Кандидатные антиревматические плазмидные конструкции обладают низкой иммуногенностью

Т.С. Непомнящих, Т.В. Трегубчак, С.Н. Якубицкий, О.С. Таранов, Р.А. Максютов, С.Н. Щелкунов ✉

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская область, Россия

Ревматоидный артрит (РА) – тяжелое системное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита и внесуставными проявлениями. При РА разрушаются хрящевые поверхности суставов, наблюдаются дегенеративные изменения подхрящевой костной ткани, нарушается подвижность суставов, происходит их деформация. РА страдает около 1 % человеческой популяции. Эффективный способ лечения РА – биологическая терапия с помощью рекомбинантных белков-антагонистов воспалительных цитокинов. Наиболее широко в клинической практике используют ингибиторы фактора некроза опухолей (TNF – tumor necrosis factor) – рекомбинантные TNF-рецепторы и антитела к TNF. Однако эти методы лечения не лишены побочных эффектов. Отмечается повышенная восприимчивость пациентов к инфекционным заболеваниям, увеличивается риск развития онкологических и аутоиммунных патологий. Кроме того, часто происходит снижение эффективности лечения из-за развития иммунного ответа на терапевтический белок. Побочные эффекты связаны с регулярным системным введением больших доз рекомбинантного белка, одним из способов решения этой проблемы может стать генная терапия. Основой новых генотерапевтических препаратов для лечения РА и других заболеваний человека могут стать гены различных вирусов, кодирующие разные иммуномодулирующие белки. Поксвирусы обладают беспрецедентным по сравнению с вирусами других семейств набором генов, продукты которых эффективно модулируют защитные функции организма хозяина. В частности, в геномах ортопоксвирусов есть гены, кодирующие TNF-связывающие белки. Ранее в различных лабораторных моделях было показано, что рекомбинантный TNF-связывающий белок CrmB является эффективным блокатором TNF. Эффективность лечения может снижаться из-за развития иммунного ответа на терапевтический белок, поэтому такие препараты должны обладать низкой иммуногенностью. В настоящей работе показано, что кандидатные антиревматические генотерапевтические плазмидные конструкции, кодирующие поксвирусный TNF-связывающий белок, обладают гораздо меньшей иммуногенностью по сравнению с белковыми препаратами.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; иммуногенность; генотерапия; ортопоксвирусный TNF-связывающий белок.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

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;21(3):317-322. DOI 10.18699/VJ17.249

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Nepomnyashchikh T.S., Tregubchak T.V., Yakubitskiy S.N., Taranov O.S., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions have low immunogenicity. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(3):317-322. DOI 10.18699/VJ17.249

УДК 616.72-002.77:577.21
Поступила в редакцию 03.05.2016 г.
Принята к публикации 19.07.2016 г.
© АВТОРЫ, 2017

✉ e-mail: snshchel@vector.nsc.ru

Candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions have low immunogenicity

T.S. Nepomnyashchikh, T.V. Tregubchak, S.N. Yakubitskiy, O.S. Taranov, R.A. Maksyutov, S.N. Shchelkunov ✉

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

Rheumatoid arthritis (RA) is a serious systemic disease of connective tissue, mainly affecting joints but also with different extra-articular manifestations. In the course of RA the degenerative changes occur in cartilage surfaces of affected joints and also in subchondral bone tissue, joints get deformed and lose their mobility. RA affects about 1 % of the global human population. Biological therapy with recombinant protein inhibitors of inflammatory cytokines is an effective and well-accepted treatment of RA. TNF inhibitors such as recombinant receptors or monoclonal antibodies are the most widely used biotherapeutics in clinical practice. However, this treatment has some serious side effects. The patients treated with TNF inhibitors are more susceptible to infection diseases, they are also at higher risk of developing neoplastic or autoimmune disorders. Biotherapeutics become less effective or even lose their efficiency with evoking specific antidrug antibodies. These drawbacks are in general associated with repeated systemic injections of large amounts of recombinant protein required to achieve the therapeutic efficacy. Genetic therapy might provide a good and effective solution. Viral genes coding for immunomodulatory factors could be used to create new gene therapy products to treat RA and other human disease. Poxviruses, as compared to other viral families, have an unprecedentedly rich set of such immunomodulatory genes. In particular, they have genes encoding TNF-binding proteins. Previously in a variety of laboratory models we have shown that recombinant TNF-binding protein CrmB can effectively block TNF. In this work we demonstrated that candidate antirheumatic genotherapeutic plasmid constructions encoding poxviral TNF-binding proteins have low immunogenicity.

Key words: rheumatoid arthritis, immunogenicity, genotherapy, ortopoxviral TNF-binding protein.

Ревматоидный артрит (РА) – системное аутоиммунное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего эрозивно-деструктивного полиартрита и внесуставными проявлениями. РА страдает около 1 % человеческой популяции. При отсутствии лечения (неоптимальном лечении) разрушаются хрящевые поверхности суставов, отмечаются дегенеративные изменения подхрящевой костной ткани – нарушается подвижность суставов, происходит их деформация (Brasington et al., 2010).

При терапии РА основными мишенями являются воспалительные цитокины, и прежде всего фактор некроза опухолей (TNF), один из основных медиаторов этого заболевания. Наиболее распространенная и эффективная стратегия биологической терапии – использование препаратов на основе антител к TNF (адалимумаб, инфликсимаб) или растворимого TNF-рецептора (этанерцепт) (Venkatesha et al., 2015). Однако биологическая терапия имеет ряд недостатков: повышается восприимчивость пациентов к инфекционным заболеваниям, увеличивается риск развития онкологических и аутоиммунных патологий (Lee et al., 2010; Sfikakis, Tsokos, 2011), требуется многократное системное введение больших доз рекомбинантного белка (Lee et al., 2010; Evans et al., 2013; Drutskaya et al., 2014). Поэтому в настоящее время актуальна разработка методов генной терапии, основанной на введении терапевтических генов. Один из способов доставки – введение плазмид, содержащих гены, кодирующие иммуномодулирующие белки (Li, Huang, 2006; Непомнящих и др., 2016).

Вирусы в процессе своей эволюции выработали различные стратегии преодоления защитных реакций организма хозяина. Поксвирусы обладают беспрецедентным, по сравнению с вирусами других семейств, набором генов, продукты которых эффективно модулируют многочисленные защитные функции организма хозяина (Shchelkunov, 2012; Shchelkunova, Shchelkunov, 2016). В частности, ортопоксвирусы детерминируют синтез белка CrmB, состоящего из двух доменов: N-концевого, связывающего TNF, и С-концевого, связывающего хемокины. В различных лабораторных моделях показано, что рекомбинантный белок CrmB (47 кДа) можно использовать в качестве эффективного блокатора TNF (Гилева и др., 2006; Gileva et al., 2006, 2015; Цырендоржиев и др., 2013, 2014). Однако препараты для терапии заболеваний должны обладать низкой иммуногенностью, поскольку выявлено, что эффективность лечения может снижаться из-за развития иммунного ответа на терапевтический белок (Krieckaert et al., 2012; Bendtzen et al., 2015; Chen et al., 2015; Eng et al., 2015). Показано, что синтезированный в бактериальных клетках укороченный TNF-BD (17 кДа) эффективно связывается с человеческим TNF и обладает меньшей по сравнению с CrmB иммуногенностью при многократном введении лабораторным животным (Трегубчак и др., 2015).

Целью данной работы было изучение индукции иммунного ответа при внутримышечном введении плазмид pcDNA-CrmB или pcDNA/sTNF-BD, кодирующих полноразмерный TNF-связывающий белок CrmB вируса натуральной оспы (variola virus, VARV) или его укороченный вариант, содержащий только N-концевой TNF-рецепторный домен, по сравнению с введением препаратов соответствующих рекомбинантных белков.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и культуры клеток. Штамм *E. coli* XL2Blue, линии клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 и мышиных фибробластов L929 получены из коллекции культур микроорганизмов и культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор». Линию клеток CV-1 культивировали в среде DMEM («БиолоТ», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров («БиолоТ», Россия). Для культуральных работ использовали шестилуночные планшеты фирмы Orange Scientific (США).

Рекомбинантные белки. В работе использовали белок CrmB VARV, выделенный с помощью аффинной хроматографии из культуральной среды клеток Sf-21, зараженных рекомбинантным бакуловирусом (Лебедев и др., 2001); TNF-BD (Трегубчак и др., 2015) и вирионный белок A30 VARV (Разумов и др., 2005), синтезированные в клетках *E. coli* и выделенные с использованием Ni-NTA агарозы согласно рекомендациям фирмы-изготовителя (QIAGEN, Германия). Качество очистки белков определяли с помощью электрофореза в ПААГ. Концентрацию белков определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976). Для полученных препаратов рекомбинантных белков CrmB и TNF-BD подтверждена их способность нейтрализовать цитотоксическое действие TNF человека и мыши на культуре клеток L929, как описано в (Gileva et al., 2006).

Рекомбинантные плазмиды. Рекомбинантные плазмиды pcDNA/CrmB, pcDNA/sTNF-BD и pcDNA/GFP получали встраиванием последовательностей ДНК, кодирующих белки CrmB, TNF-BD или GFP, в плазмиду pcDNA3.1. Структуру созданных плазмид подтверждали секвенированием.

Полученными рекомбинантными плазмидами или векторной плазмидой pcDNA3.1 трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL2Blue и культивировали при эффективной аэрации и температуре 37 ºС, 15 ч. Очистку рекомбинантных плазмидных ДНК из полученных культур производили при помощи набора EndoFree Plasmid Giga Kit фирмы QIAGEN (Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Животные. В экспериментах использовали мышей линии BALB/c, самок, возраст 6 нед, массой 16–18 г, полученных из вивария ГНЦ ВБ «Вектор». Их содержали при естественном световом режиме и постоянном доступе к воде и пище. Животных содержали и выводили из эксперимента в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1968).

Трансфекция культуры клеток CV-1. Клетки линии CV-1 культивировали, как описано выше, до формирования клеточного монослоя на 80–85 % поверхности лунки. Смешивали 2 мкг плазмиды pcDNA/GFP с 15 мкл липофектамина (Invitrogen, США) в концентрации 1 мг/мл, добавляли 1 мл среды DMEM и оставляли на 15 мин при комнатной температуре, затем наносили на монослой клеток, предварительно дважды промытый средой DMEM

без сыворотки. Через 5 ч удаляли среду, клетки заливали средой DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки коров и инкубировали при 37 °С в течение 48 ч. В качестве контроля использовали нетрансфецированные клетки. Продукцию GFP анализировали в клетках CV-1 путем визуализации в проходящем ультрафиолетовом свете.

Микроскопическое исследование проводили с помощью исследовательского микроскопа AxioImager A1 (ZEISS, Германия), оснащенного цифровой камерой высокого разрешения HRC, флуоресцентным блоком и системой анализа изображения AxioVision Rel. 4.8.2., включая модуль многоканальной флуоресценции Multidimensional Acquisition. Использовали набор фильтров: EXBR 450-490, BSFT 510, EMLP 515. Объективы EC Plan Neofluar: ×10, ×20, ×40.

Иммунизация животных. Полученными препаратами рекомбинантных плазмид или белков иммунизировали мышей. Животные были разбиты на шесть групп по типу вводимого препарата: первой группе (контрольной) вводили плазмидную ДНК pcDNA3.1; второй – pcDNA/sTNF-BD; третьей – pcDNA/CrmB; четвертой – белок A30; пятой – белок TNF-BD; шестой – белок VARV-CrmB. Использовано по шесть животных на группу. Перед иммунизацией проводили контрольный забор крови из ретроорбитального синуса. Количество препарата для белков брали из расчета 5 мкг/мышь, плазмидной ДНК – 100 мкг/мышь. Препараты в объеме 100 мкл вводили внутримышечно в правую заднюю лапу. Иммунизацию проводили с интервалом 14 сут. Всего проведено четыре последовательные иммунизации.

Через 12 сут после каждой иммунизации забирали кровь из ретроорбитального синуса у шести животных из каждой группы и отделяли сыворотку.

Иммуноферментный анализ (ИФА) концентрации антител против рекомбинантных вирусных белков проводили в 96-луночных планшетах (Costar). Белки VARV-CrmB, TNF-BD или A30 с концентрацией 1 мкг/мл сорбировали на дно лунок при температуре 4 °С в течение 16 ч. Далее планшет промывали три раза буфером PBS в сочетании с Твин 20 (PBST). В каждую лунку вносили по 100 мкл 0.5 % БСА в PBST, инкубировали при комнатной температуре 2 ч. Содержимое лунок удаляли, затем наносили по 100 мкл двукратных разведений полученных сывороток (от 1 : 2 до 1 : 256) в PBST, содержащем 0.5 % БСА, и инкубировали при температуре 37 °С в течение одного часа. Анализировали смесь иммунной сыворотки, полученной от шести животных каждой группы. Далее жидкость из лунок удаляли и лунки три раза промывали PBST. Затем в лунки вносили по 100 мкл конъюгата пероксидазы хрена с антителами козы против иммуноглобулинов мыши (разведение 1 : 5000, Bio-Rad), разбавленного 0.5 % БСА в PBST, и инкубировали при температуре 37 °С в течение одного часа. Затем жидкость из лунок удаляли, лунки три раза промывали буфером PBST, добавляли в каждую лунку по 100 мкл проявляющего раствора и инкубировали в темноте при комнатной температуре 30 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 100 мкл 1 н HCl. Интенсивность окрашивания определяли, измеряя оптическую плотность при длине волны 495 нм. В качестве контроля неспецифического связывания использовали лунки, в которых вместо изучаемых белков был сорбирован БСА.

Статистический анализ. Сравнение групп проводили с помощью двустороннего *t*-теста Стьюдента для зависимых (сравнение сывороток одной группы животных при сорбции разных белков) или независимых выборок (сравнение сывороток, полученных от животных из различных групп). Коррекцию на множественное тестирование проводили по методу Беньямини–Хохберга (FDR-коррекция). Достоверными считались отличия при корректированном значении $p < 0.05$.

Результаты

Анализ синтеза белка GFP, направляемого плазмидой pcDNA-GFP, *in vitro* и *in vivo.* Для подтверждения возможности продукции рекомбинантных белков, гены которых встроены в вектор pcDNA3.1, проводили трансфекцию клеток линии CV-1 плазмидой pcDNA/GFP, как указано в разделе Материалы и методы. Продукция GFP была показана в клетках CV-1 путем визуализации в проходящем ультрафиолетовом свете.

Далее определяли экспрессию гена белка GFP в векторе pcDNA3.1 *in vivo*. Для этого сформировали две группы по шесть животных. Мышам первой группы вводили внутримышечно в дозе 100 мкг/мышь плазмиду pcDNA/GFP; второй (контрольной) группы – плазмиду pcDNA3.1. Через 3 и 7 сут после инъекции трех животных из каждой группы выводили из эксперимента, изготавливали нативные препараты мышцы бедра (место введения), которые анализировали с помощью люминесцентного микроскопа.

Через 3 сут обнаруживалась узкая полоска характерного для GFP зеленого свечения по ходу раневого канала (рис. 1, *а*). Через 7 сут после инъекции плазмиды pcDNA/GFP зона зеленого свечения распространялась на значительное расстояние от места инъекции (рис. 1, *б*). У мышей контрольной группы свечение не обнаружено.

Анализ иммуногенности рекомбинантных плазмид и белков. Иммунизировали мышей препаратами векторной плазмиды pcDNA3.1, рекомбинантных плазмид pcDNA/sTNF-BD, pcDNA/CrmB, рекомбинантных белков A30, TNF-BD или VARV-CrmB. Количество специфических антител в полученных сыворотках определяли с помощью ИФА. Анализировали смесь иммунной сыворотки, полученной от шести животных каждой группы.

После первой и второй иммунизации не было достоверного отличия концентрации антител к целевым белкам по сравнению с контрольными сыворотками, полученными до иммунизации.

После третьей иммунизации специфический иммунный ответ был выявлен только для мышей, которым вводили рекомбинантный белок CrmB (рис. 2, *а*). После четвертой иммунизации концентрация антител на белок CrmB увеличилась (см. рис. 2, *б*). Кроме того, менее выраженный специфичный иммунный ответ обнаружен после четвертой иммунизации у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками A30 и TNF-BD (см. рис. 2, *б*). Для остальных групп мышей не показано достоверное отличие концентраций антител к целевым белкам по сравнению с контролем.

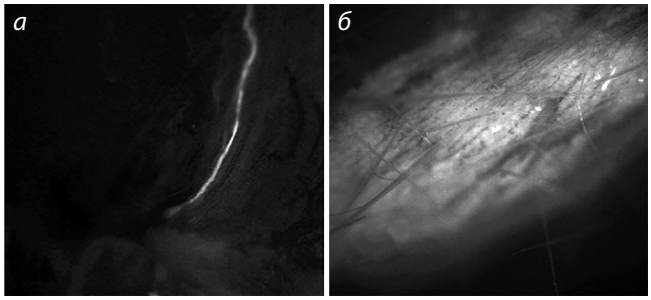

Рис. 1. Нативный препарат мышцы бедра.

Флуоресцентная микроскопия. Экспрессия GFP в мышечной ткани на 3-и (*а*) и 7-е сут (*б*) после инъекции плазмиды pcDNA-GFP. ×200.

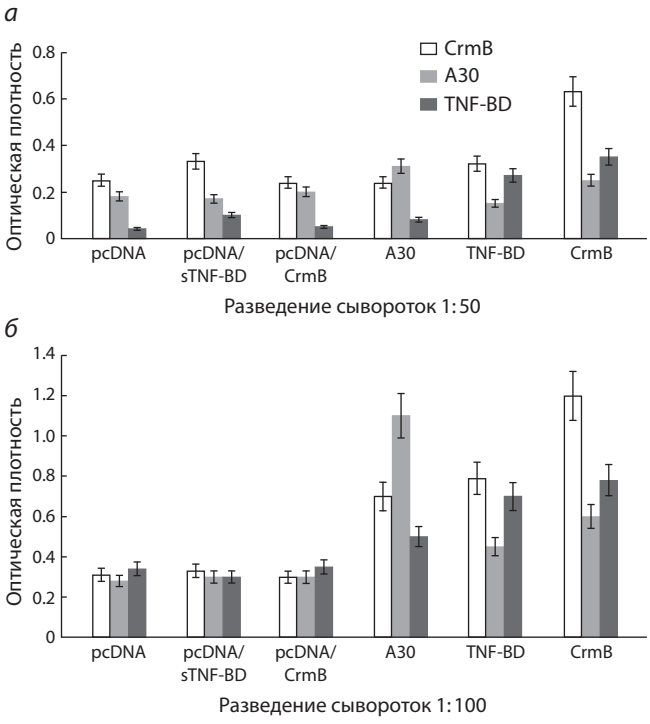

Рис. 2. Сравнение методом ИФА сывороток, полученных от животных, иммунизированных препаратами плазмидных ДНК или белков.

По оси *X* приведены данные для сывороток различных групп мышей. pcDNA – иммунизация проводилась векторной плазмидой без вставки (отрицательный контроль); pcDNA/sTNF-BD – векторной плазмидой со вставкой гена, кодирующего TNF-связывающий домен белка VARV-CrmB; pcDNA/CrmB – с геном, кодирующим полноразмерный белок CrmB; A30 – препаратом высокоиммуногенного оболочечного белка A30 ВНО (положительный контроль); TNF-BD – препаратом TNF-связывающего домена белка CrmB; CrmB – препаратом полноразмерного TNF-связывающего белка CrmB. Столбиками показаны средние значения оптической плотности и значения ошибки среднего, полученные при сорбции на планшеты для ИФА препаратов разных белков. Представлены результаты, полученные после третьей (*а*) и четвертой (*б*) иммунизации.

Обсуждение

Цитокины – ключевые модуляторы воспалительных и иммунных реакций – играют центральную роль в развитии воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидного артрита. Одним из основных медиаторов патогенеза этих заболеваний является TNF (Непомнящих и др., 2016). В настоящее время биологическая терапия с помощью антагонистов TNF успешно используется для лечения ревматоидного артрита, в том числе и в виде монотерапии (Karampetsou et al., 2010).

Несмотря на высокую эффективность биологической терапии, в последнее время все больше исследователей задаются вопросами ее безопасности. У пациентов, принимающих анти-TNF препараты, возрастает риск развития серьезных легочных и кожных инфекций; иногда наблюдаются различные аутоиммунные заболевания, отмечается более высокая частота лимфом (Lee et al., 2010; Sfikakis, Tsokos, 2011). Побочные эффекты терапии белковыми антагонистами цитокинов обусловлены в значительной степени ее системным характером. Для достижения лечебного эффекта требуются большие дозы терапевтического белка, необходимы повторные инъекции (Lee et al., 2010; Evans et al., 2013; Drutskaya et al., 2014).

Кроме того, отмечено образование антител против биотерапевтических молекул. На примере адалимумаба и этанерцепта при лечении ревматоидного артрита показано, что уровень таких антител обратно коррелирует с эффективностью терапии и уровнем биотерапевтических молекул в сыворотке пациентов (Krieckaert et al., 2012; Chen et al., 2015). Показано, что в присутствии специфических антител инфликсимаб слабо детектируется в сыворотке пациентов (Eng et al., 2015). Несмотря на то что ненейтрализующие антитела не связываются с активным сайтом биотерапевтической молекулы и не препятствуют ее связыванию с лигандом, они могут способствовать ее эндоцитозу и деградации, снижая, таким образом, эффективность терапии (Bendtzen et al., 2015). Кроме того, отмечены случаи и серьезных аллергических реакций (Schellekens, 2002; Shankar et al., 2007; Vincent et al., 2013). Нейтрализующие антитела могут реагировать и с эндогенными белками, приводя к развитию системных патологий (Li et al., 2001; Casadevall et al., 2002). Таким образом, нежелательная иммуногенность может стать серьезным препятствием на пути создания биотерапевтических препаратов (Pineda et al., 2016).

Перспективным направлением лечения аутоиммунных заболеваний является развитие генной терапии. Генная терапия обладает рядом преимуществ по сравнению с биологической терапией белковыми препаратами: обеспечивается стабильная долговременная экспрессия терапевтического гена; целевой белковый продукт концентрируется в месте патологии и минимизируются системные побочные эффекты (Evans, Robbins, 1999). При экспрессии терапевтического гена непосредственно в месте введения для достижения терапевтического эффекта потребуется гораздо меньшая концентрация белка, чем при инъекции рекомбинантного белка (Bandara al., 1993; Gouze et al., 2003; Kim et al., 2003); отпадает необходимость повторных инъекций.

В модели коллаген-индуцированного артрита у крыс нами недавно была показана возможность генной терапии этого заболевания в результате двукратного внутримышечного введения рекомбинантной плазмиды pcDNA/sTNF-BD, кодирующей TNF-BD белка CrmB вируса натуральной оспы (Щелкунов и др., 2016).

Известно, что один из ключевых факторов, определяющих эффективность генной терапии, – иммуногенность продукта трансгена. Так, в экспериментах на крысах с использованием рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, кодирующих IL-1Ra или GFP, было показано, что целевой продукт у иммунокомпетентных животных не детектируется уже через 21 сут, в то время как у бестимусных животных он обнаруживался на протяжении по крайней мере 5 мес. (Gouze et al., 2007). Известно, что иммуногенность рекомбинантных плазмидных векторов существенно ниже, чем у рекомбинантных вирусов (Li, Huang, 2006).

Целью данной работы было изучение индукции гуморального иммунного ответа на терапевтические TNF-связывающие белки при введении терапевтически эффективных доз препаратов этих рекомбинантных белков (Gileva et al., 2006) или рекомбинантных плазмид, кодирующих данные белки (Щелкунов и др., 2016).

Иммуногенность рекомбинантных белков VARV-CrmB и TNF-BD проверяли относительно вирионного поксвирусного белка A30, используемого в данном случае в качестве контроля. A30 – белок, необходимый для слияния мембран вируса и клетки, индуцирует синтез B-клетками вируснейтрализующих антител (Разумов и др., 2005) и является одним из ключевых антигенов, вызывающих иммунный ответ, при попадании вируса в организм. Выбор белка A30 как контроля в данном эксперименте обусловлен тем, что для него показана высокая иммуногенность (Sakhatskyy et al., 2008).

Плазмида pcDNA3.1 – эффективный вектор для продукции целевых белков *in vivo*. На его основе нами были созданы рекомбинантные плазмиды pcDNA/TNF-BD и pcDNA/CrmB.

Поскольку отсутствовала достаточно чувствительная система детекции продукции целевых рекомбинантных вирусных белков *in vivo*, нами выполнены эксперименты по анализу продукции белка GFP, ген которого был встроен в ту же самую векторную плазмиду pcDNA3.1. На этой модельной системе было продемонстрировано, что спустя 3 сут после внутримышечной инъекции мышам плазмиды pcDNA/GFP в мышечной ткани задней конечности наблюдался четко локализованный синтез целевого белка по ходу раневого канала (см. рис. 1, *а*), а на 7-е сут в зоне инъекции выявлены эффективная наработка белка GFP и его распространение в близлежащие ткани (см. рис. 1, *б*).

Анализ индукции синтеза антител против целевых белков при введении соответствующих плазмид или препаратов очищенных рекомбинантных белков 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 установили для группы мышей, иммунизированных рекомбинантным белком CrmB (см. рис. 2, *а*). Для остальных групп мышей при этом не зафиксировали достоверное отличие концентраций антител к целевым белкам по сравнению с контролем. После четвертой инъекции наряду с увеличенным уровнем антител против белка CrmB выраженный специфичный иммунный ответ выявили также для мышей, иммунизированных рекомбинантными белками A30 и TNF-BD (см. рис. 2, *б*).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что специфический иммунный ответ против целевых белков при многократной инъекции терапевтических доз рекомбинантных плазмид не детектируется, в то время как для рекомбинантных белков он обнаруживается уже после третьей-четвертой иммунизации, что может указывать на затруднения при длительном применении последних.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно заключить, что локальное введение рекомбинантных плазмид, направляющих синтез терапевтических белков, обуславливает гораздо меньший иммуногенный эффект по отношению к этим белкам по сравнению с инъекцией препаратов соответствующих рекомбинантных белков.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00050).

Авторы выражают благодарность И.П. Гилевой за предоставленную плазмиду.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Гилева И.П., Малкова Е.М., Непомнящих Т.С., Виноградов И.В., Лебедев Л.Р., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Рябчикова Е.И., Щелкунов С.Н. Изучение действия TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на развитие ЛПС-индуцированного эндотоксического шока. Цитокины и воспаление. 2006;5(1):44-49.

Лебедев Л.Р., Рязанкин И.А., Сизов А.А., Агеенко В.А., Одегов В.Н., Афиногенова Г.Н., Щелкунов С.Н. Способ очистки антагонистов фактора некроза опухолей и исследование их некоторых свойств. Биотехнология. 2001;6:14-18.

Непомнящих Т.С., Антонец Д.В., Щелкунов С.Н. Генотерапия артрита. Генетика. 2016;52(6):625-640.

Разумов И.А., Гилева И.П., Васильева М.А., Непомнящих Т.С., Мишина М.Н., Беланов Е.Ф., Кочнева Г.В., Коновалов Е.Е., Щелкунов С.Н., Локтев В.Б. Нейтрализующие моноклональные антитела перекрестно реагируют с белками слияния вирусов эктромелии (ген 129L) и натуральной оспы (ген A30L). Молекуляр. биология. 2005;39(6):1046-1054.

Трегубчак Т.В., Шеховцов С.В., Непомнящих Т.С., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А., Щелкунов С.Н. TNF-связывающий домен белка CrmB вируса натуральной оспы, синтезированный в клетках *Escherichia coli*, эффективно взаимодействует с TNF человека. Докл. Акад. наук. 2015;462(4):176-180.

Цырендоржиев Д.Д., Орловская И.А., Трегубчак Т.В., Гилева И.П., Цырендоржиева М.Д., Щелкунов С.Н. Биологические эффекты индивидуально синтезированного TNF-связывающего домена белка CrmB вируса натуральной оспы. Бюл. эксперим. биологии. 2014;157(2):214-217.

Цырендоржиев Д.Д., Сенников С.В., Орловская И.А., Гилева И.П., Рязанкин И.А., Топоркова Л.Б., Курилин В.В., Лопатникова Ю.А., Грыдина А.А., Щелкунов С.Н. Эффективность рекомбинантного TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы в модели коллаген-индуцированного артрита. Мед. иммунол. 2013;15(6):513-524.

Щелкунов С.Н., Таранов О.С., Трегубчак Т.В., Максютов Р.А., Силков А.Н., Нестеров А.Е., Сенников С.В. Генотерапия коллаген-индуцированного артрита крыс при внутримышечном введении плазмиды, кодирующей TNF-связывающий домен белка CrmB вируса натуральной оспы. Докл. Акад. наук. 2016;469(4):504-507.

Bandara G., Mueller G.M., Galea-Lauri J., Tindal M.H., Georgescu H.I., Suchanek M.K., Hung G.L., Glorioso J.C., Robbins P.D.,

Evans C.H. Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by *ex vivo* gene transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993;90(22):10764-10768.

Bendtzen K., Bliddal H., Stoltenberg M., Szkudlarek M., Fana V., Lindegaard H.M., Omerovic E., Højgaard P., Jensen E.K., Bouchelouche P.N. Antibodies to infliximab and adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: a cross-sectional study. Arthritis. 2015;2015:784825. DOI 10.1155/2015/784825.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-254.

Brasington J.R., Kahl L., Ranganathan P., Cheng T.P., Atkinson J. Immunologic rheumatic disorders. J. Allergy Clin. Immunol. 2010; 125(Suppl. 2):204-215. http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.067.

Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J.J., Martin-Dupont P., Michaud P., Papo T., Ugo V., Teyssandier I., Varet B., Mayeux P. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin N. Engl. J. Med. 2002;346(7):469-475. DOI 10.1056/NEJMoa011931.

Chen Y.M., Tsai W.C., Tseng J.C., Chen Y.H., Hsieh C.W., Hung W.T., Lan J.L. Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 2015;74(3):e16. DOI 10.1136/annrheumdis-2013-203893.

Drutskaya M.S., Efimov G.A., Zvartsev R.V., Chashchina A.A., Chudakov D.M., Tillib S.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Experimental models of arthritis in which pathogenesis is dependent on TNF expression. Biochemistry. (Moscow). 2014;79(12):1349-1357. DOI 10.1134/S0006297914120086.

Eng G.P., Bendtzen K., Bliddal H., Stoltenberg M., Szkudlarek M., Fana V., Lindegaard H.M., Omerovic E., Højgaard P., Jensen E.K., Bouchelouche P.N. Antibodies to infliximab and adalimumab in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission: a cross-sectional study. Arthritis. 2015;2015:784825. DOI 10.1155/2015/784825.

Evans C.H., Ghivizzani S.C., Robbins P.D. Arthritis gene therapy and its tortuous path into the clinic. Transl. Res. 2013;161:205-216. DOI 10.1016/j.trsl.2013.01.002.

Evans C.H., Robbins P.D. Gene therapy of arthritis. Intern. Med. 1999; 38(3):233-239.

Gileva I.P., Nepomnyashchikh T.S., Antonets D.V., Lebedev L.R., Kochneva G.V., Grazhdantseva A.V., Shchelkunov S.N. Properties of the recombinant TNF-binding proteins from variola, monkeypox, and cowpox viruses are different. Biochim. Biophys. Acta. 2006; 1764:1710-1718.

Gileva I.P., Viazovaia E.A., Toporkova L.B., Tsyrendorzhiev D.D., Shchelkunov S.N., Orlovskaya I.A. TNF binding protein of variola virus acts as a TNF antagonist at epicutaneous application. Curr. Pharm. Biotechnol. 2015;16:72-76.

Gouze E., Gouze J.N., Palmer G.D., Pilapil C., Evans C.H., Ghivizzani S.C. Transgene persistence and cell turnover in the diarthrodial joint: implications for gene therapy of chronic joint diseases. Mol. Ther. 2007;15(6):1114-1120. DOI 10.1038/sj.mt.6300151.

Gouze J.-N., Gouze E., Palmer G.D., Liew V.S., Pascher A., Betz O.B., Thornhill T.S., Evans C.H., Grodzinsky A.J., Ghivizzani S.C. A comparative study of the inhibitory effects of interleukin-1 receptor antagonist following administration as a recombinant protein or by gene transfer. Arthritis Res. Ther. 2003;5(5):R301-R309. DOI 10.1186/ar795.

Karampetsou M.P., Liossis S.N.C., Sfikakis P.P. TNF-antagonists beyond approved indications: stories of success and prospects for the future. QJM. 2010;103(12):917-928.

Kim J.M., Jeong J.G., Ho S.H., Hahn W., Park E.J., Kim S., Yu S.S., Lee Y.W., Kim S. Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist. Gene Ther. 2003;10(18):1543-1550.

Krieckaert C.L., Jamnitski A., Nurmohamed M.T., Kostense P.J., Boers M., Wolbink G. Comparison of long-term clinical outcome with etanercept treatment and adalimumab treatment of rheumatoid arthritis with respect to immunogenicity. Arthritis Rheum. 2012; 64(12):3850-3855. DOI 10.1002/art.34680.

Lee S.J., Chinen J., Kavanaugh A. Immunomodulator therapy: monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins. J. Allergy Clin. Immunol. 2010;125(Suppl. 2):314-323. DOI 10.1016/j.jaci.2009.08.018.

Li J., Yang C., Xia Y., Bertino A., Glaspy J., Roberts M., Kuter D.J. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. Blood. 2001;98(12):3241-3248. DOI 10.1182/blood.V98.12.3241.

Li S.D., Huang L. Gene therapy progress and prospects: non viral gene therapy by systemic delivery. Gene Ther. 2006;13(18):1313-1319. DOI 10.1038/sj.gt.3302838.

Pineda C., Castañeda Hernández G., Jacobs I.A., Alvarez D.F., Carini C. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. BioDrugs. 2016;30(3):195-206. DOI 10.1007/s40259-016-0174-5.

Sakhatskyy P., Wang S., Zhang C., Chou T.H., Kishko M., Lu S. Immunogenecity and protection efficacy of subunit-based smallpox vaccines using variola major antigens. Virology. 2008;371:98-107.

Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. Clin. Ther. 2002;24(11):1720-1740. DOI 10.1016/S0149-2918(02)80075-3.

Sfikakis P.P., Tsokos G.C. Towards the next generation of anti TNF drugs. Clin. Immunol. 2011;141(3):231-235. DOI 10.1016/j.clim.2011.09.005.

Shankar G., Pendley C., Stein K.E. A risk-based bioanalytical strategy for the assessment of antibody immune responses against biological drugs. Nat. Biotechnol. 2007;25(5):555-561. DOI 10.1038/nbt1303.

Shchelkunov S.N. Orthopoxvirus genes that mediate disease virulence and host tropism. Adv. Virol. 2012;ID 524743. DOI 10.1155/2012/524743.

Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N., Immunomodulating Drugs based on poxviral proteins. BioDrugs. 2016;30:9-16. DOI 10.1007/s40259-016-0158-5.

Venkatesha S.H., Dudics S., Acharya B., Moudgil K.D. Cytokine modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. Int. J. Mol. Sci. 2015;16(1):887-906. DOI 10.3390/ijms16010887.

Vincent F.B., Morand E.F., Murphy K., Mackay F., Mariette X., Marcelli C. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. Ann. Rheum. Dis. 2013;72(2):165-178. DOI 10.1136/annrheumdis-2012-202545.