

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038215**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.26

(51) Int. Cl. **G01N 33/569** (2006.01)

(21) Номер заявки
201800391

(22) Дата подачи заявки
2018.06.09

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ЖЕЛТОЧНЫХ АНТИТЕЛ И ДЕТЕКТОРНЫХ АНТИТЕЛ, МЕЧЕННЫХ БИОТИНОМ

(43) 2019.12.30

(56) US-A1-20170158753
RU-C2-2435865
RU-C2-2500422
RU-A-2016109642
EA-B1-23397

(96) 2018000071 (RU) 2018.06.09

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**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,
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 антигена вируса желтой лихорадки в инфицированных культурах клеток и в препаратах живой и инактивированной вакцины против желтой лихорадки. Изобретение касается получения специфических к антигену вируса желтой лихорадки антител класса IgY, выделяемых из желтков яиц иммунизированных куриц, и их применению для количественного определения антигена вируса желтой лихорадки иммуноферментном анализе (ИФА) как в качестве иммуносорбента для первичного связывания антигена, так и для детекции связанных комплексов. Изобретение может быть использовано при производстве инактивированных вакцин против желтой лихорадки для контроля иммуногенности вакцины (контроля содержания антигена вируса желтой лихорадки - основного показателя качества вакцины как профилактического препарата, вызывающего защитный иммунитет).

B1

038215

038215

B1

Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, иммунологии, вакцинологии и вирусологии и предназначено для лабораторной идентификации антигена вируса желтой лихорадки в инфицированных тканях, культурах клеток и в препаратах живой и инаktivированной вакцины вируса желтой лихорадки. Изобретение может быть использовано в производстве инаktivированной вакцины вируса желтой лихорадки (из штамма 17 D) для контроля содержания антигена данного вируса - основного показателя качества вакцины как профилактического препарата, вызывающего защитный иммунитет (иммуногенность вакцины).

Уровень техники

Переход на производство и использование более безопасной вакцины против желтой лихорадки, а именно, инаktivированной (взамен живой вакцины, которая эффективна, но обладает известными недостатками в плане безопасности), требует применения метода количественного определения антигена - инаktivированного вируса желтой лихорадки при производстве и составлении формуляции вакцины (Monath T.P. et al. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever//N. Engl. J. Med. - 2011. - Vol. 364. - P. 1326-1333). Методом выбора является иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием моно- или поликлональных специфических антител млекопитающих (Thomas P. Monath, et al. Inactivates yellow fever 17 D vaccine: development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity//Vaccine. - 2010. - Vol. 28. - P. 3827-3840). Однако известно, что использование антител млекопитающих 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 антиген вируса желтой лихорадки (штамм 17 D) в инфицированных тканях, культурах клеток и вакцинных препаратах.

Поставленная задача решается за счет того, что в качестве иммуносорбента при проведении ИФА используются препараты высокоактивных аффинно очищенных специфических антител класса Y (IgY), полученные авторами изобретения из яичных желтков иммунизированных кур, функционально соответствующих антителам (IgG) млекопитающих, а в качестве вторичных (детекторных) антител - препараты тех же IgY, модифицированные меткой (предпочтительно, биотином) для возможности детекции.

Решение задачи обеспечивается установленной авторами возможностью получения из яичных желтков кур, иммунизированных вирусом желтой лихорадки, 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 животного. 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 антиген вируса желтой лихорадки.

Вирус желтой лихорадки содержит в своем составе 11 белков: 3 структурных - белки C, M, E, и 8 неструктурных белков - NS1, NS2A, NS2B, NS2K, NS3, NS4A, NS4B, NS5. В предпочтительных вариантах изобретения в качестве антигена вируса желтой лихорадки могут быть использованы структурные белки C, M, E. Предлагаемая система ИФА предпочтительно предназначена для определения антигена вируса желтой лихорадки в вакцинных препаратах (преимущественно в инаktivированных, поскольку в живой вакцине наличие установленной дозы вируса обычно определяется биологическим путём - титрованием на культуре клеток). Таким образом, способ по настоящему изобретению может быть применен при производстве инаktivированной вакцины против вируса желтой лихорадки. Дополнительно, предлагаемая система ИФА может также использоваться для определения антигена вируса желтой лихорадки в любых вирусосодержащих субстратах (тканях, культурах клеток и т.д.). При осуществлении изобретения достигаются следующие технические результаты:

усовершенствована методика (ИФА) измерения количества антигена вируса желтой лихорадки, в частности данная методика обеспечивает повышение специфичности определения антигена из-за снижения неспецифических взаимодействий, а также упрощенный дизайн ИФА;

разработан способ, позволяющий с высокой достоверностью измерять количество антигена вируса желтой лихорадки в процессе изготовления инактивированной вакцины против желтой лихорадки, что абсолютно необходимо и входит в процесс производства вакцины.

Использование разработанного способа позволяет составлять формуляцию инактивированной вакцины против желтой лихорадки, точно контролируя количество антигена в дозе вакцины согласно данным по иммуногенности вакцины, что также является абсолютно необходимым при производстве вакцины.

Подробное описание изобретения

В описании 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.

Штамм 17 D вируса желтой лихорадки используется для производства живой вакцины против желтой лихорадки в России и за рубежом. Данный штамм также используется для изготовления экспериментальных серий инактивированной вакцины против желтой лихорадки, а в дальнейшем будет использоваться для изготовления коммерческих серий данной вакцины.

Имуноглобулины, 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 коммерческой живой вакциной против желтой лихорадки, приготовленной из штамма 17 D. 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 сенсибилизации твердой 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 антигена вируса желтой лихорадки.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Получение IgY.

1. Иммунизация куриц.

Используют несущихся куриц породы Леггорн 5-6-месячного возраста. Иммуноген представляет собой сконцентрированную в 5 раз коммерческую живую вакцину против желтой лихорадки, приготовленной из штамма 17 D (производство ФГБНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН", Москва). Цикл иммунизации включает трехкратное введение иммуногена (по 1,0 мл в 4 точки пекторальных мышц) с интервалами в 2 недели. Сбор яиц начинают через 2-4 недели после завершения полного цикла иммунизации. Яйца хранят до 2 месяцев при 4°C; желтки хранят неопределенно долгое время при -20°C.

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 ч при +4°C.

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°C и медленно добавляют 33,5 г Na₂SO₄ (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 10000 g в течение 20 мин при +25°C.

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°C.

- 2.11. Медленно добавляют в раствор 2,8 г Na_2SO_4 (хч).
- 2.12. Выдерживают раствор 15 мин при $+25^\circ\text{C}$ после полного исчезновения осадка.
- 2.13. Центрифугируют раствор при 12000 g в течение 10 мин при $+25^\circ\text{C}$.
- 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 $+4^\circ\text{C}$.
- 2.19. Стерилизуют полученный препарат IgY фильтрацией через фильтр Millipore (0,45 мкм).
- 2.20. Сохраняют стерильный препарат IgY при $+4^\circ\text{C}$ (несколько месяцев) или при -20°C (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.

Объём колонки: 5 мл.

Связывающая способность: 100 мг IgY.

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

Связывающий буфер: 20 mM фосфат натрия + 0,5M K_2SO_4 , pH 7,5.

Буфер для элюции: 20 mM фосфат натрия, pH 7,5.

Очищающий буфер: 20 mM 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 0,5M, 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 $+4-8^\circ\text{C}$ до 1 года. Для неопределённо длительного хранения добавляют глицерин (до 50%) и хранят при -20°C .

Пример 2. Биотинилирование препаратов IgY к антигену вируса желтой лихорадки.

1) Готовят раствор N-гидроксисукцинимидобиотина (Sigma, H1759-250MG): 10 мг в диметилсульфоксиде (Sigma, D2650-100 мл).

2) Готовят раствор IgY в концентрации 3 мг/мл в 0,1M 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 ч при комнатной температуре.

4) Добавляют 60 мкл 1M раствора NH_4Cl на 750 мкг биотина, инкубируют 10 мин при комнатной температуре.

5) Диализуют против 0,1M фосфатно-солевого буфера, pH 7,2.

6) Стерилизуют через фильтр 0,45 мкм, хранят при $+4-8^\circ\text{C}$ до 1 года. Для неопределённо длительного хранения добавляют глицерин (до 50%) и хранят при -20°C .

Пример 3. ИФА для определения антигена вируса желтой лихорадки в препаратах вакцины вируса желтой лихорадки.

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

1) Иммунопанель с высокой сорбционной ёмкостью (Costar, кат. № 9018) сенсibiliзируют аффинно очищенным IgY к антигену вируса желтой лихорадки: в каждую лунку панели вносят по 0,1 мл раствора IgY к антигену вируса желтой лихорадки в концентрации 10 мкг/мл в карбонат-гидрокарбонатном буфере pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100 CAP), панель накрывают крышкой и инкубируют 18 ч при $+4-8^\circ\text{C}$ или 3 ч при $+37^\circ\text{C}$.

2) Содержимое лунок встряхивают, 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. № P1379-100 мл) - 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 ч при температуре $+37^\circ\text{C}$. 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 вируса желтой лихорадки (вакцины) в разведениях, начиная, например, с 1:2, 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 ч при +37°C или 18 ч при +4-8°C. Это фаза связывания определяемого 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 антигену вируса желтой лихорадки, меченному биотином в разведении, подобранном шахматным титрованием, в ИФА-буфере. Панель накрывают крышкой и инкубируют 1 ч при +37°C. Это фаза детекции определяемого антигена, связанного с иммуносорбентом.

5) Содержимое лунок удаляют, лунки промывают 5 раз 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°C. Это фаза выявления комплекса иммуносорбент + определяемый антиген + детекторные меченые антитела.

6) Содержимое лунок удаляют, лунки промывают 5 раз ФСБ-Т, как описано выше. Вносят в лунки по 0,1 мл готового субстрат-индикаторного раствора - тетраметилбензидина (ТМБ, Sigma, кат. № Т0440-100 мл). Панель инкубируют в темноте 25-30 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 антигеном вируса желтой лихорадки (его наивысшее разведение) к оптической плотности контрольных лунок (ИФА-буфер) $\geq 2,1$ (P/N). Количество антигена вируса желтой лихорадки в исследуемом образце выражают в виде титра (конечное разведение с $P/N \geq 2,1$), либо вычисляют в весовых единицах (например, мкг/мл) по концентрации белка в исходном препарате и величине его титра.

В таблице представлены данные определения антигена вируса желтой лихорадки: титрование в ИФА коммерческой серии живой вакцины желтой лихорадки. В качестве иммуносорбента использован желточный IgY, полученный в результате иммунизации куриц живой вакциной желтой лихорадки (коммерческая серия), в качестве детекторных антител - тот же биотинилированный IgY.

Из таблицы следует, что согласно критерию положительности результата ($P/N \geq 2,1$) титр антигена вируса желтой лихорадки (ЖЛ) равен 1:64.

Антиген	Разведения антигена						
	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1:128
Вакцина ЖЛ	2,87*	2,719	2,496	1,596	0,753	0,312	0,176
ИФА-буфер	0,107	0,102	0,098	0,097	0,105	0,101	0,102

* - Оптическая плотность при 450 нм.

Суммируя вышеизложенное, особенностью изобретения является использование в качестве иммуносорбента для количественного определения антигена вируса желтой лихорадки в ИФА аффинно очищенных препаратов IgY 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. Преимущества данной системы детекции антигенов (в частности, антигена вируса желтой лихорадки) заключаются в упрощенном дизайне ИФА (одни и те же антитела используются для первичного связывания антигена и для детекции связанного комплекса), экономичности (полный отказ от использования млекопитающих), а также обеспечении более низкого неспецифического фона и, соответственно, более высокой достоверности результатов анализа. Предлагаемая система ИФА на основе желточных антител IgY обладает высокой чувствительностью (примерно 3,2 Ig БОЕ/0,5 мл, где БОЕ - бляшкообразующая единица) и специфичностью, что обеспечивает достоверное определение антигена вируса желтой лихорадки в препаратах коммерческой живой вакцины против желтой лихорадки (данные таблицы, демонстрирующие титрование коммерческой живой вакцины против желтой лихорадки).

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 антигена вируса желтой лихорадки в композиции, содержащей антиген вируса желтой лихорадки, методом иммуноферментного анализа "двойной сэндвич",

включающий, по меньшей мере, следующие стадии:

А) иммобилизуют аффинно очищенный иммуноглобулин класса Y (IgY) против указанного антигена вируса желтой лихорадки, полученный из яичных желтков куриц, на поверхности, обладающей высокой сорбционной ёмкостью;

Б) добавляют композицию, содержащую антиген вируса желтой лихорадки, к поверхности, на которой находится иммобилизованный аффинно очищенный IgY, таким образом, чтобы на поверхности образовался комплекс IgY-антиген;

В) добавляют аффинно очищенный IgY, модифицированный меткой, к комплексу IgY-антиген на указанной поверхности;

Г) детектируют результат взаимодействия IgY, модифицированных меткой, с комплексом IgY-антиген и определяют количество антигена вируса желтой лихорадки, содержащегося в композиции.

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

3. Способ по п.1, в котором антигеном вируса желтой лихорадки являются фрагменты структурных белков вируса желтой лихорадки: белок С, белок М или белок Е.

4. Способ по п.1, в котором композицией, содержащей антиген вируса желтой лихорадки, является вакцинный препарат против желтой лихорадки.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
