

УДК 577.21

Метод получения рекомбинантных VSV с подтверждением биологической активности

В. Д. Мороз^{1#*}, Н. Б. Гасанов^{1#*}, А. Д. Егоров¹, А. С. Малоголовкин^{1,2}, М. О. Нагорных¹,
Е. Н. Субчева¹, Е. С. Колосова¹, А. Ю. Физикова¹, Р. А. Иванов¹, А. В. Карабельский¹

¹Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, пгт Сириус, 354340 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Сеченовский университет, Москва, 119435 Россия

Авторы внесли равный вклад в работу.

*E-mail: moroz.vd@talantiuspeh.ru; gasanov.nb@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 01.11.2023

Принята к печати 30.01.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27314

РЕФЕРАТ Создание новых эффективных средств лечения опухолей является перспективным и актуальным направлением трансляционной медицины. Онколитические вирусы способны индуцировать иммуногенную клеточную смерть, активируя иммунную систему организма для распознавания злокачественной опухоли. В данной работе представлены результаты оптимизации метода получения рекомбинантных вирусов везикулярного стоматита. Для сборки вирусных частиц получена клеточная линия НЕК293ТН-Т7, стабильно экспрессирующая ДНК-зависимую РНК-полимеразу Т7 для экспрессии вирусного генома, а также получены хелперные плазмиды, кодирующие вирусные гены под контролем СAG-промоторов. Онколитическую активность очищенного препарата модельного вируса определяли на клетках меланомы мыши В16F10Red, экспрессирующих красный флуоресцентный белок. Предложенный метод позволяет получать очищенный вирусный препарат с высоким титром и с онколитической активностью; благодаря амплификации вирусных частиц в суспензионной культуре клеток НЕК293, легко масштабируется и может в дальнейшем использоваться для получения других рекомбинантных онколитических вирусов на основе вируса везикулярного стоматита для иммунотерапии злокачественных опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА VSV, онколитические вирусы, онкологические заболевания, меланома, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ VSV – вирус везикулярного стоматита; rVSV – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита; GFP – зеленый флуоресцентный белок; ЦПД – цитопатическое действие; MOI (англ. multiplicity of infection) – множественность заражения; ЦФ – центрифугирование; УЦФ – ультрацентрифугирование; TCID₅₀/мл – тканевая инфицирующая доза вируса; RFP – красный флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Онколитические вирусы уже долгое время рассматриваются как возможные противоопухолевые средства. В настоящее время разработка новых онколитических вирусов является одним из приоритетных направлений иммунотерапии опухолей. По последним данным ведется более 200 клинических исследований безопасности и эффективности препаратов на основе онколитических вирусов [1, 2]. РНК-содержащий вирус везикулярного стоматита (VSV) эффективно инфицирует разные типы клеток животных и человека, не будучи патогенным для человека. Низкая вирулентность, быстрый

цикл репликации в цитоплазме (без интеграции в геном), возможность получения высокого титра при наработке VSV в культурах клеток млекопитающих (ВНК-21, НЕК293), возможность генетической модификации и отсутствие в человеческой популяции нейтрализующих антител сделали VSV идеальным кандидатом для получения вирусных вакцин, векторов доставки трансгена и онколитических вирусов [3–5]. Сборка rVSV, например rVSV-dG-GFP, включает этап трансфекции клеток ВНК-21 пятью плазмидами и коинфекцию клеток вирусом осповакцины (VV) или иным вирусом, экспрессирующим ДНК-зависимую РНК-полимеразу

T7 (T7-РНК-полимераза) [6]. При этом при получении биотехнологических продуктов, которые предполагается использовать в качестве лекарственных препаратов, необходимо минимизировать число вспомогательных вирусов, в частности репликативно-активных, поскольку они могут быть источниками вирусной контаминации. Кроме того, готовая лекарственная форма не должна содержать остатков VV или иных вирусов [7]. В современной литературе крайне мало источников с полным и подробным описанием всех этапов получения, очистки, концентрирования и проверки функциональной активности онколитических вирусов на основе VSV для дальнейшего проведения научных исследований. В настоящей работе разработан метод получения очищенного препарата репликативно-активного модельного rVSV, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (rVSV-dM51-GFP), без использования вспомогательного вируса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды и генетическая инженерия

Для клонирования использовали коммерческие плазмиды: pBS-N-ФТ-Kan (cat# EH1013, Kerafast, США), pBS-P-ФТ-Amp (cat# EH1014, Kerafast), pBS-L-ФТ-Amp (cat# EH1015, Kerafast), pBS-G-ОТ-Kan (cat# EH1016, Kerafast), pCAGGS-G-Kan (cat# EH1017, Kerafast), pVSV-dG-GFP 2.6 (cat# EH1026, Kerafast), а также плазмиду: pCAG-T7pol (cat# 59926, Addgene). Для амплификации плазмид использовали штаммы *Escherichia coli* (DH5-alpha, NEB® Stable (cat# C3040H, NEB, Англия)). Генетическую трансформацию, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование, гель-электрофорез и выделение ДНК проводили согласно стандартным протоколам и рекомендациям производителей ферментов [8]. Для выделения ДНК использовали коммерческие наборы (кат. # BC021L, кат. # BC124, ЗАО «Евроген» (Россия)). Направленный мутагенез гена *VSVM*, кодирующего белок *VSVM*, проводили с использованием инвертированной ПЦР на матрице pVSV-dG-GFP 2.6 (cat# EH1026, Kerafast) и специфичными праймерами: прямой GACACCTATGATCCGAATCAATTAAGAT-ATGAGA; обратный CTCGTCAACTCCAAAATAGGATTTGTC-AATTGGA.

В полученную после мутагенеза плазмиду pVSV-dG-dM51-GFP по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *NheI/XbaI* клонировали ген *VSVG* из плазмиды pCAGGS-G-Kan и получали плазмиду pVSV-dM51-GFP, необходимую для сборки ре-

пликативно-активного rVSV-dM51-GFP. Для получения хелперных плазмид с CAG-промотором (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVP) в плазмиду pCAG-T7pol по *XbaI/NotI*-сайтам рестрикции клонировали последовательности гена *L*, гены *N* и *P* клонировали по *EcoRI/NotI*-сайтам. Амплификацию генов проводили с использованием специфичных праймеров, а в качестве матрицы для амплификации генов *VSVN*, *VSVP* и *VSVL* использовали плазмиды pBS-N-ФТ-Kan, pBS-P-ФТ-Amp, pBS-L-ФТ-Amp соответственно. Правильность сборки векторов проверяли секвенированием по Сэнгеру на ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) при стандартных условиях и с использованием реагентов, рекомендованных производителем.

Получение клеточных линий HEK293TN-T7 и ВНК-21-T7

Ген T7-RNApol, кодирующий T7-РНК-полимеразу, клонировали в ретровирусный вектор pBabe-bleo (Plasmid #176) по *BamHI/SalI*-сайтам рестрикции, корректность сборки вектора pBabe-bleo подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Для получения ретровируса полученной плазмидой трансфицировали клетки Phoenix-AMPHO (CRL-3213 – ATCC) с использованием Lipofectamine® 3000 (cat# L3000015, Thermo Fisher Scientific) согласно рекомендациям производителя. Клетки HEK293TN и ВНК-21 заражали культуральной жидкостью с полученным ретровирусом (3 раза каждые 12 ч). Селекцию проводили в течение недели на зеоцине 100 мкг/мл (cat# R25005, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Выжившие клетки пересевали, через 2 недели после начала селекции проводили скрининг отдельных колоний по наличию встройки гена T7-RNApol в геноме клеток с использованием ПЦР и специфичных праймеров. Для дальнейшей работы отбирали по одному клону клеток HEK293TN-T7 и ВНК-21-T7, активность T7-РНК-полимеразы в которых подтверждали, определяя уровень люминесценции с использованием набора Luciferase Assay System (Promega, США). Для этого проводили трансфекцию клеток следующими векторами экспрессии: плазмидами pEGFPN3 (cat# 632515, Clontech), плазмидой pSmart_5'-Mod-FFLuc-3'-Mod [9], плазмидами pCAG-T7pol и pSmart_5'-Mod-FFLuc-3'-Mod (положительный контроль).

Получение и амплификация rVSV-dM51-GFP

Для сборки rVSV-dM51-GFP клетки HEK293TN-T7 в лунках 12-луночного планшета при достижении 80–85% конфлюентности трансфицировали плазмидами pCAG-VSVN, pCAG-VSVP, pCAG-VSVL,

pCAGGS-G и pVSV-dM51-GFP в соотношении 3:5:1:4:8, соответственно, с использованием PEI (соотношение 5:1) и суммарным количеством ДНК (10.5 мкг). Культуральную жидкость, полученную через 72 ч после трансфекции, использовали для последующей амплификации вируса в адгезионных клетках ВНК-21 (cat# 85011433, ECACC General Collection) и в суспензионных клетках НЕК293, растущих на бессывороточной среде (BalanCD НЕК293, Irvine Scientific). Добавляли вирусосодержащие супернатанты ($MOI = 10^{-4}$), полученные после ЦФ (3000 *g*) культуральной жидкости, полученной на предыдущих этапах наработки препарата rVSV-dM51-GFP, и инкубировали клетки в течение 72 ч. Отбирали культуральную жидкость на всех этапах наработки вируса, ЦФ (3000 *g*) и хранили при -80°C , или использовали сразу для повторной трансдукции или выделения, очистки, исследования вируса и пр. После амплификации вирусов в клетках НЕК293 вирусосодержащие супернатанты фильтровали через 0.45-мкм фильтры и концентрировали (300 кДа, Vivaspin 6, VS0651, Sartorius) в 100–200 раз с переводом в стандартный фосфатно-солевой буфер (PBS) с рН 7.4 для хранения, очистки или анализа.

Очистка rVSV-dM51-GFP методом ультрацентрифугирования

Для очистки и концентрирования препарата rVSV-dM51-GFP методом УЦФ на первом этапе проводили первичную очистку, осаждение вирусных частиц через «сахарозную подушку», представляющую собой раствор 20% сахарозы в буфере HEN (10 mM HEPES рН 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). В пробирки для УЦФ (cat# 344061, Beckman Coulter) перенесли супернатант с вирусом и вносили под слой супернатанта 4 мл раствора 20% сахарозы. Проводили УЦФ при 120 000 *g* в течение 1 ч при 4°C , удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера ET (1 mM Tris-HCl, рН 7.5, 1 mM EDTA, 10% ДМСО) и инкубировали в течение 2 ч при 4°C . Далее проводили 2 этап УЦФ в ступенчатом градиенте плотности сахарозы в буфере HEN с тремя различными плотностями (25, 45, 60%), ЦФ при 130 000 *g* и 4°C в течение 16 ч. Отбирали полосу на границе 25 и 45% растворов. На 3 этапе полученный образец разводили в стандартном PBS (рН 7.4) в 12 раз, ЦФ при 120 000 *g* и 4°C в течение 1 ч. Осадок, содержащий очищенную фракцию препарата, растворяли в необходимом объеме PBS (рН 7.4).

Анализ образцов препарата rVSV-dM51-GFP методом электронной микроскопии

Использовали сканирующей электронной микроскоп Crossbeam 550 (Carl Zeiss, Германия) в режиме

просвечивающей электронной микроскопии (STEM). Образец наносили на предварительно обработанные плазмой воздуха в течение 10 с медные сетки (formvar/carbon (200 mesh), cat#BZ31022a, EMCN, Китай) с помощью установки плазменной очистки Zepto (Diener Electronic), инкубировали в течение 2 мин, далее сетку промывали бидистиллированной водой и контрастировали 1% водным раствором уранилацетата (cat#0379, Polysciences Inc.) 1 мин. Полученные сетки с образцом высушивали на воздухе при комнатной температуре. Съемку проводили при ускоряющем напряжении 30 кВ.

Анализ образцов препарата rVSV-dM51-GFP

Анализ белкового состава образцов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с использованием додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) по стандартному протоколу [10]. Расчет титра ($TCID_{50}/\text{мл}$) препарата rVSV-dM51-GFP осуществляли по методу Рида–Менча [11].

Получение клеточной линии B16F10red

Клеточную линию B16F10Red получали на основе культуры клеток меланомы мыши B16F10 из коллекции опухолевых штаммов ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» (3-й пассаж), полученную из мыши линии C57BL/6. Клетки B16F10 трансдуцировали вирусными частицами, которые содержатся в культуральной среде НЕК293TN, трансфицированных плазмидами pMD2.G (cat# 12259, Addgene), pMDLg/pRRE (cat# 12251, Addgene) pRSV-REV (cat# 12253, Addgene) и плазмидой, кодирующей слитый белок Н2В-Katushka2 под промотором EF1a. Выжившие в селективной среде клетки пересеивали в культуральный флакон площадью 25 cm^2 и отбирали колонии, имеющие наиболее яркую флуоресценцию репортера Н2В-Katushka2. Интенсивность флуоресценции в полученной сублинии B16F10Red детектировали с помощью микроскопа с флуоресцентным модулем (Carl Zeiss Axio Vert.A1).

Мониторинг количества B16F10Red-клеток с помощью IncuCyte S3

Для изучения динамики изменения количества флуоресцирующих клеток B16F10Red после заражения вирусными частицами с разными разведениями препарата rVSV-dM51-GFP клетки инкубировали в течение 84 ч согласно рекомендациям производителя с использованием системы прижизненного клеточного анализа IncuCyte S3, измеряющего количества флуоресцирующих клеток каждые 2 ч.

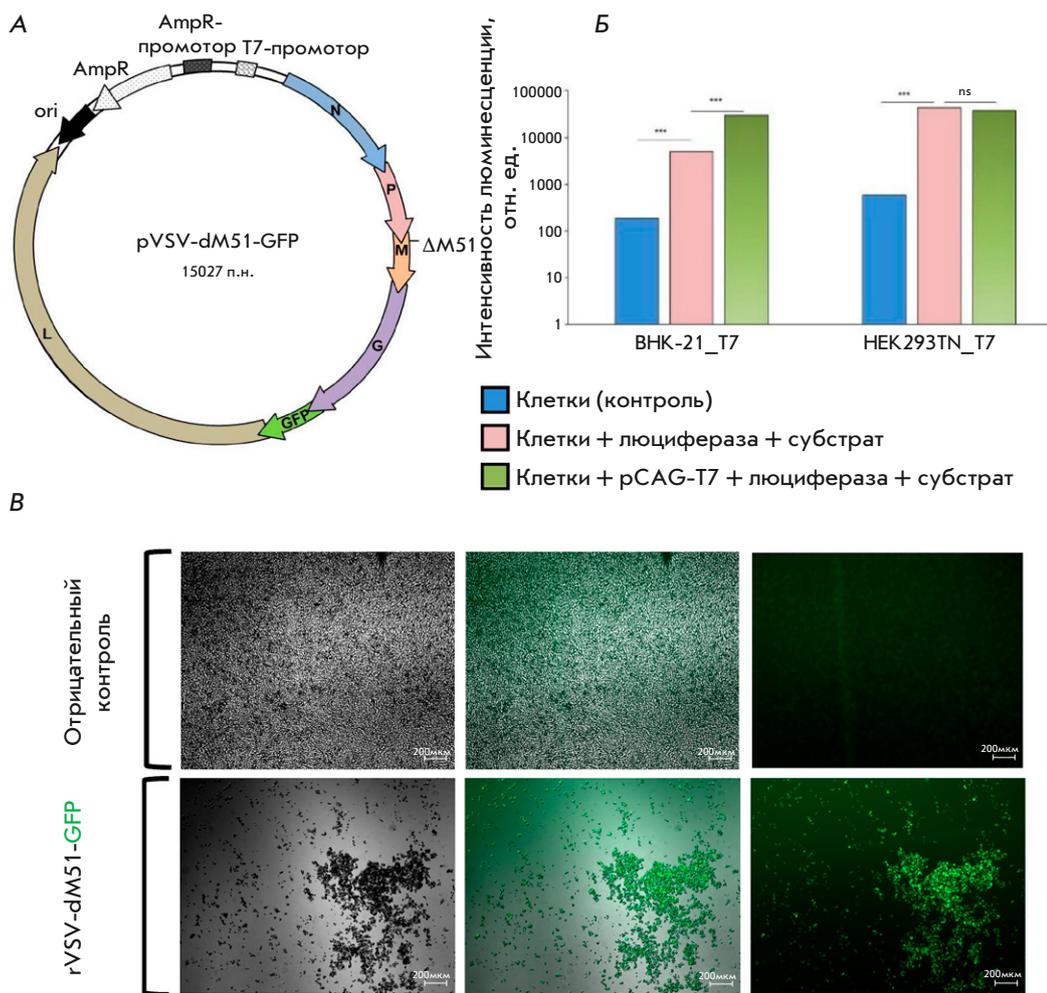


Рис. 1. Сборка вирусных частиц rVSV-dM51-GFP. **А** – карта плазмиды с геном вируса для сборки rVSV-dM51-GFP. Отмечены мутация dM51 и гены, кодирующие белки rVSV-dM51-GFP, включая встроенный ген VSVG; **Б** – уровень люминесценции в клетках HEK293TN-T7 и БНК-21-T7; **В** – микрофотографии клеток HEK293TN-T7 через 72 ч после трансфекции (верхняя строка – отрицательный контроль трансфекции со всеми плазмидами для сборки rVSV-dM51-GFP без коровой плазмиды, кодирующей геном вируса (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN и pCAG-VSVP), нижняя строка – трансфекция со всеми плазмидами (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVP и pVSV-dM51-GFP), необходимыми для сборки rVSV-dM51-GFP

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Классический метод сборки rVSV включает трансфекцию клеток БНК-21 пятью плазмидами, экспрессирующими отдельные гены и полный геном VSV, и коинфекцию клеток вирусом осповакцины или иным вирусом, экспрессирующим Т7-РНК-полимеразу, необходимую для сборки rVSV [6]. Использование отдельных вирусов, экспрессирующих Т7-РНК-полимеразу для сборки rVSV, имеет ряд недостатков, которые были упомянуты выше. Котрансфекция клеток плазмидами для сборки rVSV и плазмидой, кодирующей ген Т7-РНК-полимеразы, позволяет обойтись без нежелательного использования хелперного вируса на этапе сборки rVSV. Использование дополнительной плазмиды в трансфекции увеличивает ДНК-нагрузку на клетки, что может иметь токсический эффект и негативно отразиться на сборке вируса. Поэтому нами были получены клеточные линии HEK293TN-T7 и БНК-21-T7, экспрессирующие Т7-РНК-полимеразу. Для проверки эффективности экс-

прессии полимеразы измеряли интенсивность люминесценции клеток после трансфекции с плазмидой с геном люциферазы светлячка под промотором Т7-РНК-полимеразы. Показано, что уровень экспрессии люциферазы под промотором Т7-РНК-полимеразы в клетках HEK293TN-T7 достигает уровня в положительном контроле (клетки после трансфекции плазмидой с геном Т7-РНК-полимеразы), но при этом превышает уровень в клетках БНК-21-T7 (рис. 1Б). Поэтому в дальнейшей работе для сборки вирусных частиц модельного rVSV использовали клеточную линию HEK293TN-T7. В качестве модельного вируса для отработки оптимизированной методики получения очищенных препаратов rVSV мы использовали rVSV-dM51-GFP с делецией метионина в 51 позиции белка М VSV (dM51). Известно, что rVSV с данной делецией при попадании в здоровые клетки не подавляет экспрессию интерферонов, что делает такую модификацию полезной с точки зрения безопасности терапевтических препаратов на основе rVSV [12].

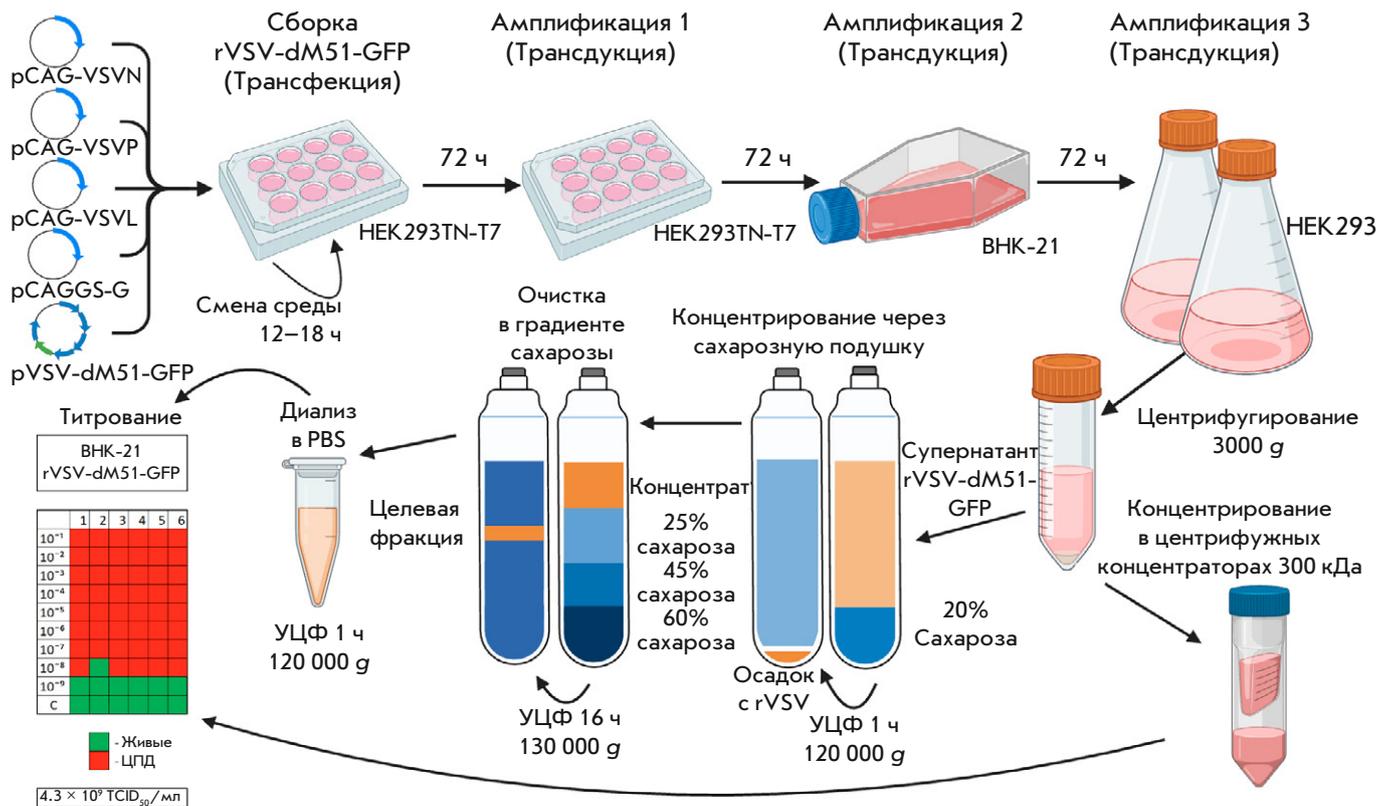


Рис. 2. Схема наработки очищенного препарата rVSV-dM51-GFP в адгезионных и суспензионных культурах клеток

Также геном модельного вируса содержит ген VSVG, кодирующий гликопротеин оболочки, необходимый для проникновения вируса в клетки, что делает его репликативно-активным, а также избавляет от необходимости предварительной трансфекции клеточных культур плазмидой с геном VSVG при наработке вирусных препаратов [6, 13]. Для внесения модификаций в геном модельного вируса мы получили плазмиду pVSV-dM51-GFP с делецией dM51 и геном VSVG (рис. 1А). Эту плазмиду использовали для трансфекции на этапе сборки вируса вместе с хелперными плазмидами (pCAG-VSVL, pCAG-VSVN, pCAG-VSVP). Для повышения эффективности этапа сборки модельного rVSV-dM51-GFP мы также сконструировали хелперные плазмиды с CAG-промотором, ориентируясь на данные об использовании этого промотора для сборки rVSV [14], а также на данные, согласно которым CAG-промотор усиливает синтез белка в клетках HEK293F [15]. Чаще всего rVSV нарабатывают в клетках BHK-21 или Vero [16], однако rVSV-dM51-GFP эффективно собирался только в клетках HEK293TN-T7 (рис. 1В). Однако в клетках BHK-21-T7, а также в BHK-21 и Vero-76, трансфицированных с использованием дополнительной плазмиды pCAG-T7pol, мы не наблюдали ни GFP-сигнала, ни ЦПД.

В эффективном варианте сборки rVSV-dM51-GFP соотношение плазмид для трансфекции клеток HEK293TN-T7 отличалось от опубликованных ранее протоколов [6, 14], когда как при соотношениях плазмид, использованных, например, в статье Витта [6], GFP-сигнал и ЦПД были на уровне отрицательного контроля (данные не приведены, так как совпадали с отрицательным контролем как на рис. 1В). Можно предположить, что соотношения плазмид, оптимальные для сборки вирусных частиц модельного вируса rVSV-dM51-GFP, в разных условиях могут отличаться, поэтому, когда rVSV не собирается, можно изменить соотношение плазмид и выбрать оптимальное в данных условиях. В связи с отсутствием полных протоколов цикла наработки rVSV, в этой работе мы приводим метод, подробно описывающий все этапы наработки очищенного препарата модельного вируса rVSV с этапами определения титра и оценки онколитической активности (рис. 2–4).

Наробка препарата в суспензионной культуре значительно облегчает процесс масштабирования технологического процесса и упрощает процесс масштабирования лабораторной технологии до объемов промышленных биореакторов и, соответственно, процедуру наработки промышленных серий rVSV

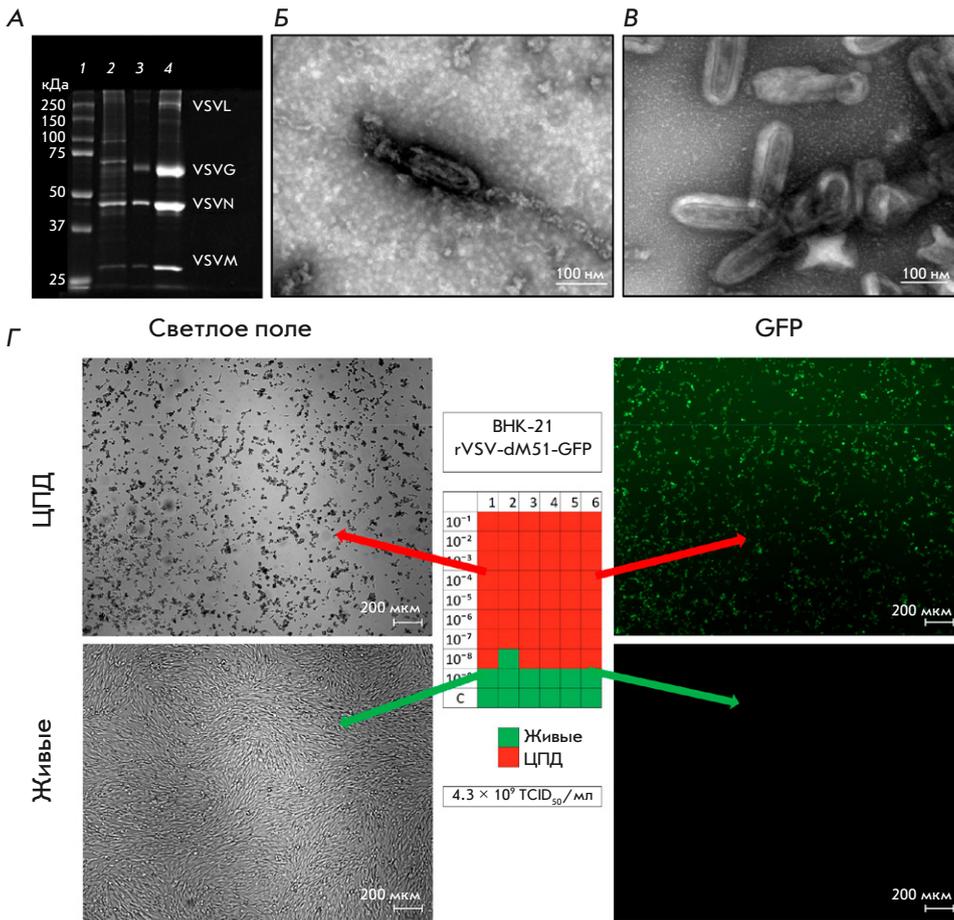


Рис. 3. Анализ препарата rVSV-dM51-GFP. А – электрофорез в ПААГ (слева направо): 1 – маркер молекулярной массы белков (10–250 кДа), 2 – супернатант после ЦФ (3000 g) культуральной жидкости с rVSV-dM51-GFP, 3 – образец фракции с rVSV-dM51-GFP после 2 этапа УЦФ, 4 – образец очищенного препарата rVSV-dM51-GFP после 3 этапа УЦФ; Б – STEM-микротография образца препарата rVSV-dM51-GFP до очистки методом УЦФ, увеличение 130 000; В – STEM-микротография образца препарата rVSV-dM51-GFP после очистки путем УЦФ, увеличение 130 000; Г – расчет TCID₅₀ на клетках BHK-21 с фотографиями клеток при наличии (сверху) и отсутствии (снизу) ЦПД

[17]. Использование на этапе культивирования бесывороточной среды, как в случае суспензионной культуры HEK293, делает необязательной проверку препарата на содержание компонентов животного происхождения [18]. Оптимизация процесса культивирования HEK293, например, использование культуральных подпиток может значительно увеличить титр вируса [17]. Для очистки препарата rVSV-dM51-GFP от примесей, ингибирующих частиц и концентрирования мы проводили трехступенчатую очистку образцов с использованием УЦФ в градиенте плотности сахарозы (рис. 2). Процесс очистки состоял из этапов концентрирования вирусных частиц, очистки в градиенте плотности сахарозы с последующим выделением и диализом целевой фракции вирусов в PBS (pH 7.4). В аналогичных вариантах очистки VSV порядок этапов варьирует, например, этап концентрирования через так называемую «сахарозную подушку» может быть завершающим [19] или отсутствовать [20]. В данной работе мы центрифугировали культуральную жидкость, содержащую rVSV-dM51-GFP, через 20% сахарозу, чтобы не только сконцентрировать образец, но и предварительно очистить его от части

примесей и тем самым увеличить эффективность следующего 2 этапа очистки в градиенте плотности сахарозы. На 2 этапе УЦФ мы использовали следующие концентрации сахарозы: 25%, 45% и 60% [21]. Завершающим этапом очистки был диализ в PBS (pH 7.4) посредством переосаждения с помощью УЦФ (рис. 2). Проведение УЦФ может привести к потере и повреждению вирусных частиц и, соответственно, к снижению титра препарата. Чтобы проверить титр и чистоту препаратов rVSV-dM51-GFP, полученных по предложенной нами схеме (рис. 2), образцы анализировали с помощью ДСН-ПААГ, TCID₅₀ и STEM (рис. 3). Изменение яркости полос, соответствующих пяти белкам rVSV, в ДСН-ПААГ [22, 23] и исчезновение полос неспецифических примесей указывают на повышение концентрации препарата на каждом этапе очистки (рис. 3А).

Анализ образцов препаратов методом STEM также показал, что после УЦФ препарата rVSV-dM51-GFP количество вирусных частиц в поле видимости возрастает, а количество примесей снижается (рис. 3Б,В). Чтобы проверить, насколько вирусные частицы сохраняют при этом жизнеспособность, мы определили титры препа-

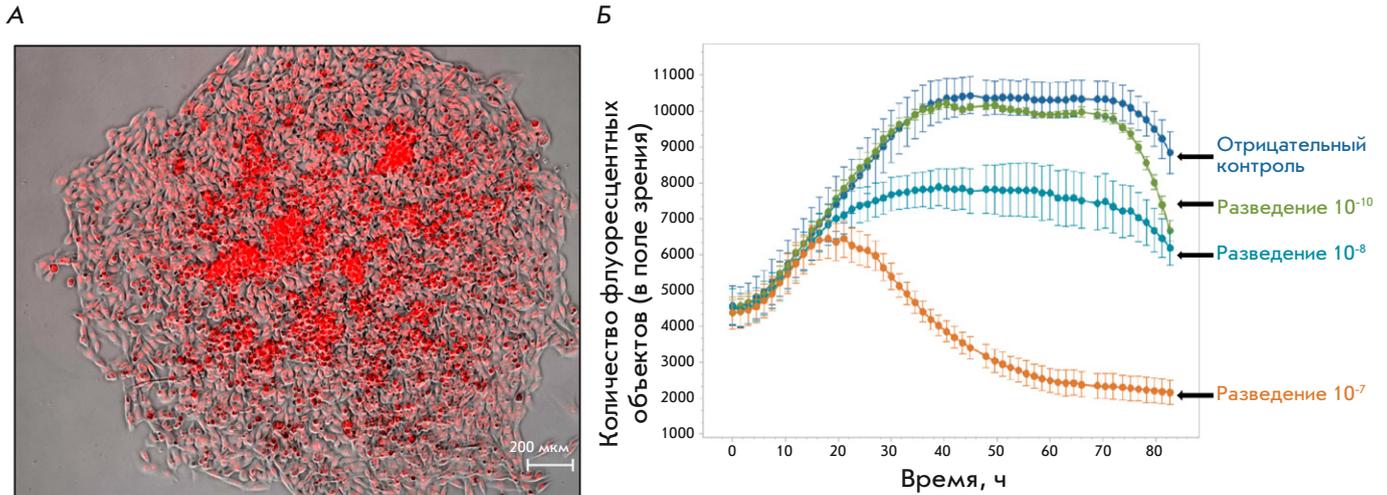


Рис. 4. Зависимость доза–эффект препарата rVSV-dM51-GFP на клетках линии B16F10Red. А – микрофотографии клеток полученной линии B16F10Red; Б – динамика изменения ЦПД на клетках линии B16F10Red после добавления препарата rVSV-dM51-GFP в разных разведениях

ратов rVSV-dM51-GFP до и после УЦФ, используя определение TCID₅₀ как метод, определяющий именно количество инфекционных вирусных частиц, обладающих цитопатическим действием [11]. В подтверждение данным, полученных методами ДСН-ПААГ-электрофореза и STEM, титр rVSV-dM51-GFP в супернатантах до концентрирования (2×10^8 TCID₅₀/мл) был ниже, чем после очистки и концентрирования препарата с помощью УЦФ (4.3×10^9 TCID₅₀/мл) (рис. 3Г). Кроме проведения качественного и количественного анализа нами были также проверены онколитические свойства и зависимость доза–эффект полученного данным методом препарата модельного rVSV на клеточной линии меланомы мыши B16F10 (рис. 4Б), которая часто используется для оценки терапевтических свойств различных препаратов, включая онколитические вирусы, в том числе и для проведения исследований *in vivo* [24–26]. Визуализация живых клеток при помощи флуоресцентных белков позволяет контролировать рост раковых клеток как в *in vitro*, так и в *in vivo*, что в свою очередь дает возможность оценивать терапевтический эффект противоопухолевых препаратов. Для оценки зависимости доза–эффект *in vitro* мы получили клеточную линию B16F10, экспрессирующую RFP (B16F10Red) (рис. 4А), и использовали метод прижизненного мониторинга количества клеток с помощью IncuCyte S3 (рис. 4Б). В вариантах без добавления препарата и в вариантах с добавлением препарата в больших разведениях (10^8 и 10^{10}) наблюдали схожую динамику роста: фаза роста (~0–40 ч), фаза плато (~40–75 ч) и фаза гибели клеток (~75 ч и более). А в варианте с меньшим разведением

препарата (10^7) динамика роста клеток сильно отличалась – примерно через 25 ч после фазы роста начиналась фаза гибели клеток. Строили кривые зависимости количества флуоресцентных объектов от степени разведения добавляемого препарата и наблюдали зависимость доза–эффект количества препарата и количества живых клеток (рис. 4Б). Исходя из этого можно сделать вывод, что после предложенных нами этапов сборки, амплификации и очистки вирусные частицы модельного вируса не теряют жизнеспособность и онколитические свойства, сохраняют способность лизировать раковые клетки при больших разведениях (10^7 – 10^8) препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами разработана масштабируемая методика получения очищенного препарата модельного rVSV-dM51-GFP без использования хелперного вируса, включающая этапы наработки, очистки, проверки титра и онколитической активности вируса. Полученный с помощью предложенной нами методики препарат модельного вируса может быть использован для оценки его терапевтических свойств в сингенных *in vivo* моделях мышей с B16F10-клетками, в том числе, в сравнении с армированными вариантами rVSV, обладающими иммуностимулирующими свойствами [12, 26, 27]. ●

Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект GTH-RND-2113).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pearl T., Markert J., Cassady K., Ghonime M. // *Mol. Ther. Oncolytics*. 2019. V. 13. P. 14–21.
2. Malogolovkin A., Gasanov N., Egorov A., Weener M., Ivanov R., Karabelsky A. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 7. P. 1271.
3. Geisbert T., Feldmann H. // *J. Infectious Dis.* 2011. V. 204. № suppl_3. P. 1075–1081.
4. Zemp F., Rajwani J., Mahoney D. // *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* 2018. V. 34. № 1. P. 122–138.
5. Velazquez-Salinas L., Naik S., Pauszek S., Peng K., Russell S., Rodriguez L. // *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2017. V. 28. № 2. P. 108–115.
6. Whitt M. // *J. Virol. Methods*. 2010. V. 169. № 2. P. 365–374.
7. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (в ред. решений Совета Евразийской экономической комиссии от 15.07.2022 № 110, от 04.07.2023 № 77).
8. Green M., Sambrook J. *Mol. Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition. New York, 2012. V. 2.
9. Kirshina A., Vasileva O., Kunyk D., Seregina K., Muslimov A., Ivanov R., Reshetnikov V. // *Biomolecules*. 2023. V. 13. № 11. P. 1677. doi: 10.3390/biom13111677.
10. Laemmli U. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
11. Lei C., Yang J., Hu J., Sun X. // *Virologica Sinica*. 2021. V. 36. № 1. P. 141–144.
12. Felt S., Grdzlishvili V. // *J. Gen. Virol.* 2017. V. 98. № 12. P. 2895–2911.
13. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Barak S., Rubinstein M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 18. P. 7306–7311.
14. Takahashi K., Yokobayashi Y. // *ACS Synth. Biol.* 2019. V. 8. № 9. P. 1976–1982.
15. Dou Y., Lin Y., Wang T., Wang X., Jia Y., Zhao C. // *FEBS Open Bio*. 2021. V. 11. № 1. P. 95–104.
16. Abdelmageed A., Ferran M. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2020. V. 58. № 1. e110.
17. Elahi S., Shen C., Gilbert R. // *J. Biotechnol.* 2019. V. 289. P. 144–149.
18. Van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W., Fu J., Hickman J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M. // *ALTEX*. 2018. V. 35. № 1. P. 99–118.
19. Kim I., Jenni S., Stanifer M., Roth E., Whelan S., van Oijen A., Harrison S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 28–36.
20. Sakata M., Tani H., Anraku M., Kataoka M., Nagata N., Seki F., Tahara M., Otsuki N., Okamoto K., Takeda M. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11607.
21. Moerdyk-Schauwecker M., Hwang S., Grdzlishvili V. // *Virol. J.* 2009. V. 6. P. 166.
22. Thomas D., Newcomb W., Brown J., Wall J., Hainfeld J., Trus B., Steven A. // *J. Virol.* 1985. V. 54. № 2. P. 598–607.
23. Buonocore L., Blight K., Rice C., Rose J. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 6865–6872.
24. Durham N., Mulgrew K., McGlinchey K., Monks N., Ji H., Herbst R., Suzich J., Hammond S., Kelly E. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 8. P. 1917–1932.
25. Abdulal R., Malki J., Ghazal E., Alsaieedi A., Almahboub S., Khan M., Alsulaiman R., Ghaith M., Abujamel T., Ganash M. // *Front. Mol. Biosci.* 2023. V. 10. P. 1190669.
26. Isaeva A.S., Porozova N.O., Idota E., Volodina S.I., Lukashchev A.N., Malogolovkin A.S. // *Sechenov Med. J.* 2023. V. 14. № 4. P. 17–30.
27. Cristi F., Gutiérrez T., Hitt M., Shmulevitz M. // *Front. Mol. Biosci.* 2022. V. 9. P. 831091.