

по теме: **Экспериментальные исследования эффективности экспериментальных образцов бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител.**

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 23.09.2014г. №14.607.21.0060 с Минобрнауки России в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы» на этапе №4 в период с 01 января 2016 года по 30 июня 2016 года в соответствии с Планом-графиком исполнения обязательств по Соглашению **выполнялись следующие работы:**

1. Разработка Программы и методики испытаний бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител и проведение испытаний.
2. Экспериментальные исследования, в том числе:
  - биологических свойств бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител в экспериментах *in vitro*;
  - способов мукозального применения бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител.
3. Проведение исследований эффективности бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител на модельных животных.

При этом были **получены следующие результаты:**

Разработан лабораторный технологический регламент получения клеточных линий СНО, продуцентов бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител. Технологическая схема получения состоит из 3-х стадий: трансфекции культуры, селекции линии-продуцента, анализа клеточной линии. Получены генетические конструкции и оптимальные системы экспрессии бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител. Для этого осуществлены биосинтез и клонирование константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина А IgA1 и IgA2m1-изотипов, а также J-цепи. Проведена сборка генов бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител, адаптированных для эукариотической экспрессии. Получены оптимальные системы экспрессии мономерных форм бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител двух изотипов, а также J-цепи. Получены клеточные линии СНО-продуценты мономерных форм бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител IgA1 и IgA2m1-изотипов. На их основе в результате дополнительной трансфекции экспрессионной плазмидой, содержащей J-цепь, получены продуценты димерных форм бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител IgA1 и IgA2m1-изотипов. Проведена работа по оптимизации процесса биосинтеза с целью увеличения выхода бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител. Разработана методика выделения и очистки бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител. Получены экспериментальные образцы monoIgA1, monoIgA2, dimIgA1, dimIgA2 - мономеры и димеры бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител IgA1- и IgA2m1-изотипов. Также получено рекомбинантное антитело FI6-IgG IgG-изотипа против гемагглютининов вируса гриппа А. Проведен иммунохимический анализ кросс-реактивности в отношении различных серотипов вируса гриппа А. Разработан план исследования экспериментальных образцов.

В теоретической части ПНИ проведены маркетинговые исследования, подготовлен отчет. Исследованы товарная и стоимостная структура российского рынка препаратов для

профилактики и лечения гриппа, проведена оценка доли рынка, которую смогут занять препараты на основе бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител.

Осуществлена валидация аналитических методов контроля качества бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител.

Разработана Программа и методики испытаний бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител, проведены испытания. Исследованы биологические свойства бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител в экспериментах *in vitro* и - способы мукозального применения бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител. Проведено исследование эффективности бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител на модельных животных.

1) Разработана система экспрессии, позволяющая осуществить получение мономерных и димерных форм бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител. Получены 4 клеточные линии СНО, продуценты мономерной и димерной форм

бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител IgA1 и IgA2m1-изотипов. Все линии прошли метотрексатную селекцию и первичный клональный анализ. Разработанная методика позволяет осуществлять выделение и двухступенчатую хроматографическую очистку мономерной и димерной форм бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител с чистотой не менее 95%. Экспериментальные образцы monoIgA1, monoIgA2, dimIgA1, dimIgA2 получены в количестве 22 – 37 мг, а контрольный образец FI6-IgG рекомбинантного антитела IgG-изотипа против гемагглютининов вируса гриппа А в количестве 159 мг. Все полученные образцы имеют степень очистки более 95%. Проведенный иммунохимический анализ экспериментальных образцов бифункциональных IgG/IgA – в отношении различных серотипов вируса гриппа А

свидетельствует о том, что все образцы распознают 10 реликтовых и актуальных штаммов ВГА в непрямом ИФА, имеют аффинность не хуже 4 нМ и направлены против консервативного эпитопа, расположенного на молекулах гемагглютинаина

HA0 и HA1 (иммуноблот). Аффинность исследованных образцов по отношению к штаммам серотипа H1N1 выше, чем по отношению к штаммам серотипа H3N2.

Проведено исследование бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител *in vitro* и на мышинных моделях гриппозной пневмонии *in vivo*. Для подтипов A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) значения IC50 антител IgA1-изотипа составили 0,5; 0,1 и 0,5 мкг/мл, индексы селективности – 200, 1000 и 200 соответственно, снижение титра вируса – 4 порядка, что характерно для препаратов с высокой противовирусной активностью.

Интраназальное введение антител IgA-изотипа наиболее эффективно в сравнении с IgG-изотипом и внутривентрикулярной формой введения у мышей, зараженных A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). При этом вплоть до 7-8 дня после заражения выживаемость животных, получивших интраназальную профилактику, сопоставима с выживаемостью животных, которым вводили контрольный препарат Тамифлю.

2) При разработке оптимальных систем экспрессии использован разработанный коллективом проекта бипромоторный вектор. Данный вектор позволяет осуществлять сбалансированную метотрексатную селекцию линий-продуцентов гетеросубъединичных белков. При селекции клонов-продуцентов использован метод роботизированного флуоресцентного клеточного сортирования, позволивший сократить временные и трудовые затраты и способствовать эффективному отбору линий-продуцентов. При разработке методики выделения и очистки на основе моноклональных антител, специфичных к иммуноглобулину А человека синтезированы и

исследованы аффинные сорбенты, необходимые для проведения хроматографии бифункциональных IgG/IgA – гибридных антител.

3) Бифункциональные IgG/IgA-гибридные антитела представляют собой новый перспективный объект исследований в антителотерапии. В ряде лабораторий в мире проводятся исследования различных структурных форматов подобных антител для применения в профилактике и терапии инфекционных и онкологических заболеваний. Применяемые в ходе реализации проекта подходы и методология основаны на самом современном уровне знаний и технологий и полностью соответствуют лучшим мировым работам в данной области.

### **Область применения результатов исследований**

1) Разрабатываемые бифункциональные IgG/IgA-гибридные антитела представляют собой новый класс противовирусных препаратов, обладая возможностью узнавать и уничтожать вирусные частицы различных серотипов, что позволяет ожидать высокой эффективности профилактического эффекта вне зависимости от конкретного сезонного штамма вируса. Данные антитела будут характеризоваться или полным отсутствием, или чрезвычайно низкой иммуногенностью, что повысит эффективность терапевтического воздействия. По сравнению с известными препаратами для лечения гриппа предлагаемое лекарственное средство будет характеризоваться минимумом побочных эффектов и не обладать токсичностью. По сравнению с препаратами иммуноглобулинов, применяемыми внутривенно, мукозальная форма применения бифункциональные IgG/IgA-гибридные антитела должна обеспечить многократное уменьшение терапевтической дозы и стоимости лечения.

2) На завершающей стадии проекта будут проведены работы, целью которых является разработка технических требований и предложений по разработке, производству и эксплуатации продукции с учетом технологических возможностей и особенностей индустриального партнера – ФГУП НПО «Микроген» Минздрава РФ. В результате выполнения исследований эффективности и безопасности экспериментальных образцов бифункциональных IgG/IgA-гибридных антител будет выбран прототип создаваемого лекарственного препарата. В 2017 г. планируется проведение ОТР по масштабированию процесса биосинтеза бифункциональных IgG/IgA-гибридных антител, будет получен опытный образец для проведения доклинических исследований. Доклинические исследования препарата будут осуществляться с учетом особенностей его мукозального использования. Далее планируется разработка промышленного технологического регламента получения мукозального средства профилактики вирусных заболеваний, постановка препарата на производство. Одновременно будут проводиться клинические испытания. По результатам работ будет подготовлено регистрационное досье и осуществлена процедура регистрации нового средства для профилактики вирусных инфекций.

3) Выполнение проекта позволит не только провести разработку новых терапевтических средств для лечения и профилактики гриппа, но и сформировать значительный научно-технический задел в новой области иммунофармакологии, основанной на использовании рекомбинантных IgG/IgA-гибридных иммуноглобулинов против различных возбудителей. Полученные знания и технологическая составляющая в области биоинженерии, получения и очистки, разработки лекарственных форм препаратов могут быть использованы для получения гомологичных препаратов для лечения других бактериальных и вирусных инфекций.

### **Эффекты от внедрения результатов проекта**

Перечисленные свойства создаваемого иммунопрепарата свидетельствуют о том, что он может быть рекомендован в первую очередь для специфической профилактики заражения гриппом пациентов групп риска (дети, пожилые люди, беременные женщины, люди, страдающие диабетом, астмой, сердечно-сосудистыми заболеваниями, люди с ослабленной системой), а также для профилактики и лечения населения в целом. Кроме того, разработка препарата уменьшит затраты системы здравоохранения на получение сезонных вакцин и борьбу с возможными пандемиями. Потребителями ожидаемого результата являются население через

аптечную систему, лечебно-профилактические учреждения, производители товаров для медико-биологического сектора экономики России, вся система здравоохранения в целом.

### **Формы и объемы коммерциализации результатов проекта**

1) Общий стоимостной объем продаж лекарственных препаратов для профилактики и лечения гриппа составил в 2012 г. 29,5 млрд. руб. Принимая во внимание, что на рынке не представлены эффективные вирус-направленные специфические средства иммунотерапии, можно ожидать, что рыночная доля создаваемого препарата составит 15-20 процентов в стоимостном выражении.

2) Описание видов новой и усовершенствованной продукции (услуги), которые могут быть созданы на основе полученных результатов интеллектуальной деятельности (РИД) будет создано на заключительном этапе ПНИ в 2016 году