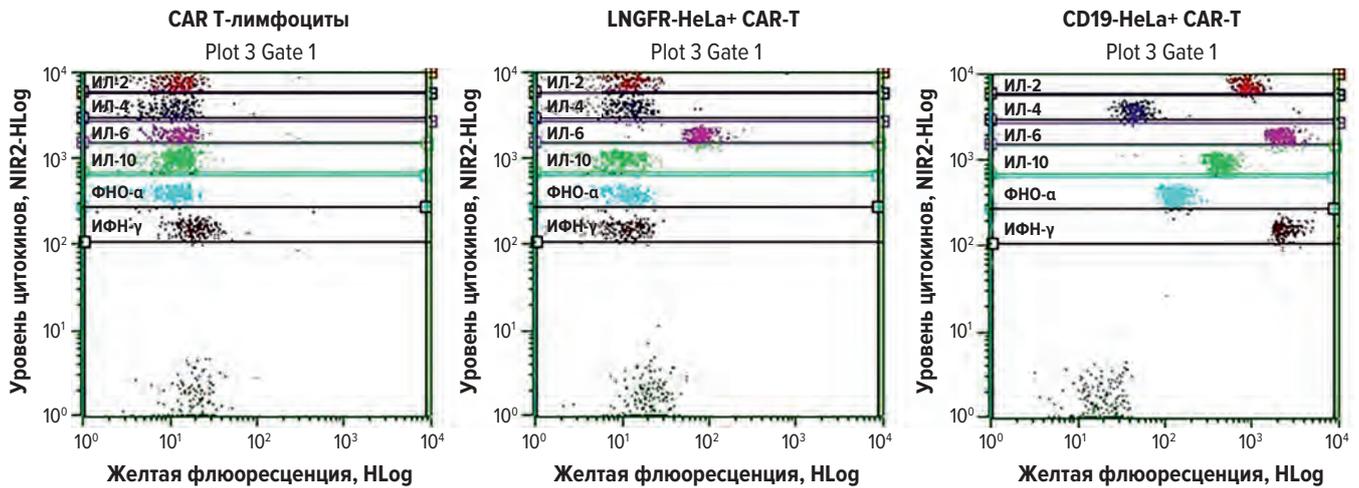


Рис. 8. Уровни цитокинов до и после инкубации CAR T-лимфоцитов с клетками-мишенями (CD19-HeLa) и немишенями (LNGFR-HeLa). ИЛ — интерлейкин; ИФН- γ — интерферон- γ ; ФНО- α — фактор некроза опухолей α .

Fig. 8. Cytokine levels before and after incubation of CAR-T lymphocytes with target (CD19-HeLa) and non-target (LNGFR-HeLa) cells. ИЛ — interleukin; ИФН- γ — interferon- γ ; ФНО- α — tumour necrosis factor α .

Функциональную активность полученных CAR T-клеток подтверждали мультиплексным анализом цитокинов методом проточной цитометрии. На рис. 8 продемонстрированы уровни цитокинов как для чистой популяции CAR T-лимфоцитов, так и при их культивировании с линией HeLa, служащей положительным (HeLa, экспрессирующая CD19) и отрицательным (HeLa, не экспрессирующая CD19, но экспрессирующая LNGFR) контролями активации CAR-T. Уровни ИЛ-2, ФНО- α и ИФН- γ значительно повышаются после культивирования CAR T-клеток с CD19-HeLa, что свидетельствует о специфической активации и проявлении цитотоксической функции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из ключевых аспектов получения CAR T-клеток является эффективная трансдукция. При этом основная сложность заключается в том, что первичные клеточные линии, к которым относятся T-лимфоциты донора, считаются сложно трансдуцируемыми. Решением проблемы может стать трансдукция T-лимфоцитов лентивирусными препаратами с высокими титрами. Однако дополнительные трудности привносит тот факт, что векторы, кодирующие CAR и служебные последовательности, как правило, являются крупноразмерными генетическими конструкциями (> 10 000 пар нуклеотидов), что значительно снижает титр вируса. Из вышесказанного следует, что для эффективного «заражения» T-клеток необходимо получение больших объемов лентивирусного супернатанта и последующее концентрирование до оптимальных пределов.

В настоящей работе проведено сравнение 4 различных методов концентрирования лентивирусных частиц с целью определить наиболее эффективный, быстрый и простой в использовании способ. По результатам титрования на клеточной линии HeLa наибольшей эффективностью обладал вирус, сконцентрированный ультрафильтрацией на центрифужных

модулях Amicon, а число трансдуцированных клеток в этом случае достигало 84,7 %. При этом довольно высокие уровни трансдукции наблюдались и у вирусов, сконцентрированных методом ультрацентрифугирования и осаждением ПЭГ, — 56,1 и 74,2 % соответственно. Наименьшая эффективность трансдукции была у вируса, сконцентрированного методом ионообменной хроматографии набором Lenti-X™ Maxi Purification Kit, и составила 21,1 %. Мы обнаружили закономерное возрастание ТЕ/мл при концентрировании лентивирусных частиц с помощью ультрафильтрации и других способов. Снижение числа ТЕ при использовании ионообменной хроматографии может быть обусловлено удержанием некоторого числа частиц на сорбенте колонки, что привело к потере функционального титра и низкому проценту трансдукции.

В отношении временных затрат можно отметить, что наиболее быструю очистку обеспечивает ультрафильтрация и очистка на колонках Lenti-X™ Maxi Purification Kit. Среднее время выполнения этих методов составляет 30 мин. Концентрирование с Lenti-X™ Concentrator увеличивает время работы до 1,5 ч, а ультрацентрифугирование требует более 2 ч.

В плане лабораторного оснащения набор Lenti-X™ Maxi Purification Kit является полностью автономным и не требует никакого дополнительного оборудования. Ультрафильтрация и Lenti-X™ Concentrator нуждаются в стандартной центрифуге, обычно имеющейся в каждой лаборатории, которая занимается культивированием клеточных линий. Ультрацентрифугирование, в свою очередь, требует наличия высокоскоростной центрифуги, обеспечивающей ускорение до 72 000 g.

Самым экономичным из перечисленных выше способов является ультрацентрифугирование, за ним следует ультрафильтрация на модулях Amicon, далее идут Lenti-X™ Concentrator и Lenti-X™ Maxi Purification Kit соответственно. Важно отметить, что при концентрировании больших объемов лентивирусного супернатанта (> 200 мл) удобно пользоваться ультрафильтрацией, т. к. теоретически в 1 центрифужном модуле можно сконцентрировать неограниченное

количество супернатанта. Таким образом, наиболее оптимальным методом для получения концентрированных препаратов вирусных частиц, обладающих высокой способностью инфицирования, является метод ультрафильтрации на модулях Amicon.

В свою очередь, заражение донорских Т-лимфоцитов вирусом, очищенным и сконцентрированным ультрафильтрацией препаратом, позволяет успешно получать популяции жизнеспособных и функциональных CAR Т-лимфоцитов с уровнем трансдукции в среднем $59,55 \pm 2,94$ %.

Анализ 3 способов титрования, а именно на клеточной линии, методом ELISA и кассетами Lenti-X GoStix Plus, продемонстрировал, что значения ТЕ/мл экспресс-тестов хорошо коррелируют ($r = 0,91$) с данными после титрования линии HeLa при условии наличия референсного вируса с известным титром и полученным при тех же условиях. Кроме того, преимуществом коммерческих кассет является быстрота проводимого анализа, составляющая не более 10 мин. Сравнивая разные методы, следует обратить внимание на важность комплексного подхода к оценке лентивирусного титра. Титрование на клеточной линии дает информацию об эффективности трансдукции вируса, тогда как с помощью ELISA возможно лишь определение физического содержания вирусных частиц в супернатанте по уровню р24. Именно поэтому для получения исчерпывающей информации о функциональности так важно комбинировать различные методы оценки его параметров, начиная от структуры капсида и заканчивая копийностью в геноме клетки-мишени.

Этап концентрирования и очистки лентивирусного препарата является важнейшим в создании функционального рекомбинантного вектора для редактирования генома Т-клетки с точки зрения клинических перспектив применения создаваемых CAR Т-клеток и прохождения всех стадий соответствия продукта стандарту GMP. Именно понимание перспектив терапевтического применения получаемых CAR Т-лимфоцитов должно лежать в основе ответственности исследователя при создании качественного CAR Т-клеточного продукта. Таким образом, определение остаточных белковых примесей и отсутствие других компонентов процессов продукции, концентрирования и очистки должны строго оцениваться на всех этапах биотехнологического процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 2017 г. FDA одобрило первый в истории CAR Т-клеток анти-CD19 препарат тисагенлеклейсел компании «Новартис», что значительно упрочило положение лентивирусных векторов среди альтернативных способов доставки трансгена в контексте CAR Т-клеточной терапии. Ввиду этого факта и благодаря другим свойствам, выгодно отличающим лентивирусный способ доставки (стабильная экспрессия трансгена, заражение покоящихся клеток, сниженная генотоксичность по сравнению с γ -ретровирусами), он был выбран нами для генетической модификации Т-лимфоцитов.

Концентрирование вирусных частиц является важным этапом процесса получения CAR Т-клеток. Мы выбрали метод ультрафильтрации как наиболее эффективный и быстрый способ получения лентивируса с наибольшим функциональным титром, на основе которого можно стабильно получать высокий уровень CAR Т-клеточной популяции.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-51035 и гранта РНФ № 19-75-10059. Данное исследование проводится в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: А.В. Петухов.

Сбор и обработка данных: К.А. Левчук, Е.К. Зайкова.

Предоставление материалов исследования: Е.К. Зайкова, К.А. Левчук, Д.Ю. Поздняков, А.А. Дакс.

Анализ и интерпретация данных: Е.К. Зайкова, К.А. Левчук.

Подготовка рукописи: К.А. Левчук, Е.К. Зайкова.

Окончательное одобрение рукописи: А.В. Петухов, А.Ю. Зарицкий.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Blaese R, Culver K, Miller A, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*. 1995;270(5235):475–80. doi: 10.1126/science.270.5235.475.
2. Kochenderfer J, Feldman S, Zhao Y, et al. Construction and Preclinical Evaluation of an Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor. *J Immunother*. 2009;32(7):689–702. doi: 10.1097/cji.0b013e3181ac6138.
3. Brentjens R, Latouche J, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*. 2003;9(3):279–86. doi: 10.1038/nm827.
4. Pule M, Savoldo B, Myers G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*. 2008;14(11):1264–70. doi: 10.1038/nm1882.
5. Kochenderfer J, Dudley M, Feldman S, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor–transduced T cells. *Blood*. 2012;119(12):2709–20. doi: 10.1182/blood-2011-10-384388.
6. Brentjens R, Davila M, Riviere I, et al. CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med*. 2013;5(177):177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930.
7. Lewinski M, Bushman F. Retroviral DNA Integration—Mechanism and Consequences. *Adv Genet*. 2005;55:147–81. doi: 10.1016/s0065-2660(05)55005-3.
8. Kochenderfer J, Dudley M, Carpenter R, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;122(25):4129–39. doi: 10.1182/blood-2013-08-519413.
9. Cruz C, Micklethwaite K, Savoldo B, et al. Infusion of donor-derived CD19-directed virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic

stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood*. 2013;122(17):2965–73. doi: 10.1182/blood-2013-06-506741.

10. Grupp S, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(16):1509–18. doi: 10.1056/nejmoa1215134.

11. Kalos M, Levine B, Porter D, et al. T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med*. 2011;3(95):95ra73. doi: 10.1126/scitranslmed.3002842.

12. Qin D, Huang Y, Li D, et al. Paralleled comparison of vectors for the generation of CAR-T cells. *Anticancer Drugs*. 2016;27(8):711–22. doi: 10.1097/cad.0000000000000387.

13. Gogol-Doring A, Ammar I, Gupta S, et al. Genome-wide Profiling Reveals Remarkable Parallels Between Insertion Site Selection Properties of the MLV Retrovirus and the piggyBac Transposon in Primary Human CD4+ T Cells. *Mol Ther*. 2016;24(3):592–606. doi: 10.1038/mt.2016.11.

14. Izsvak Z, Hackett P, Cooper L, Ivics Z. Translating Sleeping Beauty transposition into cellular therapies: Victories and challenges. *BioEssays*. 2011;33(6):478–9. doi: 10.1002/bies.201190025.

15. Manuri P, Wilson M, Maiti S, et al. piggyBac Transposon/Transposase System to Generate CD19-Specific T Cells for the Treatment of B-Lineage Malignancies. *Hum Gene Ther*. 2010;21(4):427–37. doi: 10.1089/hum.2009.114.

16. Nakazawa Y, Huye L, Salsman V, et al. PiggyBac-mediated Cancer Immunotherapy Using EBV-specific Cytotoxic T-cells Expressing HER2-specific Chimeric Antigen Receptor. *Mol Ther*. 2011;19(12):2133–43. doi: 10.1038/mt.2011.131.

17. Barrett D, Zhao Y, Liu X, et al. Treatment of Advanced Leukemia in Mice with mRNA Engineered T Cells. *Hum Gene Ther*. 2011;22(12):1575–86. doi: 10.1089/hum.2011.070.

18. Dai X, Park J, Du Y, et al. One-step generation of modular CAR-T cells with AAV–Cpfl. *Nat Meth*. 2019;16(3):247–54. doi: 10.1038/s41592-019-0329-7.

19. Mann R, Mulligan R, Baltimore D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*. 1983;33(1):153–9. doi: 10.1016/0092-8674(83)90344-6.

20. Le Doux J, Davis H, Morgan J, Yarmush M. Kinetics of retrovirus production and decay. *Biotechnol Bioeng*. 1999;63(6):654–62. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(19990620)63:6<654::aid-bit3>3.0.co;2-1.

21. Andreadis S, Brott D, Fuller A, Palsson B. Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J Virol*. 1997;71(10):7541–8. doi: 10.1128/jvi.71.10.7541-7548.1997.

22. Naldini L, Blomer U, Galloway P, et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*. 1996;272(5259):263–7. doi: 10.1126/science.272.5259.263.

23. Sakuma T, Barry M, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*. 2012;443(3):603–18. doi: 10.1042/bj20120146.

24. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J Virol*. 1998;72(11):8463–71. doi: 10.1128/jvi.72.11.8463-8471.1998.

25. Vannucci L, Lai M, Chiappesi F, et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*. 2013;36(1):1–22.

26. Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, et al. Insertional Transformation of Hematopoietic Cells by Self-inactivating Lentiviral and Gammaretroviral Vectors. *Mol Ther*. 2009;17(11):1919–28. doi: 10.1038/mt.2009.179.

27. Sastry L, Xu Y, Duffy L, et al. Product-Enhanced Reverse Transcriptase Assay for Replication-Competent Retrovirus and Lentivirus Detection. *Hum Gene Ther*. 2005;16(10):1227–36. doi: 10.1089/hum.2005.16.1227.

28. Cornetta K, Yao J, Jasti A, et al. Replication-competent Lentivirus Analysis of Clinical Grade Vector Products. *Mol Ther*. 2011;19(3):557–66. doi: 10.1038/mt.2010.278.

29. Sena-Esteves M, Gao G. Titration of Lentivirus Vectors. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(4):pdb.prot095695. doi: 10.1101/pdb.prot095695.

30. Kutner R, Zhang X, Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc*. 2009;4(4):495–505. doi: 10.1038/nprot.2009.22.

31. Merten O, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. *Mol Ther Meth Clin Dev*. 2016;3:16017. doi: 10.1038/mtm.2016.17.

32. Sena-Esteves M, Tebbets J, Steffens S, et al. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Meth*. 2004;122(2):131–9. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.017.

33. Boudeffa D, Fenard D, Mormin M, et al. Development of Innovative Scalable Protocols for the Purification of Lentiviral Vectors Pseudotyped With GaLV-TR or Mutated Measles Virus Glycoproteins. *Mol Ther*. 2015;23:S214–S215. doi: 10.1016/s1525-0016(16)34143-0.

34. Baekelandt V, Eggermont K, Michiels M, et al. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther*. 2003;10(23):1933–40. doi: 10.1038/sj.gt.3302094.

35. Sanber K, Knight S, Stephen S, et al. Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production. *Sci Rep*. 2015;5(1):9021. doi: 10.1038/srep09021.

36. Зайцев Д.В., Зайкова Е.К., Головкин А.С. и др. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и технология CAR-T при солидных опухолях в эксперименте. *Клиническая онкогематология*. 2020;13(2):115–22. doi: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-115-122.

[Zaytsev DV, Zaikova EK, Golovkin AS, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and CAR-T Technology for Solid Tumors in Experiment. *Clinical oncohematology*. 2020;13(2):115–22. doi: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-115-122. (In Russ)]

37. Петухов, А.В., Маркова, В.А., Моторин, Д.В. и др. Получение CAR T-лимфоцитов, специфичных к CD19, и оценка их функциональной активности in vitro. *Клиническая онкогематология*. 2018;11(1):1–9. doi: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-9.

[Petukhov AV, Markova VA, Motorin DV, et al. Manufacturing of CD19 Specific CAR T-Cells and Evaluation of their Functional Activity in Vitro. *Clinical oncohematology*. 2018;11(1):1–9. doi: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-9. (In Russ)]