

УДК 577.21

# Метод получения рекомбинантных VSV с подтверждением биологической активности

В. Д. Мороз<sup>1#\*</sup>, Н. Б. Гасанов<sup>1#\*</sup>, А. Д. Егоров<sup>1</sup>, А. С. Малоголовкин<sup>1,2</sup>, М. О. Нагорных<sup>1</sup>, Е. Н. Субчева<sup>1</sup>, Е. С. Колосова<sup>1</sup>, А. Ю. Физикова<sup>1</sup>, Р. А. Иванов<sup>1</sup>, А. В. Карабельский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, пгт Сириус, 354340 Россия

<sup>2</sup>Первый 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-T7, стабильно экспрессирующая ДНК-зависимую РНК-полимеразу T7 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 B16F10Red, 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; TCID<sub>50</sub>/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 *VSVN*, кодирующего белок *VSVN*, 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% конfluenceности 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  $-80^{\circ}\text{C}$ , 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 pH 7.4, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). В пробирки для УЦФ (cat# 344061, Beckman Coulter) переносили супернатант с вирусом и вносили под слой супернатанта 4 мл раствора 20% сахарозы. Проводили УЦФ при 120 000 g в течение 1 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ , удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера ET (1 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 10% ДМСО) и инкубировали в течение 2 ч при  $4^{\circ}\text{C}$ . 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  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 16 ч. Отбирали полосу на границе 25 и 45% растворов. На 3 этапе полученный образец разводили в стандартном PBS (pH 7.4) в 12 раз, ЦФ при 120 000 g и  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч. Осадок, содержащий очищенную фракцию препарата, растворяли в необходимом объеме PBS (pH 7.4).

#### Анализ образцов препарата rVSV-dM51-GFP методом электронной микроскопии

Использовали сканирующий электронный 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

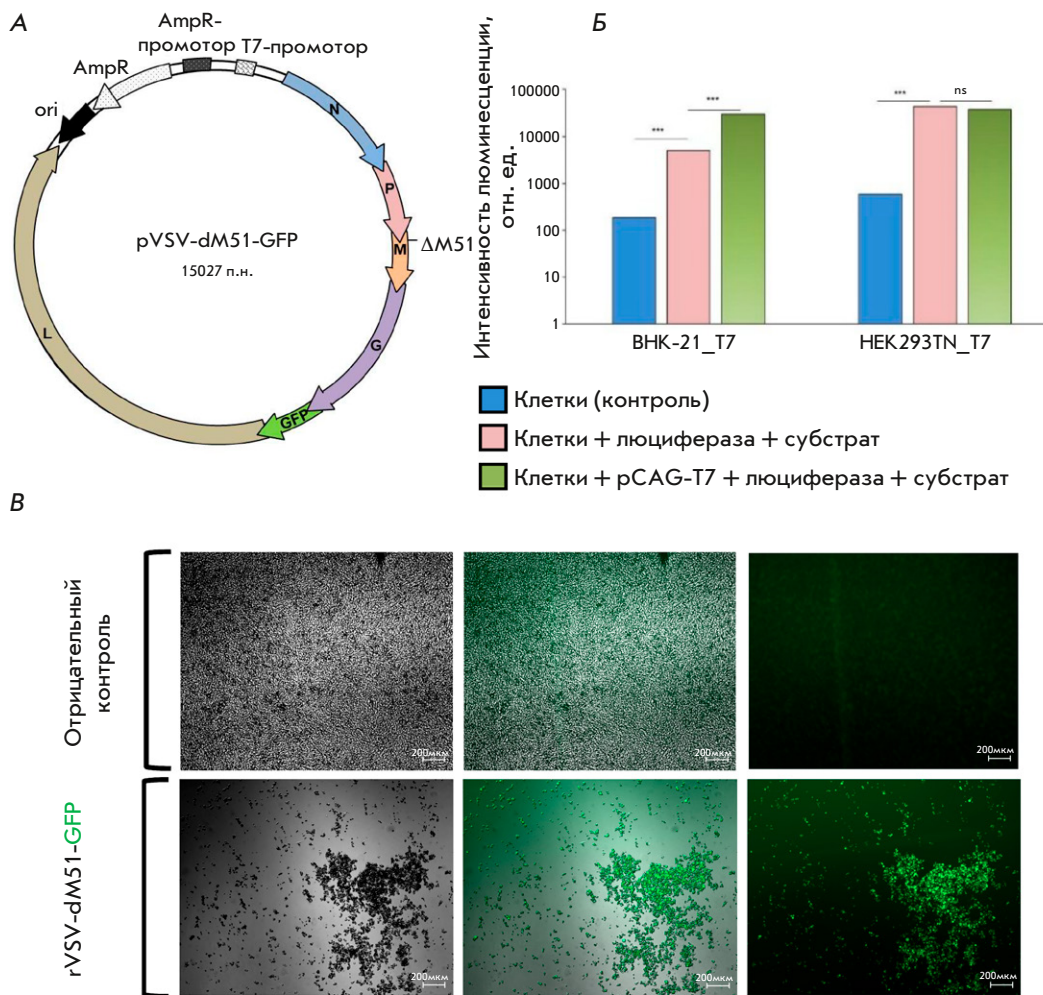
Анализ белкового состава образцов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с использованием додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) по стандартному протоколу [10]. Расчет титра ( $TCID_{50}/\text{мл}$ ) препарата rVSV-dM51-GFP осуществляли по методу Рида–Менча [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 H2B-Katushka2 под промотором EF1a. Выжившие в селективной среде клетки пересевали в культуральный флакон площадью 25  $\text{cm}^2$  и отбирали колонии, имеющие наиболее яркую флуоресценцию репортера H2B-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 плаزمидами 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].

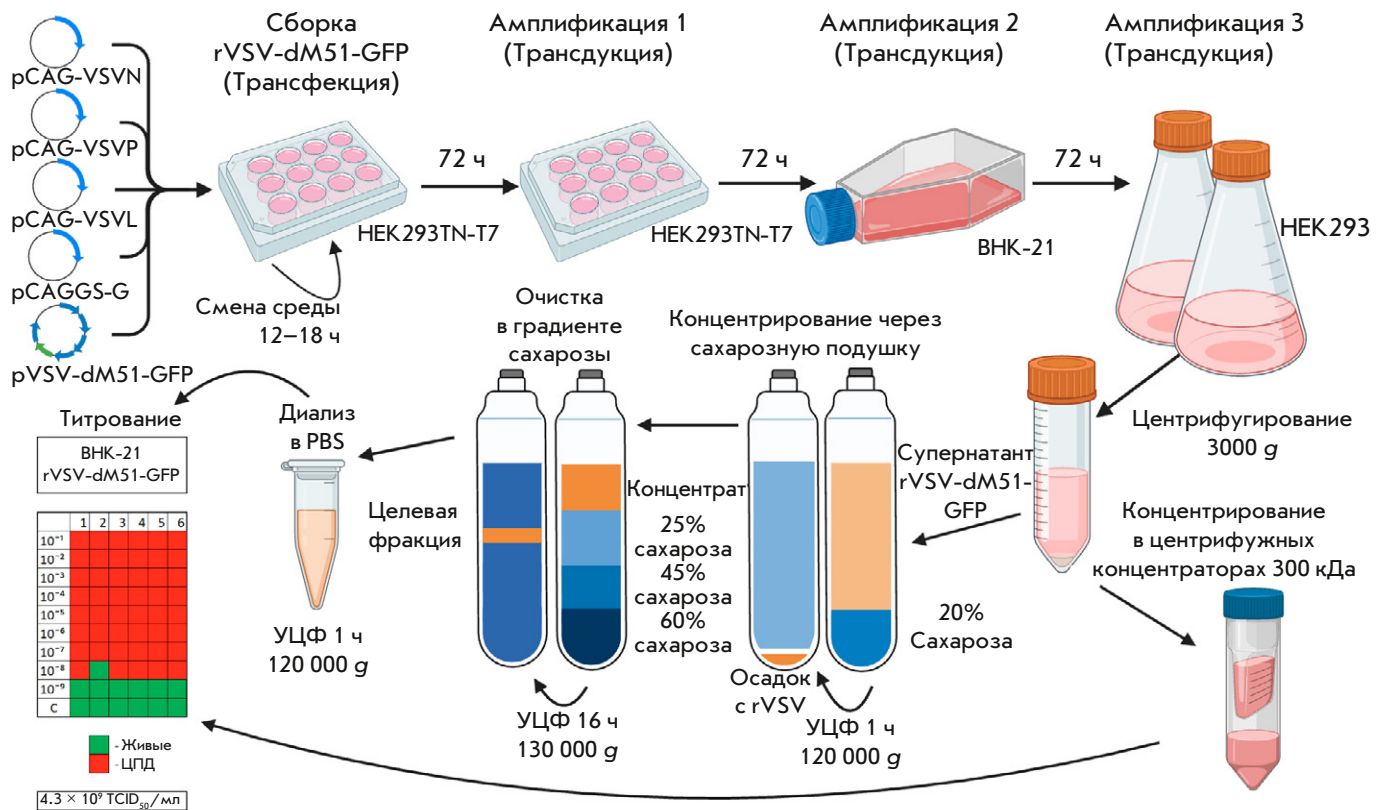
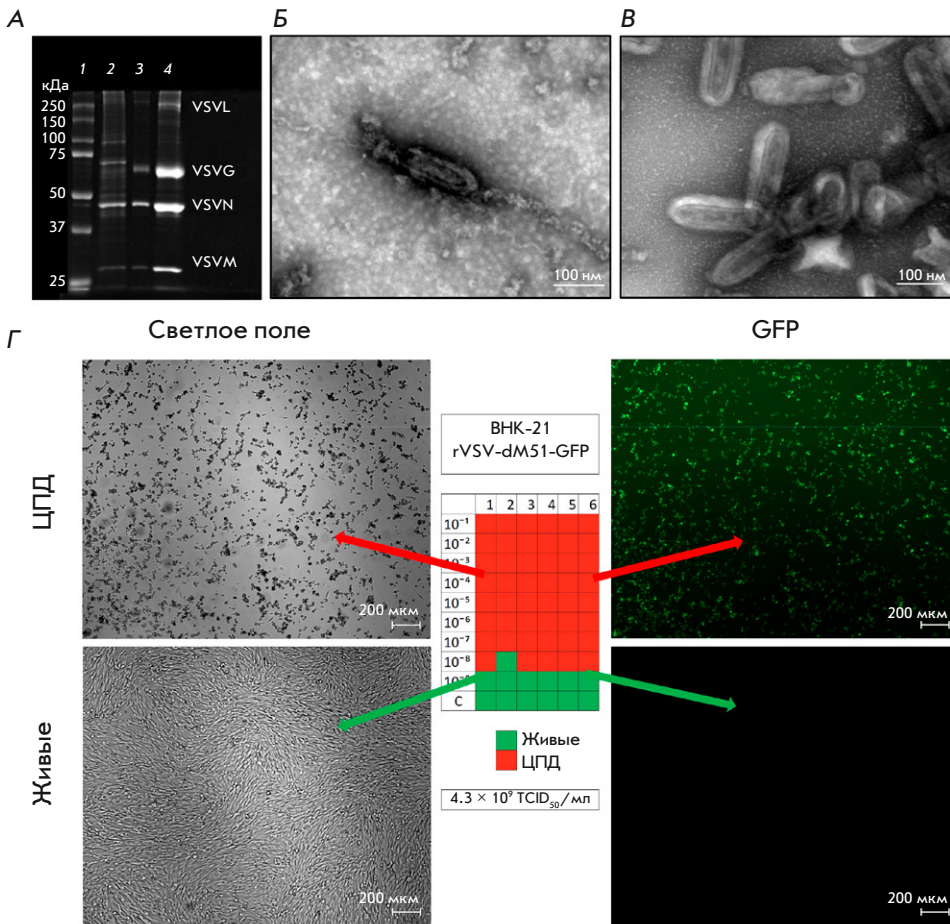


Рис. 2. Схема наработки очищенного препарата rVSV-dM51-GFP в адгезионных и суспензионных культурах клеток

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).

Наработка 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

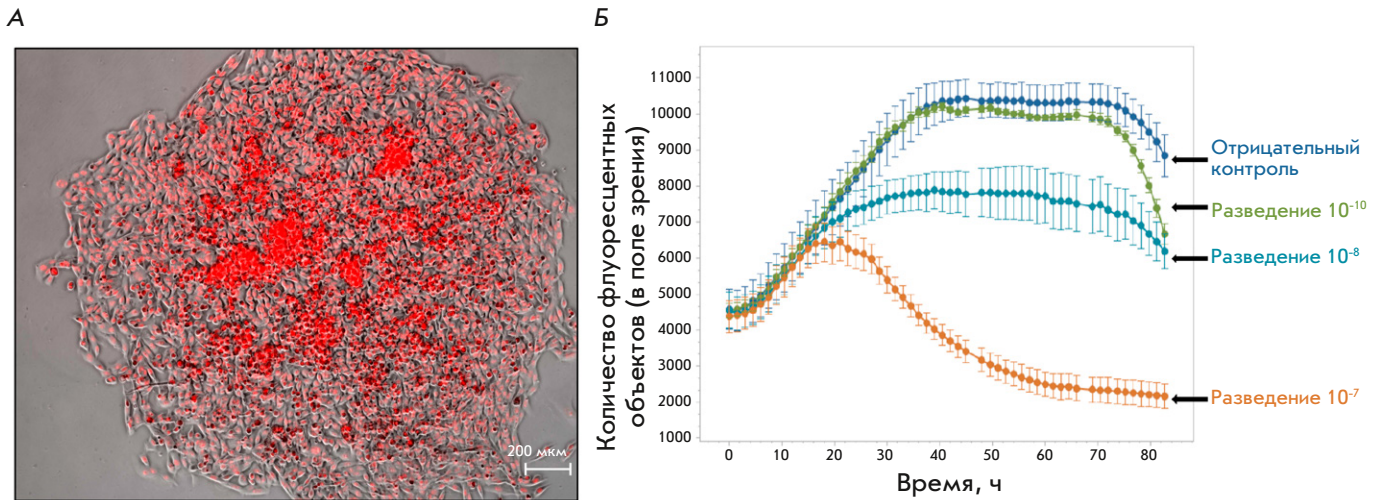


**Рис. 3.** Анализ препарата rVSV-dM51-GFP. А – электрофорез в ПААГ (слева направо): 1 – маркер молекулярной массы белков (10–250 кДа), 2 – супернатант после ЦФ (3000 g) культуральной жидкости с rVSV-dM51-GFP, 3 – образец фракции с rVSV-dM51-GFP после 2 этапа УЦФ, 4 – образец очищенного препарата rVSV-dM51-GFP 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 TCID<sub>50</sub> 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, TCID<sub>50</sub> 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 TCID<sub>50</sub> 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 ( $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл) был ниже, чем после очистки и концентрирования препарата с помощью УЦФ ( $4.3 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/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.