

ЗАПИТ
на виконання науково-технічного проєкту

1. Назва науково-технічного проєкту

Отримання моноклональних антитіл проти білків коронавірусу SARS-CoV-2 для розробки ефективних тест-систем для швидкої діагностики COVID-19

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Науково-технічні проєкти установ НАН України 2021 року

4. Назва розділу програми або напрям цільового проєкту

8. Новітні біотехнології для охорони здоров'я, фармакології та агропромислового комплексу

5. Строки виконання науково-технічного проєкту 2021 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 (прикладні дослідження)

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Імунобіотехнологічні дослідження з розробки вітчизняних профілактичних і діагностичних препаратів для виявлення маркерів інфікування збудниками інфекційних хвороб

9. Код та назва наукового напрямку (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук



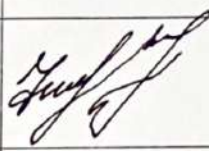

н е м а є

10. Науковий керівник науково-технічного проєкту

Стасик Олег Володимирович, д.б.н., с.д., завідувач відділу, Інститут біології клітини НАН України

телефон: +38 032 261 2146; факс: +38 032 261 2148; e-mail: StasykOV@nas.gov.ua

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Бобак Ярослав Петрович	к.б.н., старший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612146, e-mail: bobak@cellbiol.lviv.ua	
Вовк Олена Іванівна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612146, e-mail: vovk@cellbiol.lviv.ua	
Чень Олег Ігорович	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: chen_oi@nas.gov.ua	
Шуваєва Галина Юрївна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032) 2612146, e-mail: shuvayeva77@gmail.com	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

COVID-19, коронавірус, моноклональні антитіла, гібридома, ІФА, ІХА, діагностичні тест-системи

14. Резюме

Розробка швидкого, точного, і, водночас, простого у застосуванні діагностичного тесту для детекції в організмі людини збудника COVID-19 вірусу SARS-CoV-2, який може бути проведений, в тому числі, і за межами спеціалізованих лабораторій, є вкрай актуальним завданням. Застосування відповідних «швидких» тестів є критичним для контролю захворюваності та превентивних протиепідеміологічних заходів, зокрема при імовірних наступних хвилях поширення COVID-19.

Проєкт присвячений отриманню високоселективних моноклональних антитіл до білків вірусу SARS-CoV-2 на основі молекулярної інженерії та гібридної технології. Відповідна технологія дозволяє отримати стабільні та ефективні клітинні продуценти високоспецифічних до обраних білкових антигенів вірусу SARS-CoV-2 антитіл у масштабах, необхідних для розробки, тестування та наступного серійного виробництва тест систем на збудник COVID-19 на основі імуоферментного та імуохроматографічного аналізів.

15. Обґрунтування доцільності виконання науково-технічного проєкту

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Коронавіруси – це велика родина патогенних РНК вірусів, 7 з яких викликають респіраторні захворювання людини, що можуть протікати як звичайна застуда, а в окремих випадках призводять до тяжкої пневмонії. Останні 20 років відзначилися появою 3 нових вірусів, що характеризувалися серйозними ускладненнями респіраторних захворювань аж до смерті пацієнта. Так, у 2002 році був виявлений SARS-CoV, що спричиняв важкий гострий респіраторний синдром, так звану атипову пневмонію, а в 2012 році ідентифікований коронавірус MERS-CoV як причина високолетального респіраторного синдрому на Середньому Сході. Нарешті, в кінці 2019 року з міста Ухань, Китай, дуже швидко розповсюдився новий коронавірус SARS-CoV-2, - патоген, який спричиняє нову коронавірусну хворобу COVID-19, що набула статусу пандемії і розглядається ВОЗ як глобальний виклик для охорони здоров'я людства. На планеті близько 200 країн і територій, де виявили вірус – серед них і Україна, яка на даний час посідає 35 місце за кількістю випадків. За даними Центру громадського здоров'я, станом на 14 червня в Україні підтверджено більше 31 тис. хворих на COVID-19, з них 14 тис. одужали, а 900 померли від хвороби та ускладнень. Вірус легко поширюється від людини до людини, тому, ймовірно, загальна кількість COVID-19 інфікуваних занижена, адже багато випадків протікає в легкій або безсимптомній формах. Безсимптомні пацієнти розповсюджують COVID-19 так само, як і люди з вираженими симптомами захворювання, а це, зазвичай, висока температура (88%), сухий кашель (68%), хронічна втома (38%). Ці симптоми схожі на грип або звичайну простуду, тому дуже важливо швидко виявляти COVID-19, що дозволить застосувати ефективні заходи контролю для обмеження поширення вірусу.

Вірус SARS-CoV2 має типову будову, притаманну коронавірусам – генетичний матеріал вкритий оболонкою – капсидом з характерними білковими «шипами». РНК розміром приблизно

~30,000 нуклеотидів кодує 27 білків, що включають РНК-залежну РНК-полімеразу (RdRP) та 4

структурних білки: S (spike) - поверхневий глікопротеїн, E (envelope) - малий білок суперкапсиду, М (matrix) – матричний білок, а також N (nucleocapsid) – білок нуклеокапсиду. Саме S-білок вважається таким, що відповідає за проникнення вірусу в клітини господаря через взаємодію з ангіотензин-перетворюючим білком -2 (ACE2). Серед 4-ох структурних білків, S-білок найбільш відмінний від описаних раніше S-білків SARS-подібних вірусів (<75% подібності в нуклеотидній послідовності), проте E-, М- та N-білки є більш консервативними, з огляду на те, що вони відповідають за правильність «складання» вірусу та його функціонування.

На сьогодні, в лабораторних умовах, золотим стандартом виявлення вірусу є детекція його генетичного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-PCR). Цей тест дозволяє діагностувати вірус ще на початку захворювання, але виконання RT-PCR передбачає кваліфіковано проведену процедуру виділення РНК з біоматеріалу та вимагає спеціалізованого обладнання, що в Україні доступне лише великим регіональним медичним установам. Отримання результату тестування займає до 2 днів, у залежності від завантаженості лабораторних центрів. Для пацієнтів малих міст та селищ для отримання результатів тестування, потрібно значно більше часу, що може бути критичним фактором для порятунку їх життя.

Іншим підходом є використання серологічних тестів на виявлення антитіл до вірусу, в основу яких покладений метод імуноферментного аналізу. Відповідне дослідження є швидшим, не потребує високоартісного обладнання і є доступним для виконання у більшості клінічних лабораторій, але, водночас, є менш надійним, внаслідок низького титру антитіл на ранніх етапах хвороби. Сучасні серологічні тести визначають присутність у крові пацієнтів IgM та IgG до

SARS-CoV-2. Було показано, що рівень цих антитіл в крові пацієнтів зростає протягом 5 днів з початку проявів симптомів. Експрес-тести визначення IgM/IgG, що базуються на принципах імунохроматографічного аналізу, мають таку саму чутливість як і імуноферментативне дослідження, але є значно зручнішими, оскільки дозволяють в межах 15 хв визначити чи інфікований пацієнт вірусом SARS-CoV-2.

Таким чином, аналіз антитіл проти вірусу має сенс на більш пізньому етапі розвитку захворювання, коли вже формується імунна відповідь на патоген, або для оцінки як формування (розвитку), так і тривалості отриманого імунітету після перенесеної коронавірусної хвороби. На ранніх етапах захворювання, коли людина вже є інфікованою і може скласти небезпеку для оточуючих, однак імунна відповідь організму ще не розвинулась, ці тести можуть давати хибний результат, що ускладнює прийняття рішення стосовно лікування чи ізоляції пацієнта.

Отже, удосконалення методів діагностики COVID-19, а саме розробка швидкого, точного, і легкого у виконанні тесту, який лікар може провести за межами спеціалізованих лабораторій, є дуже важливим з точки зору превентивних заходів, та для контролю пандемії при дуже імовірних наступних хвилях поширення коронавірусної хвороби.

Основні завдання проекту:

1. Синтез та очистка рекомбінантних білків (антигенів) вірусу SARS-CoV-2 на основі мікробних продуцентів.
2. Імунізація лабораторних мишей препаратами очищених рекомбінантних білків вірусу SARS-CoV-2.
3. Отримання клітин гібридом, здатних секретувати специфічні антитіла до використаних антигенів.
4. Клонування та тестування отриманих гібридом з метою отримання найстабільнішого клону (-ів) для продукування високоспецифічних антитіл проти білків вірусу SARS-CoV-2.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Відповідно до висновків ВООЗ, пріоритетом для виявлення COVID-19 є діагностичні тести на визначення РНК та білків, які можна виконати «поруч із пацієнтом» - при огляді хворого вдома або безпосередньо в лікарні у місцевостях, де немає можливості провести лабораторні дослідження. Крім того, таке швидке тестування великих груп людей, наприклад при перетині кордону або осіб, хто контактував з хворим на COVID-19, дозволить контролювати поширення захворювання. Ці тести мають бути доступними в ціні і не вимагати спеціальних навичок і високотехнологічного обладнання у виконанні.

В літературі описаний подібний імунохроматографічний експрес-тест за принципом “lateral flow”: Корейська фармологічна компанія SD Biosensor також розробила пілотний діагностичний набір на визначення білків (антигенів) вірусу, що дозволяє протягом 30 хв. проаналізувати мазок з носоглотки або горла пацієнта на присутність вірусу. Відповідно до результатів проаналізованих 7 зразків, тест був 100% специфічний, показники чутливості склали 80%. Наразі, наукові дані щодо подібних тестів є дуже обмежені, оскільки невід’ємною частиною подібних тестів є специфічні моноклональні антитіла проти вірусних антигенів, а їх отримання вимагає тривалого часу.

Наша пропозиція полягає у створенні оригінальних вітчизняних моноклональних антитіл, які будуть специфічно розпізнавати білки-мішені вірусу, що викликає COVID-19. В подальшому, їх можна використовувати для швидкого виявлення вірусу в лабораторіях медичних установ, де немає можливості проводити складне виявлення вірусу методом ПЛР. Імуноферментне виявлення вірусу буде потребувати значно менше часу, порядку 2-3 години, порівняно з ПЛР аналізом. Найважливіше, отримані антитіла можна використати для створення ІХА “lateral flow” експрес-тестів для детекції антигенів вірусу SARS-CoV-2 в біологічних зразках людини і швидко

налагодити їх вітчизняне виробництво.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Проект базується на значному попередньому досвіді колективу авторів щодо створення продуцентів рекомбінантних білків на основі бактерій *Escherichia coli* чи метилотрофних дріжджів *Hansenula (Ogataea) polymorpha* та отримання моноклональних антитіл.

Для створення продуцентів фрагментів рекомбінантних білків вірусу SARS-CoV-2 на основі бактерій *Escherichia coli* чи метилотрофних дріжджів *Hansenula (Ogataea) polymorpha* будуть використані стандартні підходи молекулярно-генетичних маніпуляцій з ДНК векторами, у яких колектив виконавців має значний досвід. Як альтернативний підхід для пришвидшення процесу та порівняння імуногенних властивостей, окремі білкові антигени можуть бути синтезовані та придбані у комерційних спеціалізованих компаній.

Для отримання моноклональних антитіл проти антигенів вірусу буде використано так звану «гібридомну» технологію. У роботі планується отримати моноклональні антитіла до S (spike) поверхневого глікопротеїну та N (nucleocapsid) білка нуклеокапсиду. Експресія рекомбінантних білків в бактерійній системі чи на основі рекомбінантних штамів дріжджів, та афінна очистка білка будуть використані як методи наробки антигенів, придатних для імунізації тварин. Зокрема у роботі буде використано послідовності білків, які не виявляли високої частоти мутацій під час попереднього етапу пандемії COVID-19.

Нижче наведено основні наукові публікації авторського колективу за 10 років:

1. Bobak YP, Vynnytska BO, Kurlishchuk YV, Sibirny AA, Stasyk OV. Cancer cell sensitivity to arginine deprivation *in vitro* is not determined by endogenous levels of arginine metabolic enzymes. *Cell Biol Int.* 2010;34(11):1085-9. (IF – 1.64)

2. Vynnytska BO, Mayevska OM, Kurlishchuk YV, Bobak YP, Stasyk OV. Canavanine augments proapoptotic effects of arginine deprivation in cultured human cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2011 Feb;22(2):148-57. (IF – 2.23)

3. Ю. В. Курліщук, Б. О. Винницька-Мироновська, Я. П. Бобак, О. В. Стасик. Вплив метаболітів аргініну на життєздатність людських пухлинних клітин за умов дефіциту цієї амінокислоти *in vitro*. *Біологічні студії.* 2011, Т.5, №2. С. 5-16.

4. O. I. Chen, L. S. Lyniv, N. I. Igmentseva, M. L. Barska, N. O. Sybirna, O. V. Stasyk. Effect of nitric oxide donor on viability of human leukemic cells upon arginine deprivation. *Studia Biologica,* 2011, V5 (2), P. 17-28.

5. Zakalskiy AE, Zakalska OM, Rzhpetskiyy YA, Potocka N, Stasyk OV, Horak D, Gonchar MV. Overexpression of (His)₆-tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography. *Protein Expr Purif.* 2012;81(1):63-8. (IF – 1.64)

6. Vynnytska-Myronovska B., Bobak Y., Garbe Y., Dittfeld C., Stasyk O., Kunz-Schughart L.A. Single amino acid arginine starvation efficiently sensitizes cancer cells to canavanine treatment and irradiation. *Int. J. Cancer,* 2012; 130(9):2164-2175. (IF – 4.9)

7. Vynnytska-Myronovska B, Kurlishchuk Y, Bobak Y, Dittfeld C, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Three-dimensional environment renders cancer cells profoundly less susceptible to a single amino acid starvation. *Amino Acids.* 2013;45(5):1221-30. (IF – 3.91)

8. Chen O., Kavalets B., Lyniv L., Vovk O., Barska M., Sybirna N., Stasyk O. Effect of combinational arginase and canavanine treatment on normal human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences,* 2013, 26(4):385–389.

9. Shuvayeva G., Bobak Y., Igmentseva N., Titone R., Morani F., Stasyk O. Isidoro C. Single amino acid arginine deprivation triggers pro-survival autophagic response in ovarian carcinoma SCOV3. *BioMed Research International* 2014, Article ID 505041, 10 pages (doi: 10.1155/2014/505041) (IF – 1.58)

10. Бобак Я. П., Курліщук Ю. В., Винницька-Мироновська Б. О., Чень О. І., Барська М. Л., Стасик О. В. «Спосіб контролю експресії генів ферментів біосинтезу амінокислот у клітинах

пухлин за допомогою канаваніну при комбінованій ензимотерапії раку”, № а201306988, 3.06.13 р., (Патент України на винахід. Рішення про видачу №25010/3А/14 від 27.10.2014)

11. Pavlyk I, Rzhpetskyu Y, Jagielski AK, Drozak J, Wasik A, Pereverzieva G, Olchowik M, Kunz-Schugart LA, Stasyk O, Redowicz MJ. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β -actin arginylation. *Amino Acids*. 2015;47(1):199-212. (IF – 3.91)

12. Stasyk OV, Boretsky YR, Gonchar MV, Sibirny AA. Recombinant arginine-degrading enzymes in metabolic anticancer therapy and bioanalytics. *Cell Biol Int*. 2015;39(3):246-52. (IF – 1.9)

13. Bobak Y, Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grydzuk O, Shuvayeva G, Redowicz MJ, Kunz-Schughart LA, Stasyk O. Arginine deprivation induces endoplasmic reticulum stress in human solid cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;70:29-38. (IF-4,0)

14. Vynnytska-Myronovska BO, Kurlishchuk Y, Chen O, Bobak Y, Dittfeld C, Hüther M, Kunz-Schughart LA, Stasyk OV. Arginine starvation in colorectal carcinoma cells: Sensing, impact on translation control and cell cycle distribution. *Exp Cell Res*. 2016;341(1):67-74. (IF – 3.2)

15. Kurlishchuk Y, Vynnytska-Myronovska B, Grosse-Gehling P, Bobak Y, Manig F, Chen O, Merker SR, Henle T, Löck S, Stange DE, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Co-application of canavanine and irradiation uncouples anticancer potential of arginine deprivation from citrulline availability. *Oncotarget*. 2016; 7(45):73292-73308 (IF – 6.4)

16. Chen O. I., Barska M. L., Lyniv L. S., Igmentseva N. I., Vovk O. I., Sybirna N. O., Stasyk O. V. Effect of combined arginase and nitric oxide donor treatment on normal and leukemic cells in vitro. *Studia Biologica*, 2016, V10 (1), P. 17-28.

17. Vovk O., Chen O., Igmentseva N., Senchuk O., Barska M., Sybirna N., Stasyk O. Effect of the combined arginase and canavanine treatment on leukemic cells in vitro and in vivo. *Ukrainian Biochemical Journal*, 2016, V 88 (2), P. 45-55.

18. Mayevska O.M., Chen O.I., Karatsai O., Bobak Ya.P., Barska M.L., Lyniv L.S., Pavlyk Yu., Rzhpetsky Yu., Redowicz M-J., Stasyk O.V. Nitric oxide donor augments antineoplastic effects of arginine deprivation in human melanoma cells. *Exp Cell Res*. 2017;355(2):162-171. (IF – 3.4)

19. Hinrichs CN, Ingargiola M, Käubler T, Löck S, Temme A, Köhn-Luque A, Deutsch A, Vovk O, Stasyk O, Kunz-Schughart LA. Arginine Deprivation Therapy: Putative Strategy to Eradicate Glioblastoma Cells by Radiosensitization. *Mol Cancer Ther.*, 2018;17(2):393-406. (IF – 5.37).

20. Chen OI, Bobak YP, Stasyk OV, Kunz-Schughart LA. A Complex Scenario and Underestimated Challenge: The Tumor Microenvironment, ER Stress, and Cancer Treatment. *Curr Med Chem.*, 2018; 25(21):2465-2502. (review) (IF – 3.47)

21. Karatsai O, Stasyk O, Redowicz MJ. Effects of Arginine and Its Deprivation on Human Glioblastoma Physiology and Signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1202:243-258.

Сумарний Impact Factor публікацій - 47,55

15.4. Структура досліджень.

Мета проєкту полягає в отриманні високоспецифічних моноклональних антитіл до S- та N-структурних білків коронавірусу SARS-CoV-2 для розробки пілотних зразків тест-систем на основі імуноферментного (ІФА) та імунохроматографічного (ІХА) аналізів, що дозволять швидко і точно діагностувати присутність антигенів вірусу в біологічних зразках людини.

Завдання проєкту:

1. Отримати очищені рекомбінантні S- і N- білки вірусу SARS-CoV-2, що будуть слугувати антигенами, проти яких будуть отримуватися моноклональні антитіла.

2. Отримати імунованих мишей з вираженою імунологічною відповіддю на використані імуногени – S- і N- білків вірусу SARS-CoV-2.

3. Провести селекцію отриманих гібридом на ГАТ/ГТ середовищах, відібрати клони, що продукують високий титр специфічних антитіл в культуральне середовище.

4. Отримати найстабільніший клон (клони) для продукування високоспецифічних антитіл проти S- і N-білків вірусу SARS-CoV-2. Тестування отриманих антитіл як компонентів ІФА та ІХА тестів.

Етапи проекту

1. Синтез та очиска рекомбінантних білків (АГ) вірусу SARS-CoV-2 на основі мікробних продуцентів

2. Імунізація лабораторних мишей очищеними рекомбінантними S- і N- білками вірусу SARS-CoV-2.

3. Отримання клітин гібридом, здатних секретувати специфічні антитіла до використаних антигенів –S- і N- білків вірусу SARS-CoV-2.

4. Клонування та тестування отриманих гібридом з метою отримання найстабільнішого клону (-ів) для продукування високоспецифічних антитіл проти білків вірусу SARS-CoV-2.

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Відділ сигнальних механізмів клітини володіє необхідною матеріально-технічною базою, щоб здійснювати роботу по отриманню моноклональних антитіл. Це включає наявність віварію, що відповідає усім вимогам утримання мишей, культурального боксу з термостатованим CO₂-інкубатором "NuAire", ламінарами "ESCO" для маніпуляцій з клітинними лініями та "БП-0.3-006 Електроніка" для роботи з непатогенними штамами бактерій або дріжджів, світловим інвертованим мікроскопом "ЛОМО", низькотемпературним холодильником "NuAire" для зберігання біологічних зразків та матеріалів. Крім того, відділ забезпечений високошвидкісними центрифугами "Eppendorf", ПЛР-машиною "Clever Scientific TC48/96", апаратами для розділення у полі струму ДНК та білків "ThermoFisher Scientific", спектрофотометрами для аналітичних досліджень "NanoDrop" та "БіоТек", центрифугами Т-23, ОПн-3 та іншим дрібним лабораторним обладнанням. Слід зазначити, що для більш ефективного виконання запланованих у проекті досліджень, планується придбання окремих сучасних моделей критично необхідних приладів.

16. Техніко-економічне обґрунтування

За допомогою гібридом, що здатні синтезувати високоспецифічні антитіла до коронавірусу SARS-CoV-2 можна досягти продукції антитіл у масштабах, необхідних для виготовлення як ІФА наборів, так і серійного виробництва тест систем ІХА для швидкого визначення COVID-19. Серед відомих модифікацій методу ІХА для тестування різних вірусів метод «lateral flow» є найбільш зручним. Відповідний підхід, як правило, надає можливість внутрішнього контролю для підтвердження коректного перебігу аналізу, та дозволяє візуальну оцінку результату тесту протягом 15-30 хв. Зберігати тест-системи та проводити аналіз можна при кімнатній температурі. У випадку вірусу SARS-CoV-2, тестування може відбуватись з біологічними зразками зі слизових поверхонь та не передбачати відбору зразків крові. Комерційні аналоги відповідного тесту на даний момент недоступні на вітчизняному та міжнародному ринку.

Так званий «швидкий» метод детекції АГ вірусу за допомогою специфічних моноклональних антитіл та імунохроматографічного аналізу (ІХА) характеризується, подібно до ІФА, селективністю (здатністю розпізнавати конкретний АГ, тобто конкретний вірус), високочутливістю (здатністю розпізнавати низькі кількості АГ), але також простотою та швидкістю аналізу (15-30 хвилин) та помірною собівартістю аналізу (до 100 грн, комерційна вартість ІФА тестів на збудник COVID-19 складає від 600 грн і вище).

Таким чином, для швидкого безпосереднього контролю великих груп людей (напр. при перетині кордону, груп ризику, осіб, що контактували із підтвердженим хворим), для практики сімейних лікарів саме таке «швидке» тестування є оптимальним. У випадку позитивного результату, тест ІХА може бути додатково підтвердженим тестуванням RT-PCR.

Можливість швидкого, високоспецифічного і доступного скринінгу на COVID-19 дозволить контролювати ризики поширення захворювання у суспільстві, а з точки зору економіки, зменшить навантаження на лабораторні центри, що забезпечить їхню безперебійну роботу, а також знизить загальні витрати бюджетних коштів, спрямованих на боротьбу з COVID-19.

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами науково-технічного проєкту

- немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги
- немає аналогів в Україні
- краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками
- перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками

18 Використання результатів науково-технічного проєкту

18.1 Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення науково-технічного проєкту

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Моноклональні антитіла до антигену коронавірусу SARS-CoV-2	ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР ХЕМА	500 ІХА тестів на збудник COVID-19

18.2 Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання науково-технічного проєкту

Епідемії вірусної етіології часто проходять хвилями, тобто спалахи можуть повернутися у регіони, де перша хвиля вже вщухла. Занадто швидке послаблення заходів щодо стримування розповсюдження віруса також може спричинити другу хвилю захворювання. Більшість експертів сфери охорони здоров'я здебільшого погоджуються: другої хвилі коронавірусу уникнути не вдасться. У ВООЗ вкотре наголосили, що без постійного масового тестування і відстеження контактів хворих, країни можуть зіткнутися з новими спалахами захворювання [див. також 21].

Досвід ряду країн, яким вдалося швидко запровадили масове тестування на коронавірус, дозволяє стверджувати, що це ефективний спосіб локалізації і стримування розповсюдження інфекції. Той факт, що до 45% інфікованих (особливо осіб молодого віку) можуть бути безсимптомними носіями COVID-19, але при цьому ефективно передавати збудник оточуючим, є викликом для ефективної боротьби з коронавірусною хворобою.

Таким чином на сьогодні створення швидких, точних, легких у виконанні і малозатратних вітчизняних тестів, які будуть надійно детектувати збудник, є вкрай актуальним завданням. Це може стати доступною альтернативою єдиному точному, але одночасно досить складному і дорогавартісному методу детекції РНК віруса за допомогою RT-PCR, всі компоненти якого необхідно імпортувати.

Ключовим компонентом для виготовлення запропонованих тест-систем є високоспецифічні моноклональні антитіла проти вірусних білків. Створені продуценти моноклональних антитіл, гібридами, можна використовувати для наробки у промислових масштабах моноклональних антитіл для виготовлення тест-систем за принципами ІФА і ІХА визначення білків віруса SARS-CoV-2.

Також відпрацьована методологія та створена приладна база можуть бути використані для розробки і впровадження вітчизняних тестів для експрес скринінгу інших збудників інфекційних хворіб, по яких Україна є імпортозалежною, зокрема, збудників різних типів грипу, а також вірусних гепатитів

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ НА УКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР ХЕМА	Моноклональні антитіла до антигену коронавірусу SARS-CoV-2	500 тестів

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

н е м а є

20. Фінансові аспекти науково-технічного проєкту

20.1. Загальна вартість роботи 400,000 тис. грн.

словами: чотириста тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2021 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	400,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ); Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка (м. Львів)

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Войтенко Нана Володимирівна	д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України
Скок Марина Володимирівна	академік НАН України, д.б.н., проф., головний науковий співробітник	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Філоненко Валерій Вікторович	д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Воробець Зіновій Дмитрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет ім. Данила Галицького, кафедра медичної біології, паразитології та генетики

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

24. Організація(ї)-партнер(и) (найменування, місцезнаходження, номери телефонів)

№	Найменування	Місцезнаходження	Номери телефонів
1	ТОВ "Хема"	02000, м.Київ-00, вул. Академіка Єфремова, 23	044 422 6216

25. Форма участі партнера у проєкті (відмітити необхідні і конкретизувати по окремих пунктах)

№	Форма участі	Назва матеріальної участі, послуги та фінансовий еквівалент
1.	ТОВ "Хема"	
<input type="checkbox"/>	Фінансова	Обсяг фінансування _____ тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Матеріальна	1. Забезпечує надання послуг у формі реактивів (компоненти буферів, середовищ, реагенти для ІФА, тощо) та допоміжних матеріалів (лабораторний пластик, корм для тварин, інші розхідні матеріали). Загальний фінансовий еквівалент 350.000 тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Послуги	1. Забезпечує консультування з оформлення науково-технічної документації та реєстрації згідно вимог чинного законодавства України. Загальний фінансовий еквівалент 50.000 тис. грн.
		Загальний фінансовий еквівалент 400,000 тис. грн.
		Загальний фінансовий еквівалент 400,000 тис. грн.

26. Час і місце впровадження розробки за проєктом

н е м а є

23 вересня 2020 року
дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України



А. Сибірний

Науковий керівник науково-технічного
проєкту

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.д.

О.В. Стасик

(підпис)

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України


(підпис)
« 23 » вересня 2020 р.
М.П.



ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ
на виконання науково-технічного проєкту

**«Отримання моноклональних антитіл проти білків коронавірусу SARS-CoV-2 для розробки ефективних тест-систем для швидкої діагностики COVID-19»
Науково-технічні проєкти установ НАН України 2021 року**

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження науково-технічного проєкту

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Імунобіотехнологічні дослідження з розробки вітчизняних профілактичних і діагностичних препаратів для виявлення маркерів інфікування збудниками інфекційних хвороб

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

н е м а є

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Дослідження молекулярних механізмів регуляції проліферації, диференціації та апоптозу у нормальних та пухлинних клітинах тварин і людини.

6. Мета науково-технічного проєкту

Мета проєкту полягає в отриманні високоспецифічних моноклональних антитіл до S- та N-структурних білків коронавірусу SARS-CoV-2 для розробки пілотних зразків тест-систем на основі імуноферментного (ІФА) та імунохроматографічного (ІХА) аналізів, що дозволять швидко і точно діагностувати присутність антигенів вірусу в біологічних зразках людини.

7. Термін проведення науково-технічного проєкту

початок — 01 січня 2021 р. ; закінчення — 31 грудня 2021 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **400,000** тис. грн.
та по роках
2021 р. — 400,000 тис. грн.

8. Календарний план науково-технічного проєкту

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Синтез та очиска рекомбінантних білків (АГ) вірусу SARS-CoV-2 на основі мікробних продуцентів	02 січня 2021 р. - 31 березня 2021 р.	к.б.н., Я.П. Бобак; д.б.н., с.д., О.В. Стасик.
2	Імунізація лабораторних мишей очищеними рекомбінантними S- і N- білками вірусу SARS-CoV-2.	01 квітня 2021 р. - 30 червня 2021 р.	к.б.н., О.І. Вовк.

3	Отримання клітин гібридом, здатних секретувати специфічні антитіла до використаних антигенів –S- і N- білків вірусу SARS-CoV-2	01 липня 2021 р. - 30 вересня 2021 р.	к.б.н., Г.Ю. Шуваєва.
4	Клонування та тестування отриманих гібридом з метою отримання найстабільнішого клону (-ів) для продукування високоспецифічних антитіл проти білків вірусу SARS-CoV-2.	01 жовтня 2021 р. - 30 грудня 2021 р.	к.б.н., О.І. Чень.

9. Зміст, основні вимоги до виконання науково-технічного проєкту, рівня і способів її виконання

Коронавірусна хвороба-2019 (COVID-19) є новою інфекційною хворобою, що викликається вірусом *SARS-CoV-2*, яка поширилася наприкінці 2019 року з провінції Ухань, Китай, і за короткий час досягла масштабів пандемії. Станом на 14 червня 2020 року у світі нараховується більше 7.8 мільйонів інфікованих, та понад 430 тис. летальних випадків, з яких більше 31 тис. хворих та 900 померлих від хвороби та ускладнень в Україні. Характерними симптомами захворювання, є висока температура (88%), сухий кашель (68%), хронічна втома (38%) [Oberfeld et al, 2020]. Вірус легко передається від людини до людини і поширюється також хворими з легким або безсимптомним перебігом хвороби, що за останніми даними можуть становити до 45% від усіх пацієнтів [Kobayashi et al, 2020; Mizumoto et al, 2020; Oran and Topol, 2020]. Тому з метою контролю та обмеження поширення вірусу необхідна його масова ефективна діагностика.

Золотим стандартом виявлення вірусу в лабораторних умовах є детекція його генетичного матеріалу методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (RT-PCR). Відповідний тест дозволяє детектувати вірус ще на початку захворювання, але для використання RT-PCR необхідне спеціалізоване обладнання, яке в Україні доступне лише великим регіональним медичним установам. Отримання результату тестування займає тривалий час через складну процедуру дослідження та завантаженість лабораторних центрів. Для пацієнтів малих міст та сільської місцевості, де немає можливості провести таке лабораторне дослідження, отримання результатів тестування вимагає ще більшого часу, що може бути критичним фактором для встановлення діагнозу та порятунку життя пацієнта.

Сучасні серологічні тести визначають присутність у крові пацієнтів антитіл IgM та IgG до SARS-CoV-2 методами імуоферментного (ІФА) та імуохроматографічного (ІХА) аналізів. Ці тести є ефективними приблизно після 5 дня розвитку хвороби, коли рівень IgM та IgG в крові інфікованої людини зростає. Отже, коли людина вже є інфікованою і може скласти небезпеку для оточуючих, а імунна відповідь організму ще не розвинулась, ці тести дають негативний результат, що ускладнює прийняття вірного рішення щодо лікування чи ізоляції пацієнта.

Автори проєкту стверджують, що на даний момент існує критична потреба у діагностичних підходах визначення білків (антигенів) вірусу за принципами ІФА та ІХА у біологічних зразках людини. Це дозволить виявляти COVID-19 «поруч із пацієнтом» - при огляді хворого вдома або безпосередньо в лікарні у місцевостях, де немає можливості провести лабораторні дослідження. Крім того, таке швидке тестування великих груп людей, наприклад при перетині кордону або осіб, хто контактував з хворим на COVID-19, дозволить ефективніше контролювати поширення захворювання. На даний момент відповідні тести відсутні на світовому ринку, оскільки *ключовим компонентом ефективного ІФА та ІХА тестів є виселективні щодо білків конкретного вірусу моноклональні антитіла.*

Наша пропозиція полягає у створенні моноклональних антитіл, які будуть специфічно розпізнавати білки-мішені вірусу SARS-CoV-2. Для отримання моноклональних антитіл проти антигенів вірусу буде застосовано гібридомну технологію, в якості антигенів будуть використані spike) поверхневий глікопротеїн та N (nucleocapsid) білок нуклеокапсиду. Експресія рекомбінантних білків в бактерійній системі чи на основі рекомбінантних штамів дріжджів, та афінна очистка білків будуть використані для наробки антигенів, придатних для імунізації тварин. Зокрема, у роботі буде використано ті послідовності білків, які не виявляли високої частоти мутацій під час попереднього етапу пандемії Covid-19.

В подальшому, отримані моноклональні антитіла планується використати для розробки пілотних зразків тест-систем на основі ІФА та ІХА аналізів, що повинні забезпечити доступне, швидке і точне діагностування присутності антигенів вірусу в біологічних зразках людини.

Слід зазначити, що колектив виконавців володіє базовим необхідним обладнанням та значним унікальним попереднім досвідом в успішному використанні гібридної технології. Проект розраховано на максимально стислий, виходячи із вимог реалізації зазначеної технології, термін в один рік.

Для виконання завдань проекту планується здійснити наступні дослідження:

1. Отримати очищені рекомбінантні S- і N- білки вірусу SARS-CoV-2, що будуть слугувати антигенами, проти яких будуть отримуватися моноклональні антитіла.
2. Отримати імунованих мишей з вираженою імунологічною відповіддю на використані імуногени – S- і N- білків вірусу SARS-CoV-2.
3. Провести селекцію отриманих гібридом на ГАТ/ГТ середовищах, відібрати клони, що продукують високий титр специфічних антитіл в культуральне середовище.
4. Отримати найстабільніший клон (клони) для продукування високоспецифічних антитіл проти S- і N-білків вірусу SARS-CoV-2. Тестування отриманих антитіл як компонентів ІФА та ІХА тестів.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та науково-технічним проєктом в цілому

Буде отримано стабільні гібридами - продуценти високоспецифічних антитіл на основі імморталізованих клітин лабораторних мишей, які можуть забезпечити продукцію відповідних антитіл до вибраного антигену коронавірусу SARS-CoV-2 у промислових масштабах. На основі відібраних антитіл, що відповідають необхідним характеристикам чутливості та селективності, будуть створені та перевірені пілотні зразки ІХА та ІФА тестів на збудник COVID-19.

За допомогою гібридом, що здатні синтезувати високоспецифічні антитіла до коронавірусу SARS-CoV-2 можна досягти продукції антитіл у масштабах, необхідних для виготовлення як ІФА наборів, так і серійного виробництва тест систем ІХА для швидкого визначення COVID-19. Серед відомих модифікацій методу ІХА для тестування різних вірусів метод «lateral flow» є найбільш зручним. Відповідний підхід, як правило, надає можливість внутрішнього контролю для підтвердження коректного перебігу аналізу, та дозволяє візуальну оцінку результату тесту протягом 15-30 хв. Зберігати тест-системи та проводити аналіз можна при кімнатній температурі. У випадку вірусу SARS-CoV-2, тестування може відбуватись з біологічними зразками зі слизових поверхонь та не передбачати відбору зразків крові. Комерційні аналоги відповідного тесту на даний момент недоступні на вітчизняному та міжнародному ринку.

Так званий «швидкий» метод детекції АГ вірусу за допомогою специфічних моноклональних антитіл та імунохроматографічного аналізу (ІХА) характеризується, подібно до ІФА, селективністю (здатністю розпізнавати конкретний АГ, тобто конкретний вірус), високочутливістю (здатністю розпізнавати низькі кількості АГ), але також простотою та швидкістю аналізу (15-30 хвилин) та помірною собівартістю аналізу (до 100 грн, комерційна вартість ІФА тестів на збудник COVID-19 складає від 600 грн і вище).

Таким чином, для швидкого безпосереднього контролю великих груп людей (напр. при перетині кордону, груп ризику, осіб, що контактували із підтвердженим хворим), для практики сімейних лікарів саме таке «швидке» тестування є оптимальним. У випадку позитивного результату, тест ІХА може бути додатково підтвердженим тестуванням RT-PCR.

Можливість швидкого, високоспецифічного і доступного скринінгу на COVID-19 дозволить контролювати ризики поширення захворювання у суспільстві, а з точки зору економіки, зменшить навантаження на лабораторні центри, що забезпечить їхню безперебійну роботу, а також знизить загальні витрати бюджетних коштів, спрямованих на боротьбу з COVID-19.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню науково-технічного проєкту

- звіт про виконання наукового проєкту, оформленого відповідно до ДСТУ 3008:2015 «Інформація та документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура та правила оформлювання» зі списком публікацій за результатами виконання роботи у звітному році;
- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями;
- перелік статей накладних витрат;
- перелік додаткової науково-технічної документації (за необхідності).

Науковий керівник науково-технічного проєкту

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.д.



О.В. Стасик

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості науково-технічного проєкту

«Отримання моноклональних антитіл проти білків коронавірусу SARS-CoV-2 для
розробки ефективних тест-систем для швидкої діагностики COVID-19»
на 2021 рік

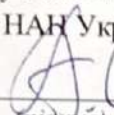
Термін виконання науково-технічного проєкту: початок — 01.01.2021 р., закінчення —
31.12.2021 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	200,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	44,000
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	42,500
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	22,000
5	Відатки на відрядження	2250	6,500
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	25,000
7	Оплата електроенергії	2273	40,000
8	Оплата природного газу	2274	20,000
Разом:			400,000
в т.ч. накладні витрати			20,000

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор

Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

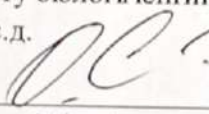

(підпис)

М.П.



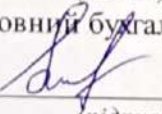
Науковий керівник науково-технічного проєкту
Завідувач відділу

Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., с.д.


(підпис)

О.В. Стасик

Головний бухгалтер


(підпис)

М.С. Демкович