

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДНК-ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ ГЕНОВ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

А.А. Рябченкова, Е.Р. Чирак, Е.Л. Чирак, Н.Н. Колмаков, И.В. Духовлинов

ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Плазмидные векторы являются одним из способов доставки генов в клетки для их временной экспрессии. Конструирование экспрессионных векторов на основе плазмидных ДНК является перспективным направлением в генной терапии и разработке вакцин. Исследование биораспределения является важным этапом в изучении фармакокинетики кандидатного лекарственного средства.

Для обнаружения очень низких концентраций целевой ДНК используют крайне чувствительный метод qPCR. Основным преимуществом этого метода перед методами мечения является возможность выявления в тканях именно фрагмента гена интереса, при этом деградировавшая ДНК не будет амплифицироваться (Liu, 2008). qPCR позволяет оценить количество плазмидной ДНК относительно общего количества ДНК, выделенной из ткани.

Целью нашего исследования было исследование биораспределения ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3A-CVVV3 в мышцах и оценка длительности его сохранения в тканях. Для исследования мы выбрали метод qPCR за его простоту и удобство использования.

Исследуемый ДНК-иммуноген представляет собой плазмиду pCMV-3Tag-3A, содержащую ген CVVV3. Ген кодирует гибридный белок длиной 424 аминокислотных остатка, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β-коронавируса SARS-CoV-2. Конструкция запатентована (Dukhovlinov, 2020). Суммарная длина плазмиды pCMV-3Tag-3A-CVVV3 составляет 5519 п.н.

Наработку ДНК проводили в штамме *E. coli* DH5α. Очистку проводили до показателей качества, соответствующих Фармакопее РФ (ОФС 1.7.1.0013.18).

Для инъекций готовили раствор ДНК-иммуногена, содержащий 1 мг/мл ДНК-иммуногена, 9 мг/мл натрия хлорида, 3 мкл/мл бензилового спирта и воду для инъекций. Мышам линии BALB/c вводили по 0,5 мл ДНК-иммуногена (0,5 терапевтической дозы, 500 мкг плазмидной ДНК) или плацебо (9 мг натрия хлорида на 1 мл воды для инъекций) внутримышечно в бедренную мышцу. Всего в исследовании принимало участие 35 мышей в контрольной группе и 35 мышей в испытываемой группе. Мышей содержали согласно правилам GLP и соответствии с ГОСТ 33044–2014. Через 10 минут, 6 часов, 24 часа, 7 дней, 14 дней, 21 день, 42 дня после инъекции животных забивали и отбирали органы (головной мозг, кишечник, костный мозг, кровь цельная, лёгкое, лимфоузел, место введения – бедренная мышца (далее – место введения), бедренная мышца интактной лапы (далее – мышца), печень, почка, селезёнка, сердце и яичник или яичко). Все органы хранили при -80 °С

Для выделения тотальной ДНК из органов экспериментальных животных использовали набор «ДНК-Экстрен-2» (Синтол, Россия). Выделение проводили согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной тотальной ДНК определяли спектрофотометрически. Для последующего анализа все пробы разводили безнуклеазной водой до концентрации тотальной ДНК 10 нг/мкл.

Для определения концентрации использовали метод qPCR. С помощью программы Primer3 (Koressaar, 2007) подобрали праймеры, отжигающиеся на плазмиде, но не отжигающиеся в геноме мыши. Последовательности праймеров для ПЦР были 5' – CATCAATGGGCGTGGATAGC-3' и 5' – ATAGACCTCCCACCGTACAC-3'. Длина амплифицируемого фрагмента составила 172 п.н.

В ходе исследования проанализировали 910 образцов ДНК (по 35 животных в контрольной и экспериментальной группах, по 13 органов на животное). В результате qPCR для образцов от контрольных животных (инъецированных физиологическим раствором) был получен ряд значений, отличающийся от нулевых. При этом в данных образцах кривые плавления показывали аналогичную температуру плавления, что и стандарты (84,5–85 °С). По этим данным определили порог «шумовой» области значений.

Для всех 455 контрольных образцов рассчитали среднее значение шумового сигнала (и соответствующую «шумовую» концентрацию плазмидной ДНК) и медианное значение сигнала. Среднее значение шумового сигнала составило 4,72 фг/образец (на 10 нг тотальной ДНК), медианное значение сигнала составило 2,13 фг/образец. Рассчитали 95-й процентиль для определения границы уровня шума. Данное значение составило 15,17 фг/образец. Это значение приняли за фоновый уровень шума.

Для каждого из экспериментальных образцов нашли среднее количество плазмидной ДНК на образец по результатам ПЦР в реальном времени. Для каждой группы из 5 образцов (каждый орган, каждая временная точка) рассчитали медианное значение количества плазмидной ДНК в группе. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Медианные значения количества плазмидной ДНК в образцах, фг/образец (на 10 нг тотальной ДНК).

	10 минут	6 часов	24 часа	7 дней	14 дней	21 день	42 дня
Головной мозг	382,98	16,88	85,80	52,00	4,32	4,29	6,80
Печень	111,08	2,69	2,16	2,39	3,23	2,75	3,21*
Почка	82,10	3,71	2,60	3,63*	5,60*	4,67	2,58
Сердце	32,56	2,04	1,85	1,95	1,08	1,91	2,01
Селезёнка	27,92	2,17	2,45	1,74	2,36	2,35	3,39
Лёгкое	80,52	4,28	3,14*	5,73*	4,67	3,88	4,07
Яичник/яичко	431,30	7,96*	7,50*	9,53*	7,17*	7,03*	12,74*
Лимфоузел	2737,49	12,20*	4,13*	5,98	5,38	7,11	6,46
Кишечник	216,13	7,78	3,87	4,39	4,09	5,10*	4,81
Мышца	4515,91	286,98	105,01	19,21	16,02	21,51	18,26
Место введения	34802,54	99,78	16,37	12,20*	18,95	31,92	19,47
Кровь	598,34	245,40	42,52	28,28	28,87	42,26	203,02
Костный мозг	29,15	1,34	0,67	0,38	2,36	10,30	11,69*

Note Жирным шрифтом выделены значения, превышающие фоновый уровень шума (более 15,17 фг/образец); * – некоторые значения в группе выше фоновых.

Плазмидная ДНК распределяется по органам неравномерно. Через 10 минут после инъекции препарата плазмидная ДНК детектируется во всех органах без исключения. В крови плазмидная ДНК сохраняется до 42 суток.

В месте введения плазмидная ДНК сохраняется до 42 дней. Через 10 минут после введения плазмидная ДНК детектируется в месте введения в максимальных количествах. Затем её количество на порядки падает в течение первых 6 часов. К концу 24 часов количество плазмидной ДНК уменьшается до значений, близких к фоновым, и сохраняется в таких количествах до 42 суток.

Ряд органов показывает схожую динамику распределения плазмидной ДНК. В сердце, селезёнке, костном мозге, легких, печени, почке и кишечнике плазмидная ДНК детектируется через 10 минут после введения и исчезает уже к 6 часам после введения. Отдельные обнаруженные положительные ответы составляют 16–18 фг/образец, что практически равно фоновым значениям.

В бедренной мышце интактной лапы количество плазмидной ДНК также падает в течение первых 24 часов. В течение продолжительного времени плазмидная ДНК сохраняется в количествах немного выше фоновых.

В яичнике и яичках плазмидная ДНК исчезает к 6 часам после введения. Несмотря на качественное присутствие плазмидной ДНК в отдельных образцах, медианные значения располагаются ниже фоновых.

Количество плазмидной ДНК в лимфоузлах через 10 минут после введения на порядок превышает содержание в большинстве остальных органов. В отдельных образцах плазмидная ДНК может сохраняться до 24 часов.

В головном мозге плазмидная ДНК сохраняется до недели.

На биораспределение плазмидной ДНК в тканях животных влияет широкий ряд факторов. Так, на него влияет способ введения (внутримышечное, внутрикожное, внутривенное, электропорация), количество вводимой ДНК, наличие вспомогательных веществ для формирования комплексов для увеличения эффективности трансфекции и предотвращения деградации (липосомы, поликатионы, белки), соотношение изоформ.

При внутрикожном введении 5 мкг плазмидной ДНК она сохраняется в месте введения до 3 суток (Palumbo, 2012). Более высокая доза в 500 мкг плазмидной ДНК (0,5 терапевтической дозы) приводит к более продолжительному сохранению плазмидной ДНК в месте введения. Через 10 минут после введения плазмидная ДНК обнаруживается во всех органах. Данный факт свидетельствует о том, что она разносится по организму с кровотоком, где циркулирует продолжительное время.

Плазмидная ДНК сохраняется до 42 суток в месте введения, в интактной мышце и крови. При этом количество плазмидной ДНК падает нелинейно. Данный феномен можно объяснить тем, что разные изоформы плазмидной ДНК (суперскрученная, открытая кольцевая и линейная) мигрируют метаболизируются с разной скоростью (Houk 2001). Так, линейная плазмидная ДНК демонстрирует кинетику 1го порядка, а суперскрученная нелинейную кинетику (Houk 2001). Во вводимом растворе доля суперскрученной фракции плазмидной ДНК составляла не менее 80 % (согласно ОФС 1.7.1.0013.18).

В большинстве остальных органов плазмидная ДНК отсутствовала через 6 часов. Вероятно, это связано с разной скоростью деградации плазмидной ДНК в разных органах. На скорость деградации влияет изоформенный состав раствора (Houk 2001) и возможное образование комплексов с белками и липидами (Clark 2013). Комплексы могут защищать ДНК от воздействия нуклеаз. Кроме того, анализируемый фрагмент составляет всего 172 п.н., и сохранение в клетках такого фрагмента не говорит о сохранении полноразмерной плазмиды. Вероятнее всего, до 42 суток сохраняются как раз небольшие фрагменты деградирующей плазмидной ДНК.

Плазмидная ДНК, преодолевшая гематоэнцефалический барьер, может сохраняться в клетках головного мозга надолго из-за низкой скорости регенерации клеток и ограниченного иммунного ответа (Rivest 2009).

Стоит отметить, что использованная методика позволяет оценивать динамику распределения плазмидной ДНК в рамках одного органа. Однако, она не позволяет напрямую сравнивать количество плазмиды, сохраняющееся в разных органах в связи с разной эффективностью выделения из них тотальной ДНК.

Исследование плазмидной ДНК pCMV-3Tag-3A-CVVV3 (80 % суперскрученной изоформы) показало, что биораспределение препарата носит преимущественно нелинейный характер. Она детектируется в месте введения, бедренной мышце интактной лапы и крови до 42 суток, в головном мозге до 7 суток и в остальных органах менее 6 часов.

Мы показали, что с помощью qPCR можно исследовать биораспределение и оценивать время жизни плазмидной ДНК в органах. Исследование биораспределения является частью фармакокинетики.

Литература

- Dukhovlinov, I.V., Chirak, E.L., Kolmakov, N.N., Fedorova, E.A. and Alekseev, A.V., (2020) Pat. of the Russian Federation № 2747762, PCT/RU2020/000257 appl. 5.04.2020
- Houk B E, Martin R, Hochhaus G and Hughes J A 2013 Pharmacokinetics of Plasmid DNA in the Rat Molecular Biology 25 pp 641–646
- Koressaar T and Remm M 2007 Enhancements and modifications of primer design program Primer3 Bioinformatics 23(10) pp 1289–1291
- Liu C, Fan M, Xu Q and Li Y 2008 Biodistribution and expression of targeted fusion anti-caries DNA vaccine pGJA-P/VAX in mice J Gene Med. 10 pp 298–305
- Palumbo R N, Zhong X, Panus D, Han W, Ji W and Wang C 2012 Transgene expression and local tissue distribution of naked and polymer-condensed plasmid DNA after intradermal administration in mice J of Controlled Release 159 pp 232–239
- Rivest S 2009 Regulation of innate immune responses in the brain Nat. Rev. Immunol. 9(6) pp 429–439