

Краткая информация о проекте

Наименование	AP14870256 «Разработка новых нанотел для эффективной нейтрализации и использования в качестве специфического и чувствительного реагента для быстрого обнаружения вируса бешенства»
Актуальность	<p>Бешенство встречается во всем мире среди различных животных-резервуаров и, как известно, является самой смертельной вирусной инфекцией с почти 100% смертельным исходом после появления симптомов. Во всем мире бешенство по-прежнему носит эндемический характер в более чем 150 странах и территориях, что приводит к ежегодным экономическим потерям на сумму около 8,6 млрд долларов США и приводит к гибели более 60 000 человек в год (из которых 96% случаев приходится на Азию и Африку). Опасность бешенства заключается в том, что до сих пор не найдено эффективного лечения и заболевание обычно приводит к летальному исходу.</p> <p>Бешенство человека представляет серьезную угрозу для здоровья населения Казахстана. Согласно ранее опубликованным данным, в период с 2007 по 2011 год было зарегистрировано 44 случая бешенства у людей, или в среднем 9 случаев в год. Заболеваемость укусами собак составила 3700 на миллион населения в 2010 г. и 4130 на миллион населения в 2011 г. Постэкспозиционная профилактика была проведена на 57 000 человек в 2009 г., 59 000 в 2010 г. и 67 000 в 2011 г. Экономические издержки от этого заболевания в Казахстане превышают 20 миллионов долларов США в год. Проблема бешенства в Казахстане остается нерешенной, постоянно регистрируются природные очаги заболевания, что требует повышения эффективности мер профилактики и борьбы с бешенством.</p> <p>Основным способом борьбы с бешенством является специфическая профилактика с применением вакцин и антирабических иммуноглобулинов (RIG). RIG получают из сыворотки лошадей (ERIG) или людей (HRIG), иммунизированных вакциной против бешенства. Однако из-за побочных эффектов ERIG теперь используются в форме Fab-фрагментов, расщепленных пепсином. Однако производство HRIG требует большого количества иммунных доноров и вызывает опасения по поводу передачи инфекционных агентов. Широко изучаются альтернативные подходы с использованием человеческих моноклональных антител. Однако антитела, полученные таким образом, дороги, требуют длительного времени производства и менее эффективны из-за низкой проницаемости в ткани. Дефицит во всем мире и высокая стоимость делают эти продукты малодоступными, поэтому ВОЗ рекомендует разрабатывать альтернативы.</p> <p>Терапия нанотелами в настоящее время считается очень перспективной альтернативой для лечения сложных вирусных инфекций. Нанотела представляют собой наименьшие функциональные фрагменты (15 кДа) антител, состоящих только из тяжелых цепей, встречающихся в природе у <i>Camelidae</i>, и представляют собой антигенсвязывающий вариабельный домен. Нанотела имеют ряд преимуществ, в том числе экономичность и простоту производства в больших количествах в бактериях, хорошую растворимость, устойчивость к значительным колебаниям температуры и pH, лучшее проникновение в ткани в условиях <i>in vivo</i>. Исходя из этих особенностей, нанотела становятся более перспективным инструментом для диагностики и лечения различных заболеваний, в том числе бешенства, по сравнению с обычными антителами.</p> <p>Доступные в настоящее время тесты для обнаружения RABV включают выделение вируса, ИФА, реакция диффузионной</p>

	<p>преципитации и тест флуоресцентных антител. Однако, эти методы достаточно трудоемки и проводятся с использованием первичных и вторичных антител, с которыми химически связаны такие ферменты, как пероксидаза хрена, что в итоге отражается на высокой стоимости этих тест-систем. Кроме того, традиционные антитела имеют ряд недостатков, связанных с их ограниченным количеством, трудностями постоянного хранения и необходимостью использования вторичных антител, а также проблемой доставки в эндемичные районы.</p>
<p>Цель</p>	<p>Разработка новых нанотел для эффективной нейтрализации вируса бешенства. Конструирование высокоспецифичного и чувствительного зонда на основе нанотел для быстрого обнаружения вируса бешенства в иммуноанализах.</p>
<p>Задачи</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Экспрессия G-белка вируса бешенства в виде правильно уложенного рекомбинантного белка и оценка антигенности продукта экспрессии. 2. Конструирование библиотеки кДНК-VНН (нанотела) методом фагового дисплея и селекция RABV-G-специфических нанотел. 3. Исследование эффективности нейтрализации RABV моно-, би- и трехвалентными RABV-специфичными нанотелами на мышах, зараженных летальной дозой RABV.
<p>Ожидаемые и достигнутые результаты</p>	<p>По результатам первых двух годов проведен компьютерный анализ внеклеточного домена G-белка вируса бешенства (RABV-G). Проведена оптимизация G-белка путем замены гидрофобных аминокислот на линкеры (G4S) между аминокислотными остатками 73–79 и 117–125, а также оптимизированы кодоны и содержания GC для оптимальной экспрессии в дрожжах. кДНК ген ExRABVG-GS, кодирующий RABV-G с сигнальным пептидом на N-конце и с-Myc, 6xHis-тэгами на C-конце, клонирован в вектор pBluescript II SK (+). Сконструирован дрожжевой pGAPZα/ExRABVG-GS вектор, содержащий сигнальный пептид, конститутивный промотор GAP, кДНК ген ExRABVG-GS. Проанализирована экспрессия и секреция G-белка дрожжевым штаммом GS115 <i>P. Pastoris</i> в культуральную среду. Показано методом ДСН-ПААГ электрофореза наличие мажорной белковой полосы с молекулярной массой около 51 кДа, соответствующая G-белку. Проведена очистка белка из трёхдневной культуральной среды методами аффинной и ионнообменной хроматографий. Проведена иммунизация кроликов очищенным рекомбинантным белком и получена поликлональная антисыворотка, содержащая антитела против внеклеточного домена G-белка вируса бешенства. Определены титры полученной антисыворотки с помощью непрямого ИФА метода. Проведено осаждение и очистка поликлональных антител. Проанализированы антигенные характеристики эпитопа G-белка вируса бешенства с помощью непрямого ELISA метода с использованием коммерческих доступных моноклональных антител специфичных к G-белку.</p> <p>Проведена подкожная иммунизация двух новозеландских белых кроликов с очищенным рекомбинантным ExRABVG-GS белком.</p>

	<p>Был определен титр поликлональных антител непрямым ELISA-методом. Антитела были очищены и с концентрированы методом осаждения. Далее они были проанализированы на иммуногенность методами дот-блот и вестерн-блот. Было показано, что антитела распознают как неденатурированные, так и денатурированные белки.</p> <p>Была проведена иммунизация двугорбых верблюдов инактивированным вирусом бешенства штамм CVS-11 и рекомбинантным белком ExRABVG-GS по отдельности. Из 150 мл периферической крови с использованием Ficoll-Paque PLUS были изолированы мононуклеарные клетки. Из них в последующем была выделена сумарная РНК, из которой были получены библиотеки кДНК генов наноантител. Создание библиотек кДНК, кодирующих VHH (нанотела), проводилось путем клонирования ПЦР продуктов в фагмидный вектор pADL-23c.</p> <p>Трансформанты TG1 <i>E.coli</i>, содержащие pADL-23c/VHH вектора, использовались для производства фагов M13K07, кодирующие новые VHH. Методом био-пэннинга были отобраны наноантитела специфичных к RABV-G с помощью непрямого ELISA метода где в качестве покрывающего антигена были использованы ранее очищенный рекомбинантный белок ExRABVG-GS и набор Platelia® Rabies II (BioRad). Далее было проведено секвенирование отобранных наноантител, их экспрессия в <i>E. coli</i> штамме WK6 и очистка His-меченых белков с помощью аффинной хроматографии с использованием системы Akta start FPLC.</p>
<p>Имена и фамилии членов исследовательской группы с их идентификаторами (Scopus Author ID, Researcher ID, ORCID, при наличии) и ссылками на соответствующие профили</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Бисенбаев Амангельды Куанбаевич, Доктор биологических наук, Индекс Хирша – 8, ORCID: 0000-0001-7837-8685, Scopus author ID: 24343057700 (https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=24343057700); 2. Сметенов Изат Темиргалиевич, PhD Индекс Хирша – 5, ORCID: 0000-0002-7739-7777, Scopus author ID: 56688607600. (https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=56688607600); 3. Алыбаев Санжар Досанович, студент докторантуры, Индекс Хирша – 3, ORCID: 0000-0002-7909-1835, Scopus author ID: 57203727066. (https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57203727066); 4. Бакиев Серик Самигуллиевич, PhD, Индекс Хирша – 2, ORCID: 0000-0001-5095-6869, Scopus author ID: 57214922444. (https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57214922444); 5. Куанбай Айгерим Курманбеккызы, PhD, Индекс Хирша – 1, ORCID: 0000-0001-6509-4085; 6. Батанова Жанат Мухаметкалиевна, кандидат ветеринарных наук, Индекс Хирша – 1, ORCID: 0000-0002-2183-1394, Scopus author ID: 57220199919. (https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57220199919); 7. Баянды Гүлшат Асхатқызы, докторант, Индекс Хирша – 2, ORCID: 0000-0003-2639-4645, Scopus author ID: 57209477405.

	<p>8. Ахметсадыков Нурлан Нуролдинович, доктор ветеринарных наук, Индекс Хирша – 6, ORCID: 0000-0001-6076-7164, Scopus author ID: 55622396700. https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=55622396700);</p> <p>9. Кауысбеков Алмас Жомартович, магистр</p> <p>10. Утегенова Қаламқас Сериковна, докторант</p>
Список публикаций со ссылками на них	<p>Баянды Г.А., Ахметсадыков Н.Н., Бисенбаев А.К. Молекулярная генетическая характеристика вируса бешенства, патогенез и достижения в диагностике и разработке средств борьбы // Вестник КазНУ, серия биологическая, - 2023. – Том 95, №2. – С.4-20. https://doi.org/10.26577/eb.2023.v95.i2.01</p>
Информация о патентах	-