

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 – биология

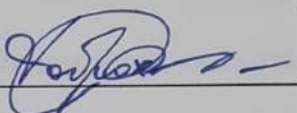
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ВЕКТОРНОГО ИММУНИТЕТА
И ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ
АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫХ ВИРУСОВ

Работа завершена:

« 4 » 06 2022 г.

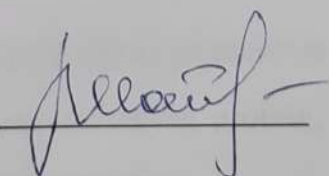
 (Д.М. Доброхотова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

ассистент кафедры генетики

« 4 » 06 2022 г.

 (А.А. Шаймарданова)

И.о. заведующего кафедрой

д.б.н., доцент

« 5 » 06 2022 г.

 (А.Р. Каюмов)

Казань – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Основная информация об аденоассоциированных вирусах.....	10
1.1.1 ААВ дикого типа.....	10
1.1.2 Рекомбинантные ААВ	11
1.2 Существующие препараты, возникающие проблемы.....	12
1.3 Механизмы возникновения ААВ-индуцированного векторного иммунитета.....	15
1.3.1 ААВ-опосредованный врожденный иммунитет	16
1.3.2 Нейтрализующие антитела к ААВ	17
1.3.3 ААВ-опосредованные взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками и Т-клетками.....	19
1.3.4 Капсид-специфические ответы со стороны CD8 ⁺ Т-клеток.....	20
Заключение	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Дизайн исследования	23
2.1 Кодонная оптимизация нуклеотидной последовательности генов и создание плазмиды рAAV-ARSA	24
2.2 Проведение генетической трансформации клеток <i>E. coli</i>	25
2.3 Выделение плазмидной ДНК	26
2.4 Электрофорез в агарозном геле.....	27
2.5 Получение рекомбинантных адено-ассоциированных вирусов AAV9- ARSA и AAV10-ARSA.....	28

2.6 Лабораторные животные	30
2.7 Выделение мРНК из гомогенатов органов.....	30
2.8 Анализ количества мРНК трансгена в гомогенатах путем кПЦР.....	30
2.9 Определение активности ARSA.....	31
2.10 Иммуногистохимическое исследование криостатных срезов органов нервной системы.....	31
2.11 Определение лейкоформулы и биохимических показателей.....	32
2.12 Статистическая обработка данных	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	33
3.1 Получены рекомбинантные вирусные векторы AAV9-ARSA и AAV10-ARSA.....	33
3.2 Успешная трансдукция органов нервной системы, показанная ИГХ	33
3.3 Сверхэкспрессия кодон-оптимизированного гена <i>ARSA</i>	37
3.4 Экспрессия функционально активного фермента <i>ARSA</i>	38
3.5 Иммунологическая безопасность.....	39
ВЫВОДЫ.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	44

ВВЕДЕНИЕ

Доля детей, рожденных с наследственными заболеваниями, ежегодно составляет, как минимум, 7.6 миллионов от общего числа новорожденных в мире по данным Всемирной организации здравоохранения на 2005 год. Текущая международная ситуация в сфере здравоохранения, по большей части, предполагает паллиативную помощь для пациентов этой группы, целью которой является облегчение симптомов заболевания, а не непосредственно решение причины его возникновения [WHO EB116/3 2005]. Люди, страдающие от орфанных (редких) заболеваний, часто не могут рассчитывать на значительное улучшение состояния здоровья, в том числе из-за низкой изученности данной группы заболеваний, а также принципов классической терапии, применимых к ним [Ferreira, 2019].

Решением в данном случае может стать генная терапия. В максимально упрощенном виде генную терапию можно описать как доставку генетического материала в целевые клетки и ткани с помощью невирусных или вирусных носителей для лечения или предотвращения заболеваний путем «исправления» нефункциональных генов. Генная терапия *in vivo* предполагает доставку генетических конструкций напрямую в организм пациента. Одним из наиболее эффективных инструментов генной терапии *in vivo* являются вирусные векторы на основе аденоассоциированных вирусов (ААВ), получившие свое распространение в клинической практике.

Важно отметить, что для большинства наследственных не существует эффективных инструментов обеспечения генной терапии *in vivo*, а препараты, на сегодняшний день представленные на фармацевтическом рынке, имеют высокую стоимость и недоступны для большей части нуждающихся пациентов. Тем не менее, генная терапия является реальным решением проблемы орфанных заболеваний, что доказывается существующими примерами, которые будут обсуждаться ниже. По этой причине разработка новых конструкций на основе ААВ для терапии генных

заболеваний остается актуальной задачей современной медицинской генетики.

ААВ являются одними из лидирующих эффективных инструментов терапии моногенных заболеваний. В данный момент интенсивно и успешно ведется использование ААВ в качестве генно-инженерной платформы для доставки терапевтических конструкторов *in vivo*. Активное применение ААВ стало возможным после их изоляции [Atchison et al., 1965] и исследований конфигурации их генетического аппарата [Rose et al., 1969; Carter et al., 1975; Lusby et al., 1980], а также изучения особенностей состава капсида и механизма сборки вирусной частицы [Myers & Carter, 1980], которые были проведены в 70-80 годах прошлого века. Получение информации о геноме ААВ 2-го серотипа [Srivastava et al., 1983] привело к возможности конструирования рекомбинантных ААВ. Более чем 50 лет растущего интереса научного сообщества в отношении ААВ обеспечило их достаточно высокую изученность, а потенциал практического применения ААВ-векторов, в том числе и в области генной терапии, привлекает все больше исследователей в наши дни. Это привело к созданию новых препаратов на основе ААВ и активной разработке новых, а также развитию исследований в области взаимодействий ААВ с организмом хозяина.

Хотя ААВ широко распространены в человеческой популяции, в литературе за всю историю их изучения не была продемонстрирована корреляция между инфицированием людей ААВ и развитием каких-либо заболеваний или патологий [Calcedo et al., 2011; C. Li et al., 2012]. Находясь в организме человека, ААВ не оказывают негативного влияния на состояние его здоровья. Таким образом, сочетание непатогенности ААВ вкупе с их высокой природной способностью к инфицированию широкого спектра человеческих тканей сделало их великолепными кандидатами в качестве векторов генной терапии [Nakai et al., 2001].

После успешных доклинических испытаний на животных генную терапию с применением ААВ-векторов в качестве терапевтических

конструкций начали тестировать на людях. Одним из наиболее значимых преимуществ клинических испытаний ААВ-конструкций считается их высокий уровень безопасности в сравнении с другими вирусными векторами, который обеспечивается природной непатогенностью ААВ [Calcedo et al., 2011; С. Li et al., 2012]. Исследования препаратов, успешно прошедшие клинические испытания и получившие регистрацию в ряде стран, послужили основой для более глубокого понимания взаимодействия ААВ с организмом человека, а также обозначили возникшие проблемы. Обсуждение некоторых исследований будет представлено ниже, в обзоре литературы.

Настоящая работа направлена на изучение формирования векторного иммунитета и эффективности генной терапии на основе аденоассоциированных вирусов. Для этого были разработаны генетические конструкции, представляющие собой рекомбинантные аденоассоциированные вирусы 9-го (ААВ9) и 10-го серотипов (ААВ10), содержащие кодон-оптимизированную последовательность гена *ARSA*. Данные конструкции были использованы для генетической модификации лабораторных животных с предварительной иммунизацией с помощью ААВ9 посредством внутривенного введения. Далее была изучена эффективность трансдукции органов животных различными серотипами ААВ. Иммунизированным животным интратекально вводили ААВ9 или ААВ10.

Целью работы являлось оценить функциональную активность и биобезопасность генных препаратов на основе ААВ9 или ААВ10 для лечения метахроматической лейкодистрофии при повторном введении предварительно иммунизированным ААВ9 крупным лабораторным животным.

В работе решались следующие **задачи**:

- 1) Получить рекомбинантный ААВ9, кодирующий комплементарную ДНК (кДНК) гена арилсульфатазы А (*ARSA*) человека (ААВ9-*ARSA*). Получить рекомбинантный ААВ10, кодирующий кДНК гена *ARSA* человека (ААВ10-*ARSA*).

2) Провести иммунизацию крупных лабораторных животных (свиней) рекомбинантным AAV9-ARSA путем внутривенной инъекции вирусных частиц. После провести интратекальное введение AAV9-ARSA или AAV10-ARSA.

3) Провести количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР) и иммуногистохимический (ИГХ) анализ биораспределения трансгена в организме лабораторных животных. Проанализировать ферментативную активность ARSA в различных отделах нервной системы лабораторных животных.

4) Провести биохимический анализ крови лабораторных животных (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, общий билирубин, креатинин- J).



СПРАВКА

о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

Казанский (Приволжский) федеральный
университет

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Доброхотова Дарья Михайловна
Самоцитирование
рассчитано для: Доброхотова Дарья Михайловна
Название работы: ДоброхотоваДМ_антиплагиат
Тип работы: Дипломная работа
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	1.75%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	1.75%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	97.69%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	97.69%
ЦИТИРОВАНИЯ	0.56%	ЦИТИРОВАНИЯ	0.56%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 03.06.2022

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 03.06.2022 17:39

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Каюмов Айрат Рашитович

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.