На правах рукописи

ТРЕГУБЧАК ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

СВОЙСТВА ИСКУССТВЕННЫХ ВАРИАНТОВ БЕЛКА ОРТОПОКСВИРУСОВ, СВЯЗЫВАЮЩЕГО ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛИ

1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Щелкунов Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Официальные оппоненты: Гуляева Людмила Федоровна, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза НИИМБ (структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»).

Рихтер Владимир Александрович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Ведущая организация: ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита состоится «18» июня 2025 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, тел.: +7(383) 363-47-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, URL: http://www.vector.nsc.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент Ильичева Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Фактор некроза опухоли (ФНО) играет центральную роль в регуляции защитных реакций организма – оказывает плейотропное действие на клетки: способствует инфильтрации очага воспаления лейкоцитами, повышая уровень продукции молекул адгезии, активирует макрофаги, увеличивает проницаемость сосудов, способствует активации антигенпредставляющих клеток и др. [Kalliolias and Ivashkiv, 2016; Yao *et al.,* 2024]. Однако часто гиперпродукция этого цитокина может приводить к развитию патологических состояний, сопровождающихся хроническими воспалительными и/или аутоиммунными реакциями, таким как ревматоидный артрит (РА), болезнь Крона, септический шок, кахексия и др. [Непомнящих *и др.,* 2007].

Среди всех заболеваний, обусловленных гиперпродукцией ФНО, наибольшую социальную значимость имеет РА, который поражает 0,5-2 % взрослого населения в наиболее работоспособном возрасте 35-55 лет [Горячев и Эрдес, 2001]. Заболевание характеризуется как синовиальным, так и системным воспалением и при неадекватном лечении приводит к инвалидности, снижению качества жизни, потере трудоспособности и существенному экономическому ущербу [Cooper, 2000]. До начала 21 века треть пациентов с РА прекращали работу из-за заболевания в течение 2 лет с момента его возникновения [Barrett *et al.,* 2000]. Кроме того, у пациентов с тяжелым РА продолжительность жизни сокращалась в среднем на 10 лет [Kvien, 2004]. В этой связи актуальным является вопрос разработки эффективных способов лечения данного заболевания.

Лечение РА кардинально изменилось за последние 20-25 лет – от контроля симптомов до предотвращения прогрессирования заболевания. Такие изменения, прежде всего, обусловлены появлением препаратов модифицирующих заболевание, существенно улучшивших качество лечения пациентов [Zhao *et al.,* 2018]. Лидирующей подгруппой среди биологических препаратов являются блокаторы ФНО, на них приходится около 75 % от общего объема рынка. Лидерами среди блокаторов ФНО являются три препарата на основе рекомбинантных белков: Ремикейд (Centocor Ortho Biotech/Schering-Plough), Энбрел (Amgen/Wyeth) и Хумира (Abbott).

На российском рынке отсутствуют антиревматоидные препараты отечественного производства, способные блокировать действие ФНО. Потребность в препаратах для лечения РА удовлетворяется дорогостоящими препаратами иностранного производства. Данные препараты не являются доступными для всех групп населения, поскольку средняя стоимость лечения одного больного РА генно-инженерными препаратами превышает 1 млн. рублей в год [Баранов *и др.,* 2007]. Кроме того, антиревматоидные препараты, представленные на международном и российском рынке, обладают рядом недостатков: наличие побочных эффектов, ограничивающих переносимость препаратов и длительность курса лечения; повышенный риск развития опухолей. Помимо этого, часто пациенты теряют чувствительность к анти-ФНО препарату за счет формирования иммунного ответа

на вводимый препарат, и в таком случае возникает необходимость замены препарата на другой [Непомнящих *и др.,* 2007; Dogra and Khullar, 2013].

Таким образом, сформировалась потребность в новых препаратах против РА, не уступающих по эффективности препаратам, представленным на рынке и превосходящих их по безопасности и экономичности. Важное значение в этом направлении исследований могут иметь ФНО-связывающие белки вирусов. Наибольшее количество генов, кодирующих белки, действующие на различные компоненты защитной системы организма хозяина, представлены в геномах поксвирусов, крупнейших ДНК-содержащих вирусов млекопитающих. Особое внимание привлекают ортопоксвирусы, к которым относятся патогенные для человека вирусы натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян и оспы коров (ВОК). Способность связывать разные лиганды (ФНО, хемокины, интерфероны, белки системы комплемента и др.) – важная особенность ортопоксвирусных иммуномодулирующих белков. Именно достигнутая в процессе коэволюции этих вирусов и человека высокая эффективность связывания вирусных белков с белками-мишенями организма человека делает такие вирусные белки перспективными для разработки на их основе терапевтических препаратов нового поколения. Для раскрытия терапевтического потенциала поксвирусных белков требуется детальное изучение широкого ряда гомологов, однако, по всей видимости, наиболее перспективны иммуномодулирующие белки ВНО, эволюционно наиболее адаптированного к защитным системам человеческого организма [Маренникова и Щелкунов, 1998].

Одними из таких иммуномодуляторов являются ФНО-связывающие белки. ВНО кодирует только один белок данного семейства – это двухдоменный белок CrmB, эффективно связывающий ФНО и хемокины [Seet *et al.*, 2003].

Ранее в отделе геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора методами генетической инженерии была получена продукция двухдоменного ФНО-связывающего белка CrmB ВНО (cytokine response modifier B ВНО) в культуре клеток насекомых. В экспериментах *in vitro* было показано, что синтезированный в клетках насекомых рекомбинантный вирусный CrmB обладает способностью эффективно связывать ФНО, препятствуя его взаимодействию с рецепторами клеток линии L-929 [Gileva *et al.*, 2006; Непомнящих *и др.*, 2008]. Кроме того, в иных тестах *in vitro* было показано, что белок CrmB ВНО отменяет эффекты ФНО на функциональную активность клеток крови здоровых доноров и доноров, больных РА, продукцию цитокинов – интерлейкина (ИЛ)-1 и ИЛ-6, а также окислительно-метаболическую активность клеток [Цырендоржиев *и др.*, 2011].

На мышиной модели липополисахарид (ЛПС)-индуированного эндотоксического шока было показано, что введение рекомбинантного белка CrmB ВНО мышам с эндотоксическим шоком приводило к достоверному снижению вызываемого ЛПС летального эффекта, отчетливому снижению гистопатологических изменений внутренних органов по сравнению с животными, не получавшими этого белка [Гилева *и др.*, 2006].

Таким образом, накопленные к началу данной работы результаты экспериментов *in vitro* и *in vivo* свидетельствовали о перспективности использования белка CrmB ВНО в качестве основы для создания анти-ФНО препаратов нового поколения.

Цели и задачи. Целью настоящего исследования являлось изучение биологических свойств рекомбинантных вариантов ФНО-связывающего белка CrmB ортопоксвирусов.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить иммуногенные свойства белка CrmB ВНО при многократном введении мышам.

2. Получить в бакуловирусной системе экспрессии рекомбинантные белки на основе функциональных доменов белка CrmB ортопоксвирусов и изучить ФНО-нейтрализующие свойства полученных белков.

3. Получить мутантные формы укороченного варианта белка CrmB (ФНО-связывающего домена, TNF-BD) ортопоксвирусов и изучить эффективность межмолекулярных взаимодействий полученных рекомбинантных белков с соответствующим лигандом.

4. Получить рекомбинантную молекулу ДНК на основе вектора pcDNA3.1, содержащую последовательность, кодирующую TNF-BD ВНО.

5. Изучить иммуногенные свойства TNF-BD ВНО, и изучить иммуногенные свойства рекомбинантной молекулы ДНК на основе вектора pcDNA3.1, содержащей последовательность, кодирующую этот белок.

6. Оценить терапевтический потенциал рекомбинантной молекулы ДНК на основе вектора pcDNA3.1, содержащей последовательность, кодирующую TNF-BD ВНО, на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс.

Научная новизна. Впервые показано, что удаление хемокин-связывающего домена белка CrmB ВНО не приводит к потере укороченным вариантом белка TNF-BD способности ингибировать биологические эффекты ФНО. TNF-BD с высокой аффинностью взаимодействует с ФНО, превосходя по данным показателям коммерческие анти-ФНО препараты, при этом TNF-BD (17 кДа) обладает сниженной иммуногенностью относительно полноразмерного белка CrmB ВНО (47 кДа).

Впервые показано, что среди всех изученных гомологов TNF-BD ортопоксвирусов, наиболее выраженными ФНО-нейтрализующими свойствами относительно ФНО человека обладает белок TNF-BD ВНО. При этом пролин в 7-ой позиции N-концевого PLAD (pre-ligand assembly domain)-субдомена белка значим для проявления ФНО-нейтрализующей активности относительно ФНО человека.

Впервые на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс показана возможность генотерапии такой патологии при двукратном внутримышечном введении рекомбинантной плазмидной ДНК pcDNA/TNF-BD.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты дополняют фундаментальные знания о механизмах взаимодействия вирусного ФНО-связывающего белка ортопоксвирусов CrmB с ФНО, а также свидетельствуют о перспективности использования укороченного варианта белка CrmB ВНО TNF-BD в качестве основы для создания новых ФНО-блокаторов для лечения паталогических состояний, обусловленных гиперпродукцией ФНО. Уникальным преимуществом разрабатываемого продукта по сравнению с конкурентными аналогами являются: высокая эффективность взаимодействия с ФНО и низкая себестоимость. При этом препарат может быть разработан как на основе белка TNF-BD, представляющего собой ФНО-связывающий домен CrmB ВНО (при условии оптимизации биотехнологических этапов производства), так и в формате генной терапии, на основе рекомбинантной молекулы ДНК, содержащей ген TNF-BD (при условии подбора оптимального вектора для доставки).

Положения, выносимые на защиту

1. ФНО-связывающий домен и входящий в его состав PLAD-субдомен белка CrmB ВНО важны для проявления ФНО-нейтрализующей активности белка. Пролин в 7-ой позиции PLAD-субдомена белка CrmB ВНО значим для проявления ФНО-нейтрализующей активности относительно ФНО человека.

2. Белок TNF-BD ВНО, представляющий собой ФНО-связывающий домен белка CrmB ВНО, полученный как в эукариотической, так и прокариотической системах экспрессии нейтрализует цитотоксическое действие ФНО человека и мыши *in vitro*. TNF-BD ВНО, полученный в эукариотической системе экспрессии, ингибирует биологические эффекты ФНО *in vivo* – увеличивает выживаемость животных на фоне ЛПС-индуцированного эндотоксического шока.

3. При многократном введении мышам укороченный вариант белка CrmB ВНО – TNF-BD ВНО, полученный в прокариотической системе экспрессии, обладает сниженными иммуногенными свойствами относительно полноразмерного белка CrmB ВНО.

Степень достоверности и апробация результатов. Все исследования выполнены с использованием современных молекулярно-биологических и биоинформатических методов на современном сертифицированном оборудовании. Результаты исследований обработаны с использованием стандартных статистических методов.

Результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях: Systems Biology and Biomedicine (SBioMed-2018) (Novosibirsk, 2018); XXI International Poxvirus, Asfarvirus, and Iridovirus Conference (Le Bischenberg, France, 2016); XX International Poxvirus, Asfarvirus, and Iridovirus Conference (Victoria, Canada, 2014); II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 300-летию М.В. Ломоносова «Ученые Урала и Сибири – развитию отечественной фармации: от синтеза до инновационных лекарственных средств» (Новосибирск, 2011); Научная конференция «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2010); XLVIII

международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2010); XLVII международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2009); Научная конференция «Медицинская геномика и протеомика» (Новосибирск, 2009).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертационной работы опубликовано 20 работ, включая 5 статей, опубликованных в журналах списка, рекомендованного ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 14 тезисов в сборниках конференций, 1 патент Российской Федерации.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментов и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии. Конструирование рекомбинантных плазмид, конструирование рекомбинантных бакуловирусов, оптимизацию условий продукции рекомбинантных белков, очистка белков при помощи металл-ионной хроматографии; создание мутантных вариантов белков, изучение ФНО-нейтрализующей активности белков *in vitro* выполнено автором лично. Изучение иммуногенных свойств полноразмерного ФНО-связывающего белка ВНО, изучение иммуногенных свойств рекомбинантных плазмидных ДНК, изучение ФНО-нейтрализующей активности белков *in vivo* выполнены автором при участии Т.С. Непомнящих. Изучение иммуногенности укороченного варианта ФНО-связывающего белка ВНО проведено автором лично. Исследование аффинности взаимодействия вирусных белков с лигандом методом поверхностно-плазмонного резонанса выполнено автором лично при участии А.М. Сычевой и С.В. Шеховцова. Изучение эффективности ингибирования рекомбинантными белками ФНО-индуцированной окислительно-метаболической активности лейкоцитов крови мышей выполнено Д.Д. Цырендоржиевым. Очистка белков методом аффинной хроматографии выполнена И.А. Рязанкиным. Биоинформатическое моделирование белок-белковых взаимодействий выполнено Н.В. Иванисенко. Исследования терапевтического потенциала рекомбинантных молекул ДНК выполнено автором лично при участии А.Е. Нестерова, Р.А. Максютова, О.С. Таранова, А.Н. Силкова.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н., профессору С.Н. Щелкунову за неоценимую помощь и советы при проведении исследований и оформлении результатов работ, представленных в диссертации. Автор искренне признателен и благодарен всем сотрудникам, ранее осуществлявшим и осуществляющим в настоящее время свою трудовую деятельность в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, внесшим свой вклад в проведение настоящего исследования: к.б.н. Т.С. Непомнящих, И.А. Рязанкину; д.б.н. И.П. Гилевой, д.б.н. Р.А. Максютову, О.С. Таранову, А.Е. Нестерову, к.б.н. Д.В. Антонцу.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: списка сокращений и условных обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, выводов, списка литературы. Работа изложена на 161 странице, включая 17 таблиц и 37 рисунков. Список литературы включает в себя 242 библиографических ссылки, из них 21 на

русском языке, 221 – на английском языке. Нумерация таблиц и рисунков приводится отдельно для каждой главы.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Обзор литературы. Обзор литературы включает в себя 4 главы и заключение. В первой главе подробно описаны биологические функции ФНО и его роль в формировании таких заболеваний, как РА, псориатический артрит и септический шок. Во второй главе описаны все существующие лабораторные модели РА, как наиболее социально значимого заболевания среди патологий, обусловленных гиперпродукцией ФНО. В следующей главе описаны терапевтические препараты, применяемые в клинической практике для лечения заболеваний, обусловленных гиперпродукцией ФНО. Также описаны современные подходы, применяемые при разработке новых анти-ФНО препаратов. Последняя глава посвящена описанию свойств ФНО-связывающих белков ортопоксвирусов.

Материалы и методы. В разделе приводится подробное описание использованных в работе молекулярно-биологических, иммунологических и биоинформатических методов (выделение нуклеиновых кислот, методы молекулярного клонирования, культивирование эукариотических культур клеток, методы очистки белков, иммуноферментный анализ, вестерн-блот анализ, иммунизация лабораторных животных, определение биологической активности вирусных ФНО-связывающих белков *in vitro* и *in vivo*, метод непрерывного представления воды и пр.).

Результаты и их обсуждение. Раздел содержит 11 глав, в которых изложены все полученные результаты, графики и рисунки.

Определение иммуногенности белка CrmB ВНО.

Ранее в эксперименте *in vitro* на культуре клеток мышиных фибробластов и *in vivo* на мышиной модели ЛПС-индуцированного эндотоксического шока белок CrmB ВНО проявил себя в качестве эффективного антагониста ФНО, что позволяет рассматривать данный белок в качестве основы для создания анти-ФНО препарата. Однако, в процессе использования терапевтического средства зачастую требуется многократное введение препарата, поэтому потенциальная основа для создания такого препарата должна обладать низкой иммуногенностью. На первом этапе работы была произведена оценка иммуногенных свойств белка CrmB ВНО. Иммуногенность CrmB ВНО проверяли относительно высокоиммуногенного вирионного поксвирусного белка A30 ВНО. Для этого проводили иммунизацию мышей линии BALB/c. Животных иммунизировали внутримышечно очищенными антигенами в дозе 10 мкг/мышь в объеме 100 мкл; проводили четыре иммунизации с интервалом 2 недели. По типу вводимого препарата было сформировано четыре группы по 15 животных в каждой группе (мыши, иммунизированные белком CrmB ВНО; белком A30 ВНО; белком A30 ВНО, эмульгированным в адъюванте Фрейнда (при первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, при

последующих – неполный); фосфатным буфером). Специфичность связывания сывороток, полученных после иммунизаций, с соответствующим вводимым иммуногеном подтвердили Вестерн-блот анализом. Титр антител полученных сывороток определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), в результате которого для белка CrmB ВНО, эволюционно наиболее адаптированного к защитным системам человеческого организма, была показана высокая иммуногенность (Таблица 1). В данном случае высокая иммуногенность CrmB ВНО может быть связана с мультимеризацией белка и высокой иммуногенностью именно высокомолекулярных комплексов. Ранее было показано, что белок CrmB ВНО образует преимущественно олигомерные формы, а белок CrmB ВОК димерные формы [Гилева и др., 2009].

Таблица 1. Титры сывороток, полученных после иммунизации.

	Титр		
	CrmB ВНО	A30 ВНО	A30 ВНО + адъювант Фрейнда
После 2-ой иммунизации	15	0	1000
После 3-ей иммунизации	400	4	2000
После 4-ой иммунизации	5000	10	5000

С целью снизить иммуногенность белка, а также установить функциональную значимость отдельных доменов и, возможно, установить видоспецифичные отличия, была проведена работа по получению рекомбинантных делеционных и химерных вариантов белков CrmB ВНО и CrmB ВОК, отображенных на рисунке 1. Ожидалось, что некоторые из полученных белков будут обладать пониженной иммуногенностью относительно CrmB ВНО, но при этом сохранят способность эффективно связывать ФНО. Предполагали, что создание рекомбинантных белков CrmB ВНО и ВОК с делетированными SECRET-доменами и дальнейшее изучение этих белков позволит установить роль SECRET-домена в олигомеризации белка CrmB. Перекрестная замена PLAD-субдоменов между CrmB ВНО и CrmB ВОК также возможно позволит установить участие этого домена в олигомеризации и видоспецифичные отличия свойств этих доменов.

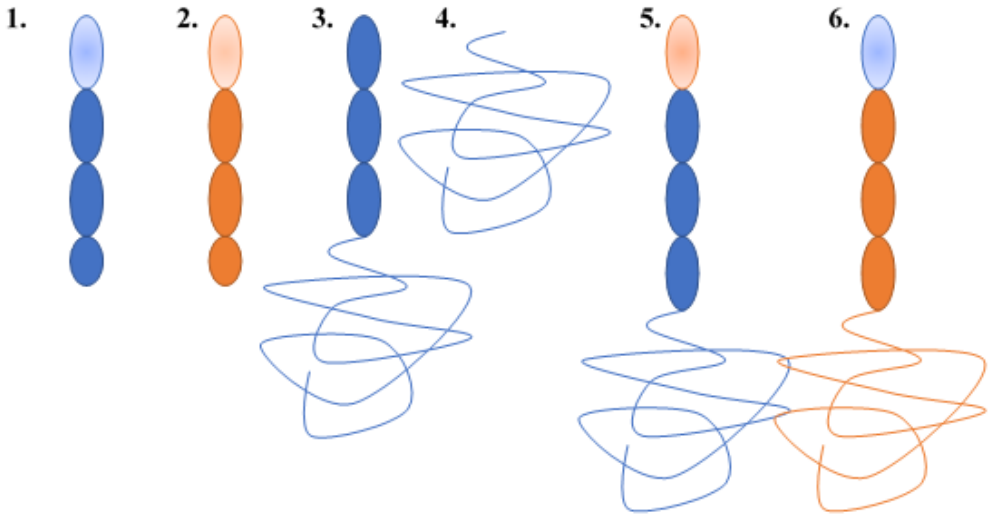

Рисунок 1. Конструируемые рекомбинантные и делеционные варианты белка CrmB. Синим указаны участки, соответствующие белку CrmB ВНО, оранжевым – CrmB ВОК. 1: CrmB ВНО с делетированным SECRET-доменом. 2: CrmB ВОК с делетированным SECRET-доменом. 3: CrmB ВНО с делетированным PLAD-субдоменом. 4: CrmB ВНО с делетированным ФНО-связывающим доменом. 5: CrmB ВНО с PLAD-субдоменом, замененным на PLAD-субдомен CrmB ВОК. 6: CrmB ВОК с PLAD-субдоменом, замененным на PLAD-субдомен CrmB ВНО.

Экспрессию генов, кодирующих соответствующие рекомбинантные белки, получали в культуре клеток насекомых Sf-21 с использованием бакуловирусной системы экспрессии Bac-to-Bac («Life Technologies», США).

Конструирование рекомбинантных плазмид на основе вектора pFastBac1, содержащих гены, кодирующие химерные и делеционные варианты белка CrmB. Конструирование рекомбинантных бакуловирусов, содержащих гены, кодирующие химерные и делеционные варианты белка CrmB.

Две данные главы описывают получение 6 рекомбинантных белков, представляющих собой химерные и укороченные варианты белков CrmB ВНО и CrmB ВОК (Рисунок 1) при помощи бакуловирусной системы экспрессии Bac-to-Bac. Гены, кодирующие целевые белки, встраивали в донорную плазмиду pFastBac1 и полученными рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки *E.coli* (штамм DH10Bac), содержащие хелперную плазмиду и бакмиду с mini-att Tn7-сайтом. Mini Tn7 элемент из pFastBac1 встраивался в mini-att Tn7-сайт бакмиды в присутствии ферментов транспозиции, предоставленных хелперной плазмидой. Колонии, содержащие рекомбинантную бакмиду, фенотипически селектировали в присутствии Bluo-gal и изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) – такие колонии остаются белыми. Затем выделяли рекомбинантные бакмидные ДНК, которые в дальнейшем использовали для трансфекции клеток насекомых Sf-21 и проводили по три пассажа для каждого из 6 рекомбинантных бакуловирусов.

Анализ продукции химерных и делеционных вариантов белка CrmB ортопоксвирусов в клетках насекомых Sf-21

Продукцию каждого из 6 рекомбинантных белков в клетках насекомых линии Sf-21 оптимизировали, варьируя множественность заражения и продолжительность инкубации с полученными рекомбинантными бакуловирусами. Было установлено, что наибольший уровень продукции для всех полученных рекомбинантных белков наблюдался при заражении клеток Sf-21 рекомбинантными бакуловирусами с множественностью заражения 0,1 БОЕ/кл и продолжительности инкубации с вирусным материалом 5 суток.

Изучение биологической активности химерных и делеционных вариантов белка CrmB ортопоксвирусов *in vitro*

Культуральную среду, содержащую рекомбинантные белки, исследовали на способность нейтрализовать цитотоксическое действие человеческого ФНО на культуре клеток мышиных фибробластов L-929. Результаты эксперимента приведены на рисунке 2.

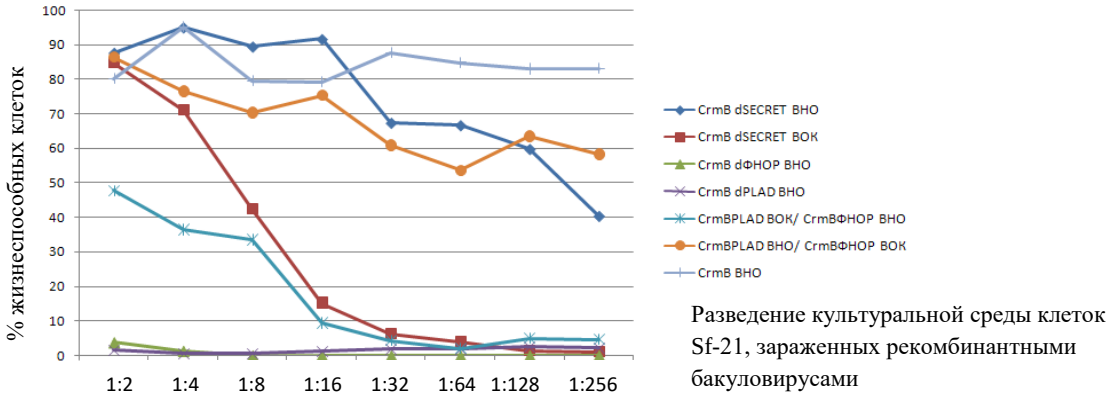

Рисунок 2. Ингибирование культуральной средой клеток Sf-21, зараженных рекомбинантными бакуловирусами, продуцирующими варианты белка CrmB, цитотоксического действия человеческого ФНО на культуре клеток мышиных фибробластов L-929. По оси ординат указан процент жизнеспособных клеток, по оси абсцисс – разведения культуральной среды: 1 : 2, 1 : 4,…, 1 : 256.

Впервые было показано, что при удалении ФНО-связывающего домена, как и при удалении PLAD-субдомена, белок CrmB ВНО теряет способность нейтрализовать цитотоксическое действие человеческого ФНО. Кроме того, из результатов эксперимента можно выдвинуть предположение, что взаимная замена PLAD-субдомена в белках CrmB ВНО и CrmB ВОК влияет на ФНО-ингибирующие свойства этих белков. Так, замена PLAD-субдомена белка CrmB ВНО на PLAD-субдомен белка CrmB ВОК приводит к снижению способности такого варианта белка (относительно белка CrmB ВНО) ингибировать эффекты, вызванные ФНО, в то время как замена PLAD-субдомена белка CrmB ВОК на PLAD-субдомен белка CrmB ВНО приводит к обратному эффекту. Предполагаемые различия могут быть вызваны различиями в аминокислотных последовательностях в области PLAD-субдоменов белков CrmB ВНО и CrmB ВОК.

Таким образом, можно заключить, что из 6 полученных белков, CrmB ВНО с делетированным SECRET-доменом (далее обозначаемый TNF-BD ВНО) является более перспективной основой для создания терапевтического препарата, чем целевой CrmB ВНО и, возможно, будет обладать сниженной иммуногенностью, ввиду меньшей молекулярной массы относительно полноразмерного белка. Рассматривая белок TNF-BD ВНО как потенциальную основу для ФНО-блокаторов необходимо было изучить ФНО-связывающие свойства белка как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*, что и стало следующим этапом работы.

Изучение ФНО-нейтрализующей биологической активности рекомбинантного белка TNF-BD ВНО в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Для изучения биологических свойств рекомбинантного белка TNF-BD ВНО проводили наработку белка в препаративных количествах и дальнейшую очистку. Электрофоретический и вестерн-блот анализы белковых препаратов, полученных после очистки, показал наличие двух белковых продуктов, связывающихся с антителами к целевому белку CrmB ВНО (Рисунок 3).

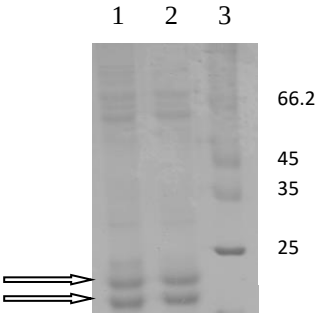

Рисунок 3. Электрофореграмма в 12,5 % SDS-ПААГ белка TNF-BD ВНО после аффинной очистки. Дорожки 1, 2: пробы белка TNF-BD ВНО. Дорожка 3: маркер молекулярного веса белков («Fermentas», Литва). Стрелками указаны белки, полученные после аффинной очистки белка TNF-BD ВНО.

Показано, что деградация белка происходит на этапе очистки, так как в супернатанте перед очисткой наблюдается один белковый продукт, связывающийся с антителами к целевому белку CrmB ВНО. Оптимизация условий очистки (добавление ингибиторов протеаз, изменение условий для элюции белка и пр.) не дали положительного результата. В этой связи дальнейшую работу проводили с препаратом, являющимся смесью двух белков. Далее сравнивали способность белков TNF-BD ВНО и целевого CrmB ВНО нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО мыши и человека на культуре клеток мышиных фибробластов L-929. Из результатов эксперимента можно заключить, что CrmB ВНО и TNF-BD ВНО со схожей эффективностью ингибируют цитотоксическое действие ФНО мыши и человека – 50 % выживаемость клеток достигается при концентрации целевых белков в диапазоне 8,66-35,98 нг/мл (Рисунок 4).

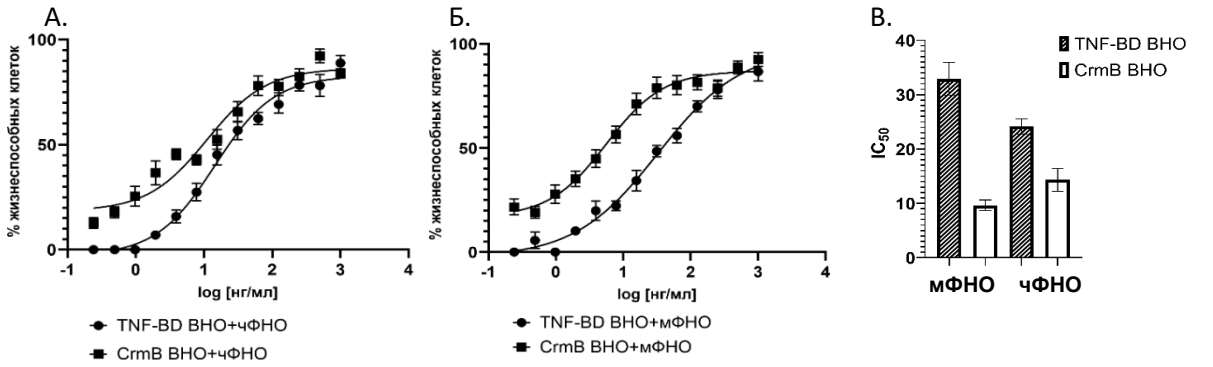

Рисунок 4. Ингибирование белками CrmB ВНО и TNF-BD ВНО цитотоксического действия ФНО человека (А) и ФНО мыши (Б) на культуре клеток мышиных фибробластов L-929. Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) ФНО человека и мыши для белков CrmB ВНО и TNF-BD ВНО, полученных в бакуловирусной системе экспрессии (В).

Биологическую активность ФНО-связывающего белка TNF-BD ВНО *in vivo* определяли на мышиной модели ЛПС-индуцированного эндотоксического шока. При введении рекомбинантных белков (TNF-BD ВНО и CrmB ВНО) выживаемость животных составила 62,5 %. Достоверных отличий при использовании ФНО-связывающего белка CrmB ВНО или его усеченного варианта с делетированным SECRET доменом при этом не выявлено.

Полученные данные *in vitro* и *in vivo* для белка TNF-BD ВНО позволяют рассматривать данный белок, как основу для создания анти-ФНО препаратов. Однако, с точки зрения перспективы масштабирования производства такого ФНО-блокатора, гетерогенность препарата является неоспоримым недостатком, что обуславливает необходимость дальнейшей оптимизации условий очистки. Еще одним ключевым недостатком при производстве потенциального ФНО-блокатора является использование бакуловирусной системы экспрессии и высокой себестоимости производства белка. С целью снижения потенциальных затрат при производстве белка TNF-BD ВНО, а также для оценки вклада посттрансляционных модификаций в биологическую активность белка нами был создан продуцент белка TNF-BD ВНО с использованием прокариотической системы экспрессии.

Получение штамма *E.coli*, продуцирующего белок TNF-BD ВНО

На первом этапе работы была получена рекомбинантная плазмидная ДНК, обеспечивающая после введения в клетки бактерий *E.coli* продукцию рекомбинантного белка TNF-BD ВНО. В качестве экспрессирующего вектора использовали плазмиду pQE-60 («Qiagen», Германия). Была проведена работа по выбору штамма продуцента белка, по оптимизации условий культивирования и способа очистки (штамм – *E.coli* SG13009 [pRep4], время инкубации, после добавления индуктора – 5 ч, очистка – металл-ионная хроматография с введением дополнительной стадии – промывки Ni-NTI-агарозы буфером, содержащим 20 мМ имидазола, непосредственно перед нанесением элюирующего буфера).

Изучение ФНО-нейтрализующей активности белка TNF-BD ВНО, полученного в прокариотической системе экспрессии, в экспериментах *in vitro*

О биологической активности рекомбинантного белка TNF-BD ВНО, полученного в прокариотической системе экспрессии, судили по способности нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО человека и мыши на культуре клеток мышиных фибробластов L-929. Было показано, что после диализа против PBS, белок обладает биологической активностью и способен нейтрализовать эффекты, вызванные ФНО, *in vitro* (Рисунок 5).

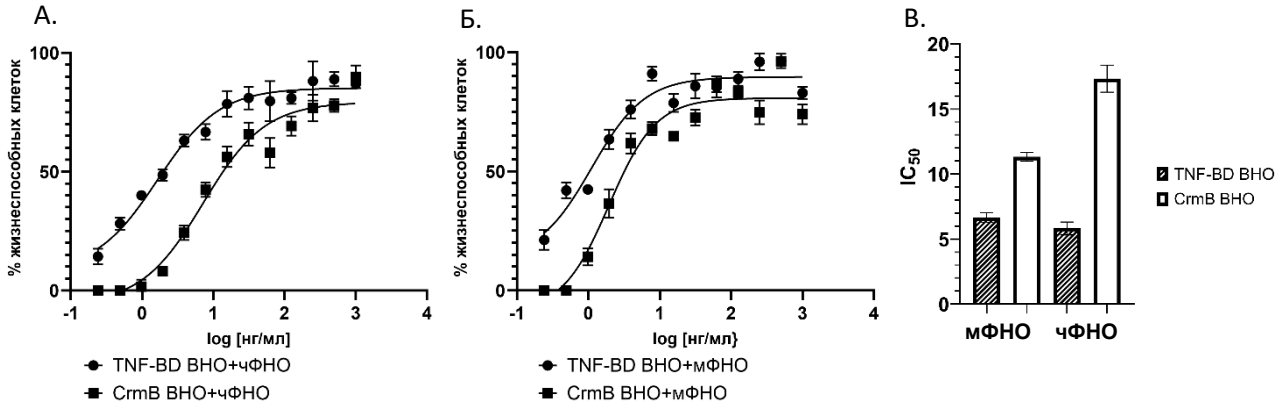

Рисунок 5. Ингибирование белками CrmB ВНО и TNF-BD ВНО, полученного в прокариотической системе экспрессии, цитотоксического действия ФНО человека (А) и ФНО мыши (Б) на культуре клеток мышиных фибробластов L-929. Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) ФНО человека и мыши для белков CrmB ВНО и TNF-BD ВНО (В).

Кроме того, при сравнительной оценке влияния белков CrmB ВНО и TNF-BD ВНО на ФНО-индуцированную окислительно-метаболическую функцию лейкоцитов крови интактных мышей показано, что удаление хемокин-связывающего домена CrmB ВНО не приводит к потере способности укороченного негликозилированного TNF-BD ВНО нейтрализовать биологические эффекты ФНО (Таблица 2). Полученные данные позволяют рассматривать негликозилированный белок TNF-BD ВНО, полученный в бактериальной системе экспрессии, как возможную основу анти-ФНО-препаратов, поэтому следующим этапом работы стало изучение иммуногенных свойств укороченного ФНО-связывающего вирусного белка.

Таблица 2. Показатели мФНО-индуцированного хемилюминесцентного ответа лейкоцитов крови мышей под влиянием TNF-BD ВНО и CrmB ВНО.

№	Препарат	Концентрации блокаторов ФНО, нг/мл		
		4	10	50
1	мФНО+CrmB ВНО	4,06±0,08	3,11±0,06	2,74±0,06
2	мФНО+TNF-BD ВНО	3,95±0,08	2,88±0,06	2,45±0,05
3	мФНО, 2 нг/мл	4,66±0,09		
4	Без стимулятора	1,86±0,04		

Изучение иммуногенных свойств белка TNF-BD ВНО, полученного в прокариотической системе экспрессии

Показано, что удаление хемокин-связывающего домена белка CrmB ВНО привело к достоверному снижению гуморального иммунного ответа, по отношению к степени гуморального иммунного ответа на полноразмерный белок, что может положительно сказаться в дальнейшем при использовании укороченного варианта белка в терапевтических целях (Рисунок 6).

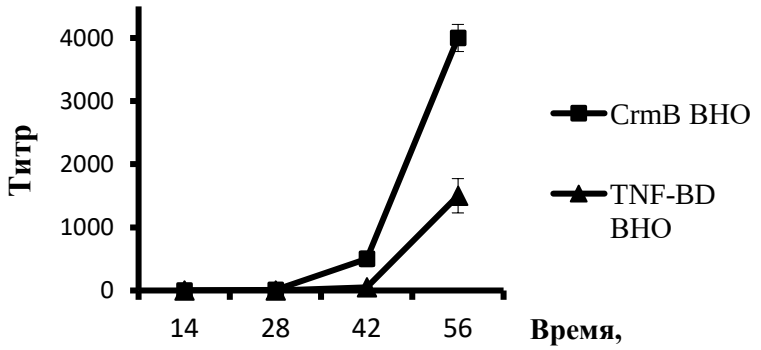

Рисунок 6. Титр сывороток, полученных после иммунизации животных белками CrmB ВНО и TNF-BD ВНО.

Однако, с целью оптимизации потенциального действующего вещества нового ФНО-блокатора далее была проведена работа, направленная на дальнейшее снижение иммуногенности белка TNF-BD ВНО. Добиться дополнительного снижения иммунного ответа к целевому белку возможно двумя способами: увеличением эффективности связывания белка с соответствующим лигандом и изменением способа доставки белка – применением подходов генной терапии.

Исследования эффективности взаимодействия вирусных ФНО-рецепторов с соответствующим лигандом

Решая вопрос, каким образом производить модификацию белка с целью изменению эффективности связывания белка с лигандом, прежде всего стоит обратить внимание на результат многолетней естественной вирусной эволюции, который в случае с белком CrmB выражен следующим образом – белок CrmB ВНО эффективно ингибирует ФНО мыши и человека, в то время как CrmB ВОК – только ФНО мыши. Изучение таких отличий является перспективным для выявления ключевых аминокислот обеспечивающих ФНО-нейтрализующий эффект.

Для этого проводили моделирование белок-белковых взаимодействий между TNF-BD ВНО и TNF-BD ВОК с ФНО человека биоинформатическими методами – оценивали свободную энергию образования молекулярных комплексов, с использованием метода непрерывного представления воды. Как можно видеть из рассчитанной суммарной свободной энергии взаимодействия (ΔG_{bind}), ФНО человека связывается сильнее с TNF-BD ВНО по сравнению с TNF-BD ВОК. Различия главным образом определяются различным вкладом от электростатических взаимодействий белков между собой (Таблица 3).

Таблица 3. Вклад отдельных энергетических термов в полную свободную энергию образования комплексов рецептор/лиганд.

	чФНО/TNF-BD ВОК	чФНО/TNF-BD ВНО
ΔE_{vdw} (ккал/моль)	-115,8	-113,1
ΔE_{el} (ккал/моль)	-438,06	-662,26
ΔE_{gas} (ккал/моль)	-553,86	-775,36
ΔG_{GB} (ккал/моль)	563	780
ΔG_{NP} (ккал/моль)	-14,81	-18,45
ΔG_{solv} (ккал/моль)	548,19	761,55
ΔG_{el} (ккал/моль)	124,94	117,74
ΔG_{bind} (ккал/моль)	-5,6	-13,81

ΔE_{vdv} – Ван-Дер-Ваальсовое взаимодействие; ΔE_{el} – электростатическое взаимодействие; ΔE_{gas} энергия взаимодействия в газовой фазе; ΔG_{GB} – полярное взаимодействие с растворителем; ΔG_{NP} – неполярное взаимодействие с растворителем, ΔG_{solv} – свободная энергия сольватации; ΔG_{bind} – суммарная свободная энергия взаимодействия.

Для проверки полученных результатов молекулярного моделирования белок-белковых взаимодействий нами была проведена работа по получению белка TNF-BD ВОК в прокариотической системе экспрессии и проведена оценка эффективности взаимодействия вирусных ФНО-рецепторов с ФНО мыши и человека методом поверхностного плазмонного резонанса (Таблица 4).

Таблица 4. Данные SPR-анализа эффективности взаимодействия вирусных рецепторов с ФНО человека и мыши.

ФНО-антагонист	**K_D, М ФНО человека**	**K_D, М ФНО мыши**
CrmB ВНО (выделенный из клеток Sf-21)	$2{,}48\times10^{-9}$	$3{,}62\times10^{-10}$
TNF-BD ВНО (выделенный из клеток *E.coli*)	$5{,}26\times10^{-10}$	$8{,}63\times10^{-10}$
CrmB ВОК (выделенный из клеток Sf-21)	$4{,}10\times10^{-9}$	$8{,}52\times10^{-10}$
TNF-BD ВОК (выделенный из клеток *E.coli*)	$6{,}46\times10^{-9}$	$1{,}16\times10^{-9}$

Полученные численные данные для комплексов TNF-BD ВОК / ФНО человека и TNF-BD ВНО / ФНО человека согласуются с полученными результатами моделирования. Кроме того, было показано, что комплекс CrmB ВОК с ФНО мыши является стабильнее комплекса CrmB ВНО / ФНО мыши. Данные различия, по-видимому, вызваны видоспецифичными аминокислотными заменами. Таким образом, можно заключить, что удаление хемокин-связывающего домена белка CrmB не снижает эффективность взаимодействия белка с ФНО. Вероятно, введение точечных мутаций в аминокислотную последовательность белка, позволит усилить

эффективность связывания белка с ФНО. Поэтому следующим этапом работы стало изучение выявленных видоспецифичных отличий между белками TNF-BD ВНО и TNF-BD ВОК.

Выбор вводимых аминокислотных замен был опосредован природными различиями в аминокислотных последовательностях белков CrmB ВНО и CrmB ВОК – в последовательность белка TNF-BD ВОК вводили замены, приближающие аминокислотную последовательность к последовательности TNF-BD ВНО (Рисунок 7).

```
TNF-BD BHO        1  MAPYTPPNGKCKDTEYKRHNLCCLSCPPGTYASRLCDSKTNT--QCTPCGSGTFTSRNNH  58
TNF-BD BOK        1  ...HA.S....-..N..N....-.-.-.........-.......NT..-............  60

TNF-BD BHO       59 LPACLSCNGRCNSNQVETRSCNTTHNRICECSPGYYCLLKGSSGCKACVSQTKCGIGYGV  118
TNF-BD BOK       61 ...........D.....................A............................  120

TNF-BD BHO       119 SGHTSVGDVICSPCGFGTYSHTVSSADKCEPVPRSHHHHHH   159
TNF-BD BOK       121 .....T...V.....L.........................   161
```

Рисунок 7. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей N-концевых частей белков CrmB ВНО (штамм India-1967) и CrmB ВОК (GRI-90). Методом направленного мутагенеза были получены точечные мутантные формы белка CrmB ВОК, приближающие первичную последовательность белка CrmB ВОК к белку CrmB ВНО (введенные мутации отображены зеленым). Красным отмечены цистеиновые остатки первого ЦБД.

При помощи метода сайт-направленного мутагенеза были получены 6 мутантных вариантов белка и оценена эффективность взаимодействия с ФНО мыши и человека методом поверхностного плазмонного резонанса. В отношении аффинности взаимодействия вирусных белков с ФНО человека, которая является более значимой в контексте применения белка для лечения заболеваний человека, замена S7P привела к значительному увеличению аффинности взаимодействия белка TNF-BD ВОК относительно ФНО человека и уменьшению аффинности взаимодействия с ФНО мыши в 2,5 раза (Таблица 5). Вероятно, наличие пролина в 7-ой позиции является значимым для проявления нейтрализующей активности вирусного белка в отношении ФНО человека, что ранее было подтверждено для бакуловирусных белков (Рисунок 2, замена S7P локализована в области PLAD-субдомена; замена PLAD-субдомена белка CrmB ВНО на PLAD-субдомен белка CrmB ВОК приводит к снижению способности такого варианта белка (относительно белка CrmB ВНО) ингибировать эффекты, вызванные ФНО, в то время как замена PLAD-субдомена белка CrmB ВОК на PLAD-субдомен белка CrmB ВНО приводит к обратному эффекту).

Таблица 5. Данные SPR-анализа эффективности взаимодействия мутантных вариантов белка TNF-BD BOK с ФНО человека и мыши.

	K_D*, M ФНО мыши	**K_D*, M ФНО человека**
TNF-BD BOK	$1{,}16\times10^{-9}$	$6{,}46\times10^{-9}$
TNF-BD BHO	$8{,}63\times10^{-10}$	$5{,}26\times10^{-10}$
TNF-BD BOK **delNT43-44 (Mut1)**	$8{,}82\times10^{-10}$	$9{,}59\times10^{-9}$
TNF-BD BOK **5A→T (Mut2)**	$5{,}53\times10^{-10}$	$6{,}61\times10^{-9}$
TNF-BD BOK **7S→P (Mut3)**	$2{,}46\times10^{-9}$	$8{,}70\times10^{-10}$
TNF-BD BOK **72D→N (Mut4)**	$9{,}50\times10^{-9}$	$7{,}71\times10^{-9}$
TNF-BD BOK **92A→S (Mut5)**	$6{,}92\times10^{-10}$	$5{,}47\times10^{-9}$
TNF-BD BOK **126T→V (Mut6)**	$7{,}43\times10^{-10}$	$7{,}71\times10^{-9}$

Далее для проверки данной гипотезы был проведен эксперимент по оценке способности нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО человека и мыши на культуре клеток мышиных фибробластов L-929 мутантного варианта белка TNF-BD BOK (S7P). По данным ингибирования цитотоксического действия ФНО человека и мыши 50 % гибель клеток наблюдается при добавлении 38-92 нг/мл мутантного варианта TNF-BD BOK (S7P), что свидетельствует о сохранении способность нейтрализовать эффекты, опосредованные ФНО *in vitro*, при введении вышеуказанной точечной замены. Однако, отсутствие дозозависимых различий при нейтрализации ФНО мыши и человека *in vitro* для укороченного белка TNF-BD BOK (S7P) в первую очередь может быть связан с отсутствием однозначной корреляции между концентрацией белка и количеством биологически активной формы белка. Так как получаемые в прокариотической системе белки синтезируются в нерастворимой форме, в обязательном порядке проводится рефолдинг, в результате которого не все белковые молекулы приобретают структуру, обладающую биологической активностью. Это затрудняет оценку биологической активности препарата и опосредует потери при производстве целевого продукта, обладающего ФНО-нейтрализующей активностью. Данный вопрос может быть решен двумя способами – биотехнологической оптимизацией производства белкового продукта или же применением подхода генной терапии. На следующем этапе данной работы нами был изучен вопрос возможности генотерапии ФНО-обусловленной патологии при введении плазмид, продуцирующих *in vivo* TNF-BD BHO.

Исследования терапевтического потенциала рекомбинантных молекул ДНК, содержащих ген, кодирующий TNF-BD ВНО

На первом этапе работы нами были сконструированы плазмидные ДНК на основе вектора pcDNA, содержащие последовательности, кодирующие полноразмерный белок CrmB ВНО, TNF-BD ВНО и GFP. Рекомбинантную плазмиду pcDNA/GFP получали с целью подтверждения наличия экспрессии генов, находящихся под контролем промотора плазмиды pcDNA3.1, так как отсутствовала достаточно чувствительная система детекции продукции целевых рекомбинантных вирусных белков *in vivo*. При внутримышечном введении мышам рекомбинантной плазмиды pcDNA/GFP через 3 сут обнаруживалась узкая полоска характерного для GFP зеленого свечения по ходу раневого канала (Рисунок 8). Через 7 сут после инъекции плазмиды pcDNA/GFP, зона зеленого свечения распространялась на значительное расстояние от места инъекции.

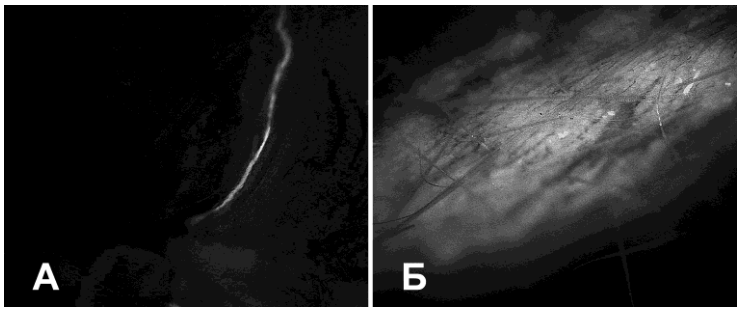

Рисунок 8. Нативные препараты мышц бедра. Флуоресцентная микроскопия. Продукция GFP в мышечной ткани на 3-и (А) и 7-е сутки (Б) после инъекции плазмиды pcDNA/GFP. Увеличение 200.

Анализ индукции синтеза антител против целевых белков при введении соответствующих плазмид или препаратов очищенных рекомбинантных белков (CrmB ВНО, TNF-BD ВНО, A30) показал, что после первой и второй внутримышечных инъекций с интервалом в две недели продукции специфичных антител ни для одного из изучаемых препаратов выявлено не было. После третьей инъекции выраженный иммунный ответ детектировали для группы мышей, иммунизированных рекомбинантным белком CrmB ВНО (Рисунок 9). Для остальных групп мышей не выявили достоверное отличие титров антител к целевым белкам по сравнению с контролем. После четвертой инъекции наряду с увеличенным уровнем антител против белка CrmB ВНО, выраженный специфичный иммунный ответ выявили также для мышей, иммунизированных рекомбинантными белками A30 и TNF-BD ВНО.

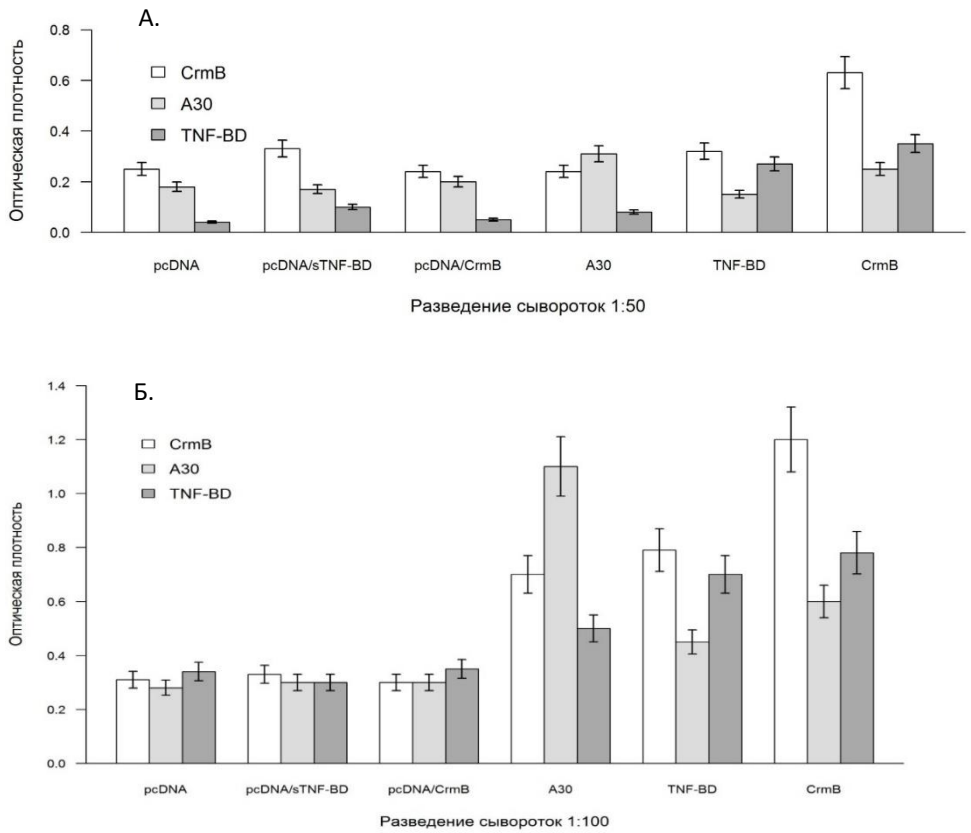

Рисунок 9. Сравнение методом ИФА сывороток, полученных от животных, иммунизированных препаратами плазмидных ДНК (pcDNA3.1, pcDNA/TNF-BD BHO, pcDNA/CrmB BHO) или белков (A30, TNF-BD BHO, CrmB BHO). По горизонтальной оси приведены данные для сывороток различных групп мышей. Столбиками разного цвета показаны данные анализов для разных белков, сорбированных на планшет для ИФА. А: результаты ИФА сывороток, полученных после 3 иммунизаций. Б: результаты ИФА сывороток, полученных после 4-й иммунизации.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при помощи метода ИФА специфический иммунный ответ против целевых белков при многократной инъекции терапевтических доз рекомбинантных плазмид (pcDNA/TNF-BD BHO, pcDNA/CrmB BHO, pcDNA3.1) не детектируется, в то время как для рекомбинантных белков он обнаруживается уже после 3-4-й иммунизации, что может затруднять длительное применение последних.

Так как в предыдущих исследованиях белок TNF-BD BHO проявил себя в качестве наиболее перспективной основы для создания терапевтических препаратов, дальнейшая работа по оценке терапевтического потенциала рекомбинантным молекул ДНК была проведена для pcDNA/TNF-BD BHO. Терапевтический потенциал оценивали на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс. Было выделено 3 группы животных, из них две экспериментальные группы, которым вводилась либо целевая плазмида (pcDNA/TNF-BD BHO), либо вектор. Терапевтический эффект оценивали при помощи метода световой микроскопии

путем оценки проявления гистопатологических изменений в тканях околосуставной сумки и суставной поверхности задних конечностей крыс, характерных для развития РА. Для этого на 41 сут от начала эксперимента животных выводили из эксперимента.

Тяжесть заболевания оценивали по 4 признакам: наличие воспалительной реакции в тканях суставной сумки, степень выраженности синовита (образование паннуса), эрозия хрящевой ткани и деструкция суставной поверхности кости.

Выполненный анализ показал, что тяжесть гистопатологических изменений суставов задних конечностей крыс наиболее выражена у животных с коллаген-индуцированным артритом, которым вводили контрольную векторную плазмиду pcDNA3.1 – наблюдается поражение костных структур. Существенно меньшие гистопатологические изменения суставов обнаружены в группе крыс с коллаген-индуцированным артритом, которым инъецировали рекомбинантную плазмиду, содержащую ген, кодирующий TNF-BD BHO – развитие патологического процесса в основном ограничивается разрушением суставного хряща (Рисунок 10).

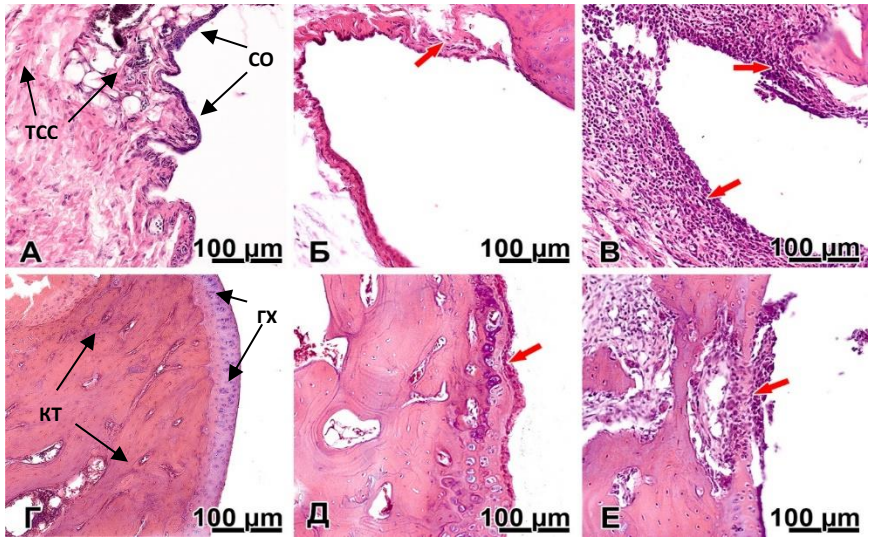

Рисунок 10. Гистологические срезы суставных сумок (А, Б, В) и суставных поверхностей (Г, Д, Е) задних конечностей крыс. А, Г – интактные животные; Б, Д – животные с коллаген-индуцированным артритом, инъецированные плазмидой pcDNA/TNF-BD BHO; В, Е - животные с коллаген-индуцированным артритом, инъецированные плазмидой pcDNA3.1. Окраска гематоксилином и эозином. Бар указан на снимках. СО – синовиальная оболочка, ТСС – ткани суставной сумки, ГХ – гиалиновый хрящ; КТ – костная ткань. А – синовиальная оболочка без патологии; Б – умеренно выраженный отек и инфильтрация единичными лимфоцитами тканей околосуставной сумки, пролиферация синовиоцитов (указано красной стрелкой); В – выраженная диффузная лимфоцитарно-гранулоцитарная инфильтрация тканей околосуставной сумки, пролиферация и гипертрофия синовиоцитов, образование паннуса (указано красной стрелкой). Г – суставной хрящ без патологии; Д – пролиферирующая грануляционная ткань (паннус) «наползает» на суставной хрящ и разрушает его поверхностный слой (указано красной стрелкой); Е – на большом

участке суставной хрящ разрушен, локальное повреждение кортикального слоя в области эпифиза кости (указано красной стрелкой).

Таким образом, выполненные исследования демонстрируют потенциальную возможность генотерапии РА при локальном введении рекомбинантной плазмиды, направляющей синтез TNF-BD ВНО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) – широко распространенное заболевание, характеризующееся неуклонно прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, приводящее к ранней потере трудоспособности и сокращению продолжительности жизни [Насонов, 2003]. Согласно современным представлениям, именно цитотоксическими эффектами ФНО обусловлены основные проявления заболевания, в том числе поражения хряща и кости. В настоящее время от него страдают около 57 млн. человек по всему миру [Stoll and Yasothan, 2009].

На российском рынке полностью отсутствуют антиревматоидные препараты отечественного производства. Потребность в препаратах для лечения РА удовлетворяется дорогостоящими препаратами иностранного производства. Данные препараты не являются доступными для всех групп населения, поскольку средняя стоимость лечения одного больного РА дорогостоящими генно-инженерными препаратами достигает 10-15 тысяч долларов в год.

Суммируя результаты работы по получению и изучению свойств белка CrmB ВНО с удаленным хемокин-связывающим доменом можно заключить, что такой укороченный вариант белка TNF-BD, полученный в эукариотической системе экспрессии, сохраняет способность эффективно нейтрализовать биологические эффекты, опосредованные ФНО *in vitro* и *in vivo*. Ввиду того, продукция целевого ФНО-связывающего вирусного белка в культуре клеток насекомых является дорогостоящей, был получен укороченный вариант вирусного белка без хемокин-связывающего домена в клетках *E.coli*. Укороченный белок TNF-BD ВНО также сохраняет способность ингибировать действие ФНО *in vitro*, при этом с высокой аффинностью связывает ФНО человека и мыши. Свободная энергия образования комплексов с ФНО человека, в которых участвует TNF-BD ВНО, превосходит энергию комплексов, в которых участвует TNF-BD ВОК.

Описанные ранее отличия между способностью CrmB ВНО и CrmB ВОК нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО различной видовой принадлежности (CrmB ВНО эффективно ингибирует действие ФНО человека и мыши, в то время как CrmB ВОК эффективно ингибирует действие ФНО мыши, но не человека) позволили при помощи методов сайт направленного мутагенеза установить значимость пролина в 7-ой позиции для проявления ФНО-нейтрализующей активности белка TNF-BD ВНО относительно ФНО человека.

Кроме того, нами показано, что TNF-BD ВНО обладает сниженной иммуногенностью относительно полноразмерного белка CrmB ВНО.

Иммуногенность препаратов является основной причиной вторичной неэффективности лечения анти-ФНО препаратами. Белок TNF-BD ВНО может стать аналоговым препаратом по отношению к выпускаемым зарубежным препаратам на основе антител и клеточного рецептора ФНО [Kaymakcalan *et al.*, 2009].

Для снижения иммуногенности потенциальной основы ФНО-блокаторов нами был изменен способ доставки целевого белка, а именно была создана рекомбинантная плазмидная ДНК, содержащая ген, кодирующий TNF-BD ВНО. Было показано, что существенно меньшие гистопатологические изменения суставов обнаружены в группе крыс с коллаген-индуцированным артритом, которым инъецировали рекомбинантную плазмиду, содержащую ген, кодирующий TNF-BD ВНО. Кроме того, на мышах показано, что при многократной инъекции терапевтической дозы рекомбинантной плазмидной ДНК, кодирующей TNF-BD ВНО, специфический иммунный ответ против целевого белка не детектируется.

На основании полученных нами экспериментальных данных для белка TNF-BD ВНО можно заключить, что TNF-BD ВНО является перспективной основой для создания новых анти-ФНО препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что рекомбинантный двухдоменный белок CrmB ВНО, полученный в бакуловирусной системе экспрессии, при многократном введении мышам обладает высокой иммуногенностью, что существенно снижает его терапевтический потенциал.
2. Показано, что удаление N-концевого ФНО-связывающего домена, как и удаление PLAD-субдомена приводит к потере способности белка CrmB ВНО нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО человека на культуре клеток мышиных фибробластов L-929.
3. Впервые показано, что удаление С-концевого хемокин-связывающего домена белка CrmB ВНО не приводит к потере укороченным вариантом белка TNF-BD, синтезированным в бакуловирусной системе экспрессии, способности ингибировать биологические эффекты ФНО *in vitro* (нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО человека и мыши на культуре клеток мышиных фибробластов L-929) и *in vivo* (увеличивать выживаемость животных на фоне ЛПС-индуцированного эндотоксического шока).
4. Впервые получен продуцент рекомбинантного белка TNF-BD ВНО на основе бактерии *Escherichia coli*. Показано, что данный белок сохраняет способность *in vitro* нейтрализовать цитотоксическое действие ФНО мыши и человека, при этом обладает сниженными иммуногенными свойствами относительно полноразмерного белка CrmB ВНО при многократной инъекции мышам.
5. Выявлены значимые отличия между K_D для CrmB белков разных ортопоксвирусов по отношению к ФНО различной видовой принадлежности: комплекс CrmB ВОК с ФНО мыши является стабильнее комплекса CrmB ВНО.

Пролин в 7-ой позиции значим для проявления ФНО-нейтрализующей активности белка TNF-BD относительно ФНО человека.

6. Методом ИФА показано, что многократная инъекция рекомбинантных плазмид pcDNA/TNF-BD и pcDNA/CrmB не приводит к индукции детектируемого уровня антител к целевым белкам, кодируемым этими плазмидами.

7. Впервые на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс показана возможность генотерапии такой патологии при двукратном внутримышечном введении рекомбинантной плазмидной ДНК pcDNA/TNF-BD.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Непомнящих Т.С., **Трегубчак Т.В.**, Якубицкий С.Н., Таранов О.С., Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. Кандидатные антиревматические плазмидные конструкции обладают низкой иммуногенностью // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21, № 3. – С. 317-322.

2. Щелкунов С.Н., Таранов О.С., **Трегубчак Т.В.**, Максютов Р.А., Силков А.Н., Нестеров А.Е., Сенников С.В. Генотерапия коллагениндуцированного артрита крыс при внутримышечном введении плазмиды, кодирующей TNF-связывающий домен белка CrmB вируса натуральной оспы // Доклады Академии Наук. – 2016. – Т. 469. – № 4. – С. 504-507.

3. **Tregubchak T.V.**, Nepomnyashchikh T.S., Shchelkunov S.N. Shekhovtsov S.V., Peltek S.E., Kolchanov N.A. TNF-Binding domain of the variola virus CrmB protein synthesized in Escherichia coli cells effectively interacts with human TNF. Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2015. – V.462. – № 1. – P.176-180.

4. Ivanisenko N.V., **Tregubchak T.V.**, Saik O.V., Ivanisenko V.A., Shchelkunov S.N. Exploring interaction of TNF and orthopoxviral CrmB protein by surface plasmon resonance and free energy calculation // Protein and Peptide Letters. – 2014. – V. 21 (12). – P. 1273-1281.

5. Tsyrendorzhiev D.D., Orlovskaya I.A., Sennikov S.V., **Tregubchak T.V.**, Gileva I.P., Tsyrendorzhieva M.D., Hchelkunov S.N. Biological effects of individually synthesized TNF-binding domain of variola virus CrmB protein // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – V. 157. – № 2. – P. 249-252.

Патент

Трегубчак Т.В., Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Щелкунов С.Н. Рекомбинантные плазмидные ДНК pQE-60-TNFR-CrmB-Ind-67 и pFastBac1-G2R-dSECRET, содержащие фрагмент генома вируса натуральной оспы, кодирующий фактор некроза опухолей связывающий домен белка CrmB и штамм бакуловируса Bv/G2R-dSECRET, продуцирующий секретируемый ФНО-связывающий белок CrmB вируса натуральной оспы с делетированным SECRET-доменом // Патент ЕА № 2471869 от 10.01.2013 г.