

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 28.11.2014 № 14.607.21.0096 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 № 2 в период с 01.01.2015 по 30.06.2015 совместно с соисполнителем проекта, Всероссийским научным центром молекулярной диагностики и лечения, выполнялась иммунохимическая характеристика моноклональных антител анти-Эбола, включающая в себя следующие работы:

- Селекция, скрининг и клонирование новых мышинных гибридом;
- Наработка, выделение и очистка новых моноклональных антител анти-Эбола;
- Иммунохимическая характеристика моноклональных антител анти-Эбола из ранее полученных и новых гибридом;
- Проведение отбора не менее 3-х кандидатных моноклональных антител анти-Эбола;
- Разработка методики оценки количественных параметров, характеризующих специфическую активность моноклональных антител анти-Эбола.

При этом были получены следующие результаты:

1. В результате проведения работ по селекции, скринингу и клонированию новых мышинных гибридом для проведения детального иммунохимического анализа и поиска кандидатов терапевтических антител были выбраны 3 гибридомы, продуцирующие антитела IgM-изотипа, и 2 гибридомы – антитела IgG-изотипа.
2. Для проведения иммунохимической характеристики осуществлены выделение и очистка 5 антител из асцитной жидкости методами аффинной хроматографии (антитела GPE118 и GPE534 IgG-изотипа) и преципитации зуглобулинов (антитела GPE274, GPE325 и GPE463 IgM-изотипа) со степенью чистоты 72.6 – 100% в количестве 16 – 41 мг.
3. Было исследовано связывание полученных антител с рекомбинантным белком G вируса Эбола в растворе и при его иммобилизации. Исследование показало наличие специфического связывания для всех антител, причем иммунореактивность антител IgG-изотипа GPE118 и GPE534 оказалась равной и

соответствующей Кд приблизительно 1 нМ, а иммунореактивность антител IgM-изотипа GPE274, GPE325 и GPE463 также оказалась равной, но в 3 раза слабее по сравнению с антителами IgG-изотипа.

4. При отборе кандидатных терапевтических антител был использован подход, позволивший на основании данных иммунохимического анализа (аффинность, перекрестная специфичность, связывание в иммуноблоте, оценка влияния гликозилирования белка G на взаимодействие с моноклональными антителами) установить, что отобранные антитела направлены против разных детерминант белка G.

5. Для отбора не менее 3 кандидатных моноклональных антител анти-Эбола было проведено спаривание всех антител против рекомбинантного белка G вируса Эбола (EBOV GP) методом твердофазного сэндвич-ИФА с использованием пероксидазных конъюгатов антител GPE118 и GPE534. Было показано, что антитела GPE118/534 и GPE325/534 образуют пары с пределом детекции EBOV GP 25 нг/мл и 50 нг/мл соответственно, что обуславливает выбор антител GPE118, GPE325 и GPE 534 в качестве кандидатов для получения терапевтического коктейля антител.

6. С использованием разработанной методики оценки количественных параметров была исследована аффинность кандидатных антител. Антитело GPE534 является наиболее аффинным с константой диссоциации комплекса антиген-антитело (Кд) 0.8 нМ; для GPE118 $K_d = 1.7 - 2.0$ нМ; третье антитело GPE325 (IgM) несколько уступает первым двум по аффинности и характеризуется Кд 1.8-3.4 нМ. Все кандидатные моноклональные антитела анти-Эбола обладают аффинностью, выраженной значением константы диссоциации комплекса антиген-антитело не более 5 нМ, что удовлетворяет требованию ТЗ.

Все задачи второго этапа работ выполнены в установленные сроки в соответствии с планом-графиком исполнения обязательств и условиями технического задания Соглашения № 14.607.21.0096 о предоставлении субсидии от 28 ноября 2014 г.