

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 27.06.2014 № 14.604.21.0068 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 01.01.2016 по 30.06.2016 выполнялись следующие работы:

1. Получение линии клеток-продуцентов рекомбинантного моноклонального антитела к β_1 -адренорецептору.
2. Получение линии клеток, экспрессирующих β_1 -адренорецептор.
3. Мониторинг стабильности экспрессии β_1 -адренорецептора методом радиолигандного анализа.
4. Разработка методики лабораторного определения уровня аутоантител к β_1 -адренорецептору в крови пациентов при помощи конкурентного ИФА
5. Создание лабораторного прототипа диагностического набора для определения уровня аутоантител к β_1 -адренорецептору.
6. Оформление отчетной документации в соответствии с требованиями технического задания и актов Минобрнауки России.
7. Отбор пациентов в исследование, проведено их клиническое обследование, завершено формирование банка биообразцов.
8. Завершение формирования базы данных

При этом были получены следующие результаты:

- 1 Проведена оптимизация и осуществлен синтез гена β_1 -АР(β_1 -АР)человека, необходимого для получения линии клеток-носителей антигена. Методами рестрикционного анализа и секвенирования показано, что синтезированный ген кодирует природную аминокислотную последовательность β_1 -АР человека. Согласно разработанному дизайну сконструирован и проверен бицистронный плазмидный вектор рМС4IPW, предназначенный для эффективной экспрессии генов в клетках млекопитающих. Оптимизированный ген β_1 -АР встроен в вектор с получением плазмидной конструкции рМС4IPW-ADRB1opt. При помощи иммуоокрашивания и цитофлуорометрического анализа показано, что трансфекция клеток плазмидой рМС4IPW-ADRB1opt приводит к экспонированию рекомбинантного β_1 -АР на внешней поверхности клетки.
- 2 Разработана методика определения содержания β_1 -АР на поверхности клеток млекопитающих посредством радиолигандного анализа. Отработка методики проводилась на Т-лимфоцитах периферической крови человека и на модельных клеточных культурах, экспрессирующих β_1 -АР, соединенный с зеленым флуоресцентным белком. Специфическое связывание радиоактивного лиганда ^{125}I -цианопиндолола с β_1 - и β_2 -адренорецепторами определяли методом конкурентного вытеснения при помощи высокоселективных "холодных" лигандов, соответственно, CGP-20712 и ICI 118551. Подобраны условия для измерения представленности рекомбинантного β_1 -АР на трансгенных клетках млекопитающих. Метод позволяет регистрировать около 1000 молекул адренорецептора на клетку.
- 3 В результате трансфекции клеток 293-Н и отбора клонов с селекцией на среде с пурамицином получена линия клеток ADL-7A с экспрессией рекомбинантного β_1 -АР. Мониторинг содержания β_1 -АР в клетках ADL-7A при помощи разработанной методики радиолигандного анализа продемонстрировал стабильность экспрессии трансгена на протяжении 42-суточного периода культивирования. Клетки ADL-7A несут в среднем $2,35 \pm 0,3 \cdot 10^6$ молекул β_1 -АР на клетку.
- 4 Синтезированы оптимизированные гены тяжелых и легких цепей рекомбинантного мышинового и химерного (мышь/человек) антител, направленных ко второй внеклеточной петле β_1 -АР. Нуклеотидные последовательности генов подтверждены секвенированием. Сконструирован двухкассетный вектор рDC, предназначенный для производства рекомбинантных антител в клетках млекопитающих. Работоспособность вектора проверена на модельных генах зеленого и красного флуоресцентных белков. Гены рекомбинантных антител встроены в вектор с получением плазмидных конструкций рDC-mAB2367 и рDC-hAB2367, правильность сборки подтверждена рестрикционным анализом. Функциональная активность плазмидных конструкций удостоверена методом транзитной трансфекции. Комбинации наборов функциональных элементов в плазмидных конструкциях являются оригинальными, однако в целом конструкторский дизайн соответствует общепринятым в этой области стандартам.

5 Методом плазмидной трансфекции получены линии клеток человека MDR1 и HR12, продуцирующие, соответственно, мышинное и химерное (мышь/человек) рекомбинантные антитела к β_1 -АР. Продуктивность клеток MDR1 составляет 10,4 мкг/сут./ 10^6 клеток. Рекомбинантные антитела произведены и очищены из кондиционированной бессывороточной среды хроматографией на гидрофобном и аффинном сорбентах. Электрофоретический и спектрофотометрический анализы подтвердили чистоту и целостность препаратов антител. Создание и использование в качестве калибровочного стандарта в разрабатываемом диагностическом наборе рекомбинантного химерного (мышь/человек) антитела ко второй внеклеточной петле β_1 -АР является новым конструкторским решением.

6 Подобраны оптимальные условия и отлажена методика иммобилизации клеток млекопитающих на планшете для ИФА. Отработку условий иммобилизации клеток проводили на модельных клеточных культурах, экспрессирующих β_1 -АР, с использованием препаратов рекомбинантных антител. Для улучшения прикрепления клеток к субстрату планшеты обрабатывали поли-L-лизинном. В качестве фиксирующего агента выбран глутаровый альдегид, экспериментально подобрана его оптимальная концентрация 0,02%. Обработка клеток этаноламином и боргидридом на заключительных стадиях фиксации существенно повышает сохранность антигена (до 70%). При оптимальных условиях потери клеток при проведении иммуноферментного анализа составляют порядка 1,5%, а коэффициент вариации результатов не превышает 10%.

7 Продемонстрировано эффективное связывание рекомбинантных антител с пептидом β_8 , соответствующим по аминокислотной последовательности второй внеклеточной петле β_1 -АР человека. Установлено, что мышинное и химерное антитела способны конкурировать друг с другом за связывание с антигеном. Определены константы реакции связывания антител с β_1 -АР и оптимизированы параметры методики конкурентного иммуноферментного анализа на клетках: формат проведения анализа, количество клеток в лунке планшета, состав блокирующего раствора, время инкубации с человеческими антителами, условия реакции с мышинными антителами, тип и степень разведения конъюгата. В модельной системе продемонстрирована возможность измерения концентрации аутоантител в диапазоне от 5 нг/мл до 50 нг/мл. Определена степень разведения образцов сыворотки 1:20, позволяющая снизить эффект матрикса до приемлемого уровня. Подобран стандарт сыворотки для добавления к калибровочным препаратам химерных антител. В целом разработанный дизайн анализа представляет собой новое конструкторское решение.

8 Собран полный комплект компонентов, составлен проект инструкции и изготовлен лабораторный прототип диагностического набора для определения уровня аутоантител к β_1 -АР в сыворотке крови пациентов. Набор опробован на случайной выборке образцов сывороток пациентов РКНПК МЗ РФ.

2.9 Всем пациентам, отобранным в исследование, в соответствии с протоколом проведено комплексное клинично-инструментальное и лабораторное обследование. Пациенты с желудочковыми нарушениями ритма сердца распределены по трем группам: 55 больных включено в группу с идиопатическими нарушениями ритма сердца (группа 1), 40 больных – в группу с ишемической болезнью сердца (группа 2), 40 больных – в группу с дилатационной кардиомиопатией воспалительного генеза (группа 3). Завершено формирование двух групп сравнения – группы больных с ишемической болезнью сердца при отсутствии желудочковых нарушений ритма сердца (включено 15 человек) и группы здоровых добровольцев (включены 21 человек). Собран банк биообразцов, закончено формирование базы данных, включающей общую информацию о пациентах и результаты клинично-инструментального и лабораторного обследований, проведен статистический анализ результатов обследования.

Выполненные работы и промежуточные результаты соответствуют требованиям технического задания и плана-графика исполнения обязательств по Соглашению.

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе выполненными надлежащим образом.