

Онколитическое действие рекомбинантного вируса миксомы с нокаутом антиапоптотического гена M011L in vitro**Научный руководитель – Малоголовкин Александр Сергеевич***Исаева А.С.¹, Хакимова Э.И.², Малоголовкин А.С.³*

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: isaeva_a_s@staff.sechenov.ru*; 2 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия, *E-mail: ha.emilia1@gmail.com*; 3 - Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина, Москва, Россия, *E-mail: Malogolovkin_a_s@staff.sechenov.ru*

Вирус миксомы (MYXV) семейства поксвирусов обладает онколитическими свойствами и способен таргетно уничтожать раковые клетки человека. Онколитические вирусы являются новым перспективным средством для иммунотерапии онкологических заболеваний за счет двойного действия: лизис раковых клеток и активация противоопухолевого иммунного ответа. Преимущества MYXV по сравнению с другими представителями онколитических вирусов выражаются отсутствием патогенности в отношении человека (в природе вызывает миксоматоз только у европейских кроликов вида *Oryctolagus cuniculus*), легкостью редактирования генома (геном представлен дцДНК длиной 160 тыс. п.о. и обладает высокой вместимостью), широким тропизмом к раковым клеткам (проникновение MYXV в клетку не определяется мембранными рецепторами), отсутствием возможности интеграции вирусного материала в геном хозяина (цикл репликации MYXV протекает в цитоплазме клетки). Для накопления потомства вирусных частиц MYXV обладает набором модулирующих белков, сдерживающих клеточную гибель и противовирусный иммунный ответ. Стратегия удаления данных генов позволяет усилить литические и иммуностимулирующие свойства вируса. К таким белкам относится M011L, функциональный аналог клеточного Bcl-2, блокирующий митохондриальный путь апоптоза в клетке.

В нашем исследовании на основе MYXV вакцинного штамма B-82 с помощью метода гомологичной рекомбинации мы разработали новый штамм MYXV с нокаутом гена *M011L* (MYXVdM011L) и проанализировали его геном методом NGS-секвенирования. Мы предполагаем, что MYXVdM011L обладает усиленными литическими свойствами в отношении раковых клеток. В данной работе мы провели сравнение литической и репликативной активности MYXVdM011L с диким типом вируса (wtMYXV) на раковых клетках человека (рак молочной железы MDA-MB 321, гепатоцеллюлярная карцинома HepG2, аденокарцинома поджелудочной железы AsPC-1). С помощью МТТ-теста мы определили уровень выживаемости клеток спустя 72 ч инкубации с вирусами в количестве 0,1, 0,5, 1, 5 и 10 MOI (множественность инфицирования). Методом количественной ПЦР мы определили изменение количества вирусов в единицах ЦПД₅₀/мл спустя 24, 48 и 72 ч после заражения 0,5 MOI вирусов.

В результате мы разработали новый рекомбинантный штамм MYXV с нокаутом антиапоптотического гена *M011L*. Анализ полногеномного секвенирования MYXVdM011L подтвердил нокаут гена M011L. С помощью МТТ-теста мы показали, что рекомбинантный штамм MYXVdM011L оказался более цитотоксичным в отношении изученных раковых клеток человека: полумаксимальная цитотоксическая концентрация $CC_{50} \pm \text{Ст.ош.}$ составила для MYXVdM011L 2.338 ± 0.974 MOI, 1.114 ± 0.376 MOI, 0.886 ± 0.11 MOI на клеточных линиях MDA-MB 321, HepG2 и AsPC-1 соответственно, в то время как для wtMYXV CC_{50} превысила 10 MOI на трех клеточных линиях. Благодаря количественной ПЦР мы показали, что MYXVdM011L проявил большую репликативную активность по сравнению с

wtMYXV: спустя 72 ч инкубации количество MYXVdM011L достигло $1,30 \times 10^7$ ЦПД50/мл и $5,91 \times 10^8$ ЦПД50/мл на MDA-MB 321 и AsPC-1 соответственно, в то время как количество wtMYXV достигло $1,32 \times 10^6$ ЦПД50/мл и $2,58 \times 10^5$ ЦПД50/мл на MDA-MB 321 и AsPC-1 соответственно.

Таким образом, полученный рекомбинантный штамм MYXVdM011L обладает усиленными литическими свойствами и повышенной репликативной активностью в отношении раковых клеток человека. Данный вирус может быть использован в дальнейших исследованиях противоопухолевого эффекта на животных моделях и представляет собой перспективный лекарственный препарат для лечения онкологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке программы академического лидерства Приоритет-2030 (Сеченовский университет).