

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 28 ноября 2014 г. № 14.607.21.0096 в рамках ФЦП

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 – 2020 годы»

на этапе № 5 (заключительном) в период с 01.07.2016 по 31.12.2016

получены следующие результаты:

1. 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.
2. 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).
3. Для отбора антител-кандидатов исследовано связывание полученных антител с рекомбинантным гликопротеином вируса Эбола в растворе и при его иммобилизации. Для подтверждения специфичности новой панели антител также использовали метод иммуноблоттинга, по данным которого все моноклональные антитела интенсивно взаимодействуют с полноразмерным гликопротеином. При этом ряд антител взаимодействуют с минорными фрагментами гликопротеина, что подтверждает их направленность к разным эпитопам. По результатам иммуноблоттинга и сэндвич-ИФА отобраны 3 антитела-кандидата для создания терапевтического коктейля. Значения констант диссоциации отобранных антител находятся в диапазоне 0.8 -1.8 нМ, что подтверждает их высокую аффинность к вирусному гликопротеину.
4. Из суммарной РНК клеток гибридом методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции проведено выделение и клонирование кДНК переменных доменов легкой и тяжелой цепей антител-кандидатов. Установленная аминокислотная последовательность подтверждена методом масс-спектрометрии. Все полученные антитела являются уникальными.
5. Проведено конструирование системы экспрессии полноразмерных рекомбинантных антител. В результате селекции получены клеточные линии СНО - продуценты исследуемых антител. Осуществлен биосинтез рекомбинантных антител в бессывороточной среде. В результате проведения процедур выделения и очистки получены экспериментальные образцы рекомбинантных антител анти-Эбола.
6. Изучены иммунохимические свойства антител-кандидатов методами иммуноблоттинга, а также непрямого и конкурентного ИФА с использованием

различных рекомбинантных белков вируса Эбола. Доказана подлинность рекомбинантных химерных Fab-фрагментов, а также их специфичность по отношению к рекомбинантному гликопротеину. Результаты непрямого ИФА свидетельствуют об отсутствии перекрестного иммунологического взаимодействия с белками NP и VP40 вируса Эбола. Исследована эпитопная специфичность полученных рекомбинантных антител с использованием панели коммерческих нейтрализующих антител. Установлено, что все исследуемые антитела направлены против разных участков гликопротеина. При этом эпитопы рекомбинантных химерных антител совпадают или частично перекрываются с эпитопами трех коммерческих нейтрализующих антител против вируса Эбола.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения исследования разработанных рекомбинантных антител, потенциальных компонентов терапевтического коктейля, на клеточных и животных моделях.