

Получение стабильной линии человеческих Т-лимфоцитов методом трансформации Herpesvirus saimiri для применения в качестве клеточных носителей в виротерапии рака

Научный руководитель – Липатова Анастасия Валерьевна

Вольская М.А.¹, Ковалев В.М.²

1 - Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия, *E-mail: volskaia.mariia@gmail.com*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия, *E-mail: kvm-kovalev@yandex.ru*

Виротерапия рака - новый подход к лечению злокачественных заболеваний, в основе которого лежат вирусы, способные избирательно заражать и лизировать раковые клетки, не нанося вреда нормальным клеткам, а также направленно стимулировать иммунную систему против опухолевых клеток. Однако, нейтрализация онколитических вирусов (ОВ) специфическими антителами, вырабатываемыми организмом, снижает эффективность виротерапии [2]. Решением этой проблемы является использование клеток-носителей, способных заражаться ОВ и транспортировать вирус к опухолям и метастазам, например, модифицированных Т-лимфоцитов. Проведение исследований Т-клеток ограничено коротким сроком их жизни, поэтому для успешной работы с ними *in vitro* необходима их иммортализация. Герпесвирус саймири (Herpesvirus saimiri, HVS) - лимфотропный вирус приматов, вызывающий Т-клеточную лимфому у некоторых видов обезьян - способен трансформировать Т-клетки человека *in vitro*, позволяя им неограниченно пролиферировать в присутствии интерлейкина-2. При этом не происходит утраты клетками Т-клеточного рецептора и выделения инфекционных вирусных частиц. Безопасность данного подхода к иммортализации была подтверждена многочисленными работами [1, 3], продемонстрировавшими отсутствие развития вирусной инфекции после введения иммортализованных клеток в организм приматов (в том числе человека).

Целью данной работы являлось получение иммортализованной линии Т-лимфоцитов человека. Мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от здорового донора, заражали HVS и культивировали в течение 6 месяцев, получив стабильную линию. Методом проведения RT-ПЦР было подтверждено наличие в клетках ДНК HVS в латентном состоянии, а характеристика линии по В-клеточным и Т-клеточным поверхностным маркерам продемонстрировала, что 99% популяции клеток являются CD4+ Т-лимфоцитами. Следующим этапом было проведение лентивирусной трансдукции клеток вектором, содержащим полицистронную кассету, несущую последовательности, кодирующие ИЛ-2, RFP и устойчивость к пуromицину. Эффективность трансдукции и селекции оценивали методом проточной цитофлуориметрии. После этого с использованием системы CRISPR/Cas9 был deletирован ген MAVS, ответственный за эффективную индукцию интерферона при заражении вирусами. Полученная линия способна эффективно реплицировать широкий ряд непатогенных штаммов онколитических вирусов и пригодна для дальнейшего изучения на моделях *in vivo* с целью доставки ОВ к отдаленным метастазам.

Источники и литература

- 1) Knappe A. et al. Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion//Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2000. – Т. 95. – №. 10. – С. 3256-3261.

- 2) Russell S. J., Peng K. W., Bell J. C. Oncolytic virotherapy//Nature biotechnology. – 2012. – Т. 30. – №. 7. – С. 658.
- 3) Whitehouse A. Herpesvirus saimiri: a potential gene delivery vector//International journal of molecular medicine. – 2003. – Т. 11. – №. 2. – С. 139-148.