

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201700541 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.05.31

(22) Дата подачи заявки
2017.11.10

(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ D-АНТИГЕНА ПОЛИОВИРУСОВ 1-3 ТИПОВ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЖЕЛТОЧНЫХ АНТИТЕЛ И ДЕТЕКТОРНЫХ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ БИОТИНОМ

(96) 2017000120 (RU) 2017.11.10

(71) Заявитель:
ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П.
ЧУМАКОВА РАН" (RU)

(72) Изобретатель:
Иванов Александр Петрович,
Клеблеева Татьяна Дмитриевна,
Иванова Ольга Евгеньевна,
Ишмухаметов Айдар Айратович (RU)

(74) Представитель:
Пустовалова М.Л., Котлов Д.В.,
Черняев М.А., Яремчук А.А. (RU)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии, вакцинологии и вирусологии и предназначено для определения D-антигена полиовирусов 1-3 типов в инфицированных культурах клеток и в препаратах инактивированной полиовирусной вакцины. Изобретение касается получения моновалентных, специфических к полиовирусам 1-3 типов антител класса IgY, выделяемых из желтков яиц иммунизированных куриц, и их применению для количественного определения D-антигена полиовирусов 1-3 типов в иммуноферментном анализе (ИФА) как в качестве иммуносорбента для первичного связывания антигена, так и для детекции связанных комплексов. Изобретение может быть использовано при производстве инактивированных полиовирусных вакцин (из "диких" или аттенуированных штаммов полиовирусов) для контроля иммуногенности вакцины (контроля содержания D-антигена - основного показателя качества вакцины как профилактического препарата, вызывающего защитный иммунитет).

A1

201700541

201700541

A1

**Способ количественного определения D-антигена полиовирусов 1-3 типов
иммуноферментным анализом с использованием специфических желточных
антител и детекторных антител, меченных биотином**

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии, вакцинологии и вирусологии и предназначено для лабораторной идентификации D-антигена полиовирусов 1-3 типов в инфицированных культурах клеток и в препаратах инаktivированной полиовирусной вакцины. Настоящее изобретение может быть использовано в производстве инаktivированных полиовирусных вакцин (из диких и аттенуированных штаммов полиовирусов) для контроля содержания D-антигена – основного показателя качества вакцины как профилактического препарата, вызывающего защитный иммунитет (иммуногенность вакцины).

Уровень техники

Заключительный этап глобальной ликвидации полиомиелита предусматривает прежде всего изменения в стратегии вакцинации, а именно: 1) синхронизацию работы по прекращению плановой иммунизации с помощью пероральной аттенуированной полиовирусной вакцины (ОПВ) и 2) разработку более безопасных процессов изготовления инаktivированных полиовирусных вакцин (ИПВ) и приемлемых стратегий их использования (Исполнительный комитет ВОЗ, 10 января 2008 г.). Многолетний опыт применения ИПВ и ОПВ показал, что ОПВ эффективна в популяциях, где циркулируют дикие полиовирусы, то есть на первых этапах борьбы с полиомиелитом, когда центральным моментом является создание коллективного иммунитета. В странах и регионах, где циркуляция диких полиовирусов прекращена (среди них – Российская Федерация), применение только ОПВ нерационально и небезопасно (вакциноассоциированный полиомиелит, возникновение штаммов-ревертантов); в таких условиях комбинация ИПВ/ОПВ становится стратегией выбора. В дальнейшем целесообразен переход исключительно на ИПВ, то есть на заключительном этапе выполнения программы ликвидации полиомиелита и в последующем периоде времени (контроль данного заболевания) ИПВ будет основным средством профилактики полиомиелита.

Создание любого варианта ИПВ (на основе диких или аттенуированных штаммов полиовирусов) неизбежно связано с разработкой метода количественного определения D-антигена (выражается в D-антигенных единицах, DU/ДАГ ЕД) – основного показателя потенциальной способности вакцины вызывать защитный иммунитет у вакцинированных

лиц. Основные производители коммерческих ИПВ (например, Sanofi Pasteur, Франция; GlaxoSmithKline, Великобритания) для определения D-антигена используют различные варианты иммунно-ферментного анализа (ИФА) собственной разработки. Эти системы ИФА основаны на использовании специфических (против полиовирусов) поликлональных антител млекопитающих, в частности, от кроликов (описаны, например, в заявке US 20100040647 A1). Однако известно, что использование антител млекопитающих (кроликов) для систем ИФА сопряжено с рядом негативных моментов, прежде всего, с возможностью неспецифических взаимодействий данных антител с другими компонентами ИФА (вторичными антителами, ферментным конъюгатом), что выражается в получении ложноположительных результатов анализа (Schade R., et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine// ATLA. – 2005. – Vol. 33. – P. 129-154).

Сущность изобретения

Задача, решаемая изобретением, заключается в конструировании системы иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющей количественно определять D-антиген каждого из 3-х типов полиовируса в препаратах ИПВ.

Поставленная задача решается за счет того, что в качестве иммуносорбента при проведении ИФА используются моновалентные (против каждого из 3-х типов полиовируса) препараты высокоактивных специфических антител класса Y (IgY), полученные авторами изобретения из яичных желтков иммунизированных куриц, функционально соответствующих антителам (IgG) млекопитающих, а в качестве вторичных (детекторных) антител – моновалентные препараты тех же IgY, модифицированные меткой для возможности детекции.

В некоторых вариантах изобретения задача решается с помощью способа количественного определения D-антигена полиовируса 1, 2 или 3 типа иммуноферментным анализом (ИФА), который заключается в том, что в качестве иммуносорбента используют аффинно очищенные моновалентные иммуноглобулины класса Y (IgY) против D-антигена полиовируса соответствующего типа, полученные из яичных желтков куриц, иммунизированных полиовирусом этого типа, а в качестве детекторных антител – те же моновалентные иммуноглобулины IgY, модифицированные меткой. В предпочтительных вариантах изобретения указанный способ отличается тем, что в качестве метки используется биотин, а в качестве иммуносорбента используется смесь из трех аффинно очищенных моновалентных иммуноглобулинов класса Y (IgY) против D-антигена полиовирусов 1, 2 и 3 типа.

Решение задачи обеспечивается установленной авторами возможностью получения из яичных желтков куриц, иммунизированных полиовирусами, специфических

антител класса IgY. Предлагаемый метод сокращает срок получения антител за счет более короткого цикла иммунизации при одновременном увеличении выхода антител за счет того, что кладка яиц каждым продуцентом происходит ежедневно или через день в течение 3-4 месяцев, а содержание антител в одном желтке соответствует количеству антител в 25-30 мл специфической сыворотки, получаемой в результате кровопускания у иммунизированного кролика. Несмотря на принципиальное сходство двух аналогов (IgG млекопитающих и IgY птиц, чьи биохимические характеристики хорошо изучены), IgY обладает рядом преимуществ, особенно ценных для его использования в диагностических целях в качестве иммунных реагентов: 1) высокая иммунореактивность птиц по отношению к чужеродным белкам инфекционного происхождения (вирусных, бактериальных, паразитарных), а также к белкам токсинов и ядов; 2) низкая перекрестная реактивность с белками млекопитающих за счёт большой филогенетической дистанции между птицами и млекопитающими, которая выражается в неспособности IgY активировать систему комплемента млекопитающих, а также в неспособности связываться с ревматоидным фактором, Fc-рецепторами, что обеспечивает низкий уровень неспецифических реакций; 3) более низкая себестоимость, поскольку одна курица-несушка может производить около 40 г IgY антител в год. Таким образом, варианты ИФА на основе специфических антител птиц представляют собой перспективный класс диагностических систем, в частности, для определения вирусных антигенов, включая D-антигены полиовирусов.

При осуществлении изобретения достигаются следующие технические результаты:

- усовершенствована новая методика измерения компонентов полиовирусной вакцины, в частности, данная методика обеспечивает повышение чувствительности определения D-антигенов разных типов из-за уменьшения фонового сигнала, а также упрощенный дизайн ИФА;

- разработан способ, позволяющий с высокой достоверностью измерять количество D-антигенов разных типов в процессе изготовления инактивированной полиовирусной вакцины, что абсолютно необходимо и входит в процесс производства вакцины;

Использование разработанного способа позволяет составлять формуляции инактивированной полиовирусной вакцины, точно контролируя количество (и соотношение) D-антигена каждого типа в дозе вакцины согласно данным по иммуногенности вакцины, что также является абсолютно необходимым при производстве вакцины.

Подробное описание изобретения

В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Термин «антитело» эквивалентен термину «иммуноглобулин» и означает гликопротеин, состоящий из двух тяжелых цепей и двух легких цепей, соединенных дисульфидными связями.

Под типами полиовируса, или вируса полиомиелита, понимают три существующих в природе серотипа дикого полиовируса — тип 1, тип 2 и тип 3, каждый из которых имеет несколько отличающийся капсидный протеин. На текущем заключительном этапе ликвидации полиомиелита в эндемичных районах продолжают циркулировать только дикие полиовирусы типа 1 и 3.

При осуществлении настоящего изобретения могут быть использованы как "дикие" штаммы полиовируса, так и различные модифицированные или аттенуированные штаммы полиовируса, например, штамм Сэбин.

Под моновалентными иммуноглобулинами следует понимать иммуноглобулины, выработанные в организме животного при иммунизации только одним антигеном.

Иммуноглобулины, как и другие белки, могут быть ковалентно модифицированы многими способами с использованием различных меток, пригодных для конкретного биологического анализа. В качестве меток для обеспечения детекции в ИФА могут быть использованы ферменты, биотин, флуорофоры или радиоактивные изотопы.

Если не определено отдельно, технические и научные термины в данной заявке имеют стандартные значения, общепринятые в научной и технической литературе.

Нижеследующие примеры осуществления изобретения приведены в целях раскрытия характеристик настоящего изобретения и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

Необходимые для осуществления изобретения антитела IgY получают из желтков яиц иммунизированных куриц 5-6 месячного возраста. Куриц иммунизируют очищенными и инактивированными «дикими» полиовирусами (1 тип - Mahoney, 2 тип - MEF-1, 3 тип - Saukett), полученными в результате заражения аутентичных перевиваемых клеток Vero (полученных из эпителия почки африканской зелёной мартышки *Chlorocebus aethiops*). IgY выделяют из желтка яиц последовательно высаливанием с помощью сульфата натрия (E.M. Akita, S. Nakai. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. J. Immunol. Methods. 1993, 160: 207-214) и аффинной хроматографией. Часть IgY используют для сенсibilизации твёрдой фазы (иммунопанель для ИФА), другую часть IgY связывают с биотином (E. Harlow and D. Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, 341) и используют как детекторные антитела в ИФА при определении D-антигена

полиовируса. Уровень нейтрализующей активности и специфичность IgY определяют в реакции нейтрализации (РН), проводимой микрометодом в перевиваемых клетках HEp-2-C (клетки эпителиальной карциномы человек, Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е издание. ВОЗ. Женева. 2005).

Авторами было неожиданно обнаружено, что использование в качестве иммуносорбента для количественного определения D-антигена полиовирусов в ИФА аффинно очищенных препаратов IgY из яичных желтков иммунизированных кур, в комбинации с детекторными моновалентными IgY, меченными биотином, обеспечивает более низкий неспецифический фон сигнала ИФА и, соответственно, более высокую чувствительность и достоверность при количественном определении антигена. Известно, что желточные IgY обладают высокой специфической активностью по отношению к определяемому антигену и низкой перекрестной реактивностью с белками млекопитающих за счёт большой филогенетической дистанции между птицами и млекопитающими (Schade R, et al., Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern Lab Anim. 2005 Apr;33(2):129-54). При этом, важным для достижения технического результата является как использование желточных моновалентных IgY как на стадии иммуносорбции на поверхности для первичного связывания антигена, так и на стадии детекции связавшихся комплексов, из-за обнаруженного авторами неспецифического взаимодействия IgG кроликов с желточными IgY, иммобилизованными на подложке.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Получение IgY.

1. Иммунизация кур.

Используют несущихся кур породы Леггорн 5-6 месячного возраста. Иммуногены представляют собой очищенные и инактивированные «дикие» полиовирусы (1 тип - Mahoney, 2 тип - MEF-1, 3 тип - Saukett), полученные в результате заражения перевиваемых клеток Vero. Цикл иммунизаций включает трехкратное введение иммуногена (по 1,0 мл в 4 точки пекторальных мышц) с интервалами в 1 месяц. Сбор яиц начинают через 2-4 недели после завершения полного цикла иммунизаций. Яйца хранят до 2-х месяцев при 4° С; желтки хранят неопределенно долгое время при минус 20 °С.

2. Выделение IgY из желтков методом высаливания сульфатом натрия (Na₂SO₄).

2.1. Прибавляют к одному куриному желтку (средний объем 15-20 мл) 9 объемов охлажденной воды для инъекций (ФС 42-2620-97).

2.2. Гомогенизируют смесь осторожным перемешиванием и выдерживают раствор 18 часов при + 4 °С.

2.3. Отделяют раствор, содержащий IgY, от преципитата фильтрованием через фильтровальную бумагу Whatman с высокой скоростью фильтрации.

- 2.4. Разбавляют фильтрат водой для инъекций до объема 175 мл.
 - 2.5. Помещают емкость с раствором на роторную мешалку с подогревом до 40 °С и медленно добавляют 33,5 г Na_2SO_4 (хч) при постоянном перемешивании.
 - 2.6. Продолжают перемешивание в течение 15 мин. после полного растворения.
 - 2.7. Переносят раствор в центрифужный стакан и центрифугируют при 10 000 g в течение 20 мин при + 25 °С.
 - 2.8. Удаляют надосадочную жидкость.
 - 2.9. Подсушивают хорошо видимый осадок при комнатной температуре.
 - 2.10. Растворяют осадок в 20 мл стандартного фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH 7,2 - 7,4 при + 25 °С.
 - 2.11. Медленно добавляют в раствор 2,8 г Na_2SO_4 (хч).
 - 2.12. Выдерживают раствор 15 мин при + 25 °С после полного исчезновения осадка.
 - 2.13. Центрифугируют раствор при 12 000 в течение 10 мин при + 25 °С.
 - 2.14. Удаляют надосадочную жидкость.
 - 2.15. Подсушивают осадок при комнатной температуре.
 - 2.16. Растворяют осадок в 5,0 мл ФСБ.
 - 2.17. Переносят осадок в диализный мешок (диаметр 1,0 см).
 - 2.18. Проводят диализ против 2 Л ФСБ при + 4 °С.
 - 2.19. Стерилизуют полученный препарат IgY фильтрацией через фильтр Millipore (0,45 мкм).
 - 2.20. Сохраняют стерильный препарат IgY при + 4 °С (несколько месяцев) или при минус 20 °С (неопределенно долго).
- Среднее содержание белка в препаратах составляет 5-10 мг/мл (определение по поглощению при 280 нм).

3. Очистка IgY на аффинной колонке HiTrap (GE Healthcare) согласно инструкции производителя:

Объем колонки: 5 мл

Связывающая способность: 100 мг IgY

Скорость элюции: 5 мл/мин (максимальная скорость: 20 мл/мин)

Связывающий буфер: 20мМ фосфат натрия + 0,5 М K_2SO_4 , pH 7,5

Буфер для элюции: 20мМ фосфат натрия, pH 7,5

Очищающий буфер: 20мМ фосфат натрия, pH 7,5 с 30 % изопропанола

Перед использованием указанные буферы стерилизуют через фильтр 0,45 мкм.

К препарату IgY (после высаливания из куриного желтка) добавляют K_2SO_4 до концентрации 0,5 М, pH доводят до 7,5. Перед нанесением на колонку полученный препарат стерилизуют через фильтр 0,45 мкм.

Процедура очистки IgY (проводят при комнатной температуре)

- 3.1. Промывают колонку минимум 5 объёмами каждого из указанных буферов (последовательно): связывающим, для элюции и очищающим.
- 3.2. Уравновешивают колонку 5 объёмами связывающего буфера.
- 3.3. Наносят образец.
- 3.4. Промывают колонку минимум 10 объёмами связывающего буфера (или до полного отсутствия белка в элюате).
- 3.5. Элюируют IgY 10 объёмами буфера для элюции.
- 3.6. Определяют содержание белка в аффинно очищенном препарате IgY (по поглощению при 280 нм), стерилизуют через фильтр 0,45 мкм, хранят при + 4-8 °С до 1 года. Для неопределённо длительного хранения добавляют глицерин (до 50 %) и хранят при минус 20 °С.

Пример 2. Определение специфической активности IgY в реакции нейтрализации.

Основным показателем качества антител является их специфическая активность, выраженная в титрах антител. Определение специфической активности IgY проводят в функциональном тесте – реакции нейтрализации, осуществляемой микрометодом с использованием в качестве индикаторных систем перевиваемых клеток HEp-2-C. Титр IgY измеряют по результатам подавления цитопатического эффекта (ЦПЭ), развивающегося в индикаторных клетках под действием испытуемого вируса. Титр IgY эквивалентен величине его разведения, способного нейтрализовать 100 (32-320) тканевых цитотоксических доз (ТЦД₅₀) гомологичного вируса.

Специфическую активность IgY определяют следующим образом.

1. В среде Игла MEM (ТУ 9385-012-01895045-2007) готовят разведение IgY 1:8. В отличие от IgG, IgY не подлежит инаktivации в течение 30 мин при + 56 °С.
2. Готовят последовательные двукратные разведения IgY до 1: 32 768.
3. Вносят по 0,025 мл каждого последовательного разведения IgY, начиная от 1:8, в каждые 4 лунки 96-луночной панели для микротитрования («Costar» или его аналог).
4. Добавляют в каждую лунку с разведениями IgY по 0,025 мл разведения гомологичного вируса, содержащего 100 (32-320) ТЦД₅₀ (рабочая концентрация вируса).
5. Помещают панель с содержимым на 3 часа в CO₂-инкубатор с 5 % CO₂ при + 36 °С.
6. Готовят суспензию индикаторных клеток HEp-2-C.
7. Удаляют из флакона с полностью сформированным монослоем клеток питательную среду Игла MEM.
8. Однократно промывают монослой клеток раствором Эрла (ТУ 9385-005-01895045-20011).

9. Вносят во флакон с монослоем клеток HEp-2-C подогретую до + 36 °C смесь из эквивалентных объемов раствора Версена (ТУ 9385-008-01895045-2007) и трипсина (ТУ 9385-01895045-2007) в количествах, достаточных для покрытия монослоя клеток.
10. Удаляют растворы после 15-30 сек. контакта с клетками.
11. Помещают флакон в термостат при + 36 °C.
12. Выдерживают флаконы в термостате до отслоения клеток от поверхности флакона.
13. Ресуспендируют отделившиеся клетки в 10,0 мл среды роста, состоящей из 95 % среды Игла MEM и 5 % сыворотки крови плодов коровы ("Gibco", кат. № 10106-169, США).
14. Разводят 0,1 мл суспензии клеток в ростовой среде до 1:10.
15. Подсчитывают в приготовленном разведении концентрацию жизнеспособных клеток с помощью счетной камеры Горяева.
16. Готовят в среде роста разведение, содержащее $1-2 \times 10^4$ соответствующих индикаторных клеток в 0,1 мл (рабочая концентрация клеток).
17. Вносят в каждую лунку со смесью IgY и соответствующего вируса по 0,1 мл суспензии клеток в рабочей концентрации.
18. Панель заклеивают стерильной адгезивной плёнкой, накрывают крышкой и помещают на 5-7 дней в CO₂-инкубатор с 5 % CO₂ при + 36 °C.
19. Ежедневно с помощью инвертированного микроскопа определяют наличие и степень проявления ЦПЭ вируса в клетках.

При каждом измерении активности IgY предусмотрены следующие виды контролей, проводимые одновременно с основным опытом: контроль рабочей концентрации гомологичного вируса, контроль токсичности IgY, контроль качества индикаторных клеток.

Контроль рабочей концентрации гомологичного вируса

1. Вносят по 0,025 мл разведения, содержащего рабочую концентрацию гомологичного вируса, и три последующие десятикратные разведения в две лунки панели.
2. Добавляют в те же лунки 0,025 мл среды Игла MEM.
3. Помещают панель с содержимым на 3 часа в CO₂ – инкубатор с 5 % CO₂ при + 36 °C.
4. Добавляют в те же лунки по 0,1 суспензии индикаторных клеток в рабочей концентрации.
5. Помещают панель с содержимым на 5-7 дней в CO₂- инкубатор с 5 % CO₂ при + 36 °C. Последующие этапы контроля соответствуют пп. 18-19 раздела, который касается определения специфической активности IgY.

Контроль цитотоксичности IgY

1. Вносят по 0,025 мл каждого последовательного двукратного разведения IgY от 1:8 до 1: 512 в 4 лунки панели.
2. Добавляют в те же лунки по 0,025 мл среды Игла MEM.

3. Добавляют в те же лунки по 0,1 мл суспензии индикаторных клеток в рабочей концентрации.

Последующие этапы контроля соответствуют пп. 18-19 раздела, который касается определения специфической активности IgY.

Контроль качества индикаторных клеток

1. Вносят по 0,05 мл среды Игла MEM в 10 лунок панели.

2. Добавляют в каждую лунку по 0,1 мл суспензии клеток в рабочей концентрации.

Последующие этапы контроля соответствуют пп. 18-19 раздела, который касается определения специфической активности IgY.

Титр нейтрализующих антител определяют по последнему разведению IgY, которое нейтрализует 100 (32-320) ТЦД₅₀ гомологичного вируса (отсутствие ЦПЭ в индикаторных клетках), либо по формуле Кербера (Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е издание. ВОЗ. Женева. 2005). Препараты IgY с титрами нейтрализующих антител $\geq 1:1024$ пригодны для конструирования систем ИФА для определения D-антигена полиовирусов.

Пример 3. Биотинилирование препаратов IgY к 1, 2, 3 типам полиовируса.

1. Готовят раствор N-гидроксисукцинимидобиотина (Sigma, H1759-250MG): 10 мг в диметилсульфоксиде (Sigma, D2650-100ml).
2. Готовят раствор IgY в концентрации 3 мг/мл в 0,1 М натрий-боратном буфере, pH 8,8.
3. Смешивают растворы, полученные на этапах 1 и 2, из расчета 750 мкг биотина на 3 мг IgY. Тщательно перемешивают и оставляют на 4 часа при комнатной температуре.
4. Добавляют 60 мкл 1 М раствора NH₄Cl на 750 мкг биотина, инкубируют 10 минут при комнатной температуре.
5. Диализуют против 0,1 М фосфатно-солевого буфера, pH 7,2.
6. Стерилизуют через фильтр 0,45 мкм, хранят при + 4-8 °С до 1 года. Для неопределённо длительного хранения добавляют глицерин (до 50 %) и хранят при минус 20 °С.

Пример 4. ИФА для определения D-антигена полиовирусов в препаратах ИПВ.

В предпочтительных вариантах изобретения используется прямой вариант ИФА («двойной сэндвич»).

1. Иммунопанель с высокой сорбционной ёмкостью (Costar, кат. № 9018) сенсibilизируют аффинно очищенным IgY к каждому из трёх типов полиовирусов: в каждую лунку панели вносят по 0,1 мл раствора IgY к одному из типов (1, 2 или 3) полиовируса в концентрации 10 мкг/мл в карбонат-гидрокарбонатном буфере pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100 CAP), панель накрывают крышкой и инкубируют 18 час. при + 4-8 °С или 3 час. при + 37 °С.

2. Содержимое лунок вытряхивают, панель постукивают по нескольким слоям фильтровальной бумаги (в положении вверх дном) для удаления остатков иммуносорбента (IgY). Лунки промывают 2 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,2 (Sigma, кат. № P4417-100TAB) с 0,05 % Tween-20 (Sigma, кат. № P1379-100ml) – ФСБ-Т, внося раствор до края лунок и сразу же удаляют его. Вносят в лунки по 0,2 мл 1 % раствора фетальной сыворотки телёнка (Gibco или аналог) в ФСБ (ФСБ-ФС), панель накрывают крышкой и инкубируют 1 час при комнатной температуре. Это процедура блокирования свободных сайтов лунок панели индифферентным белком.

3. Блокирующий раствор удаляют, лунки промывают 2 раза ФСБ-Т, как описано выше. Вносят по 0,1 мл исследуемого препарата С-ИПВ, ИПВ, международного стандарта ИПВ и т.д. в разведениях, начиная, например, с 1:8, в ФСБ-ФС с 0,05 % Tween-20 (ИФА-буфер), по 2 лунки на разведение. Параллельно разведениям исследуемого препарата вносят по 0,1 мл ИФА-буфера – негативный контроль. Панель накрывают крышкой и инкубируют 2 час. при + 37 °С или 18 час. при + 4-8 °С. Это фаза связывания определяемого D-антигена с иммуносорбентом.

4. Содержимое лунок удаляют, лунки промывают 4 раза ФСБ-Т, как описано выше. Вносят в лунки по 0,1 мл детекторных антител – IgY к соответствующему типу полиовируса, меченых биотином в разведении, подобранном шахматным титрованием, в ИФА-буфере. Панель накрывают крышкой и инкубируют 1 час при + 37 °С. Это фаза детекции определяемого D-антигена, связанного с иммуносорбентом.

5. Содержимое лунок удаляют, лунки промывают 4 раза ФСБ-Т, как описано выше. Вносят в лунки по 0,1 мл стрептавидин-пероксидазного конъюгата (Sigma, S5512-1MG) в ИФА-буфере в рабочем разведении, которое подбирается титрованием в отдельном опыте. Панель накрывают крышкой и инкубируют 45 мин. при + 37 °С. Это фаза выявления комплекса иммуносорбент + определяемый D-антиген + детекторные меченые антитела.

6. Содержимое лунок удаляют, лунки промывают 4 раза ФСБ-Т, как описано выше. Вносят в лунки по 0,1 мл готового субстрат-индикаторного раствора – тетраметилбензидина (ТМБ, Sigma, кат. № TO440-100ml). Панель инкубируют в темноте 20 мин. при комнатной температуре.

7. Вносят в лунки по 0,05 мл 2М раствора серной кислоты (остановка ферментной реакции).

8. Результат немедленно считывают в ИФА-ридере (любая доступная модель) по абсорбции на длине волны 450 нм. Результат считается положительным при отношении оптической плотности лунок с определяемым D-антигеном (его наивысшее разведение) к оптической плотности контрольных лунок (ИФА-буфер) $\geq 2,1$ (P/N). Количество D-антигена в исследуемом образце ИПВ вычисляют по отношению к референс-образцу ИПВ (с

известным количеством D-антигена), который титруется в ИФА параллельно исследуемому образцу, используя простую пропорцию (приблизительный подсчёт), либо метод "параллельных линий" (PLA) – точный подсчёт. Концентрацию D-антигена выражают в D-антигенных единицах на 1 мл (DU/ml, ДАГ ЕД/мл).

В таблице 1 представлены результаты определения D-антигена полиовируса 1 типа: параллельное титрование в ИФА экспериментальной серии С-ИПВ на основе штамма Сэбин 1 (штамм Р 712 Ch 2ab) и международного стандарта ИПВ из «диких» штаммов полиовируса – 12/104 (NIBSC, Великобритания). В качестве иммуносорбента использован желточный IgY, полученный в результате иммунизации куриц очищенным и инаktivированным формальдегидом полиовирусом 1 типа Mahoney, в качестве детекторных антител – тот же биотинилированный IgY.

Из таблицы 1 следует, что, согласно критерию положительности результата ($P/N \geq 2,1$), титр D-антигена 1 типа в С-ИПВ (Сэбин 1) равен 1: 256, титр D-антигена 1 «дикого» типа в составе международного стандарта (12/104 NIBSC) равен 1: 1024, то есть концентрация D-антигена в составе С-ИПВ (Сэбин 1) равна примерно 69 ДАГ ЕД/мл.

Таблица 1.

Антиген	Разведения антигена					
	1: 16	1: 64	1: 256	1: 1024	1: 4096	1: 16384
С-ИПВ (Сэбин 1)	1,295*	0,420	0,181	0,114	0,100	0,103
Стандарт ИПВ-1 (NIBSC)	3,807	1,454	0,443	0,200	0,117	0,109
Контроль (ИФА-буфер)	0,088	0,097	0,086	0,086	0,085	0,087
Среднее значение = 0,088						

* - оптическая плотность при 450 нм

Пример 5. Сравнительная оценка комбинированной и полной систем ИФА с использованием IgY.

Для оценки характеристик описанной системы ИФА, основанной на использовании иммуноглобулинов класса Y (IgY) как на этапе иммуносорбции, так и в качестве детекторных антител (далее – "полная" система ИФА), авторами был проведен сравнительный анализ чувствительности ИФА в сравнении с "комбинированной" системой ИФА, когда иммуноглобулины класса Y используются только на этапе иммуносорбции, а на этапе детекции используются очищенные антитела IgG кролика, специфичные к каждому из трех полиовирусов. Титры IgY и IgG были подобраны исходя из результатов экспериментов по подавлению цитопатического эффекта, развивающегося в индикаторных клетках под действием испытуемого вируса (см. Пример 2). Комбинированная ИФА система представляла собой: IgY (полученные в результате

иммунизации куриц смесью полиовирусов 1, 2 и 3 типов) – исследуемый антиген – детекторные IgG кролика (раздельные для каждого типа вирусов). Полная ИФА система согласно изобретению представляла собой: IgY (полученные в результате иммунизации куриц раздельно полиовирусами 1, 2 и 3 типов) – исследуемый антиген – детекторные IgY (раздельные для каждого типа вирусов), меченные биотином.

Результаты определения D-антигена полиовируса 1 типа методом полной ИФА системы показаны в Таблице 1 (см. выше), а результаты определения D-антигена полиовируса 1 типа методом комбинированной ИФА системы показаны в Таблице 2.

Таблица 2.

Антиген	Разведения антигена					
	1: 16	1: 64	1: 256	1: 1024	1: 4096	1: 16384
С-ИПВ (Сэбин 1)	0,895*	0,420	0,281	0,214	0,200	0,203
Стандарт ИПВ-1 (NIBSC)	2,704	1,054	0,443	0,243	0,237	0,219
Контроль (ИФА- буфер)	0,173	0,17	0,186	0,183	0,192	0,179
	Среднее значение = 0,181					

* - оптическая плотность при 450 нм

Из сравнения данных таблиц 1 и 2 следует: (а) более низкий фон контроля в полной ИФА системе (среднее значение – 0,088 против среднего значения комбинированной системы – 0,181); (б) более высокий титр исследуемого и стандартного антигенов в полной ИФА системе: Сэбин1 – 1:256, стандарт NIBSC – 1:1024 согласно критерию $P/N \geq 2,1$ в сравнении с комбинированной системой: Сэбин1 – 1:64-1:256, стандарт – 1:256 согласно критерию $P/N \geq 2,1$.

Суммируя вышесказанное, особенностью настоящего изобретения является использование в качестве иммуносорбента для количественного определения D-антигена полиовирусов в ИФА аффинно очищенных моновалентных препаратов IgY (против каждого из трёх полиовирусов) из яичных желтков иммунизированных куриц, которые обладают высокой специфической активностью по отношению к определяемому антигену и низкой перекрестной реактивностью с белками млекопитающих за счёт большой филогенетической дистанции между птицами и млекопитающим, и детекторных желточных IgY, меченных биотином (моновалентных, против каждого из трёх

полиовирусов). Преимущества данной системы детекции антигенов (в частности, D-антигена полиовирусов) заключаются в упрощенном дизайне ИФА (одни и те же антитела используются для первичного связывания антигена и для детекции связавшегося комплекса), экономичности (полный отказ от использования млекопитающих), а также обеспечении более низкого неспецифического фона и, соответственно, более высокой достоверности результатов анализа.

Несмотря на то, что изобретение описано со ссылкой на раскрываемые варианты воплощения, для специалистов в данной области должно быть очевидно, что конкретные подробно описанные эксперименты приведены лишь в целях иллюстрирования настоящего изобретения, и их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения. Должно быть понятно, что возможно осуществление различных модификаций без отступления от сути настоящего изобретения.

Формула изобретения

1. Способ количественного определения D-антигена полиовируса 1, 2 или 3 типа иммуноферментным анализом (ИФА), заключающийся в том, что в качестве иммуносорбента используют аффинно очищенные моновалентные иммуноглобулины класса Y (IgY) против D-антигена полиовируса соответствующего типа, полученные из яичных желтков куриц, иммунизированных полиовирусом этого типа, а в качестве детекторных антител – те же моновалентные иммуноглобулины IgY, модифицированные меткой.

2. Способ по п. 1, в котором в качестве метки используется биотин.

3. Способ по п. 2, в котором в качестве иммуносорбента используют смесь из трех аффинно очищенных моновалентных иммуноглобулинов класса Y (IgY) против D-антигена полиовирусов 1, 2 и 3 типа.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201700541

Дата подачи: 10 ноября 2017 (10.11.2017)		Дата испрашиваемого приоритета:	
Название изобретения:		Способ количественного определения D-антигена полиовирусов 1-3 типов иммуно-ферментным анализом с использованием специфических желточных антител и детекторных антител, меченных биотином	
Заявитель:		ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ.М.П. ЧУМАКОВА РАН"	
☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) ☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/561 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)	
Согласно международной патентной классификации (МПК)			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)			
G01N 33/53, 33/50, 33/569, 33/68, 33/561			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей		Относится к пункту №
Y	RU 2535058 C2 (КОЗЛОВ ВИТАЛИЙ ГРИГОРЬЕВИЧ) 10.12.2014, формула		1-3
Y	REZAPKIN Gennady et al. Improved ELISA test for determination of potency of Inactivated Poliovirus Vaccine (IPV). Biologicals, 2005, vol. 33, n. 1, pp. 17-27		1-3
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
* Особые категории ссылочных документов:		"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности "У" документ, имеющий наиболее близкое отношение поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории "&" документ, являющийся патентом-аналогом "L" документ, приведенный в других целях	
"А" документ, определяющий общий уровень техники			
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее			
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.			
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета			
"D" документ, приведенный в евразийской заявке			
Дата действительного завершения патентного поиска:		06 марта 2018 (06.03.2018)	
Наименование и адрес Международного поискового органа:		Уполномоченное лицо :	
Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		 А.А. Никитин Телефон № (495) 531-6481	