

**Аннотация проекта (ПНИЭР), выполняемого в рамках ФЦП
«Исследования и разработки по приоритетным направлениям
развития научно-технологического комплекса России на 2014 -
2020 годы»**

**Номер Соглашения о предоставлении субсидии/государственного
контракта:** 14.607.21.0096

Название проекта: Получение и иммунохимическое исследование
рекомбинантных антител-кандидатов для комплексной профилактики и
терапии заболеваний, вызванных вирусом Эбола

Основное приоритетное направление: Науки о жизни

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования "Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова"

Руководитель проекта: Долгих Дмитрий Александрович

Должность: профессор

E-mail: dolgikh@nmr.ru

Ключевые слова: вирус эбола, геморрагическая лихорадка, филовирусы,
гликопротеин капсида, gp40, нейтрализующие антитела, пассивная
иммунизация, рекомбинантные антитела

Цель проекта

1. Проект направлен на решение проблемы получения рекомбинантных антител для пассивной иммунотерапии геморрагической лихорадки Эбола.
2. Цель проекта - получение, исследование и отбор моноклональных антител против вирусного гликопротеина для создания на их основе рекомбинантных антител как потенциальных компонентов нового комбинированного терапевтического средства борьбы с лихорадкой Эбола.

Основные планируемые результаты проекта

1. Планируется получение следующих основных результатов:
 - в результате иммунизации будет получен и охарактеризован в терминах аффинности и кросс-реактивности представительный набор моноклональных антител против компонентов вирусного капсида;
 - будут отобраны не менее трех моноклональных антител, специфичных к неперекрывающимся эпитопам вирусного гликопротеина;
 - будет проведено выделение генов вариабельных доменов кандидатных моноклональных антител анти- Эбола, конструирование генов рекомбинантных антител анти-Эбола и системы их экспрессии;
 - будут получены клеточные линии CHO - продуценты рекомбинантных антител анти-Эбола;
 - будут осуществлены биосинтез, выделение и очистка экспериментальных образцов рекомбинантных антител анти-Эбола;
 - на завершающей стадии проекта будет осуществлена иммунохимическая характеристика рекомбинантных антител анти-Эбола.
2. Кандидатные моноклональные антитела анти-Эбола должны обладать аффинностью, выраженной значением константы диссоциации комплекса антиген-антитело не более 5 нМ. Первичная структура вариабельных доменов кандидатных моноклональных антител анти-Эбола должна быть

подтверждена методами генетического анализа и масс-спектрометрии. Степень очистки экспериментальных образцов рекомбинантных антител анти-Эбола должна быть не менее 95% по данным гель-электрофоретического и хроматографического анализов.

Краткая характеристика создаваемой/созданной научной (научно-технической, инновационной) продукции

1. Конечным продуктом являются не менее трех экспериментальных образцов полноразмерных химерных антител анти-Эбола, охарактеризованных в терминах аффинности и кросс-реактивности в отношении белков вируса Эбола. Экспериментальные образцы рекомбинантных антител должны соответствовать аналитическим критериям для проведения в дальнейшем биологических испытаний на животных.
2. Для получения высокоаффинных моноклональных антител проводилась иммунизация мышей конъюгатом рекомбинантного гликопротеина вируса Эбола с белком теплового шока. Для оценки эпитопной специфичности моноклональных антител был применен комплексный подход, основанный на сравнительном анализе различных методов ИФА, иммуноблоттинга и исследования влияния гликозилирования. При получении клеточных линий СНО - продуцентов рекомбинантных антител будет использован уникальный би-промоторный экспрессионный вектор, отбор клонов-продуцентов будет осуществлен с помощью роботизированной флуоресцентной системы клеточного сортирования.
3. Учеными из США и Канады создана композиция терапевтических антител Zmarr для профилактики и лечения геморрагической лихорадки Эбола. Антитела нарабатываются в листьях табака. Набор рекомбинантных антител, разрабатываемый в ходе реализации настоящего проекта, может оказаться альтернативной использованием композиции Zmarr или даже превосходить последний по своим биологическим свойствам.
4. Успешный отбор трех высокоаффинных моноклональных антител анти-Эбола позволяет с высокой степенью вероятности о достижении всех заявленных результатов.

Назначение и область применения, эффекты от внедрения результатов проекта

Эпидемия геморрагической лихорадки Эбола представляет серьезную угрозу всему мировому сообществу. Поэтому достижение целей проекта помимо коммерческой составляющей представляет несомненный гуманитарный вклад в объединение усилий разных стран по борьбе с данной угрозой. Возникновение эпидемии в 2014 г. свидетельствует о том, что эпидемии геморрагической лихорадки Эбола могут иметь в дальнейшем рецидивирующий характер. В связи с данным обстоятельством представляется жизненно необходимым формирование наряду со средствами вакцинации национального резерва терапевтических средств для борьбы с последствиями заражения вирусом Эбола, а также промышленных возможностей, позволяющих в короткие сроки увеличить производство инъекционных форм рекомбинантных терапевтических средств на основе

моноклональных антител.

Возможным потребителем результатов ПНИЭР и созданного на их основе фармацевтического препарата являются организации Министерства здравоохранения, а также Министерства чрезвычайных ситуаций РФ.

На завершающей стадии проекта (2016 г.) 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. Также будут разработаны рекомендации по проведению биологических испытаний рекомбинантных антител анти-Эбола. В 2017 г. планируется проведение работ по масштабированию процесса биосинтеза рекомбинантных антител анти-Эбола. Будут начаты биологические испытания и доклинические исследования.

Текущие результаты проекта

Проведена иммунизация мышей линии Balb/c иммуноконъюгатом рекомбинантного белка G вируса Эбола с белком теплового шока HSP65. В результате проведения селекции, скрининга и клонирования новых мышинных гибридом были отобраны 5 гибридом, проведено изотипирование культуральных супернатантов. Для проведения детального иммунохимического анализа и отбора антител-кандидатов были отобраны 3 гибридомы, продуцирующие антитела IgM изотипа, и 2 – IgG изотипа. Осуществлены выделение и очистка всех антител из асцитной жидкости методами аффинной хроматографии на белок G- сефарозе (антитела GPE118 и GPE534 IgG-изотипа) и преципитации эуглобулинов (антитела GPE274, GPE325 и GPE463 IgM-изотипа).

Для отбора не менее 3 кандидатных моноклональных антител (МоАт) анти-Эбола исследовано связывание полученных антител с рекомбинантным белком G вируса Эбола в растворе и при его иммобилизации. Для подтверждения специфичности новой панели МоАт также использовали метод иммуноблота, по данным которого все МоАт из новой панели анти-Эбола интенсивно взаимодействуют с полноразмерным белком G. При этом ряд антител взаимодействуют с минорными фрагментами гликопротеина, что подтверждает направленность МоАт к разным эпитопам. Проведено эпитопное картирование новой панели антител анти-Эбола. В результате картирования эпитопов новой панели МоАт анти-Эбола методом сэндвич-ИФА установлены 3 МоАт, которые и являются кандидатными моноклональными антителами для проведения дальнейших исследований. Все кандидатные МоАт анти-Эбола обладают аффинностью, выраженной значением константы диссоциации комплекса антиген-антитело не более 5 нМ, что удовлетворяет требованию ТЗ.

Из суммарной РНК клеток гибридом методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции проведено выделение и клонирование кДНК переменных доменов легкой и тяжелой цепей кандидатных МоАт, установлена их нуклеотидная последовательность. Методом масс-спектрометрии установлено соответствие аминокислотной последовательности переменных доменов последовательностям пептидов, полученных в результате трипсинолиза нативных антител.