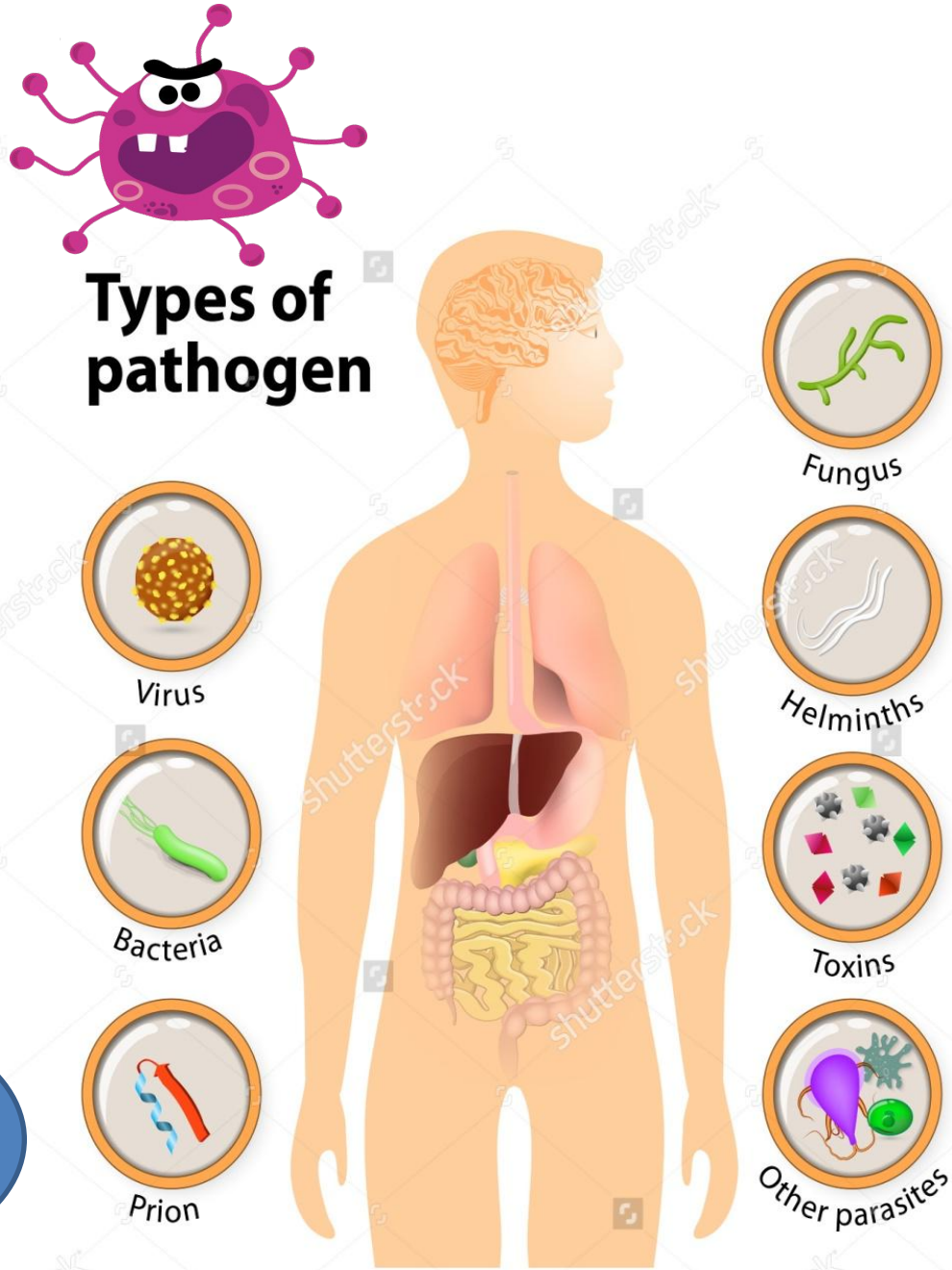
1. Гибридомная технология.
2. Моноклональные антитела как инструмент исследования антигенной структуры вирусов Марбург и Эбола (семейство Filoviridae).

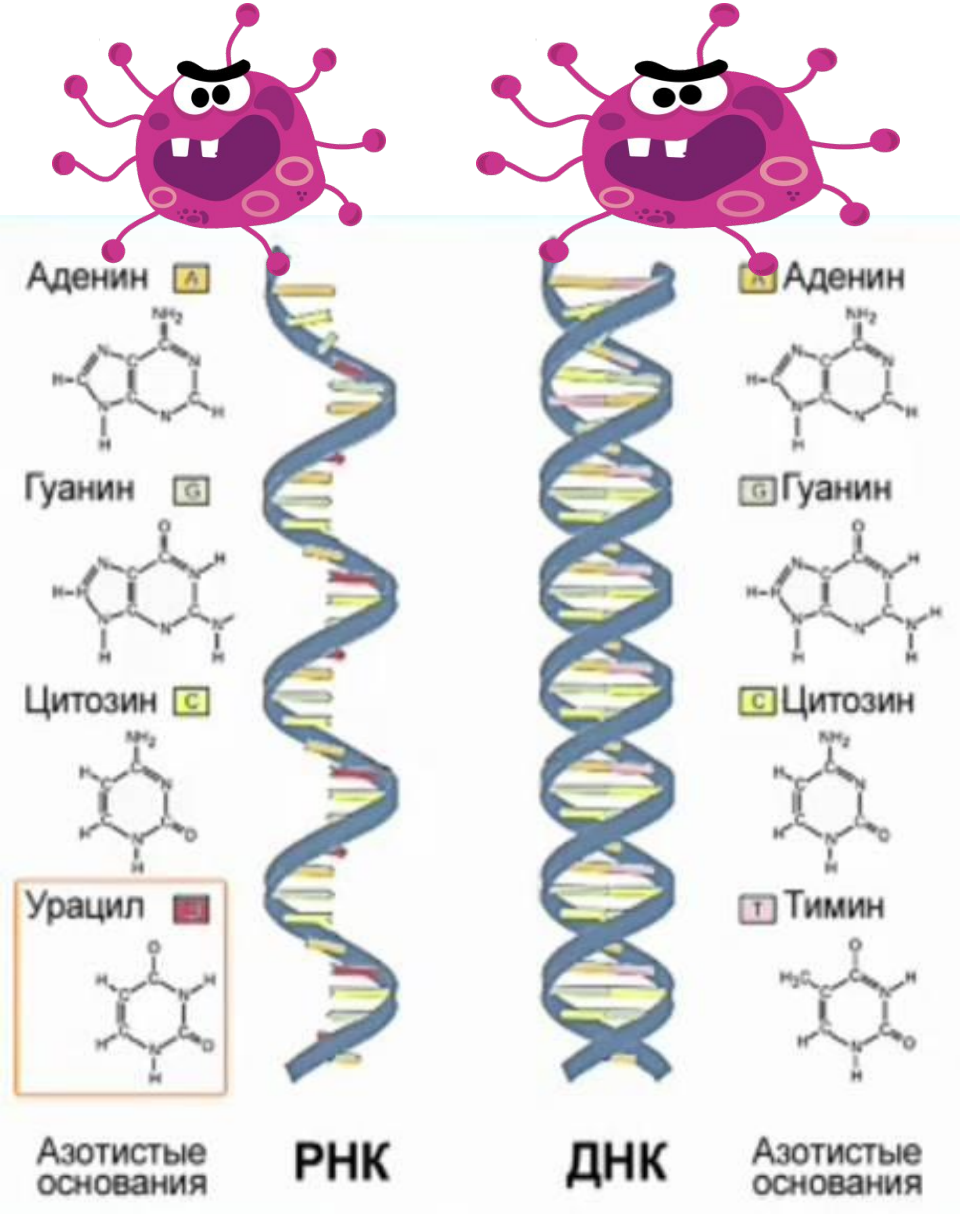
д.б.н. Казачинская Елена Ивановна
зав. сектором гибридомной технологии
отдела биоинженерии
ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”

Здоровых нет!
Есть недообследованные.
DEMOTIVATORS.RU

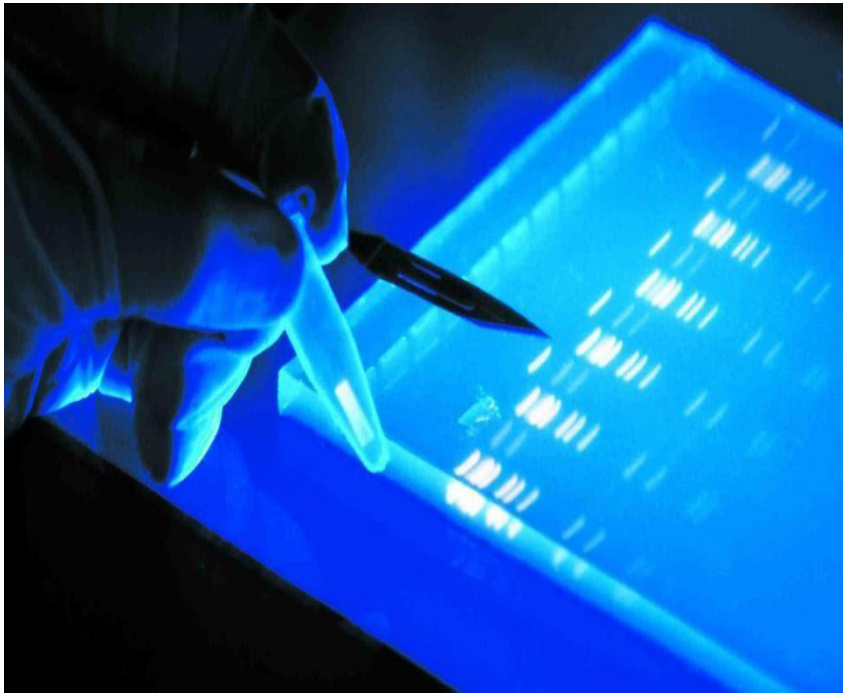

Types of pathogen
Virus
Bacteria
Prion
Fungus
Helminths
Toxins
Other parasites

опухоли

Биологические “следы” чужеродных объектов

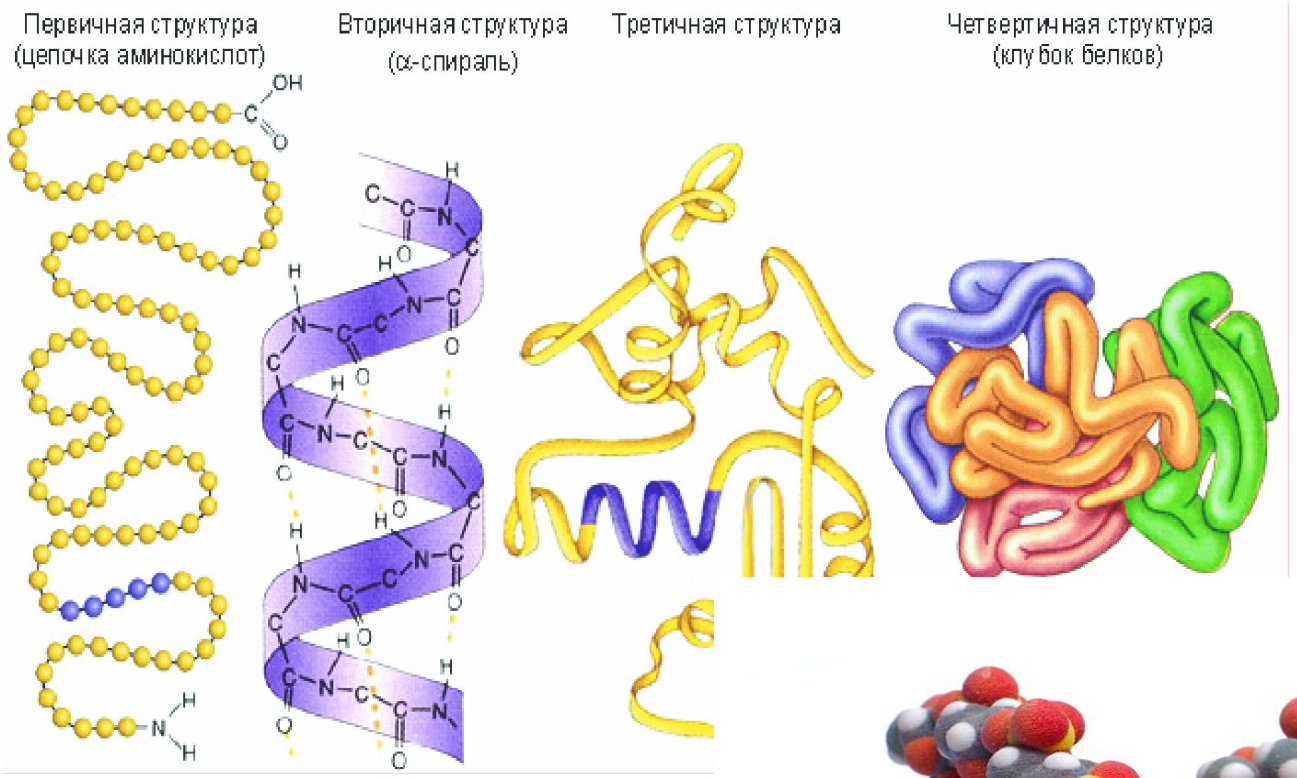


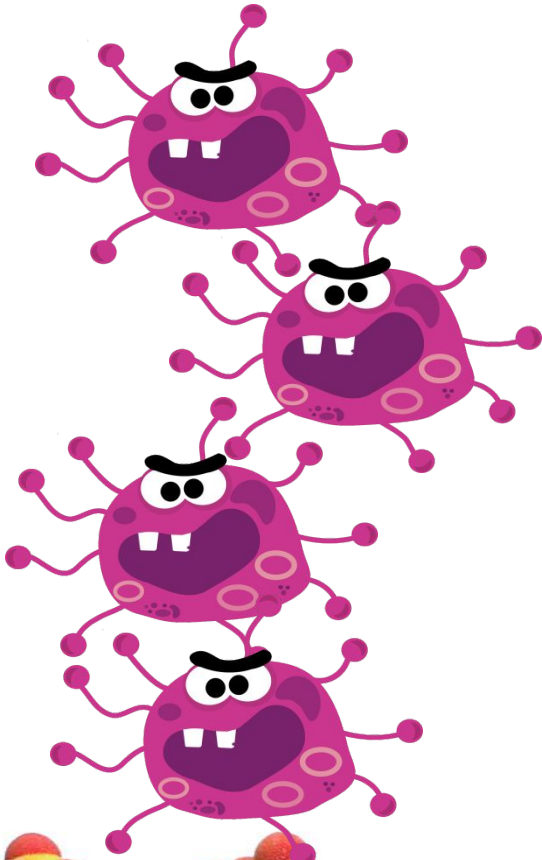
ПЦР – полимеразная цепная реакция

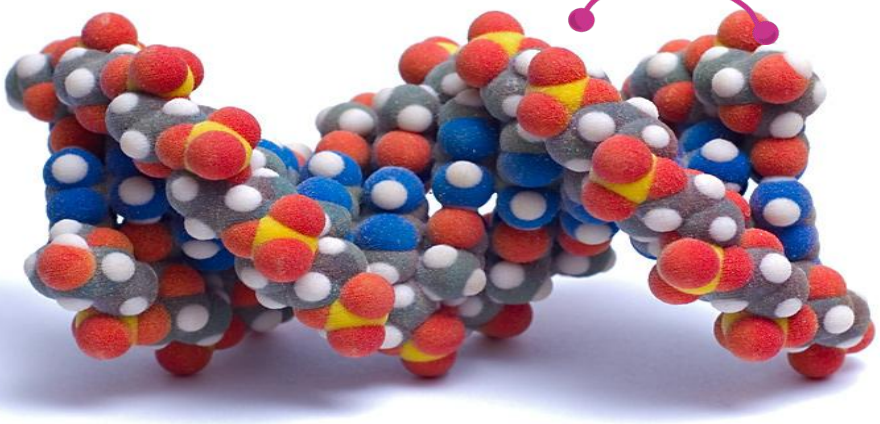


Биологические “следы” чужеродных объектов

Белки (антигены)



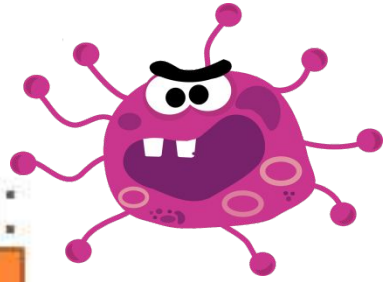


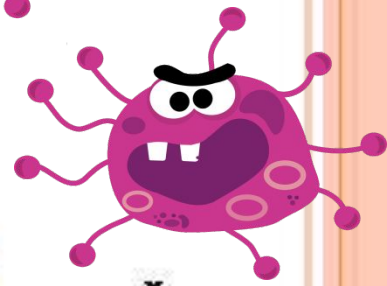


www.visualscience.ru

Профилактические прививки по национальному календарю в РФ	
против какого патогена	этиология патогена
гепатит В	ДНК-содержащий вирус
туберкулез (БЦЖ)	микобактерия
пневмококковая инфекция	грамположительный пневмококк
дифтерия	грамположительная коринебактерия
коклюш	грамотрицательная коккобацилла
столбняк	грамположительная палочка
полиомиелит	РНК-содержащий пикорновирус
гемофильная инфекция	грамотрицательная коккобацилла
корь	(-)РНК содержащий парамиксвирус
краснуха	(+) РНК-содержащий вирус рода Rubivirus, сем. Togaviridae
эпидемический паротит	(-)РНК содержащий парамиксвирус
менингококковая инфекция	грамотрицательный диплококк
грипп	(-)РНК содержащий ортомиксвирус
гепатит А	(+)РНК-содержащий пикорновирус
брюшнотифозная инфекция	бактерия *Salmonella typhi*

Способы передачи инфекции:





СПОСОБ ПЕРЕДАЧИ

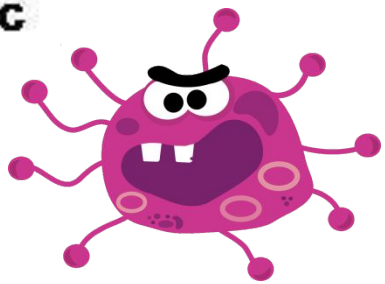
КОНТАКТНЫЙ
-Прямой;
-Непрямой

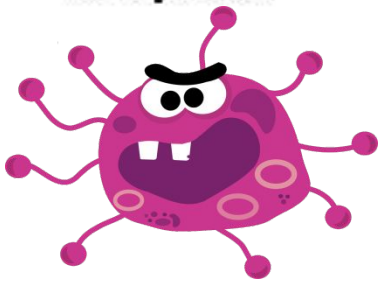
АЭРОЗОЛЬНЫЙ
-Воздушно-капельный;
-Воздушно-пылевой

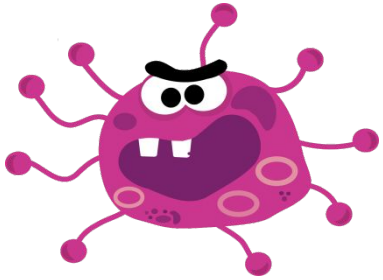
ВЕРТИКАЛЬНЫЙ
-Трансплацентарно

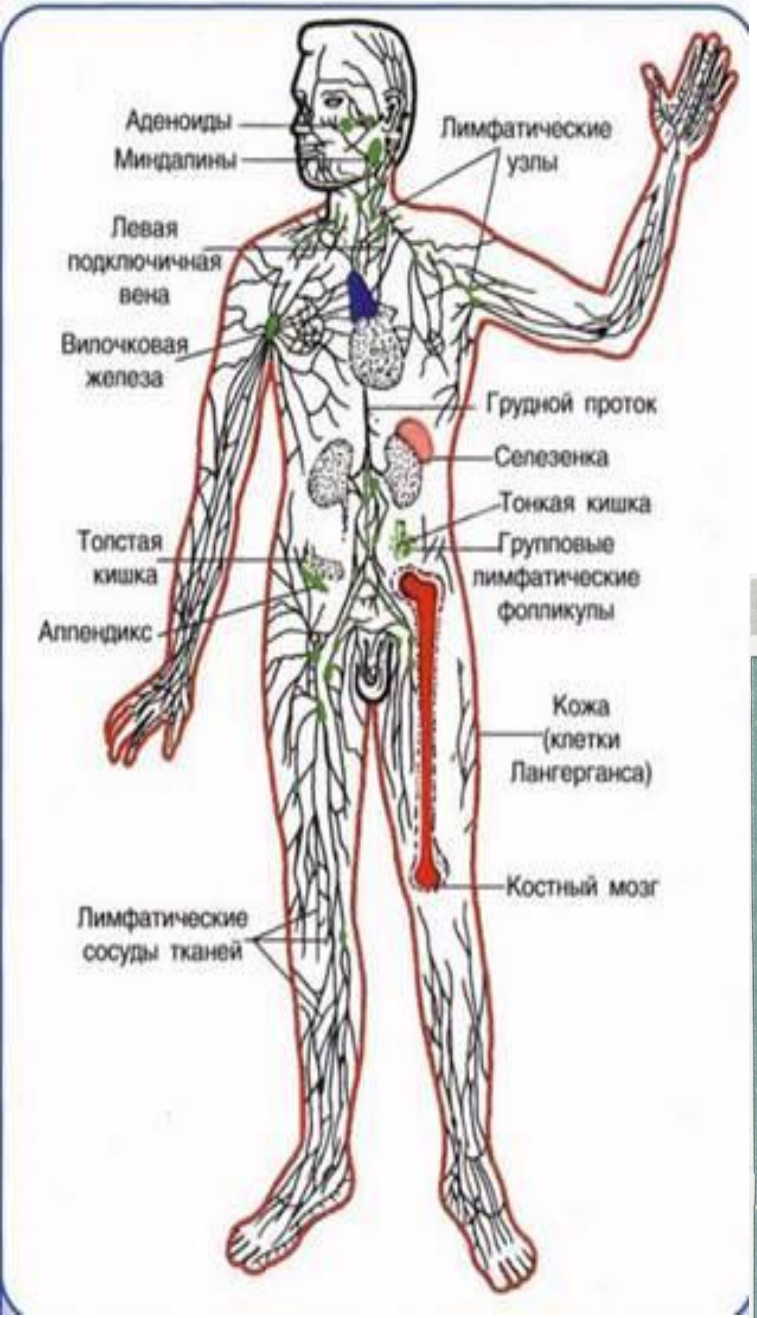
ФЕКАЛЬНО-ОРАЛЬНЫЙ
-Контактно-бытовой;
-Водный;
-Пищевой

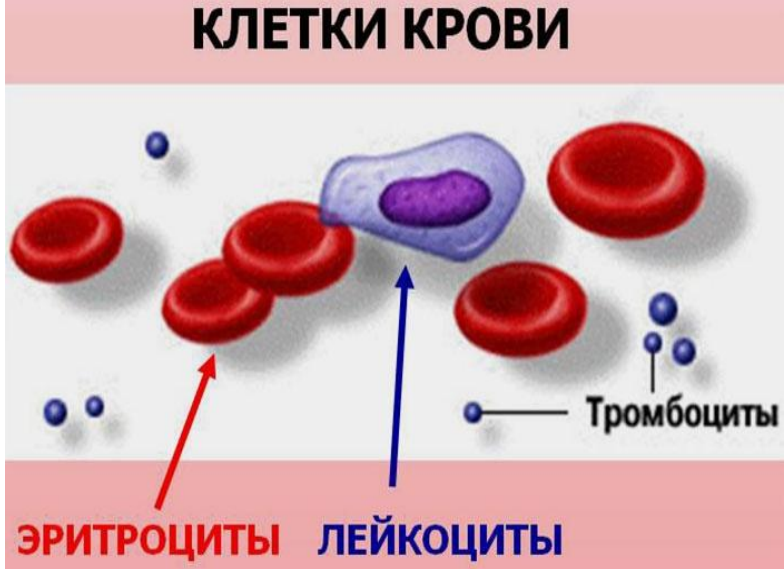
ТРАНСМИССИВНО
- Через укус

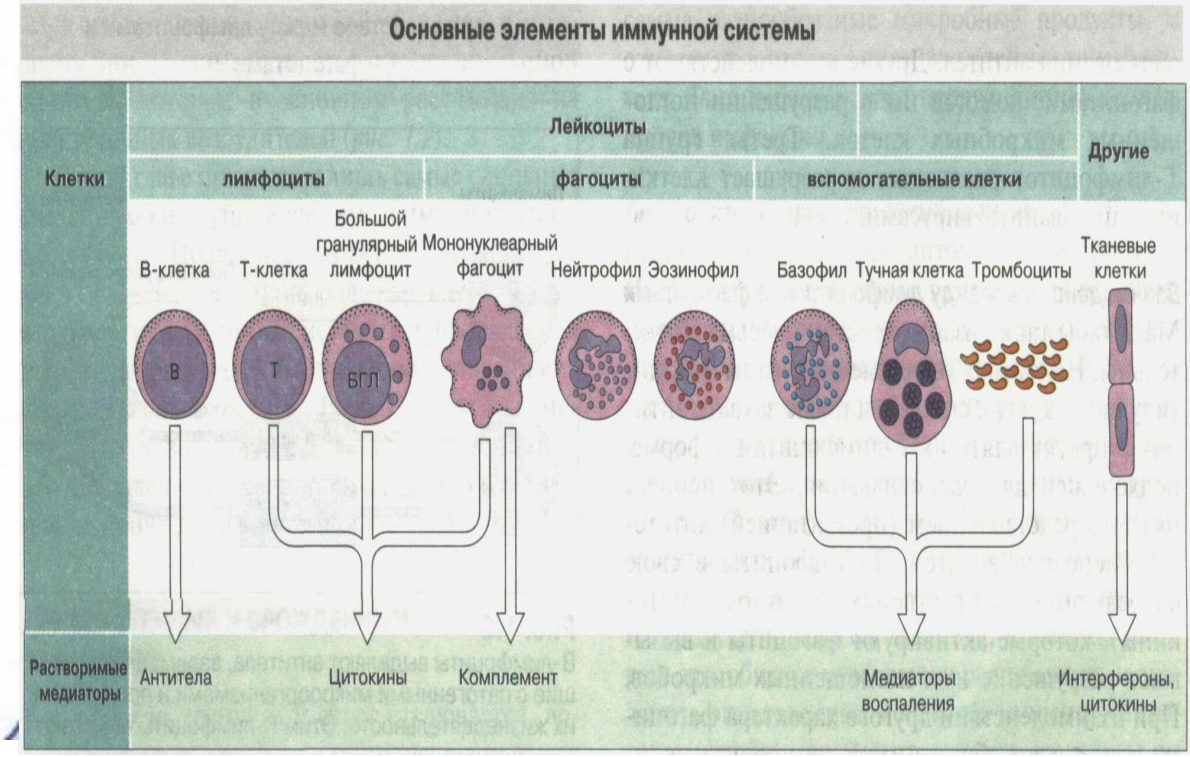


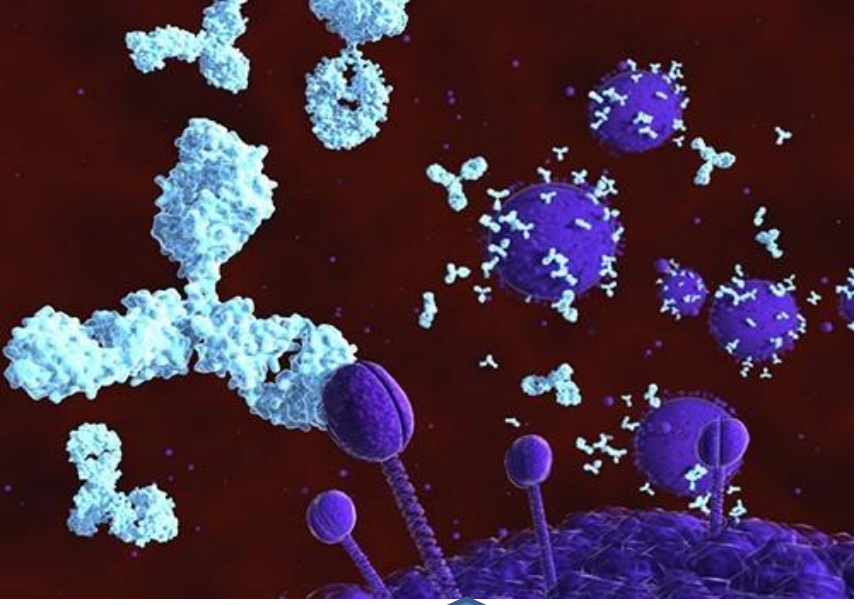




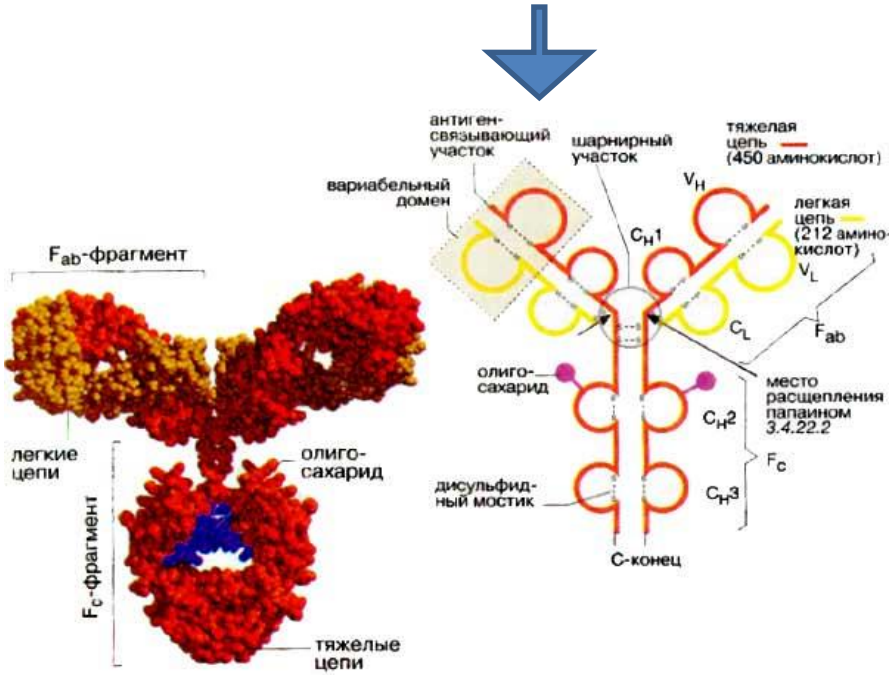

Аденоиды
Миндалины
Лимфатические узлы
Левая подключичная вена
Вилочковая железа
Грудной проток
Селезенка
Тонкая кишка
Толстая кишка
Групповые лимфатические фолликулы
Аппендикс
Кожа (клетки Лангерганса)
Костный мозг
Лимфатические сосуды тканей


КЛЕТКИ КРОВИ
Тромбоциты
ЭРИТРОЦИТЫ
ЛЕЙКОЦИТЫ

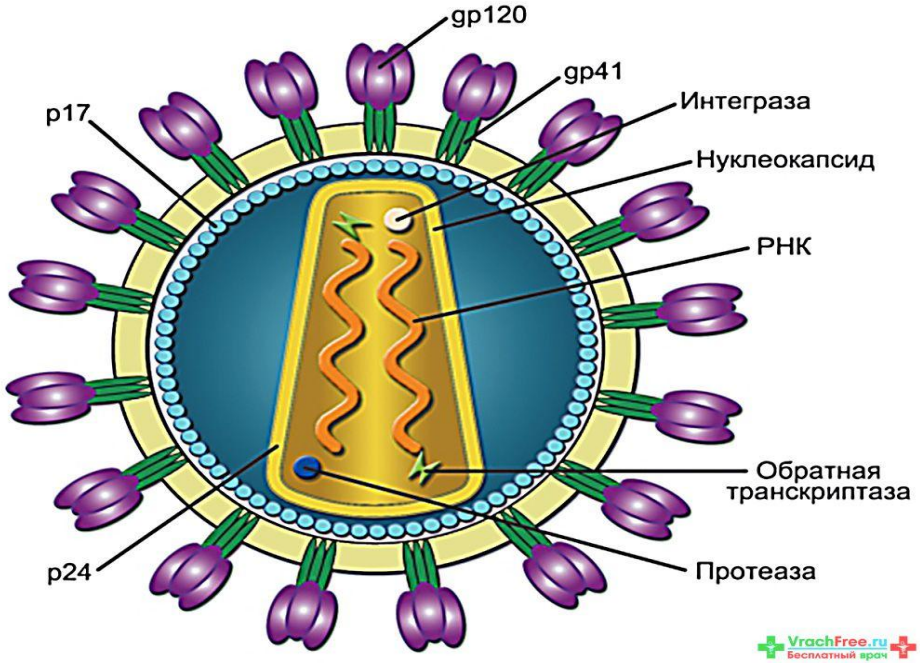

Основные элементы иммунной системы
Клетки
Лейкоциты
Другие
лимфоциты
фагоциты
вспомогательные клетки
В-клетка
Т-клетка
Большой гранулярный лимфоцит
Мононуклеарный фагоцит
Нейтрофил
Эозинофил
Базофил
Тучная клетка
Тромбоциты
Тканевые клетки
В
Т
БГЛ
Растворимые медиаторы
Антитела
Цитокины
Комплемент
Медиаторы воспаления
Интерфероны, цитокины



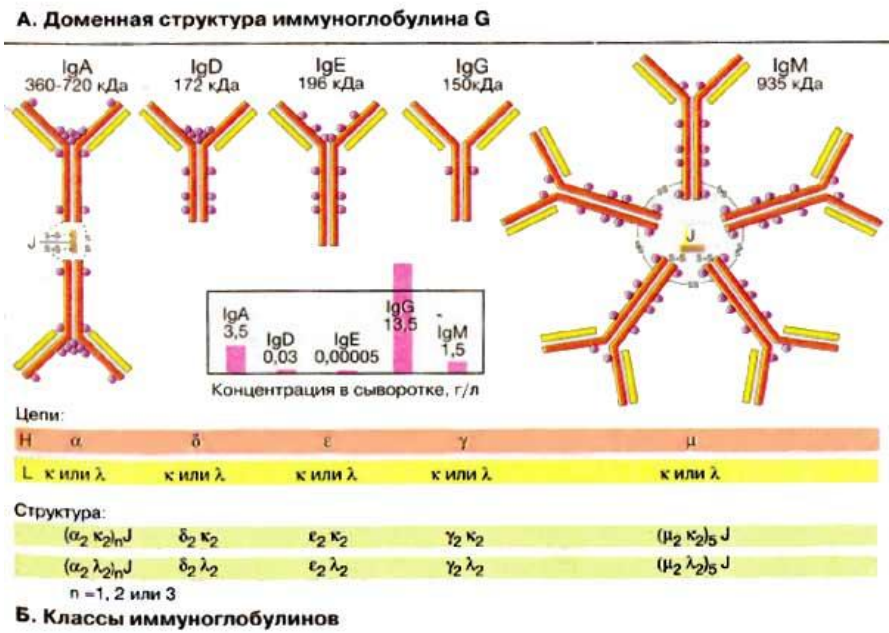
Белки (антитела)



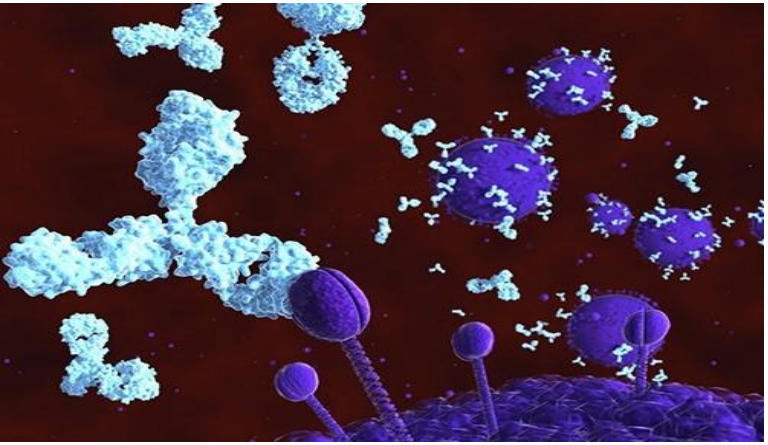
“Встреча” в организме человека ВИЧ и антител, специфичных к нему.



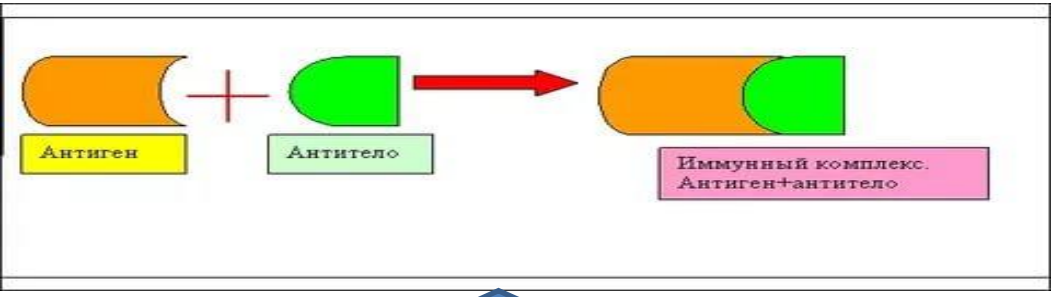
VrachFree.ru Бесплатный врач



На принципе реакции антигена с антителом in vivo основаны методы выявления антигенов или специфичных к ним антител in vitro.



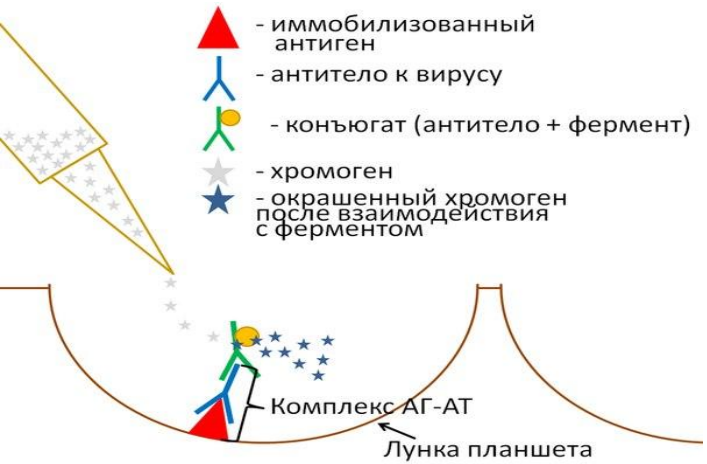
“Встреча” в организме (in vivo) ВИЧ и антител, специфичных к нему.

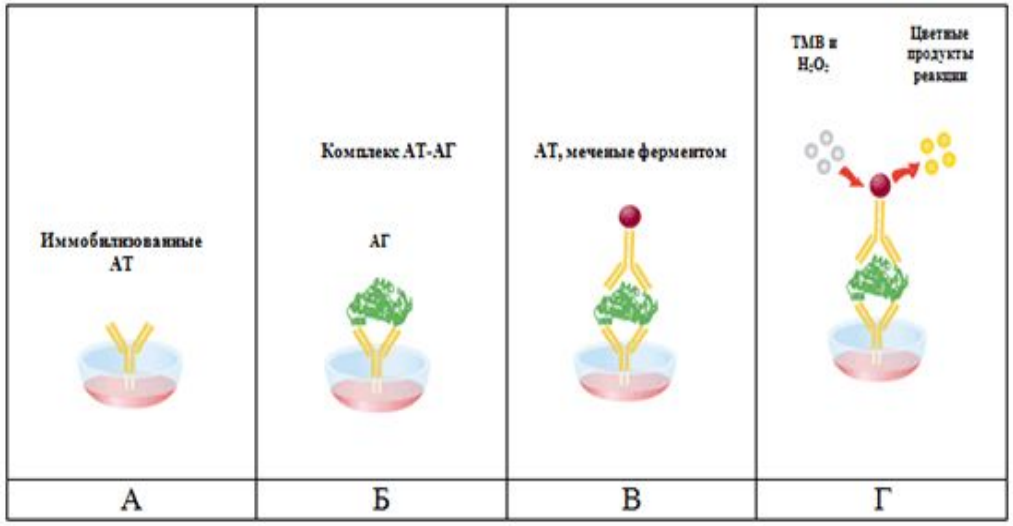


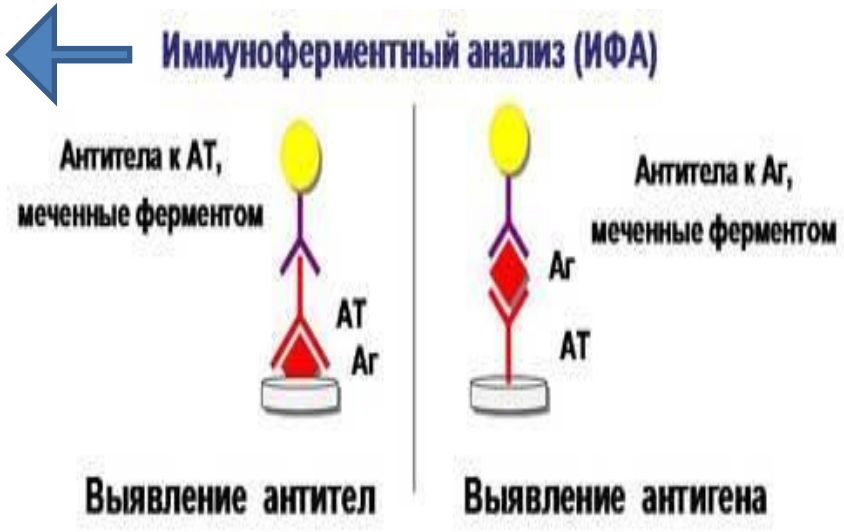
“Встреча” в пробирке (in vitro) антигена и антитела, специфичного к нему.

1. **реакции агглютинации (определения групп крови);**
2. **реакция коагглютинаци;и**
3. **реакция торможения гемагглютинации (РТГА);**
4. **реакция преципитации;**
5. **реакция двойной иммунодиффузии;**
6. **реакция радиальной иммунодиффузии;**
7. **иммуноэлектрофорез;**
8. **реакция флоккуляции (токсин + антитоксин);**
9. **иммунная электронная микроскопия;**
10. **реакция связывания комплемента (РСК);**
11. **реакция нейтрализации;**
12. **иммуноферментный метод, или анализ (ИФА)**

Реакция антигена с антителом - специфическая реакция in vitro.







ИФА тест-системы производства ЗАО “Вектор-Бест”:

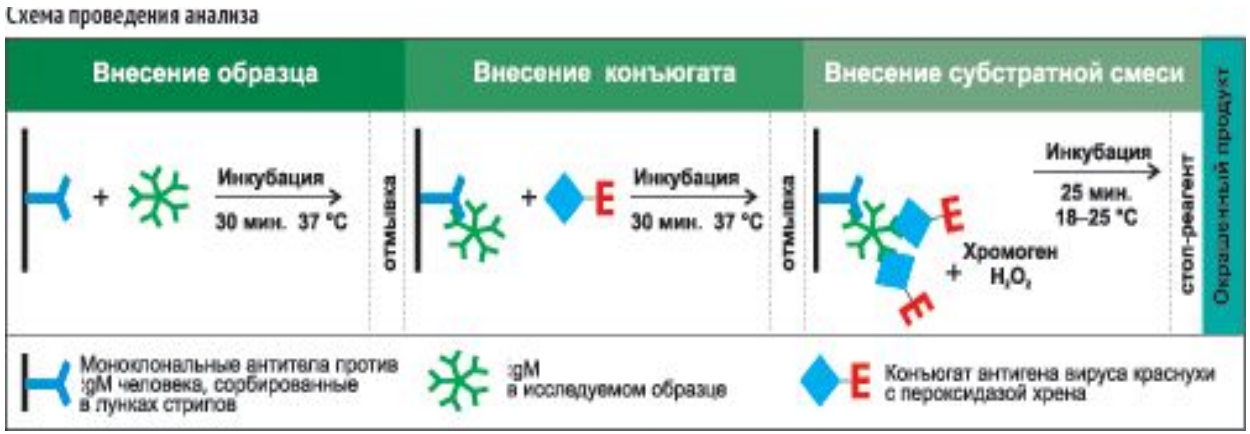
ВИЧ-инфекция**	**беременность и ее мониторинг* (гормоны)**
Вирусные гепатиты (А, В**, С**, Д, Е)**	**диагностика сахарного диабета* (С-пептид, инсулин)**
ИППП (сифилис, хламидиоз, уреплазмоз, микоплазмоз)	**анемии**
TORCH и герпесвирусные инфекции (токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирус, вирусы простого герпеса 1 и 2 типа, вирус Эпштейна-Барр, герпеса человека 6 типа, герпеса человека 8 типа, вирус ветряной оспы и опоясывающего лишая	**природно-очаговые и зоонозные инфекции (клещевой энцефалит**, боррелиоз, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, Крымская-Конго геморрагическая лихорадка**, лихорадка Западного Нила, иерсиниоз, бруцеллез)**
микозы (кандидоз, аспергиллез)	**маркеры острой фазы* (С-реактивный белок)**
опухолевые маркеры*	**диагностика тромбозов* (Д-димер)**
вакцинноуправляемые инфекции (корь, паратит)	**кардиомаркеры***
инфекции респираторного тракта (хламидиоз, микоплазмоз)	**аутоиммунные и системные заболевания**
туберкулез	**гуморальный иммунный статус**
паразитарные инвазии (токсокароз, описторхоз, клонорхоз, трихинеллез, эхинококкоз, аскаридоз, анизакидоз, цистицеркоз, лямблиоз**, гельминтозы)**	**желудочно-кишечные заболевания (хелиобактерная инфекция, ротавирусная инфекция*, аденовирусная инфекция*, норовирусная инфекция, целиакия, атрофический гастрит*)**
цитокины*	**аллергодиагностика**
гормоны*	

**** - ИФА –тесты на выявление антител (IgG и IgM) и антигенов; * - выявление только антигенов.**

№ по каталогу, назначение	Название ИФА тест-системы
D-0134 ВИЧ-инфекция	ВИЧ-1 р24-антиген – ИФА – БЕСТ РУ № ФСР 2009/06044 Набор реагентов для иммуноферментного выявления и подтверждения наличия антигена р24 ВИЧ-1.
D-0352 вирусные гепатиты	ВГА-антиген-ИФА-БЕСТ РУ № ФСР 2007/00686 Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса гепатита А.
D-0544 вирусные гепатиты	HBsAg-ИФА – БЕСТ (комплект 3) РУ № ФСР 2012/13925 Набор реагентов для иммуноферментного выявления HBs-антигена вируса гепатита В. Чувствительность 0,01 МЕ/мл (нг/мл).
D-0778 вирусные гепатиты	ВГС АГ/АТ – ИФА – БЕСТ (комплект 2) РУ № ФСР 2010/09023 Наборы реагентов для иммуноферментного выявления core антигена вируса гепатита С и антител к ВГС.
D-1154 природно-очаговая инфекция	ВектоВКЭ-антиген РУ № ФСР 2007/00611 Набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса клещевого энцефалита.
X-3952 оценка функции щитовидной железы	ТТГ – ИФА – БЕСТ РУ № РЗН 2016/3936 Набор реагентов для имуноферментного определения концентрации тиреотропного гормона в сыворотке (плазме) крови. Чувствительность: 0,05 мМЕ/л
X-3972 Оценка функции репродуктивной системы	Тестостерон – ИФА – БЕСТ РУ № ФСР 2012/13416 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации тестостерона в сыворотке крови. Чувствительность: 0,2 нмоль/л
X-4002 сахарный диабет	Инсулин-ИФА-БЕСТ РУ № РЗН 2016/3609 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации инсулина в сыворотке (плазме) крови человека. Чувствительность: 0,75 мМЕ/л. Диапазон измерений: 0-200 мМЕ/л.
T-8454 Опухолевые маркеры	РЭА-ИФА-БЕСТ РУ № РЗН 2015/3447 Набор реагентов для иммуноферментного определения концентрации ракового эмбрионального антигена в сыворотке крови Чувствительность: 3,3 мМЕ/мл (0,3 нг/мл) Диапазон измерений: 0-880 мМЕ/мл (0-80 нг/мл)

Аденовирус-антиген–ИФА–БЕСТ

Рубелла-IgM-ИФА-Бест



Одновременное выявление core антигена вируса гепатита С (ВГС) и иммуноглобулинов классов G и M к белкам ВГС (core, NS_3, NS_4) в сыворотке (плазме) крови методом иммуноферментного анализа.

Основные характеристики набора:

- Чувствительность - 100% по ОСО 42-28-310-02П
- Специфичность - 100% по ОСО 42-28-310-02П
- В лунках планшета иммобилизованы рекомбинантные антигены ВГС и моноклональные антитела к core антигену ВГС
- Исследуемый образец - 50 мкл сыворотки (плазмы)
- Общее время инкубации - 2 часа 25 мин.
- Учет результатов: спектрофотометрия при длине волны 450/620 нм
- Срок хранения: 12 месяцев при температуре (2-8)°С

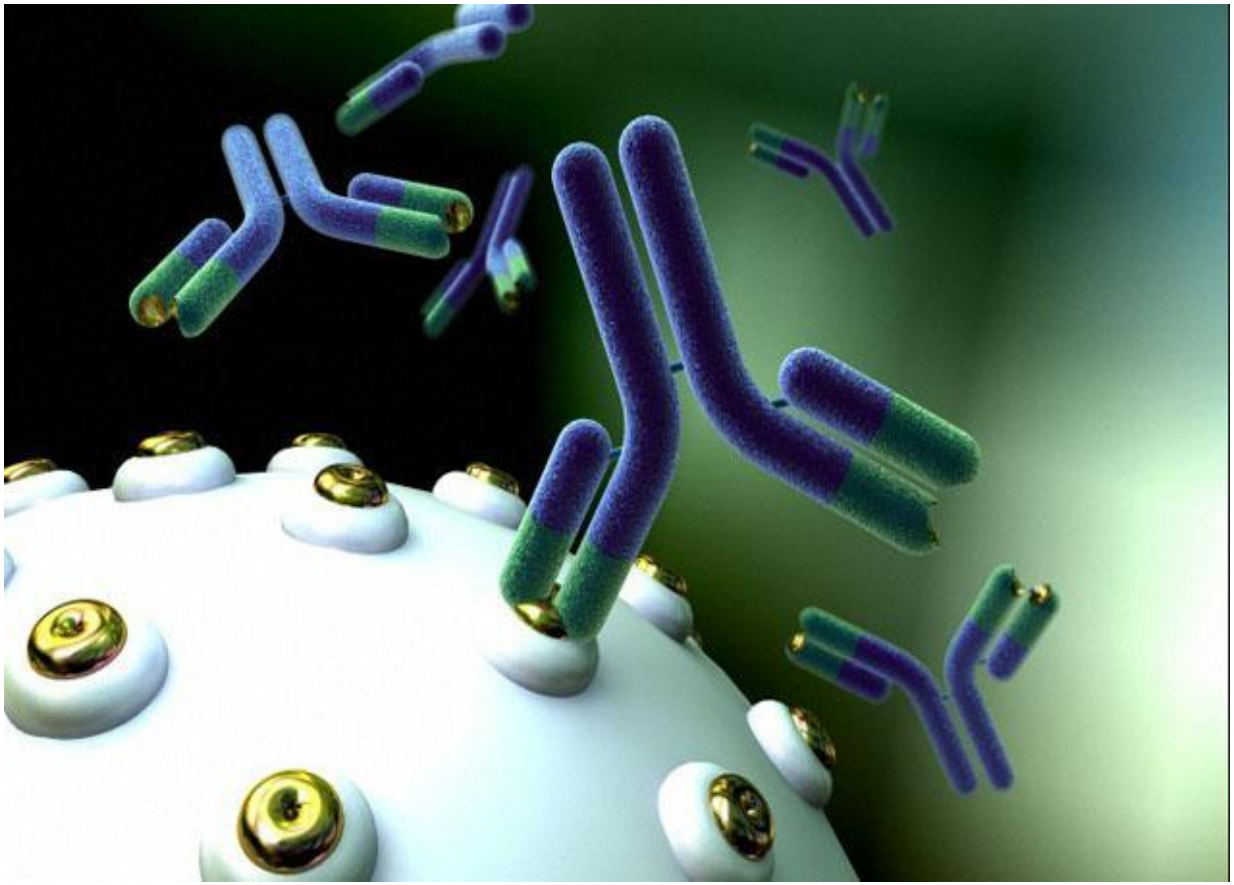
Назначение набора:

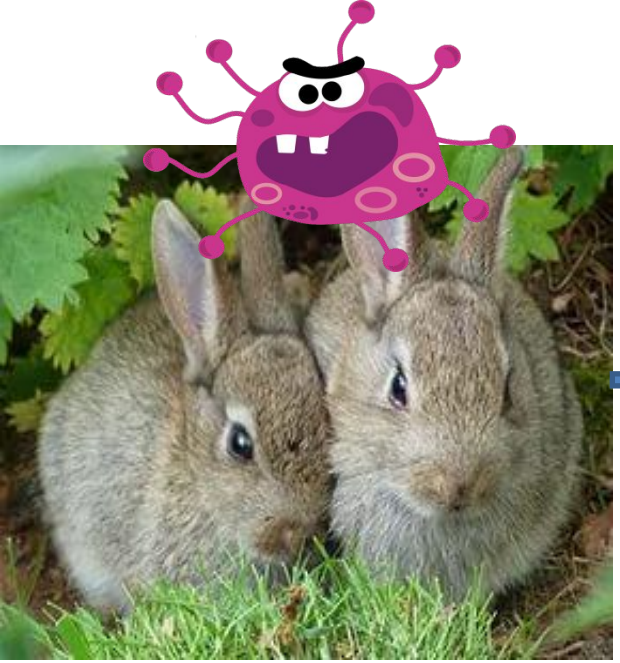
- **Лабораторная диагностика гепатита С**
- **Обследование доноров крови**

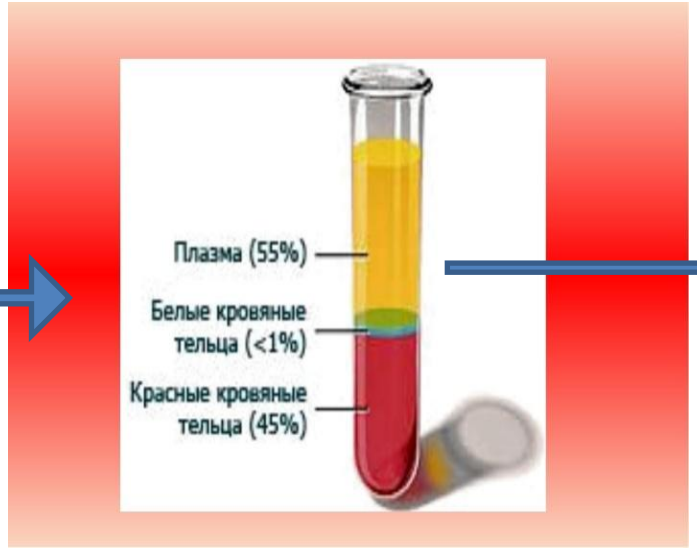
Схема проведения анализа

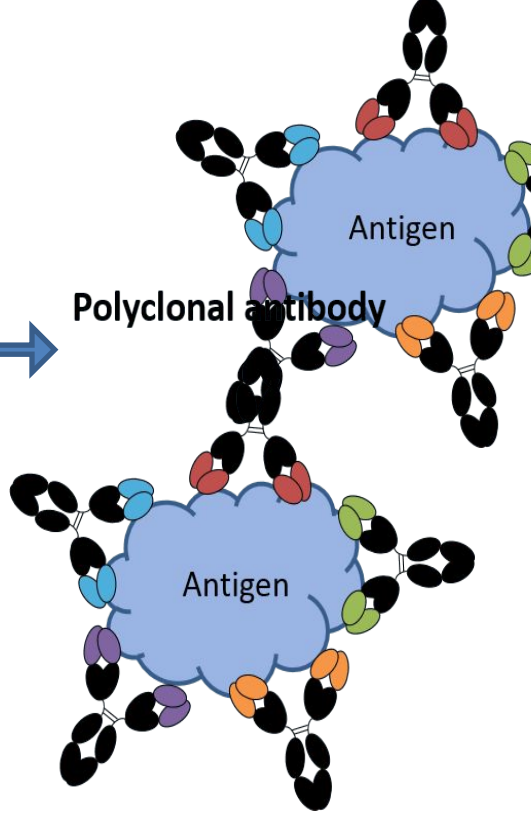
- Рекомбинантные антигены ВГС (core, NS_3, NS_4), сорбированные в лунках планшета
- Антитела к core антигену ВГС, сорбированные в лунках планшета
- core антиген ВГС в исследуемом образце
- IgM к ВГС в исследуемом образце
- IgG к ВГС в исследуемом образце
- биотинилированные антитела к core антигену ВГС (конъюгат №1)
- E — Смесь конъюгатов моноклональных антител к IgG и IgM человека с пероксидазой хрена (в составе конъюгата №2)
- E — стрептавидин с пероксидазой хрена (в составе конъюгата №2)

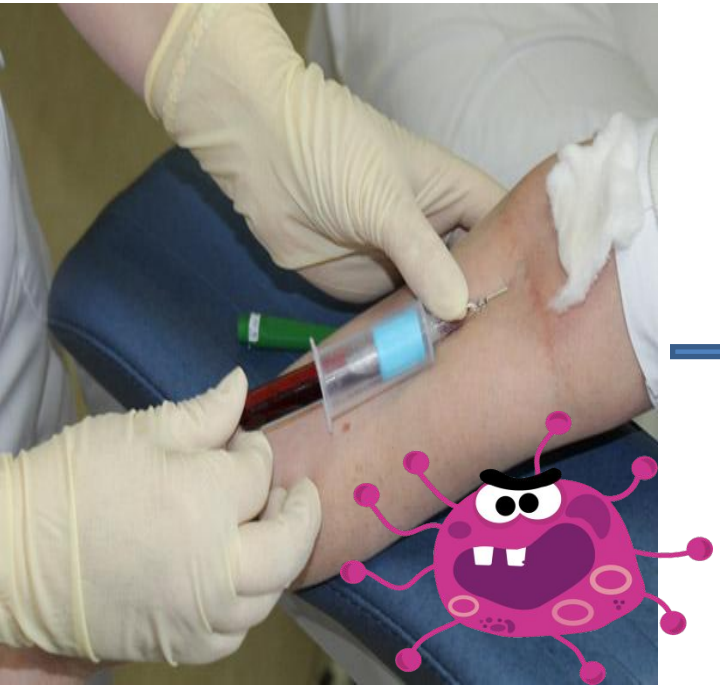
Моноклональное антитело – это молекула иммуноглобулина (гликопротеина), паратоп вариабельной области которого строго специфичен к эпитопу другого протеина (как ключ к замку).

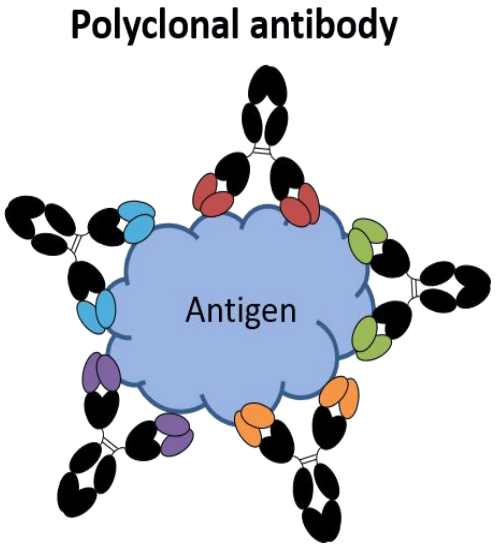


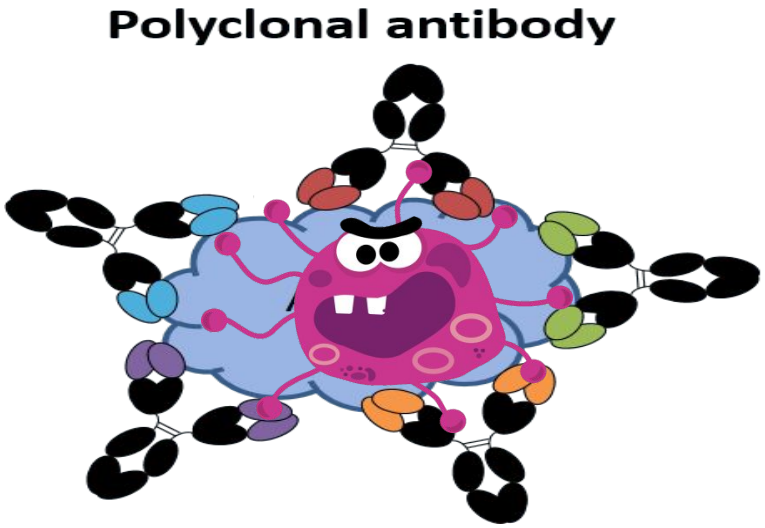


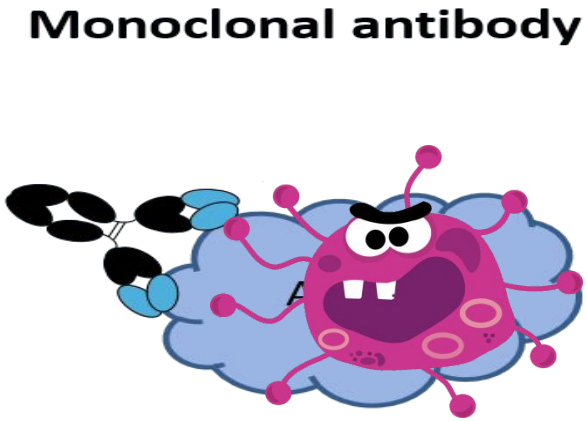

Плазма (55%)
Белые кровяные тельца (<1%)
Красные кровяные тельца (45%)

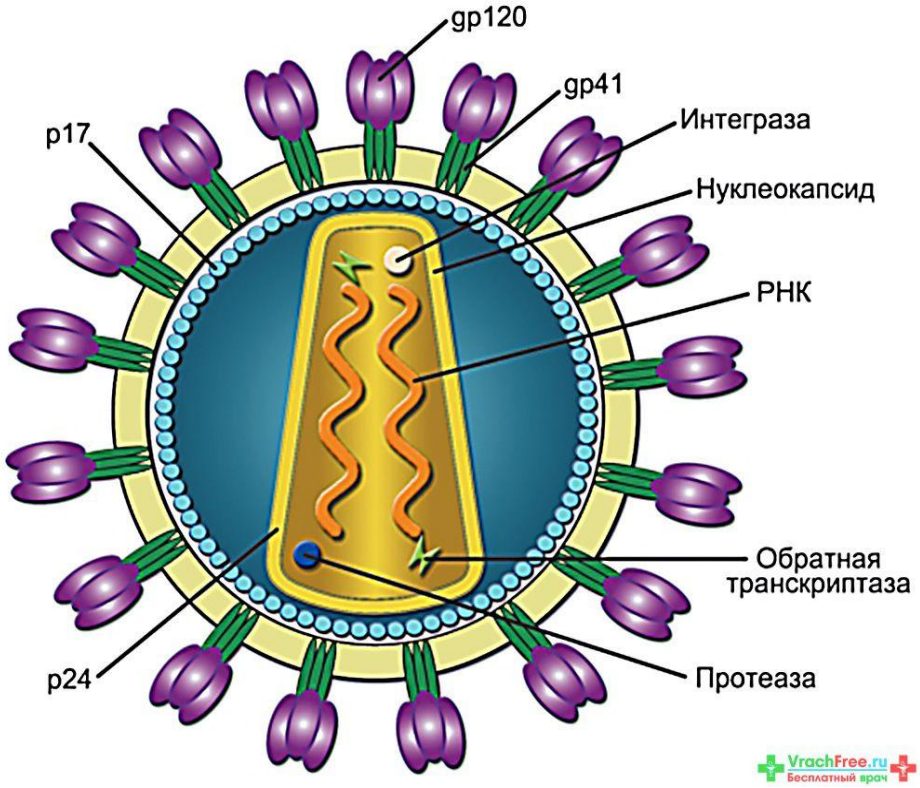

Antigen
Polyclonal antibody
Antigen

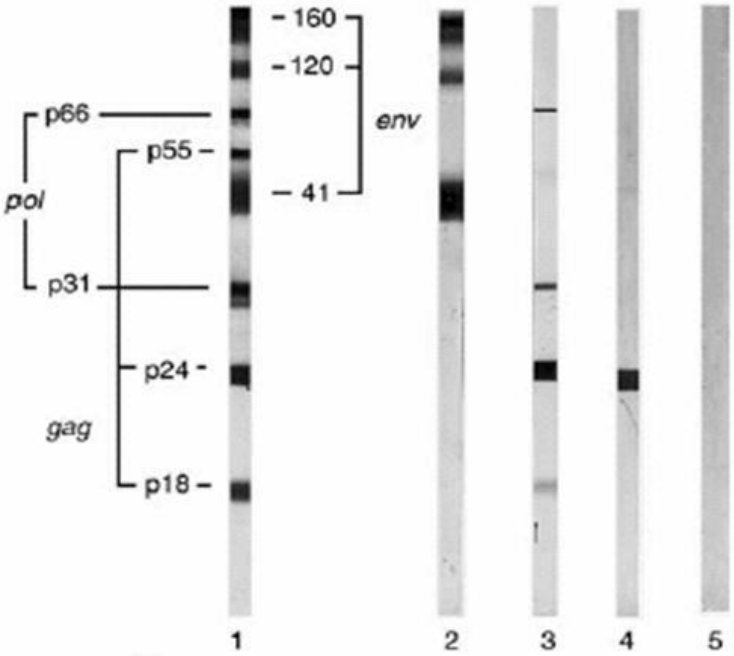



Polyclonal antibody
Antigen

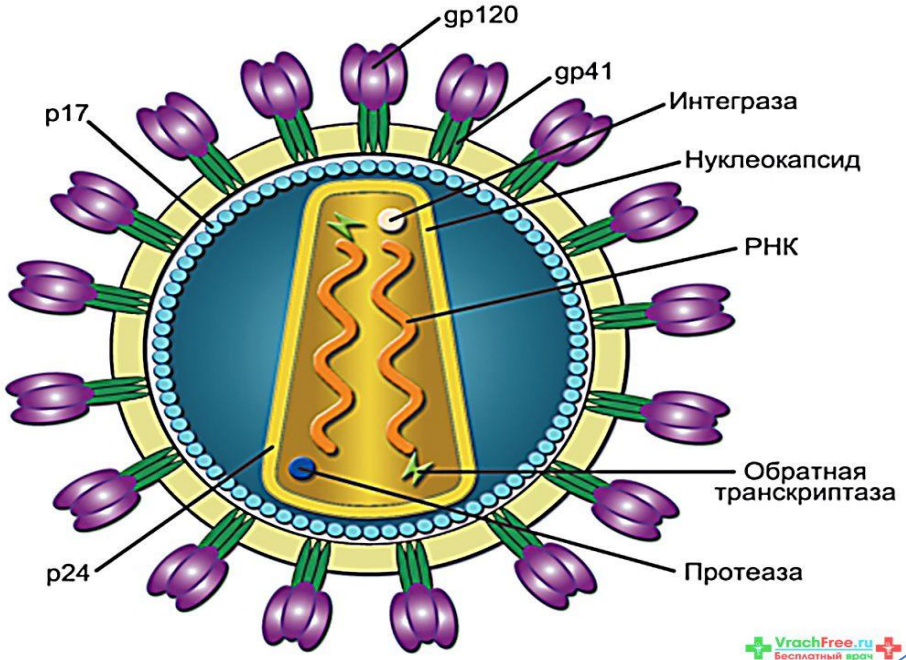


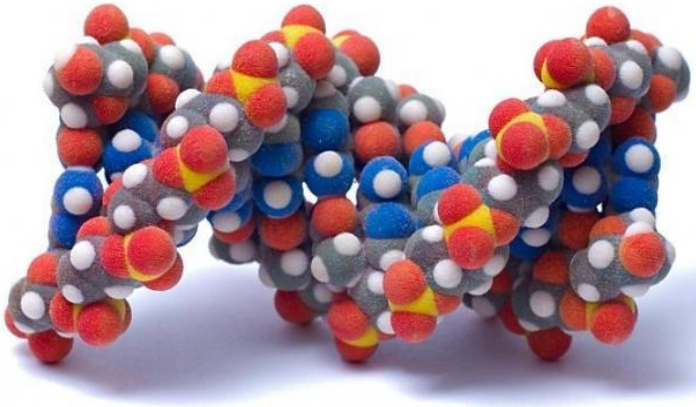




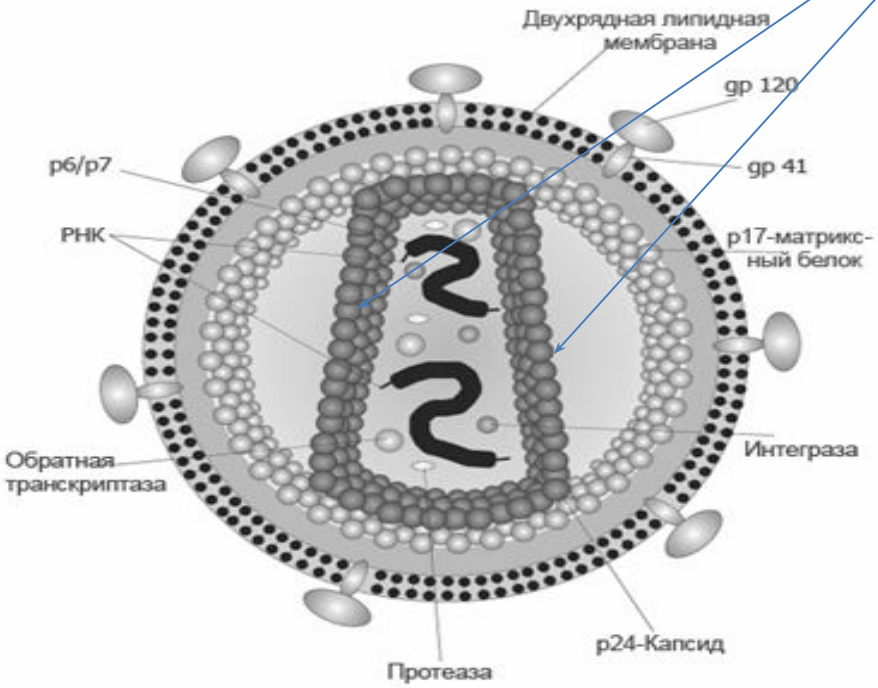


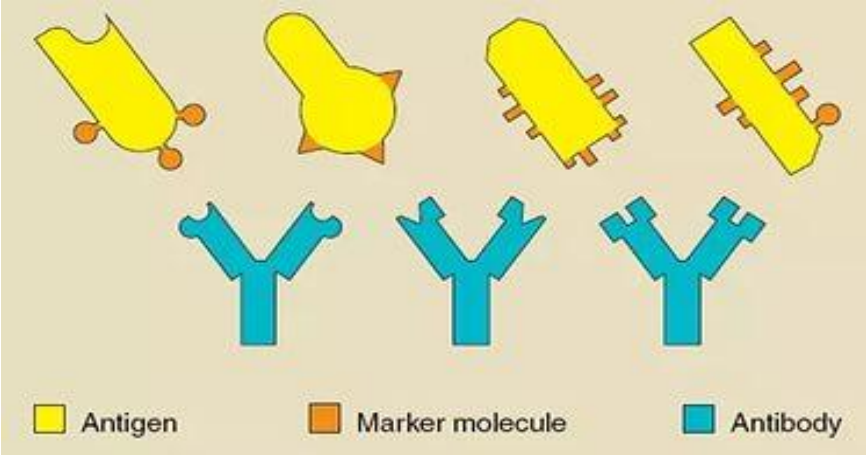
Иммуноблоттинг белков ВИЧ с сыворотками больных



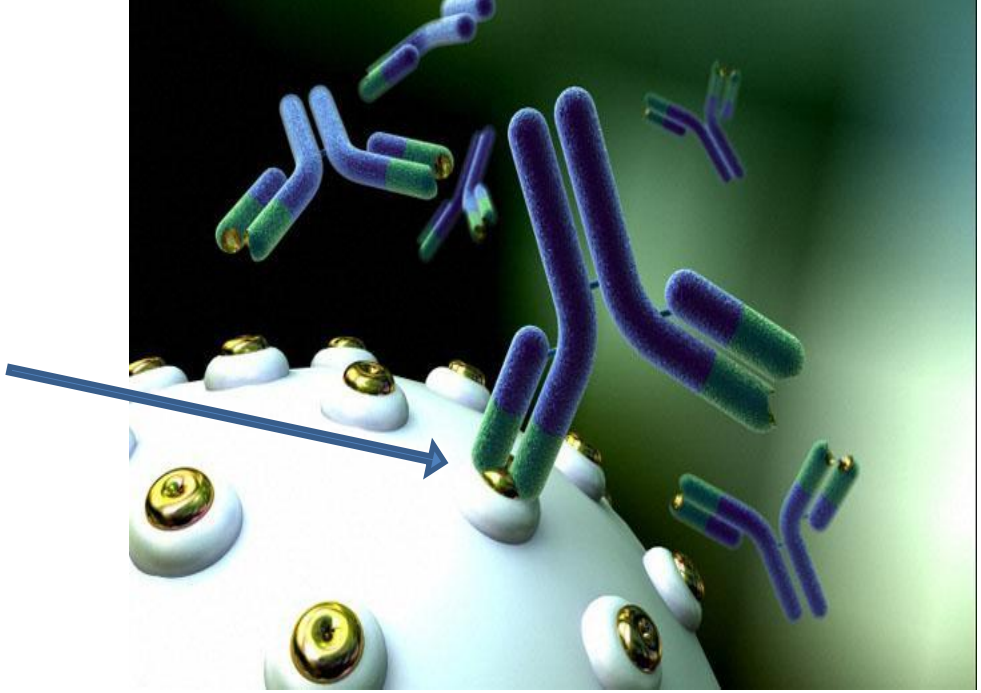


Капсид зрелого вириона ВИЧ состоит из 2000 молекул белка p24.
Молекула белка p24 состоит из 250 а.к.
Эпитоп для одного антитела обычно состоит из 3 - 10 а.к.

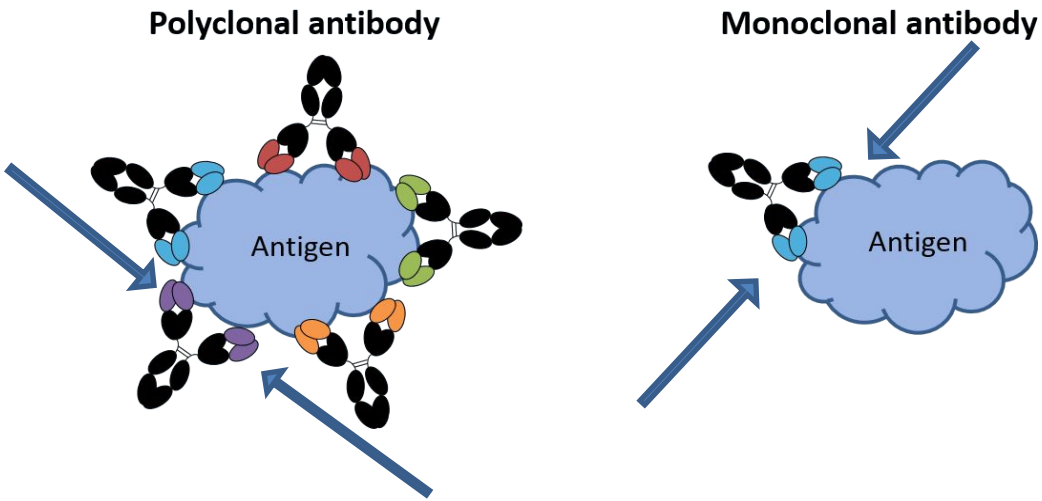




Аффинность – прочность (энергия) связи одного антиген-связывающего центра антитела с индивидуальным эпитопом антигена.



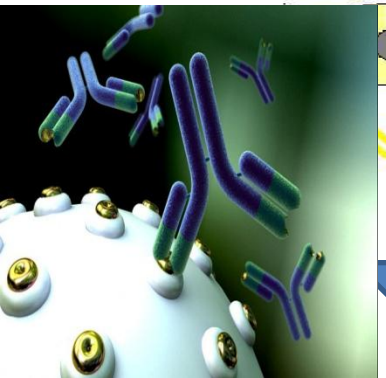
Авидность - суммарная сила взаимодействия антитела с антигеном и определяется аффинностью антител и числом антиген-связывающих центров.



Kohler G. and Milstein C., (Кембридж) в работе «Длительно живущие культуры гибридных клеток, секретирующие антитела предопределенной специфичности», Nature, 1975г. предложили метод создания иммортализованной (бессмертной) линии клеток, продуцирующих антитела одной специфичности, путем слияния нормальных лимфоцитов иммунизированных животных с клетками опухоли.

В 1984 г. за открытие принципа получения моноклональных антител авто[illegible] олучили Нобелевскую премию по физиологии и [illegible]е.

-ГФТФ



Клональная селекция В-клеток

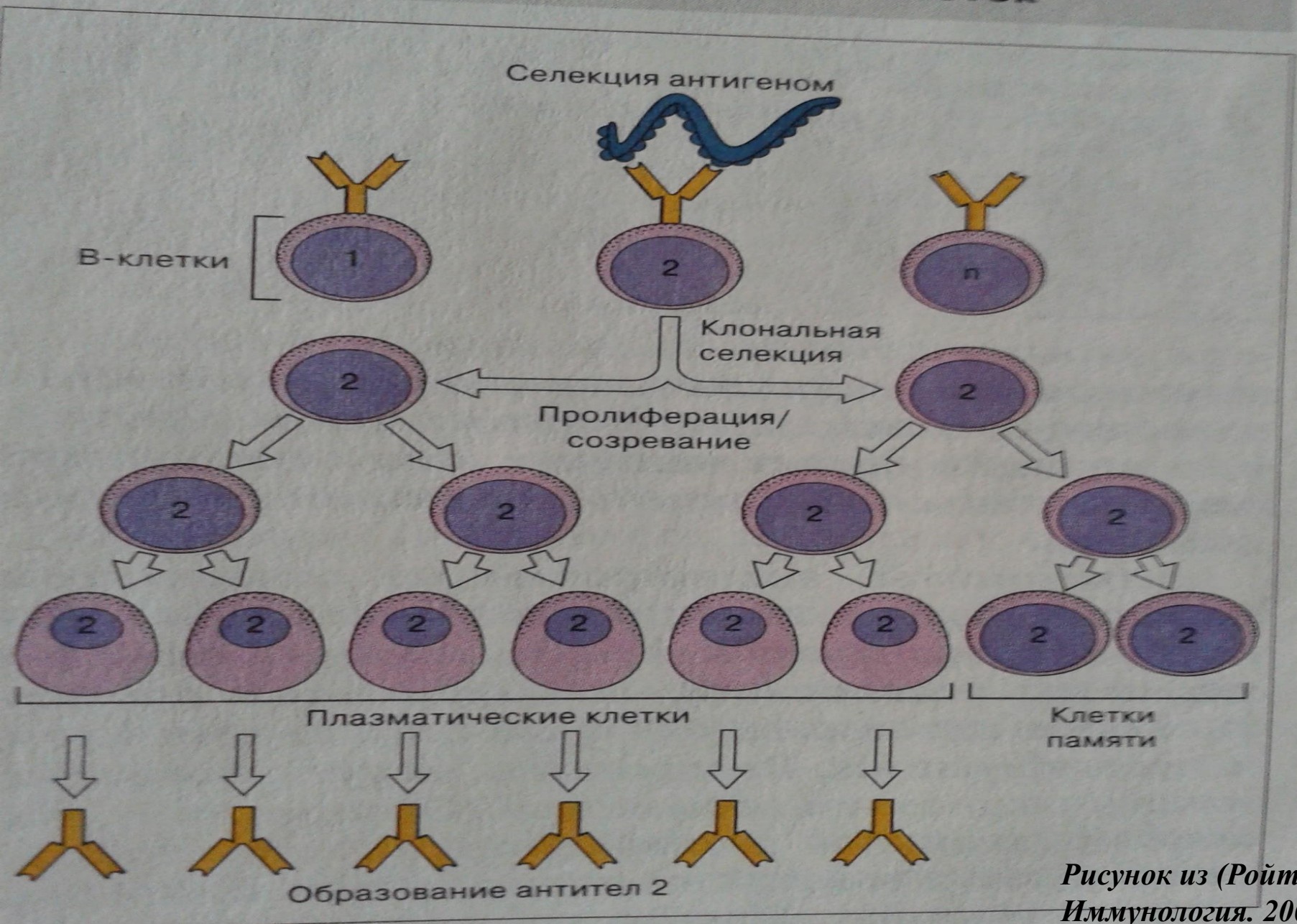
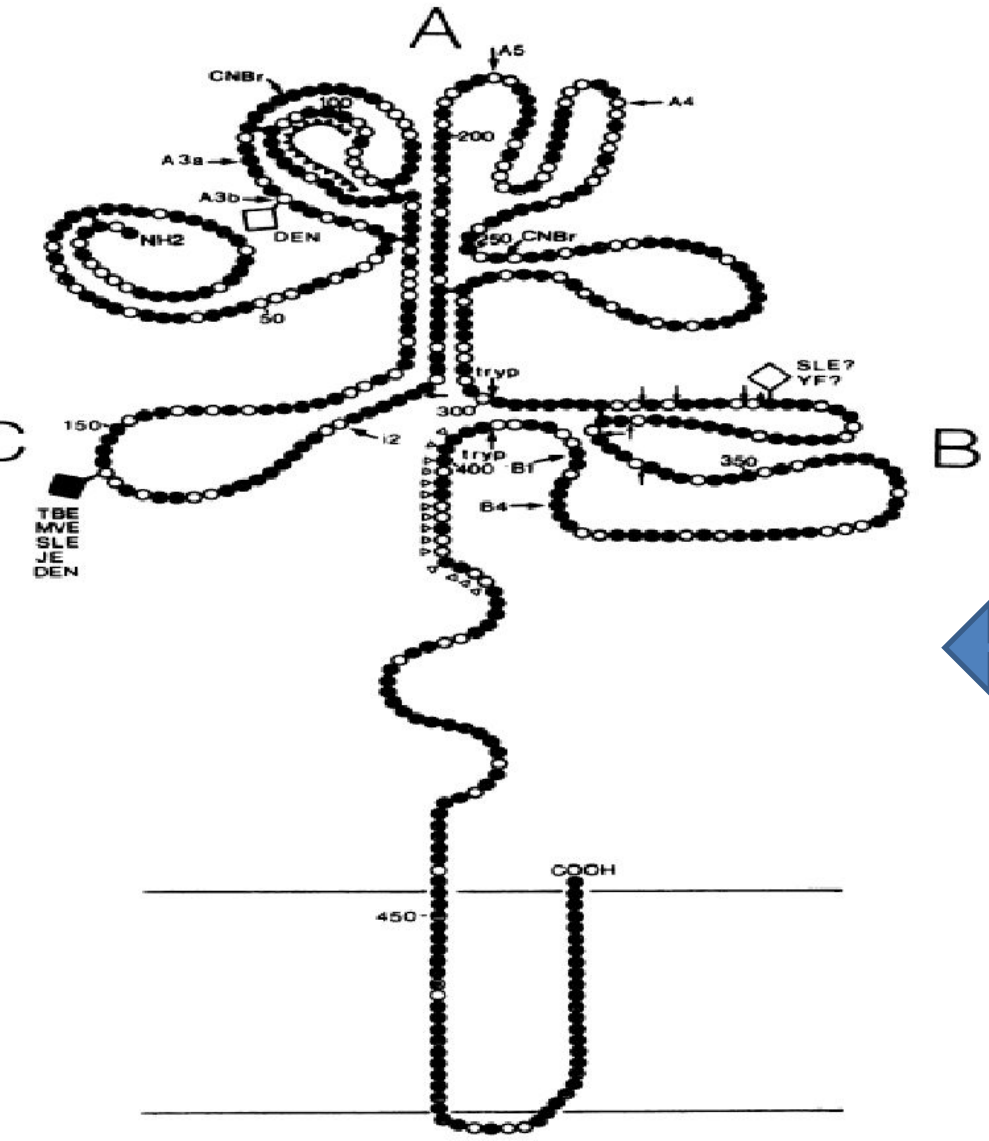


Рисунок из (Ройт А. Иммунология. 2000)

Этапы гибридомной технологии.

.Цель получения МКА в препаративном количестве:

- картирование антигенных эпитопов исследуемого патогена



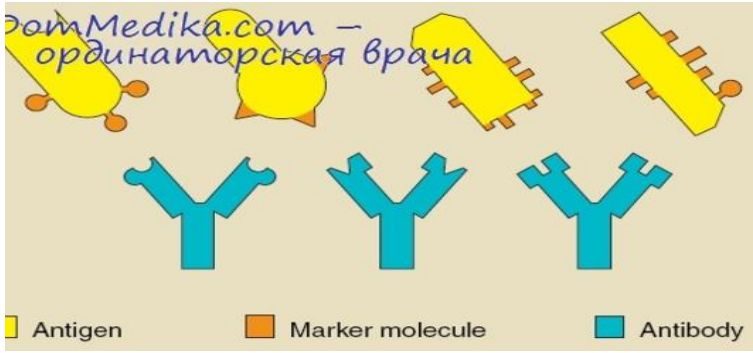
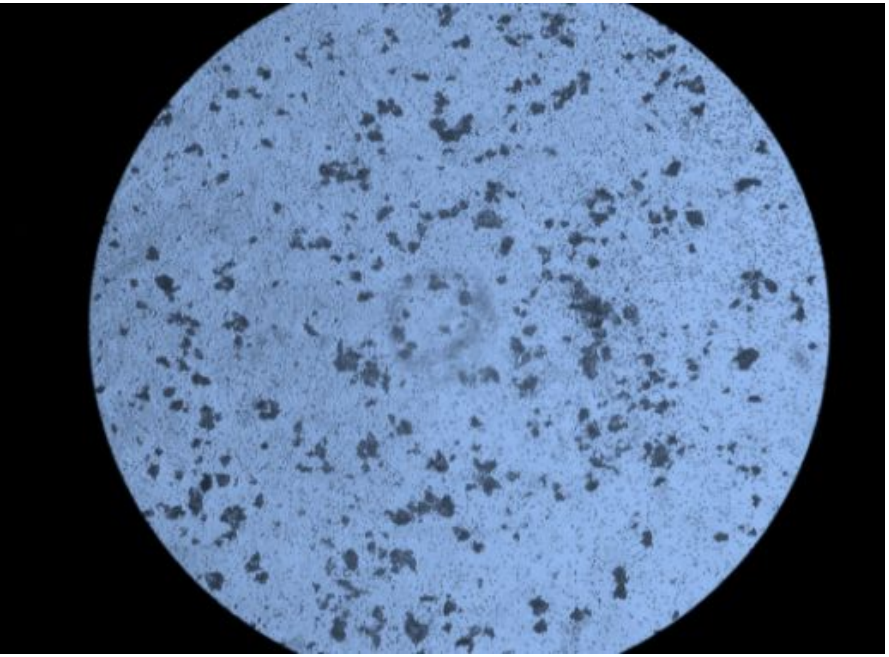


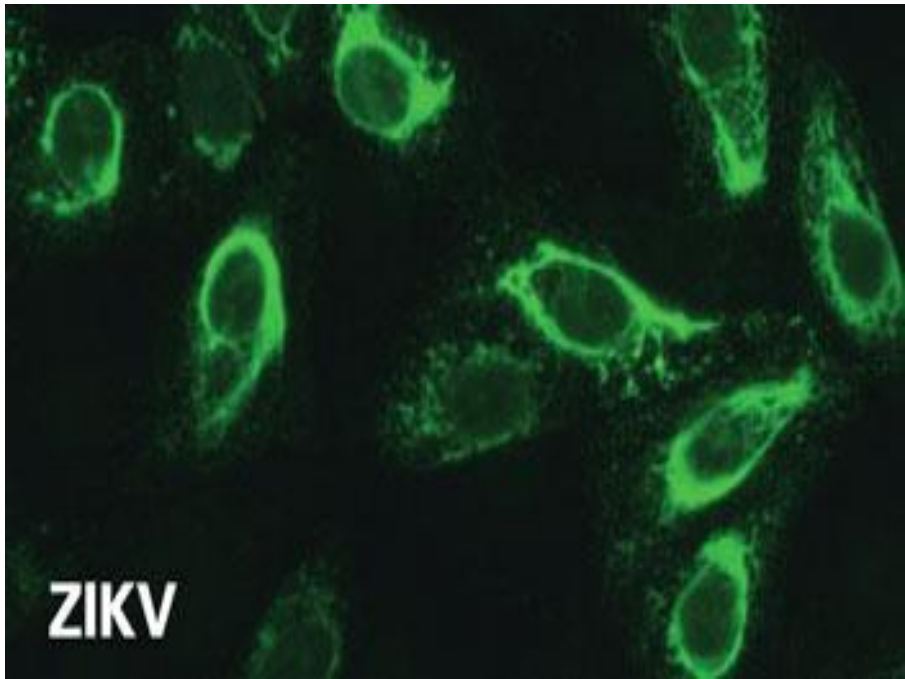
Рис. Схема гликопротеина E TBEV с картироваными эпитопами кросс-реактивности среди флавивирусов в пределах II домена и тип-, субтип- специфическими эпитопами в пределах I и III доменов белка E

(Mandl CMandl C.Mandl C.W. et al., 1989).

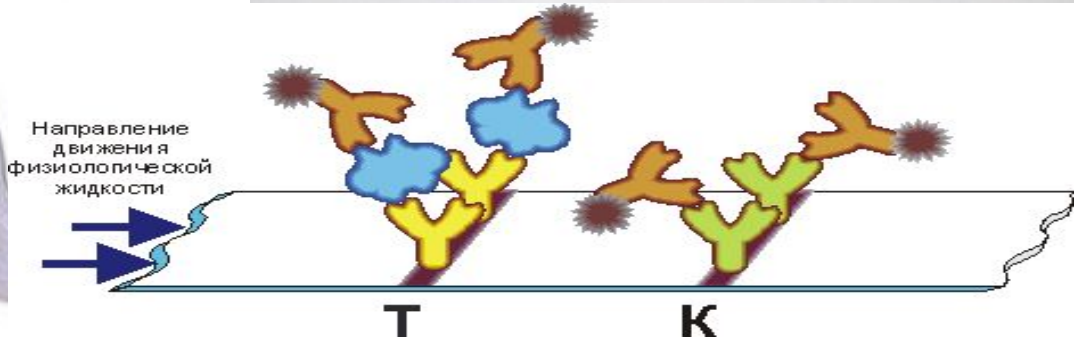
- **моноклональные антитела для обнаружения исследуемого патогена в тканях (клетках) лабораторных животных или в культуре инфицированных клеток**



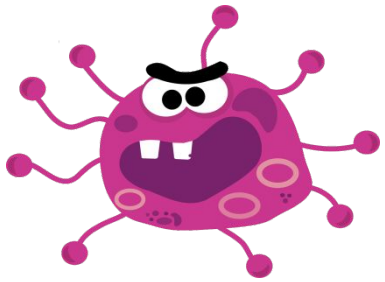
Выявление белка pp65 цитомегаловируса в инфицированных клетках *Vero* иммуноцитохимическим окрашиванием с использованием мышиных МКА 5F10 и конъюгатом антивидовых антител с пероксидазой. Субстрат для пероксидазы 3-avino-9- ethelcarbazol.

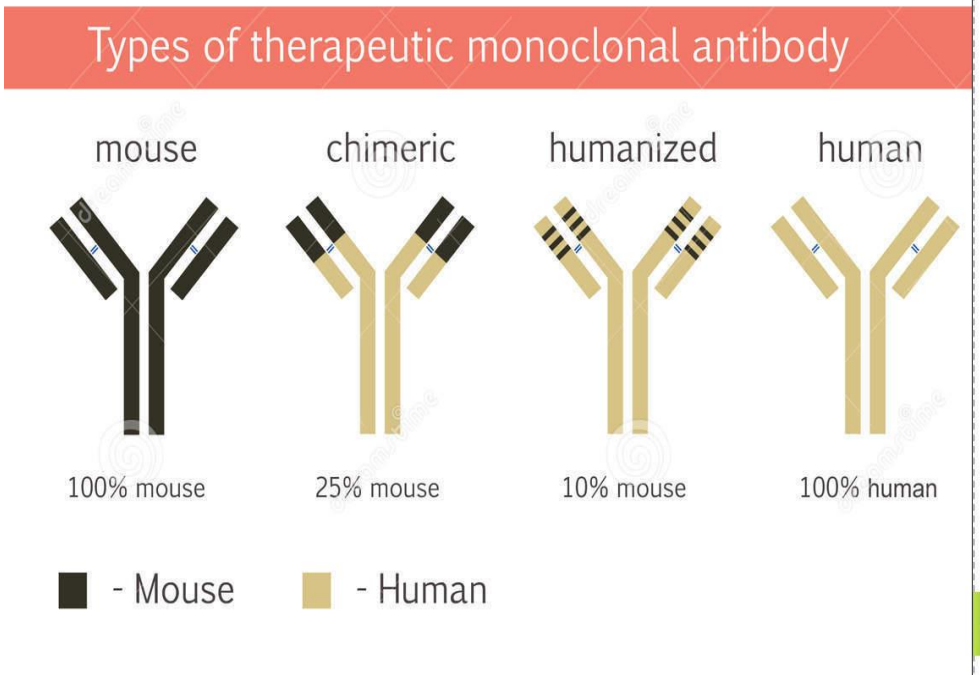


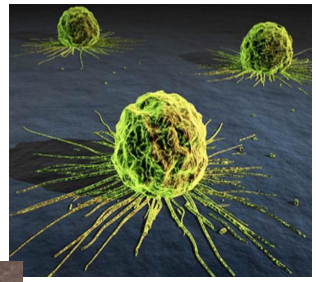
- **Моноклональные антитела для диагностики (разработка тест-системы ИФА или ИХА)**

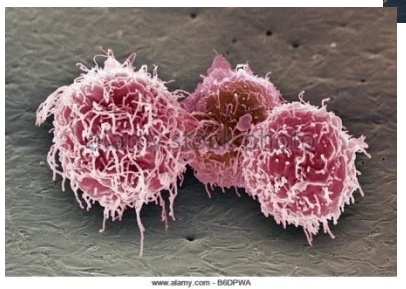


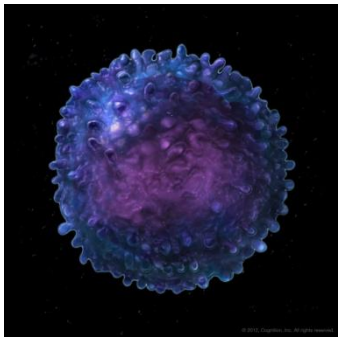
- **моноклональные антитела для получения терапевтических препаратов**

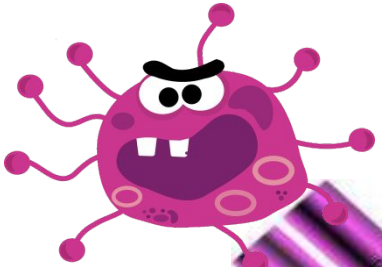


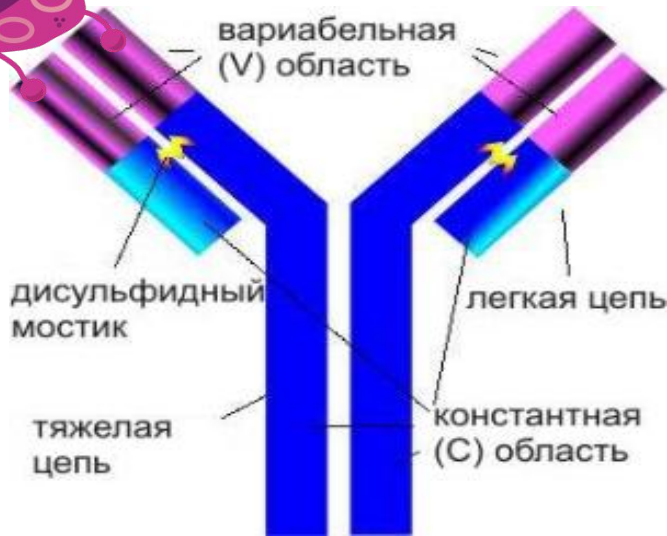






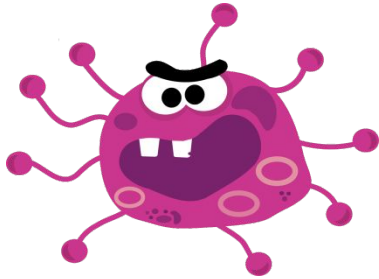


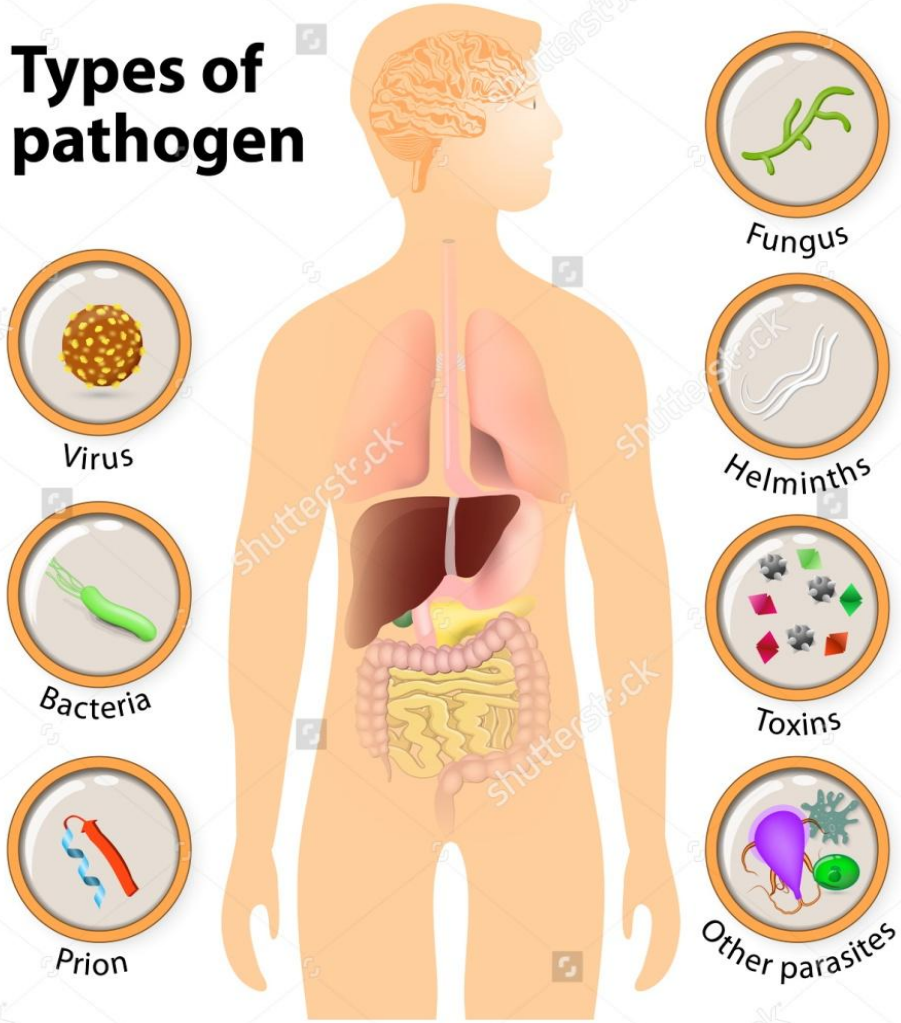




Этапы гибридомной технологии.

2. Выбор и подготовка антигена для иммунизации животных с целью получения моноклональных

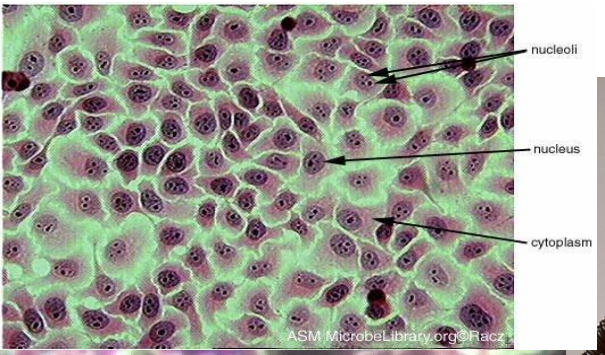


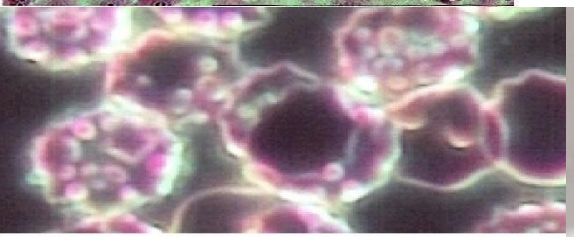


Антигены – любая органическая субстанция, способная вызвать иммунный ответ (цельные объекты или их отдельные белки; природные или рекомбинантные белки).

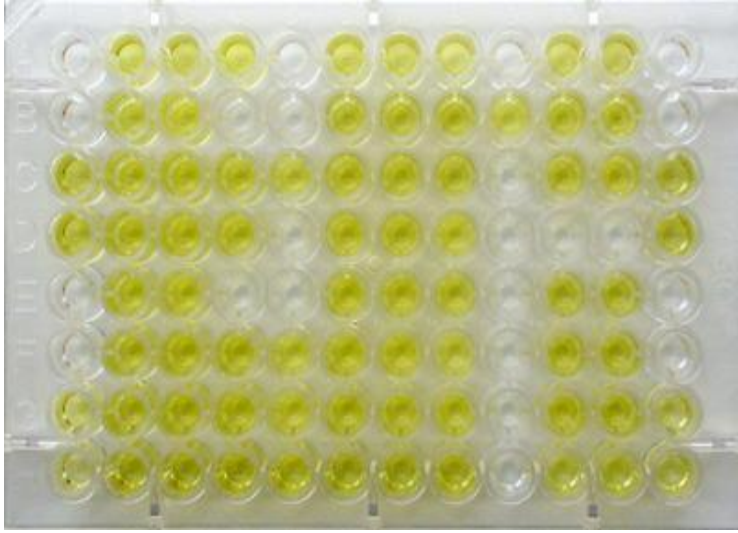
- опухоли
- наркотики
- цитокины
- антитела

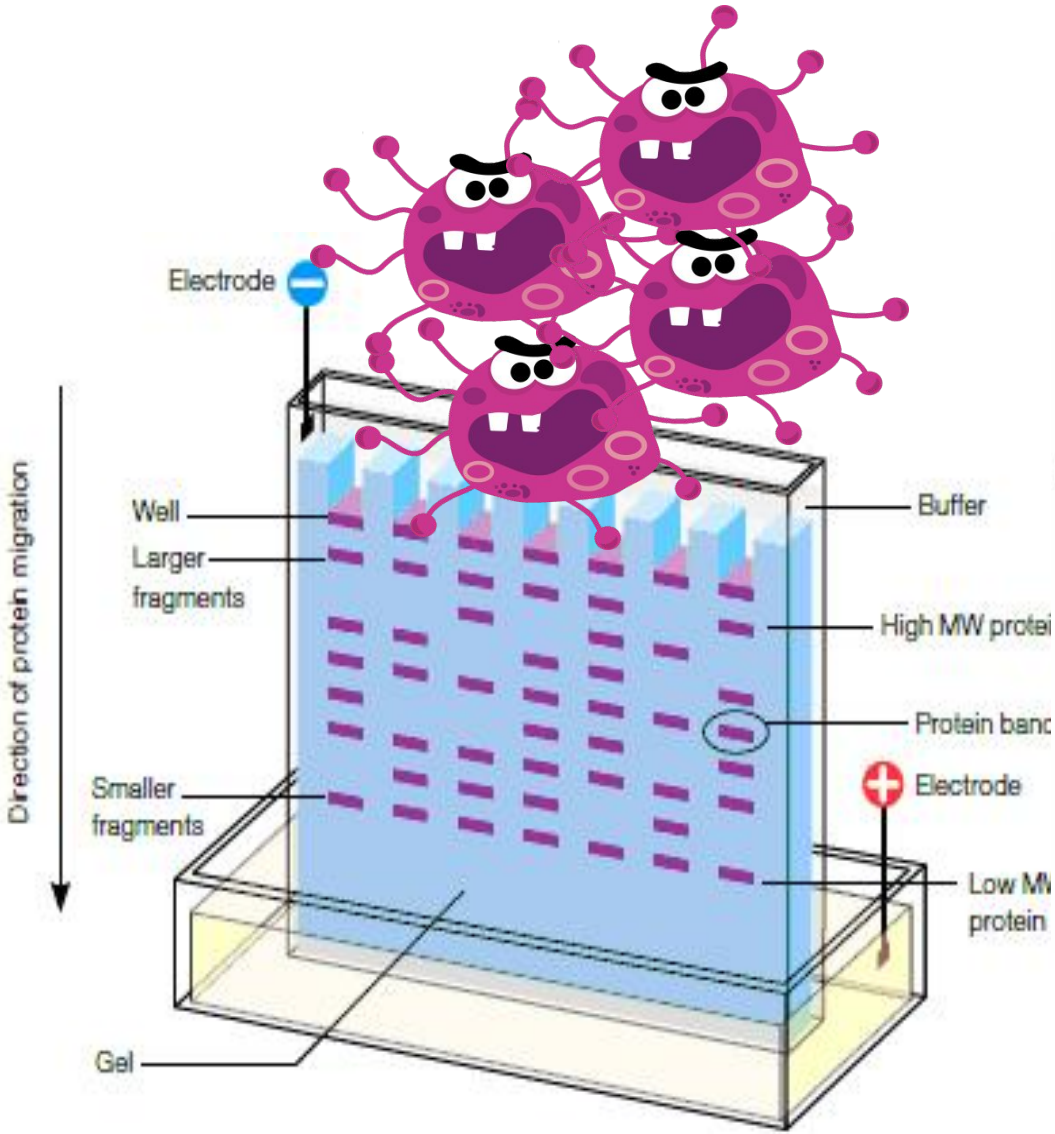
Подготовка антигена для иммунизации

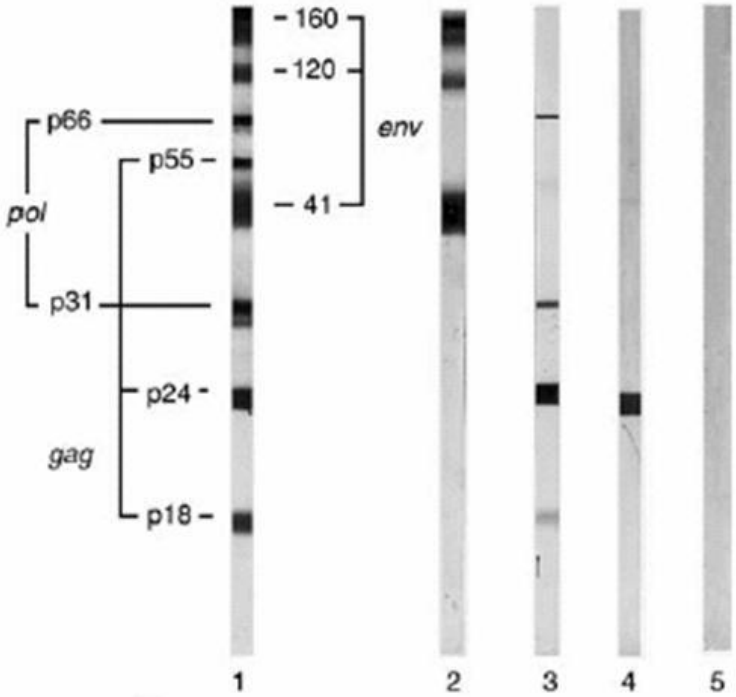




Тест антигена на антигенность- -- - способность узнавать специфические антитела in vitro





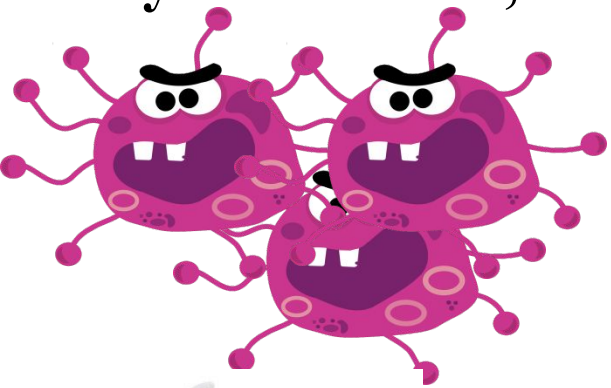


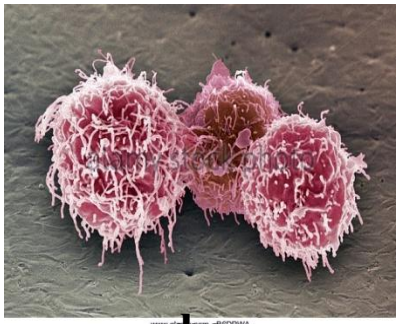
Иммуноблоттинг белков ВИЧ с сыворотками больных

Этапы гибридомной технологии.

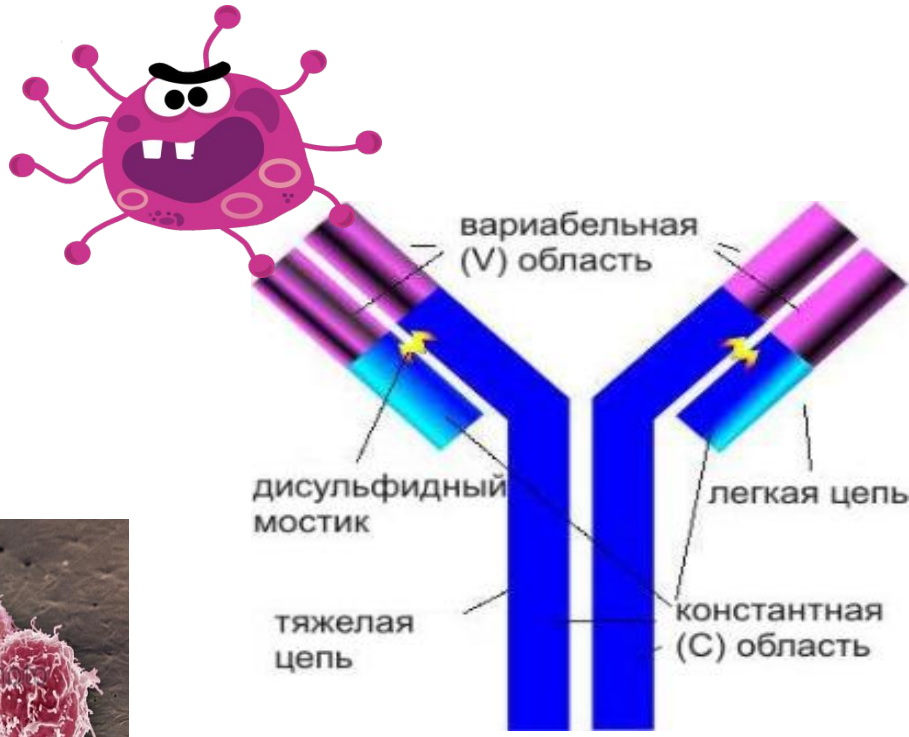
3. Иммунизация.

Иммуногенность – способность антигена in vivo вызывать иммунный ответ, т.е. синтез антител (иммуноглобулинов).





лимфоцит



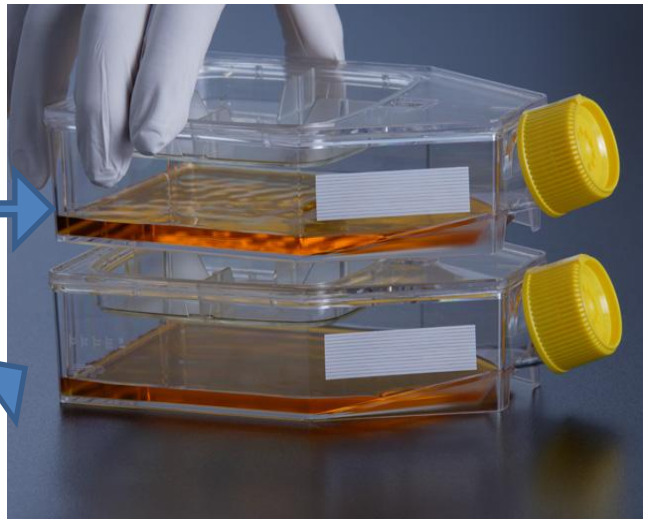
Неполный адъювант Фрейнда - водно-жировая эмульсия, содержащая вазелиновое маслоНеполный адъювант Фрейнда - водно-жировая эмульсия, содержащая вазелиновое масло, ланолинНеполный адъювант Фрейнда - водно-жировая эмульсия, содержащая вазелиновое масло, ланолин и эмульгаторНеполный адъювант Фрейнда - включает в себя, кроме вышеперечисленных компонентов, ВЦЖНеполный адъювант Фрейнда - водно-жировая эмульсия, содержащая вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор. Депонирует антиген и усиливает его захват фагоцитами.

Неполный адъювант Фрейнда - включает в себя, кроме вышеперечисленных компонентов, ВЦЖ. Это позволяет ему дополнительно активировать макрофаги и костимулировать Т-клетки.

Основное свойство большинства адъювантов - способность их депонировать антиген в липосомах, т. е. адсорбировать его на своей поверхности и длительное время сохранять в организме, что увеличивает продолжительность его влияния на иммунную систему.

Этапы гибридомной технологии.

4. Подготовка популяции миеломных клеток-реципиентов к слиянию селекцией в среде, содержащей 8-азагуанин – токсичный аналог ГФТФ, для гибели ревертантов, содержащих ген ГФТФ.

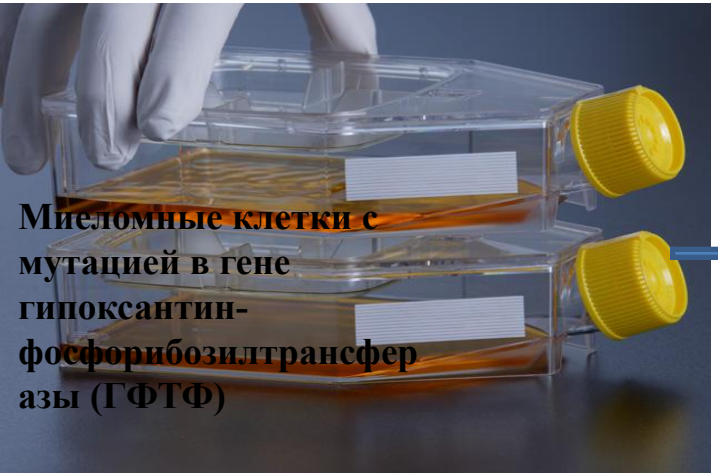


Миеломные клетки с мутацией в гене гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (ГФТФ)

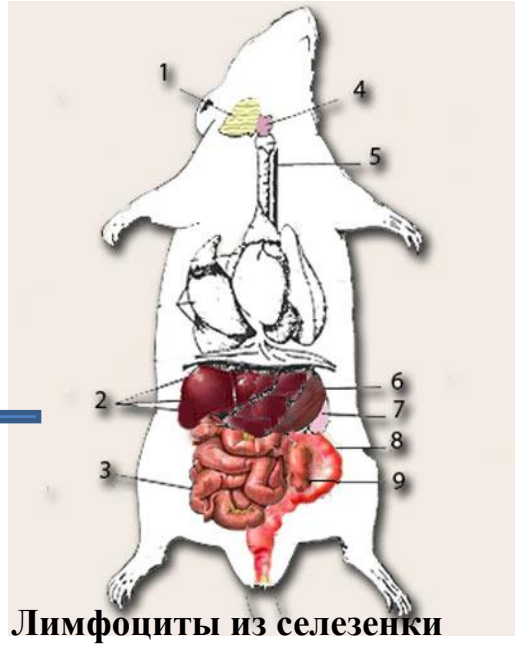
Используют перевиваемые миеломные В-клетки от мышей той же линии, не секретирующими собственных антител. Лимфоцит и миелома, взятые от одного вида животного инбредной линии, имеют сходный репертуар антигенов гистосовместимости на клеточной поверхности.

Этапы гибридомной технологии.

5. Гибридизация – слияние миеломных клеток с лимфоцитами мыши –донора селезенки под действием полиэтиленгликоля с м.м. 1300-1600.

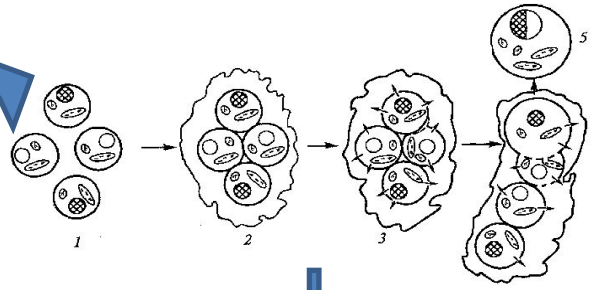


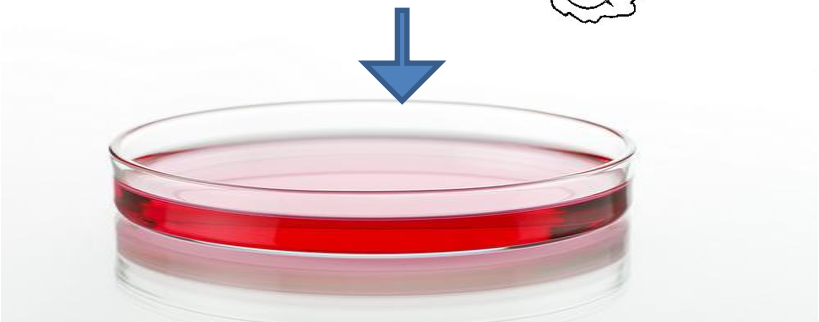
Миеломные клетки с мутацией в гене гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (ГФТФ)



Лимфоциты из селезенки иммунизированной мыши инбредной линии Balb/

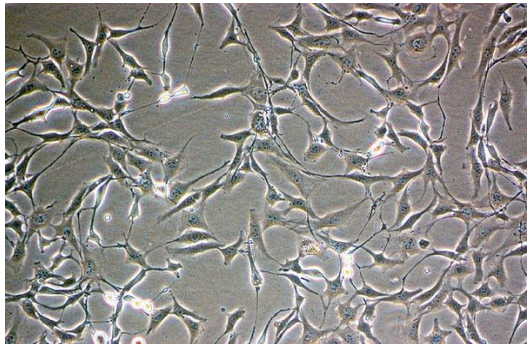
Полиэтиленгликоль полимер полимер этиленгликоля $HO–(CH_2–CH_2–O)_n–H$ – сливающий агент



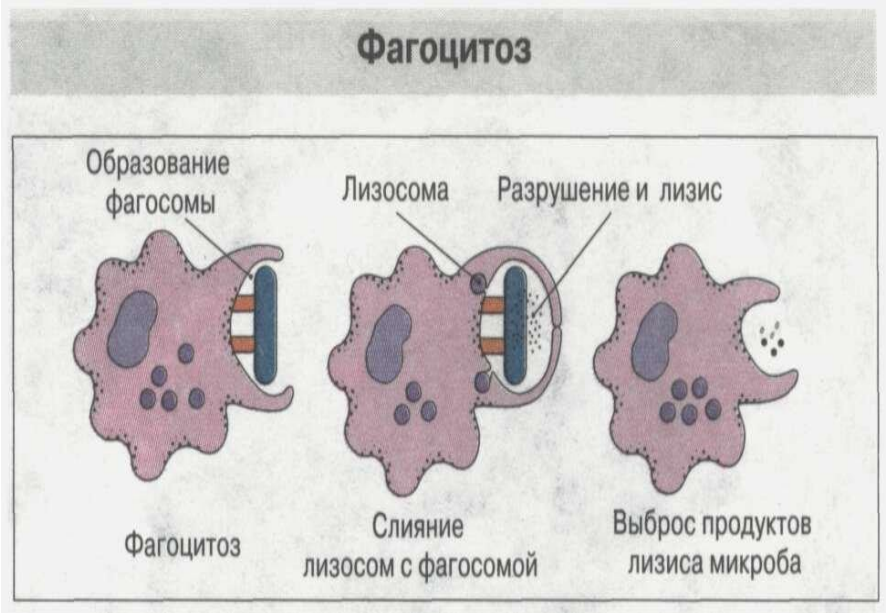


Соотношение клеток для слияния (1/3) - 20 млн. миеломных клеток (один культуральный флакон 175 см^3) на 60 млн. лимфоцитов (одна селезенка).
<u>Из 10 тысяч клеток сливается одна пара – это хороший результат.</u>
Посев - 1 млн. участвовавших в слиянии клеток на один 96-луночный планшет (10 тыс. клеток в лунку с предварительно посаженными в лунки перитониальными макрофагами мыши для зачистки погибших неслившихся миеломных и лимфотических клеток.

Селекция гибридом с аминоптерином

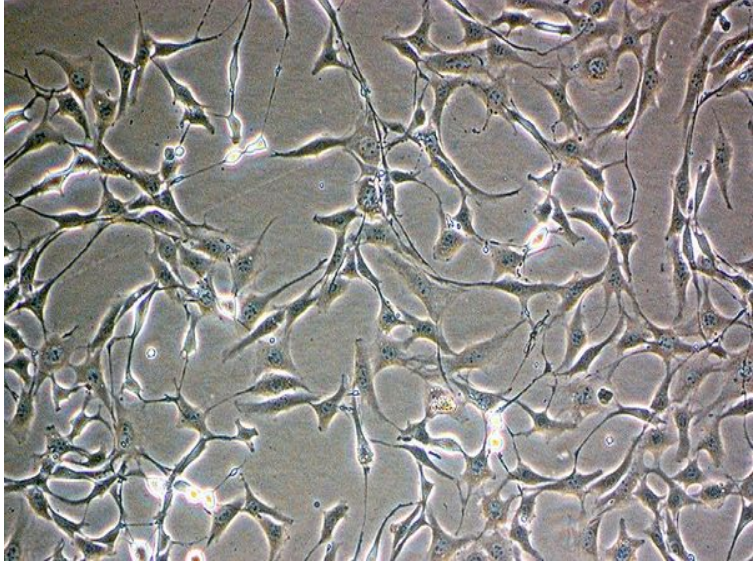


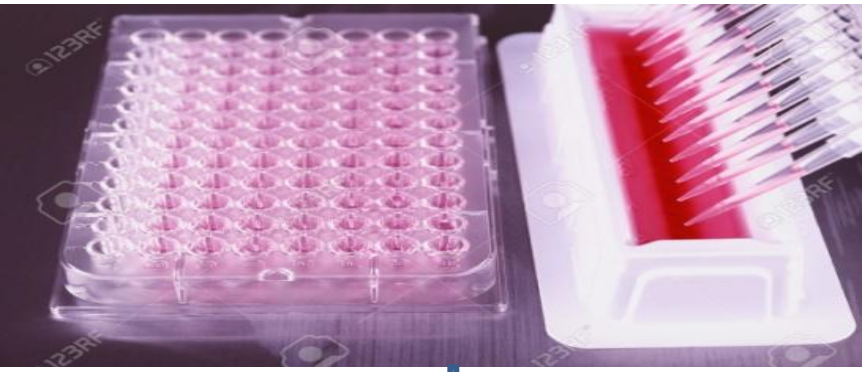
После слияния клетки в течение 10-14 дней поддерживают в среде, содержащей НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин).

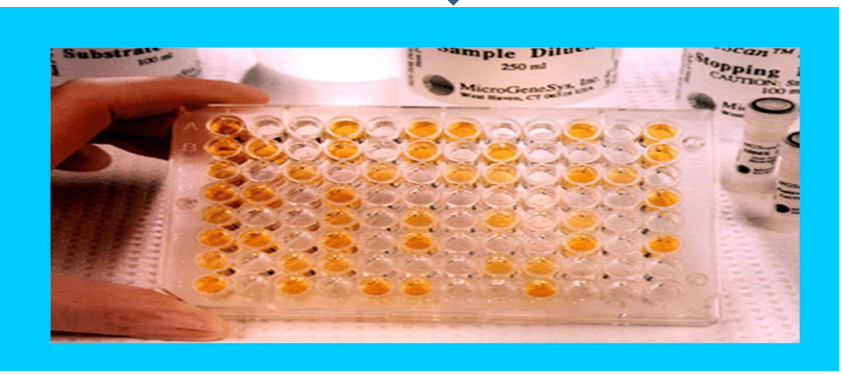


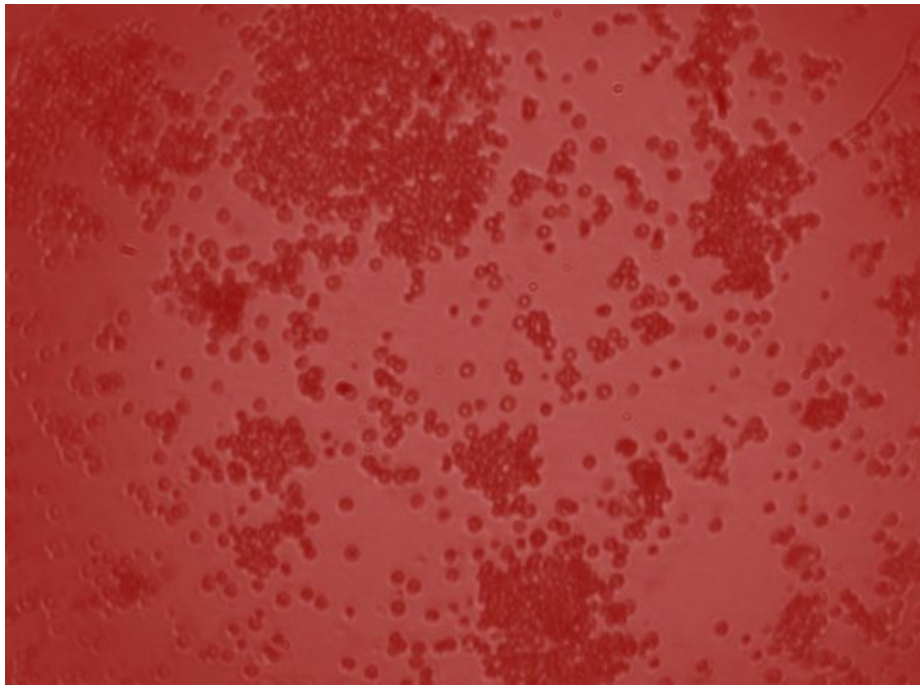
Этапы гибридомной технологии.

6. Клонирование слившихся клеток - - - посев одной гибридной клетки в одну лунку.





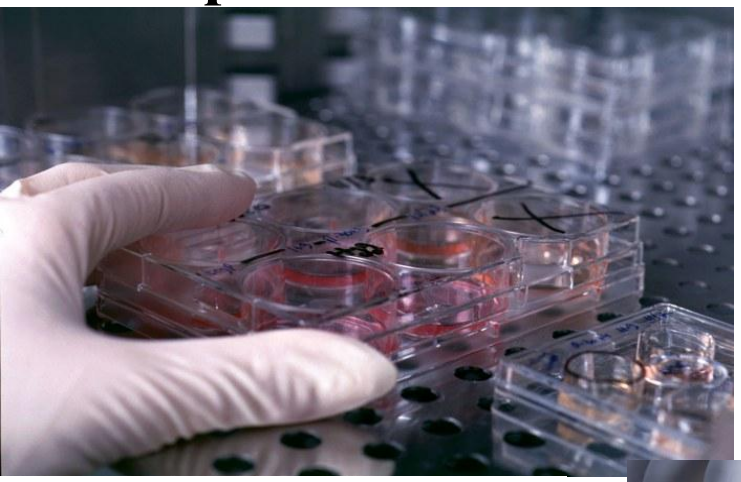


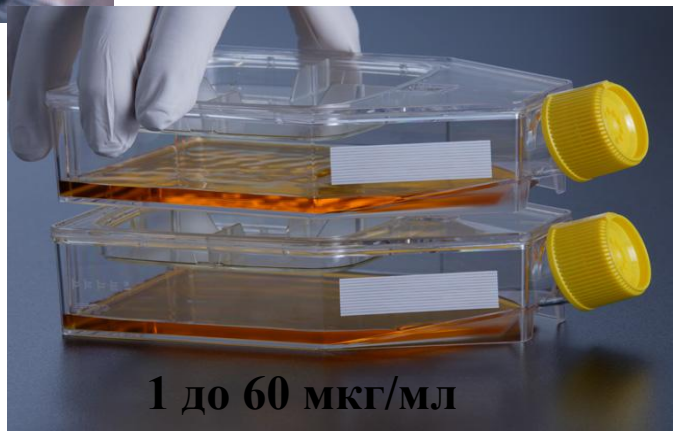


3-кратное тестирование ростовой среды от каждой колонии в ИФА на антигене, которым иммунизировали мышь. Дальнейший рассев только положительных колоний, выросших из одной клетки.

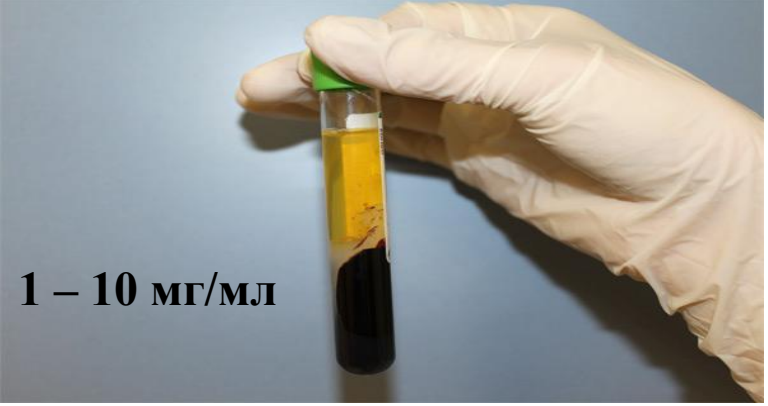
Этапы гибридомной технологии.

7. Выращивание отдельных клонов клеток в массовой культуре и заморозка клеток из первичных клонов.



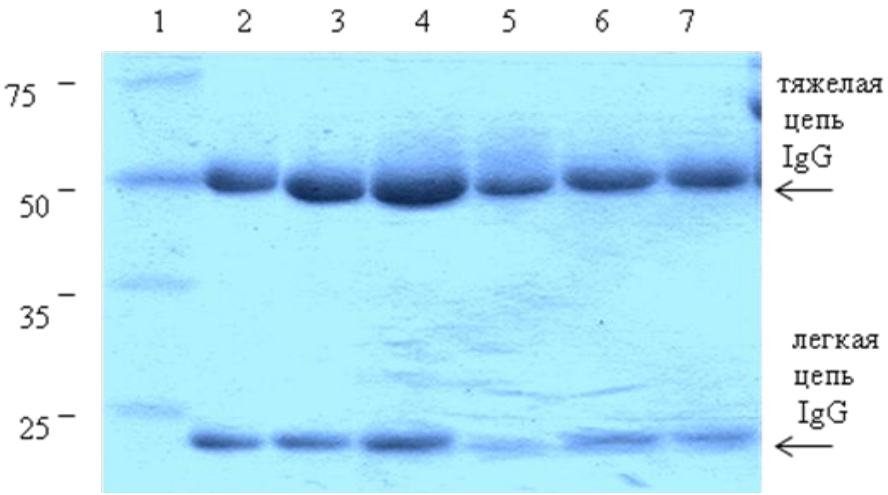


8. Внутрибрюшинное прививание гибридомных клеток мышам инбредной линии Balb/c (1 - 2 млн клеток на мышь).

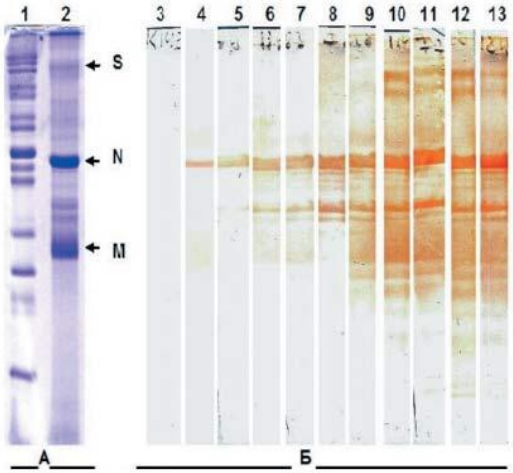


Этапы гибридомной технологии.

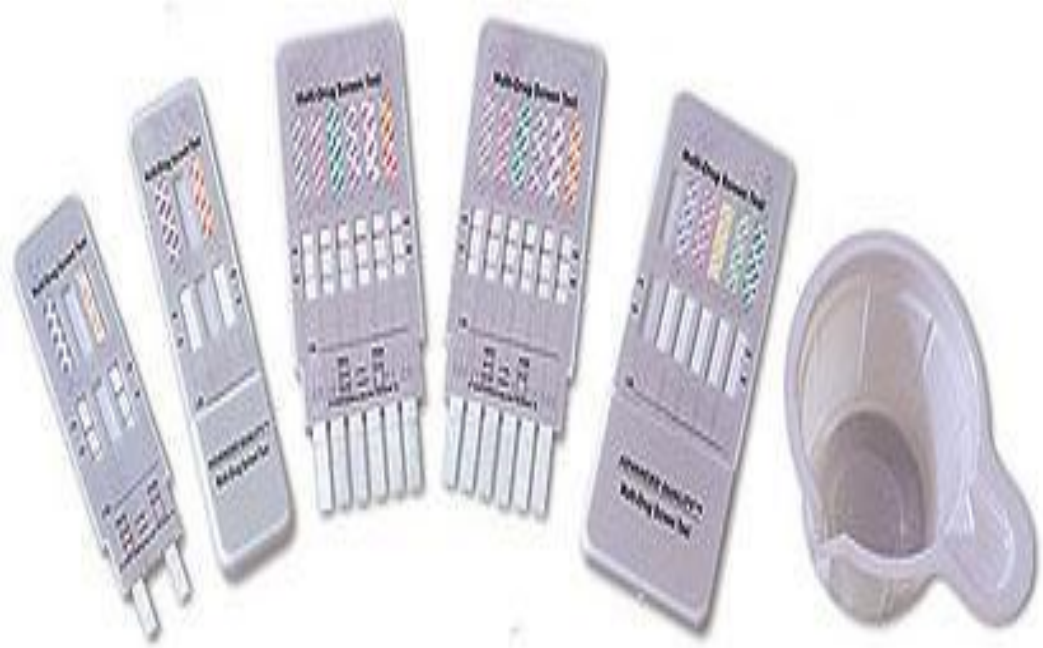
9. Очистка моноклональных антител из асцитической жидкости мышей.



Асцитная жидкость содержит гомогенные моноклональные антитела в высокой концентрации (1 – 10 мг/мл) . Для очистки антител применяется фракционирование сульфатом аммония. Последующая ионообменная хроматография обеспечивает чистоту антител на уровне только 90 %, поэтому для дальнейшей очистки необходимо использовать дополнительные методы, например гель-фильтрацию. В настоящее время большее распространение получил метод очистки антител с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном белке А или белке G. Этот метод очистки более быстрый (одностадийный) и позволяет получать антитела с чистотой более 95 %.



ELISAS
that perform
DRG
DRG
DRG

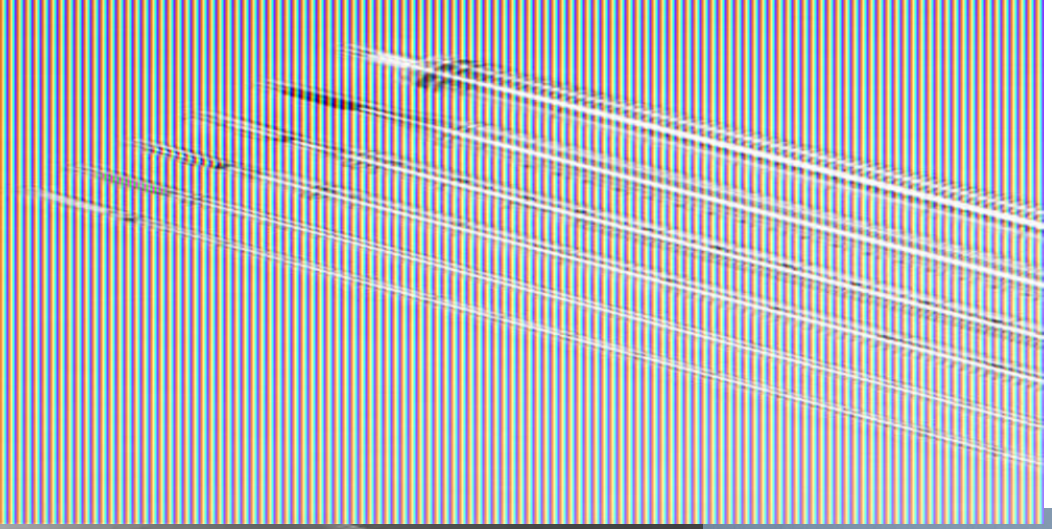


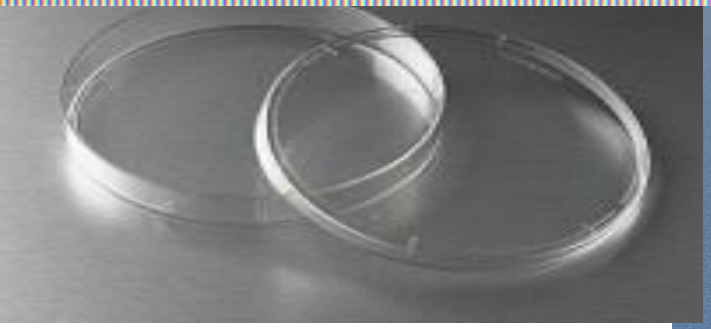
Стерильный бокс для работ по получению гибридных клеточных линий

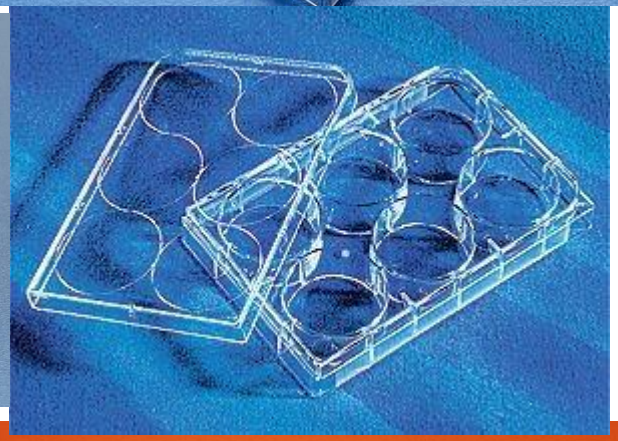
Автоматические пипетки – дозаторы и насадки к ним

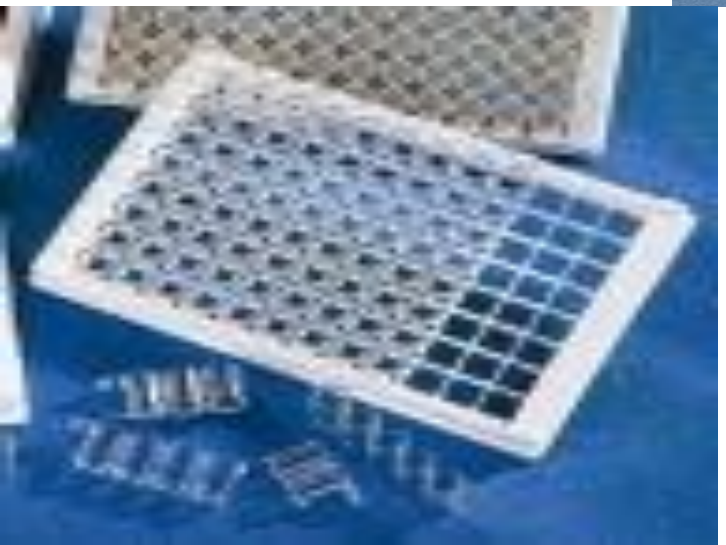
Камера для электрофореза с источником тока

Камера для переноса белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану



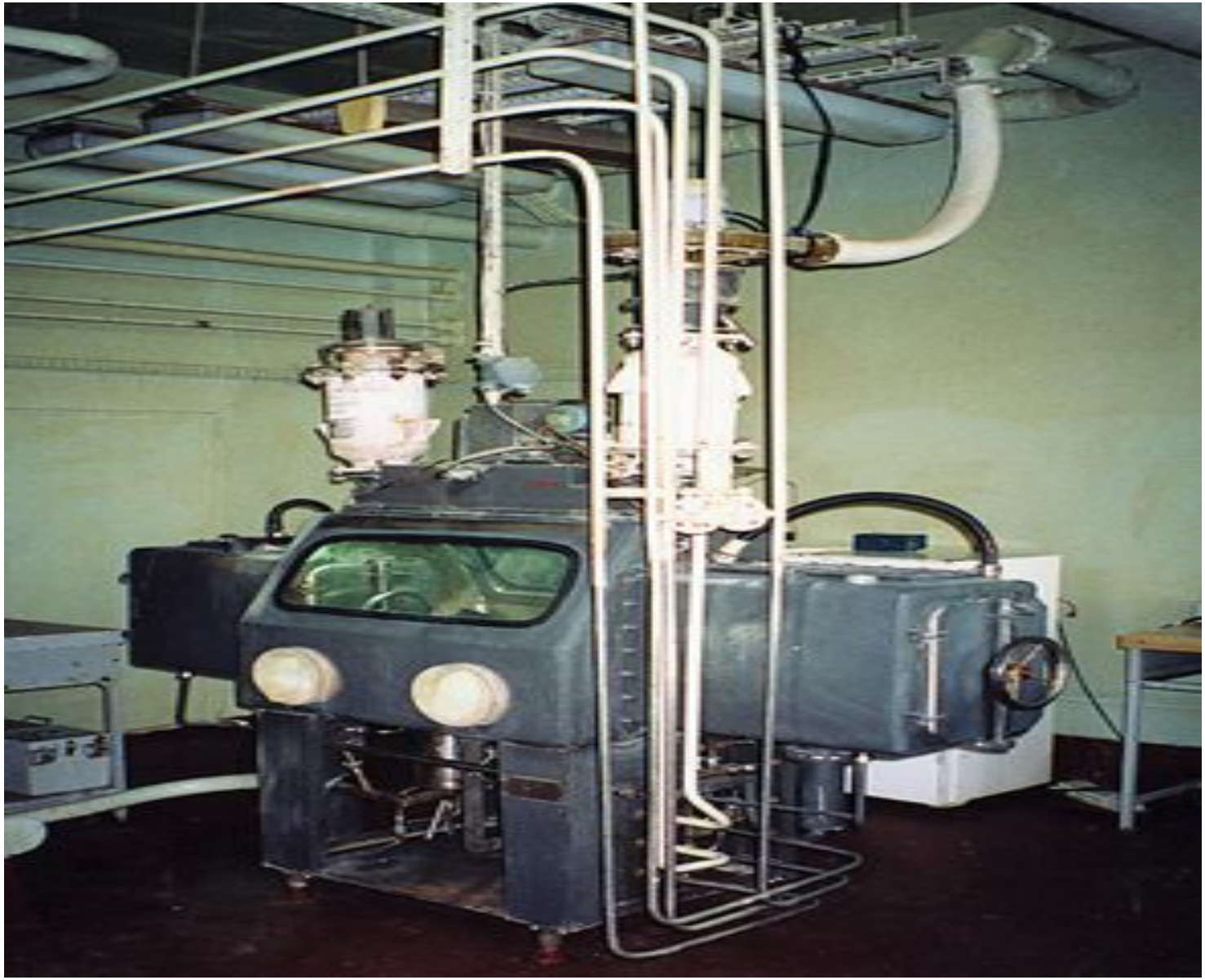






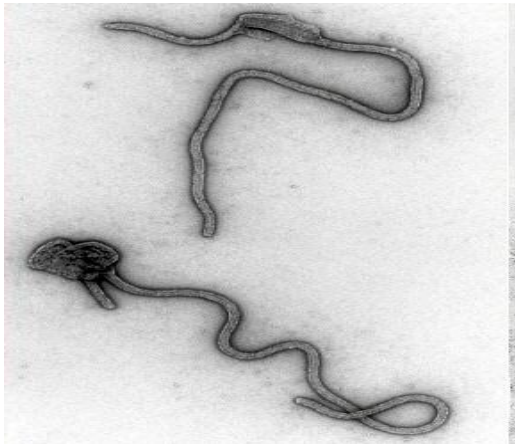
Световой микроскоп

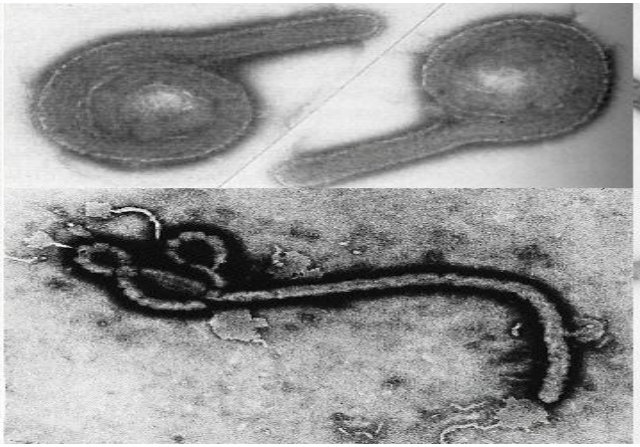
Планшетный анализатор для ИФА

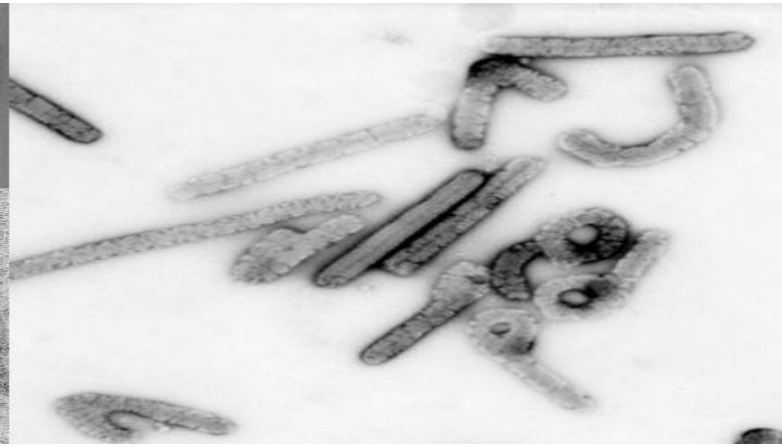


Бокс биологической безопасности III класса “крокодил” для работы с особо опасными патогенами.

2 часть. Моноклональные антитела как инструмент исследования антигенной структуры вирусов Марбург и Эбола (семейство Filoviridae - от лат. *filum* – нить).



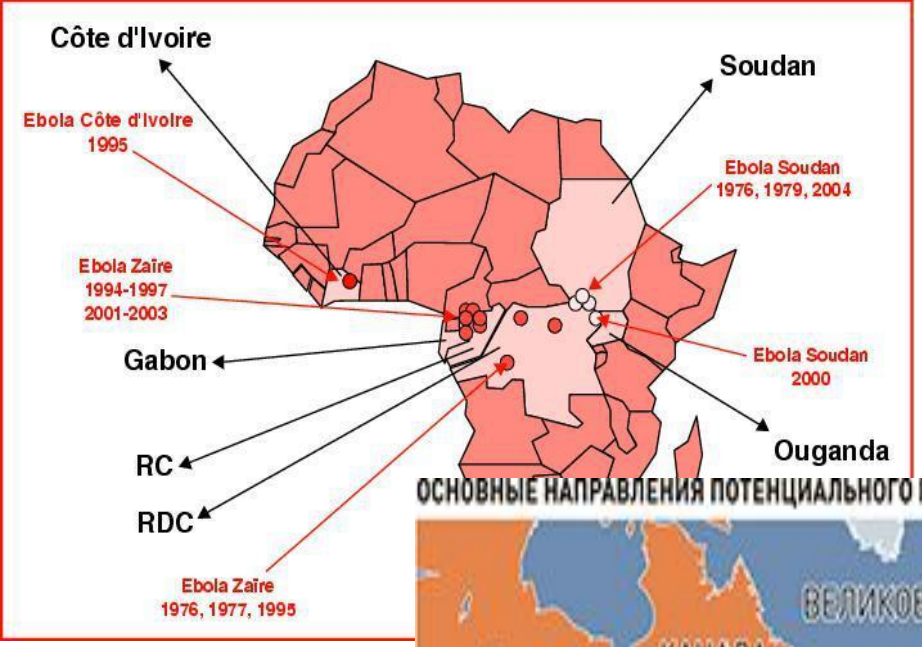




Случаи лихорадки Марбург

год	место	штамм	число заболевших	число погибших
1967	г. Марбург	Popp и Ratayczak	32	7 (21)
1967	г. Белград	Popp и Voege		
1975	Зимбабве	Ozolin		
1980	Кения	Musoke	2	1
1987	Кения	Ravn		
1988	Россия	Popp	1	1
1990	Россия	Popp	1	-
1998-1999	Республика Конго	Like Victoria marburgvirus	154	83%
2004-2005	Ангола	Like Victoria marburgvirus	252	227 (90%)
2007	Уганда		2	1
2008	Уганда Голландия		1	1

год	место	штамм	число заболевших	число погибших
1976	Заир	Zair	318	280 (88%)
1976	Судан	Sudan	284	151 (53%)
1976	Англия	Sudan	1	-
1977	Заир	Zair	1	1
1979	Судан	Sudan	34	22 (65%)
1986	США	Рестон	обезьяны	
1992	Филлипины	Reston	обезьяны	
1994	Берег Слоновой Кости	Ivory Cost	1	-
1994	Габон	Zair	52	31 (60%)
1995	Заир, Габон	Zair	315	250 (81%)
1996	Габон	Zair	37	21 (57)
2000-2008	Уганда, Габон, Конго, Судан	Sudan	701	90%
2005	Россия	Zair	1	1
2008	Филлипины	Reston	свиньи	
2013-2015	Гвинея, Либерия Сьерре-Леоне Нигерия Сенегал США Испания Мали Италия Англия	Zair	3807 10675 14122 20 1 4 1 8 1 1	2536 4809 3955 8 - 1 - 6 - -



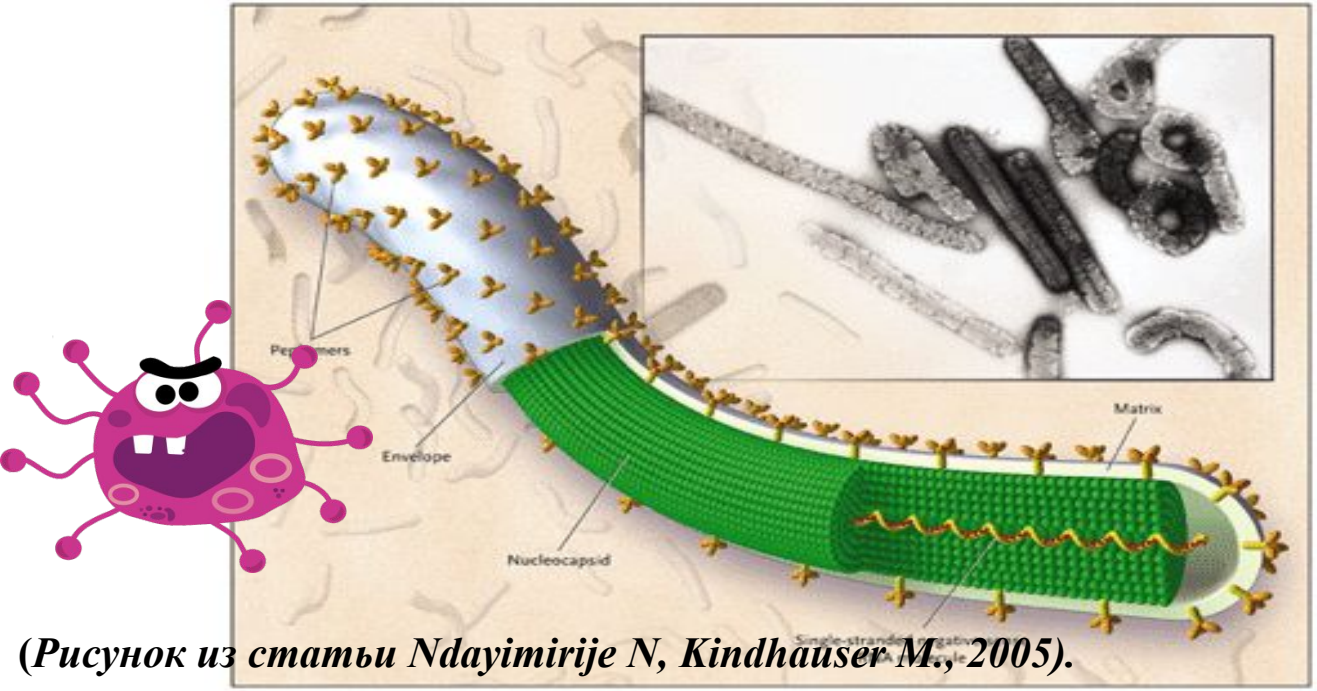
ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЭБОЛЫ

Рейсы из Нигерии, человек в неделю
3000-6000
1500-3000
300-1500

Количество зараженных/умерших
умерших — зараженных

ВЕЛИКОБРИТАНИЯ
ГОЛЛАНДИЯ
ГЕРМАНИЯ
КАНАДА
ФРАНЦИЯ
ИТАЛИЯ
ИСПАНИЯ
ТУРЦИЯ
США
КИТАЙ
ЕГИПЕТ
САУДОВСКАЯ АРАВИЯ
ИНДИЯ
ГВИНЕЯ
СЬЕРРА-ЛЕОНЕ
ЛИБЕРИЯ
НИГЕРИЯ
605
2021
648
1074
1830
3458
8
20

По данным доклада Всемирной организации здравоохранения (по состоянию на 25 сентября)

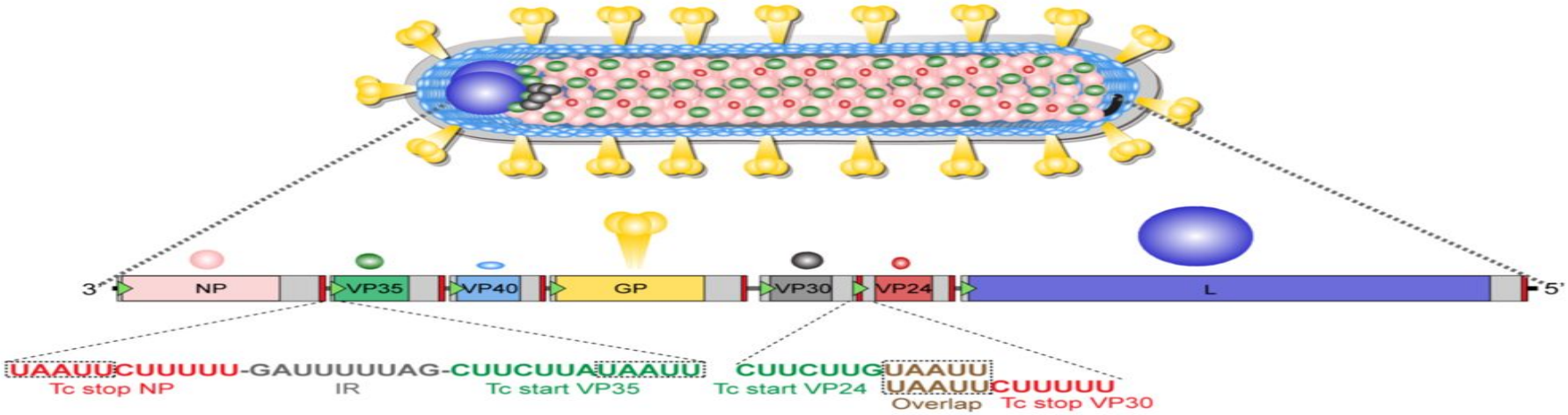


(*Рисунок из статьи Ndayimirije N, Kindhauser M., 2005).*

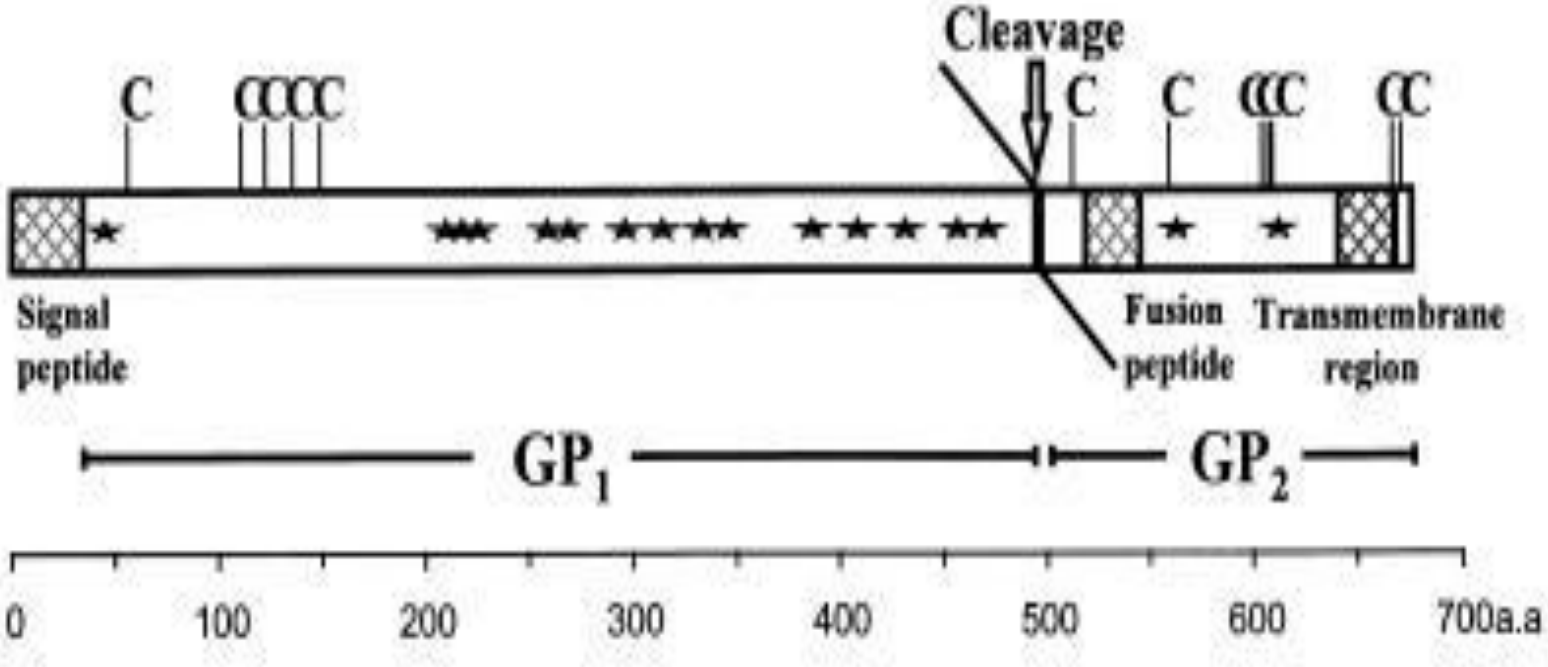
Процентное содержание белков в вирионе:

GP - 4, 7%;
VP40 – 37,7 %;
VP35 – 24,5 %;
NP – 17 %
VP24 – 7,5 %;
VP30 – 6,6 %;
L – 2 %;

(Elliot L.H. et al., 1985).

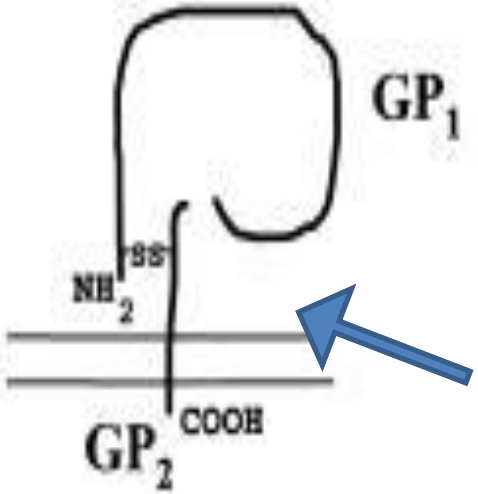


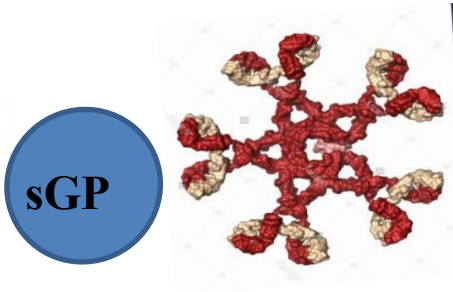
Филоментозные частицы длиной 790 нм вирус Марбург, 970 нм вирус Эбола, диаметр частиц 80 нм. Геном – несегментированная одноцепочечная негативная РНК (1,1 % от массы вириона)



Subtypes of Ebola virus

EBOV-Zaire	.- R - T/A - R - R -.
EBOV-Sudan	.- R - S - R - R -.
EBOV-Ivory Coast	.- R - K - R - R -.
EBOV-Reston	.- K - Q - K - R -.
	.- R - X - K/R - R -.





Сливающий и иммуносупрес-сивный домены

Volchkov V. et al., 1998)

При филовирусных инфекциях развивается виремия - в это время количество вирусных частиц в крови 10^6 -10^9 в мл.
Летальный исход может наступить на 5-8 сутки от обезвоживания, кровопотери и шока.
Защитные антитела появляются через 7 дней от начала болезни.

<u>Процентное содержание белков в вирионе:</u>

GP - 4, 7%;
VP40 – 37,7 %;
VP35 – 24,5 %;
NP – 17 %
VP24 – 7,5 %;
VP30 – 6,6 %;
L – 2 %;

(Elliot L.H. et al., 1985).

Название: Эпидемия
Оригинальное название: Outbreak
Страна: США
Год выпуска: 1995
Жанр: триллер, боевик
Режиссер: Вольфганг Петерсен
В ролях: Дастин Хоффман, Рене Руссо, Морган Фриман, Кевин Спейси, Кьюба Гудинг мл., Дональд Сазерленд

Описание: Из Африки в Америку с зараженной обезьянкой попадает смертельный вирус. Специалисты-эпидемиологи из НИИ инфекционных заболеваний армии США, в числе которых полковник Сэм Дэниелс, срочно вылетают в эпицентр заражения. Двое из высших военных руководителей — начальники Сэма — скрывают от него, что им известен этот вирус, который они выводили несколько лет. И, более того, даже разработали сыворотку, способную обезвредить вирус. Для предотвращения страшной эпидемии нужна сыворотка, которую можно получить лишь из крови первоначального носителя — той самой обезьянки. Дело осложняется тем, что место ее нахождения неизвестно, а счет идет на часы……..

Научные центры изучения филовирусов в России.

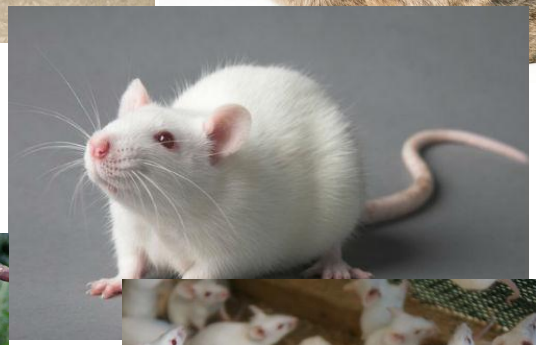
Пущинский научный центр РАН. Серпуховской район Московской области

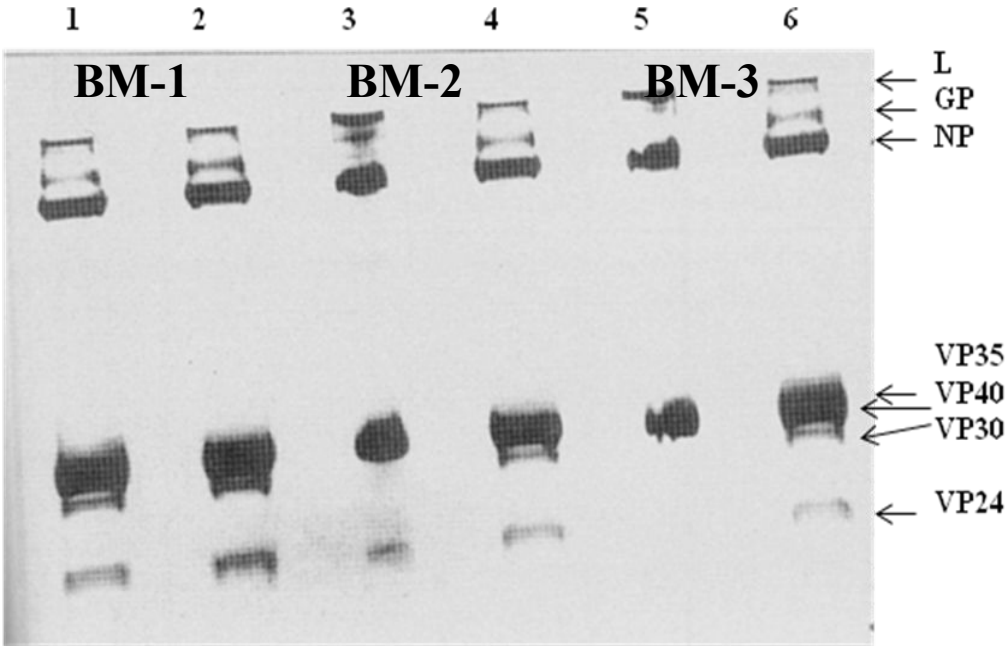
Получение IgG лошадей для профилактики и лечения.

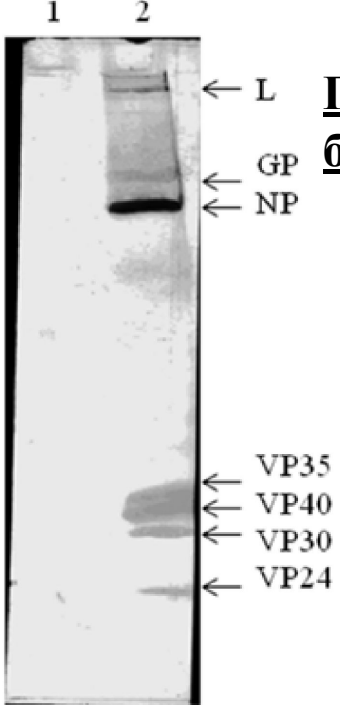
ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор”

Наукоград Кольцово, Новосибирская область

Разработка инактивированных вакцин.

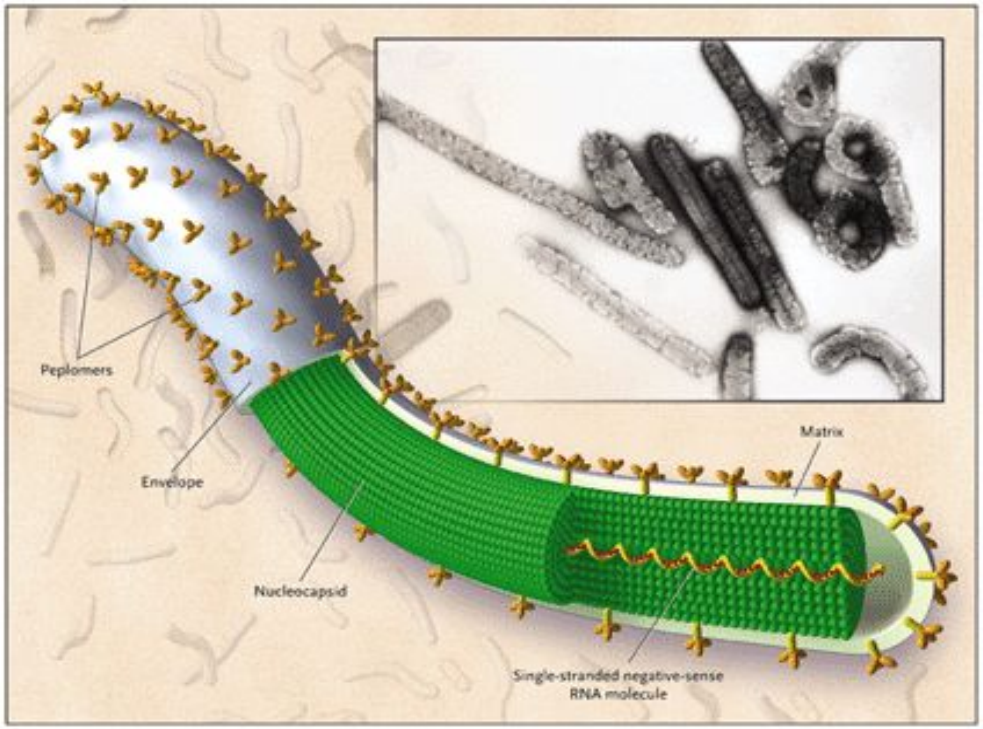






<u>Процентное содержание белков в вирионе:</u>

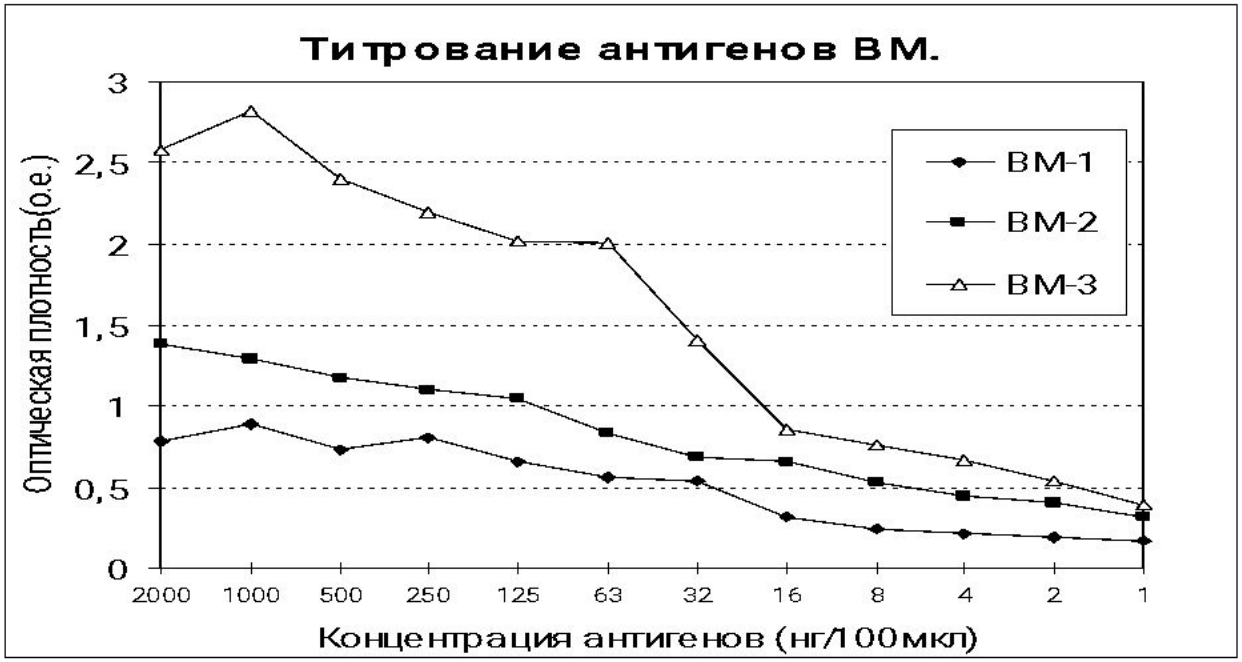
GP - 4, 7%;
VP40 – 37,7 %;
VP35 – 24,5 %;
NP – 17 %
VP24 – 7,5 %;
VP30 – 6,6 %;
L – 2 %;
(Elliot L.H. et al., 1985).



Иммуноблоттинг. Выявление белков вируса Марбург (ВМ-3) антителами сыворотки крови реконвалесцента (1990 г.).
1 – нормальная сыворотка крови человека в разведении 1/1000;
2 – сыворотка крови человека, переболевшего геморрагической лихорадкой Марбург (*Никифоров В.В. и др., 1994*), в разведении 1/1000;
Стрелками обозначено местоположение белков вируса Марбург на нитроцеллюлозной мембране.

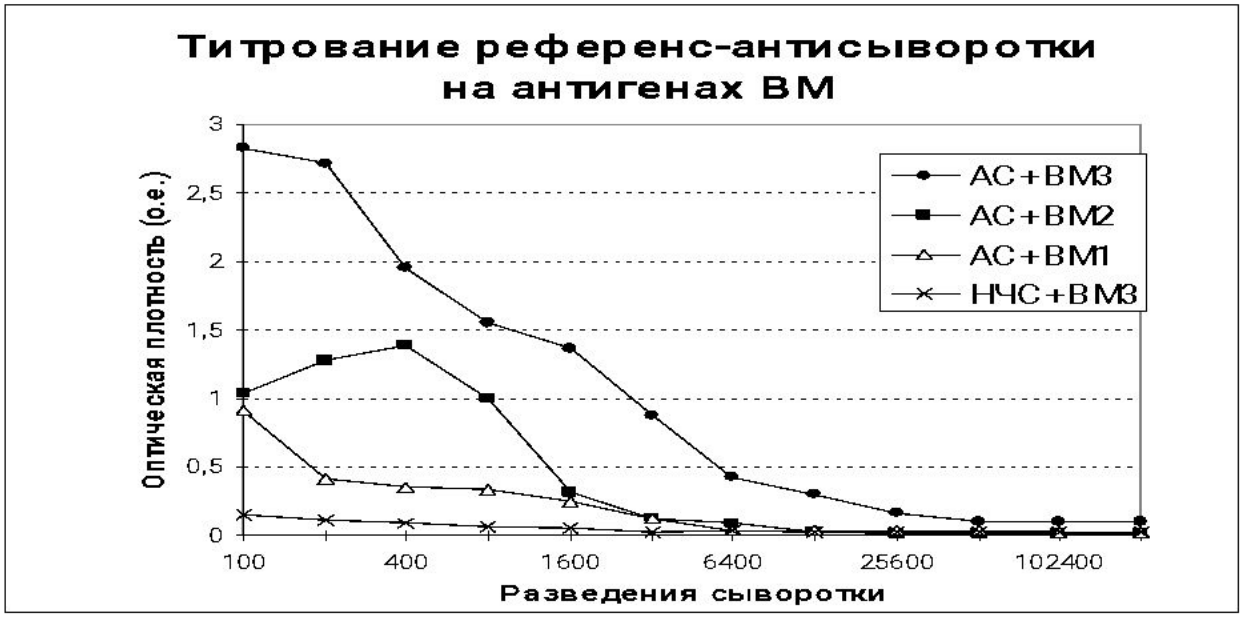
Определение специфичности взаимодействия инактивированных антигенов вируса Марбург с сывороткой крови реконвалесцента

А.

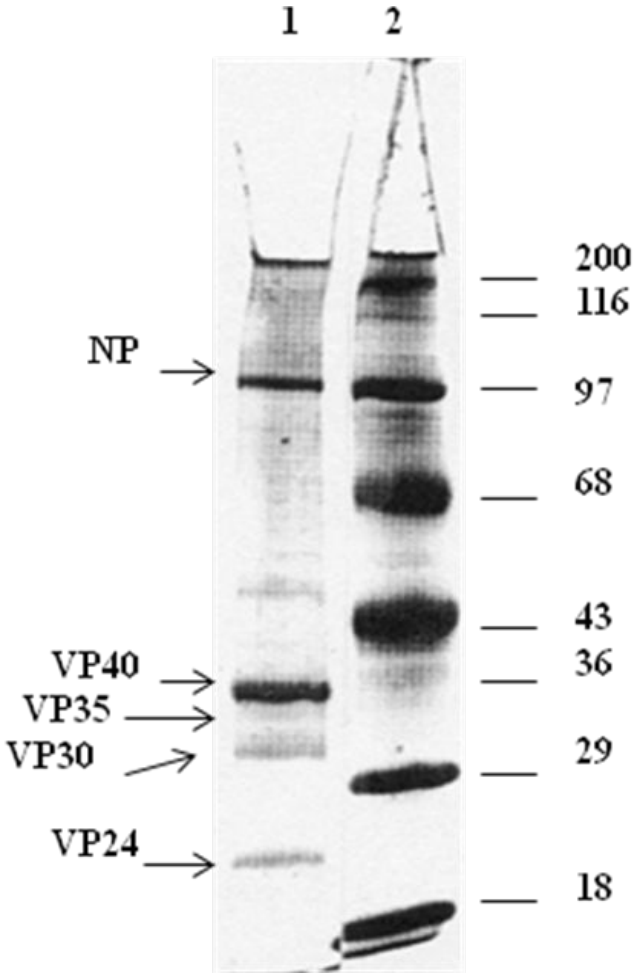


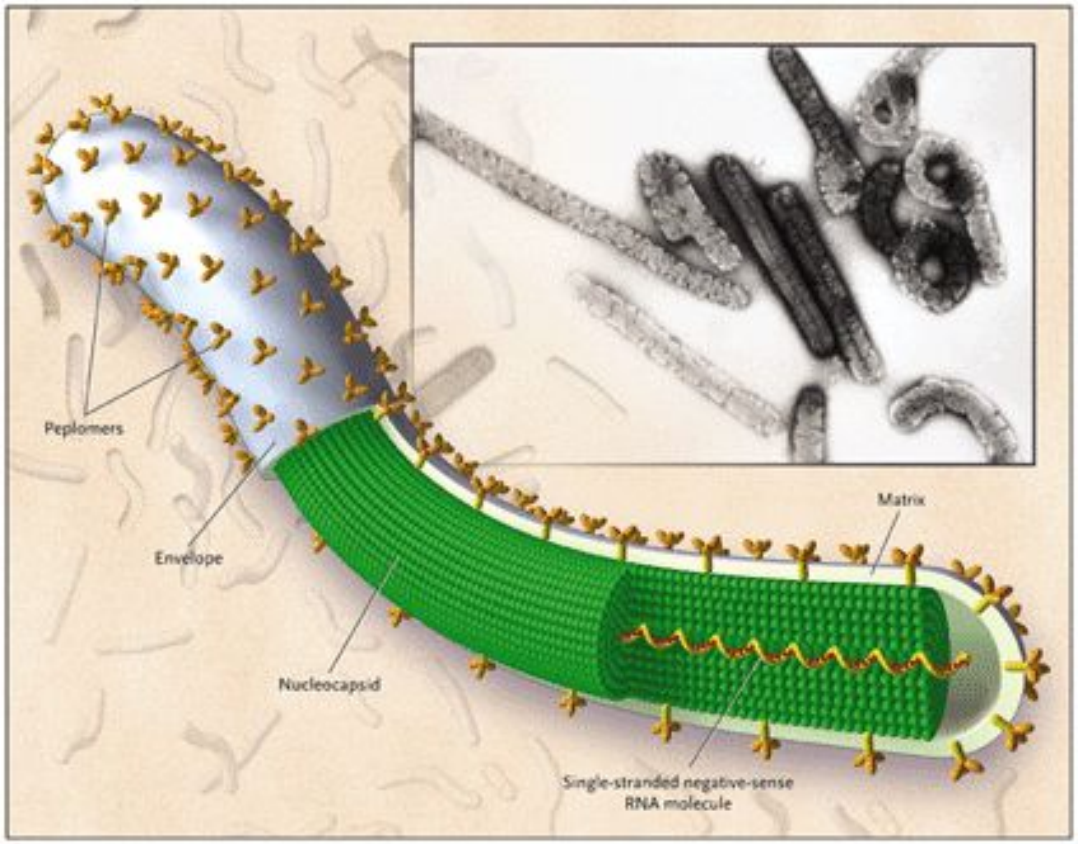
Сыворотку крови использовали в разведении 1/500.

В.



Концентрация антигенов 200 нг/лунка.
Инактивация ВМ-3:
- 0,17% димера этиленимина 24 ч при комнатной температуре и прогреванием при 60 ^{0} С в течение часа.



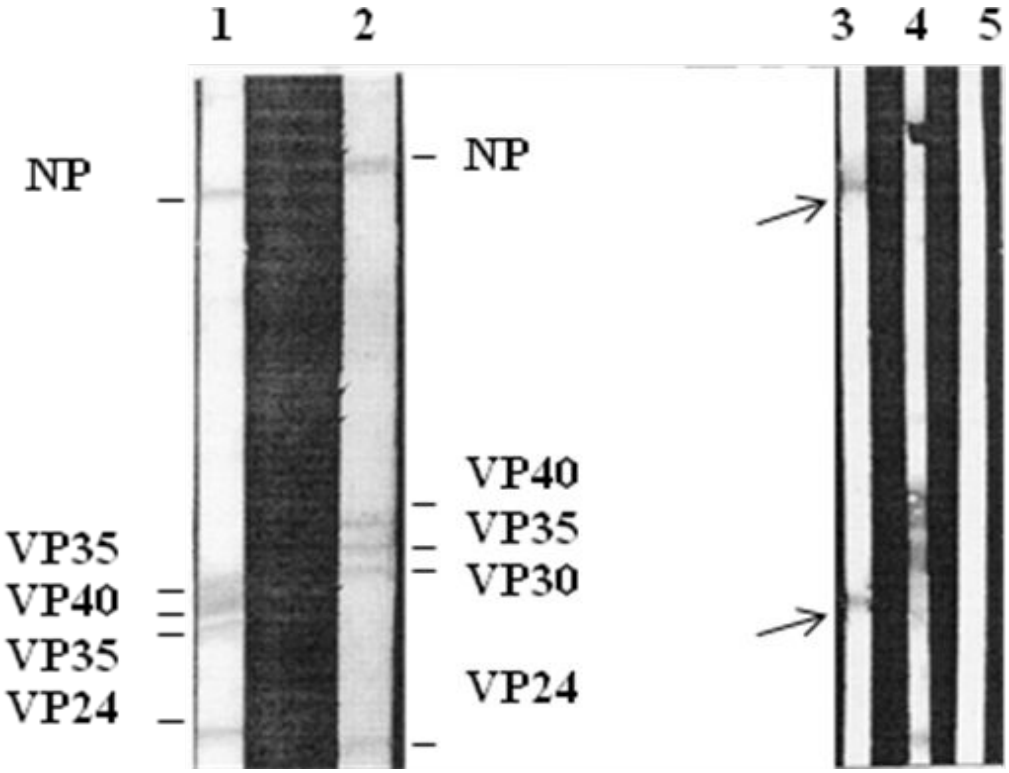


Инактивация вируса Эбола:
кипячение 2 мин в растворе,
Содержащем 5 % меркаптоэтанола и 1% SDS,
с дальнейшим прогревание при 60^0 С в течение часа.

<u>Процентное содержание белков в вирионе:</u>

GP - 4, 7%;
VP40 – 37,7 %;
VP35 – 24,5 %;
NP – 17 %
VP24 – 7,5 %;
VP30 – 6,6 %;
L – 2 %;
(Elliot L.H. et al., 1985).

Иммуноблоттинг. Выявление белков вируса Марбург для перекрестного взаимодействия антител, специфичных к вирусу Эбола.



1, 2 – белки очищенных концентрированных препаратов вирусов Марбург и Эбола, перенесенные после электрофореза на нитроцеллюлозную мембрану, окрашены амидочерным; обозначено местоположение белков NP, VP40, VP35, VP30 и VP24 филовирусов.
3 - иммуноблоттинг белков вируса Марбург с АС мыши (№ 1), иммунизированной вирусом Эбола;
4 – иммуноблоттинг белков вируса Эбола с АС мыши (№ 1), иммунизированной вирусом Эбола;
5 – иммуноблоттинг белков вируса Марбург с нормальной сывороткой крови мыши;
все антитела использовали в разведении (1/300);
Стрелками показаны белки для перекрестной активности антител, специфичных к инактивированному вирусу Эбола, с белками NP и VP35 инактивированного вируса Марбург.

Таблица 1. Исследование спектра белков-иммуногенов вируса Марбург

Источник антител	Сутки взятия крови от начала иммунизации	Иммуноген	Титры антител в Твердофазном ИФА (обратные величины)		Белки-иммуногены, выявляемые в иммуноблоттинге на гомологичном инактивированном антигене
			Антигены		
			инакт. ВМ	инакт. ВЭ	
мышь № 1	14	инакт. ВМ	8100	<100	NP, VP35, VP40
мышь № 2	21	инакт. ВМ	24300	300	GP, NP, VP35, VP40,VP30,VP24
кролик	нет данных	инакт. ВМ	24300	<100	NP, VP40, VP35, VP30,VP24
IgG лошади	нет данных	инф. ВМ	218700	<100	GP, NP, VP35, VP40,VP30
человек	нет данных	инф. ВМ	24300	900	GP, NP, VP35, VP40,VP30,VP24
морская свинка	нет данных	инакт. ВМ	900	<100	NP, VP40, VP35
морская свинка* (6.4; 7.2)	14	инф. ВМ	200; 200	<100	NP
морская свинка* (2.2; 4.2;6,3)	14	инф. ВМ	6400; 6400; 12800	<100	GP, NP, VP40, VP35
морская свинка* (1.1; 2.1;4.1;5.1; 6.1; 6.2; 6.5; 7.1)	14	инф. ВМ	1600; 1600;800; 800; 400; 6400; 6400;800	<100	NP, VP40, VP35
морская свинка* (1.2;5.2)	14	инф. ВМ	400; 400	<100	NP, VP35
морская свинка* (1.3; 1.4)	14	инф. ВМ	400; 400	<100	NP, VP40
морская свинка* (3.1)	14	инф. ВМ	200	<100	VP40

Примечание: инакт. – инактивированный вирусный препарат; инф. – инфекционный вирус;
*- сыворотки от выживших морских свинок, инфицированных вирусом Марбург (условное обозначение каждого животного);
человек переболел лихорадкой Марбург при заражении во время лабораторной аварии (Никифоров В.В. и др., 1994); нормальные сыворотки - мыши, кролика, лошади, морской свинки и человека использовались в качестве отрицательного контроля.
Выделены мажорные полосы, соответствуюшие данным вирусным белкам. Перекрестное взаимодействие антител с вирусом Эбола.

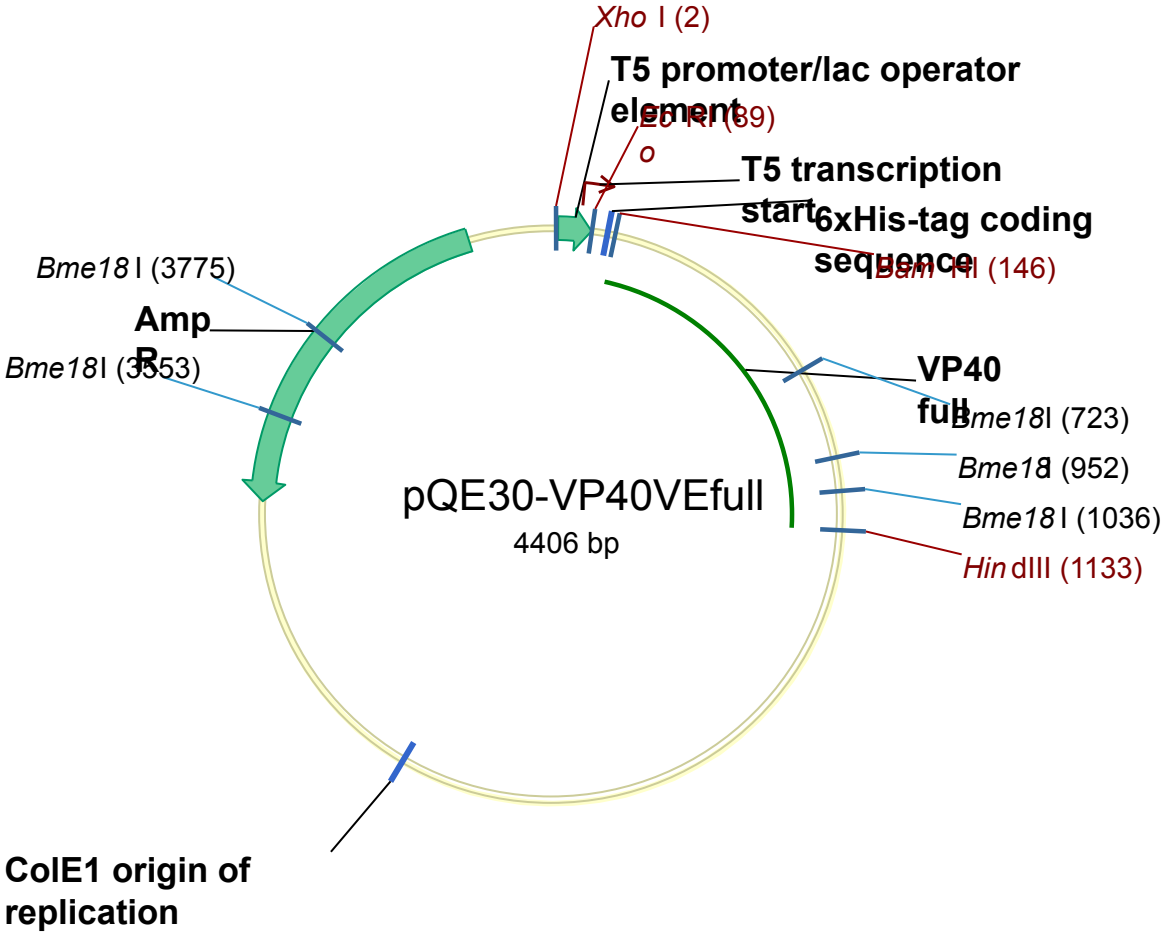
Таблица 2. Исследование спектра белков-иммуногенов вируса Эбола

Источник антител	Сутки взятия крови от начала иммунизации	Иммуноген	Титры антител в твердофазном ИФА (обратные величины)		Белки-иммуногены, выявляемые в иммуноблоттинге на гомологичном инактивированном антигене
			Антигены		
			инакт. ВМ	инакт. ВЭ	
мышь № 1	14	инакт. ВЭ-IS	2700	72900	NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 2	14	инакт. ВЭ-IS	900	72900	NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 3	14	инакт. ВЭ-IS	300	81000	L, GP, NP, P40, VP35,VP30, VP24
мышь № 4	21	инакт. ВЭ-IS	300	729000	L, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 5	14	инакт. ВЭ-IS	300	2187000	L, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 6	14	инакт. ВЭ-8МС	<100	9000	L, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 7	14	инакт. ВЭ-8МС	300	243000	L, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 8	14	инакт. ВЭ-8МС	300	72900	L, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24
мышь № 9	14	инакт. ВЭ-8МС	300	72900	L, GP, NP, VP40, VP35, VP30, VP24
кролик	нет данных	инакт. ВЭ-IS	2700	72900	NP, VP40, VP35, VP30, VP24
крыса	14	инакт. ВЭ-IS	8100	72900	NP
IgG лошади	26-42	инф.ВЭ	24300	218700	NP, VP40, VP35
морская свинка	нет данных	инакт. ВЭ-IS	<100	900	NP
морская свинка	нет данных	инф.ВЭ	<100	900	GP, NP
нормальные сыворотки	без антигена		<100	<100	-

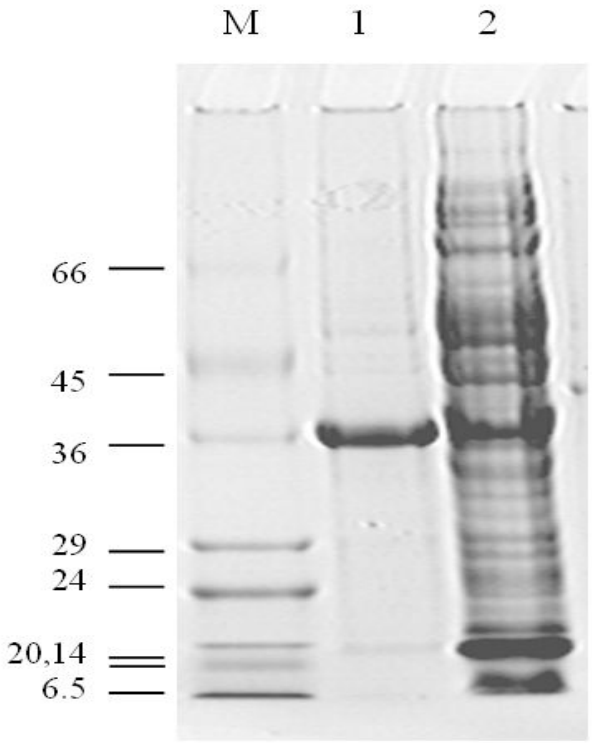
Примечание: инакт. – инактивированный вирусный препарат; инф. – инфекционный вирус;
нормальные сыворотки - мыши, кролика, крысы, лошади, морской свинки использовались в качестве отриц. контроля.
Выделены мажорные полосы соответствуюшие данным вирусным белкам.
Перекрестное взаимодействие антител с вирусом Марбург

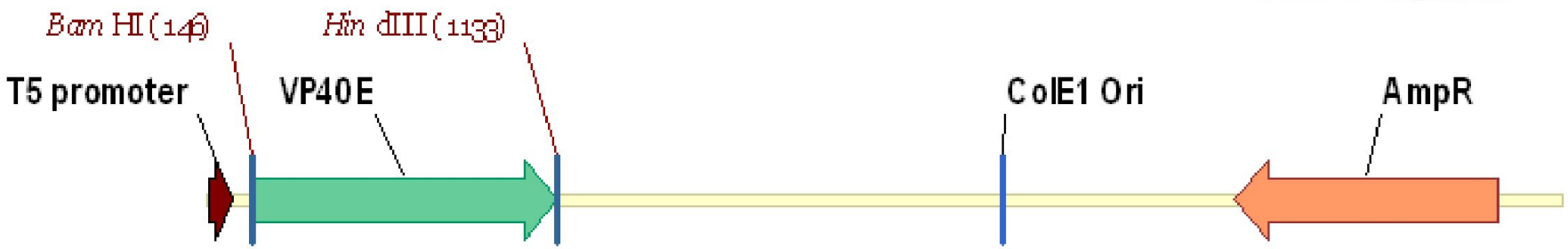
Для наработки филовирусных антигенов необходим 4 уровень биозащиты,
так как они относятся к I группе патогенности.
Альтернативой использованию вирусных препаратов может быть применение
препаратов рекомбинантных белков,
имеющих антигенные эпитопы, соответствующие антигенным эпитопам вирусных белков.

Схематическое изображение рекомбинантной плазмиды pQE30-VP40ВЭ



Электрофореграмма: экспрессия гена VP40 вируса Эбола в клетках E.coli





Характеристики рекомбинантных белков вируса Марбург.

Рек. белки	Молекулярный вес (kДа)		*Вектора* (QIAGEN)	Синтез рек. белков (мг/л)	Концентрация очищенных белков (мг/мл)
	ПААГ-ЭФ[a]	Теоретический[b]			
rGP	74	≈74	PQE31	1-2	0,1
rNP	98	≈82	PQE-32	5-9	0,5
rVP35	40	≈41	PQE-31	50-70	2-5
rVP40	37-38	≈37	PQE-31	90-100	5-7

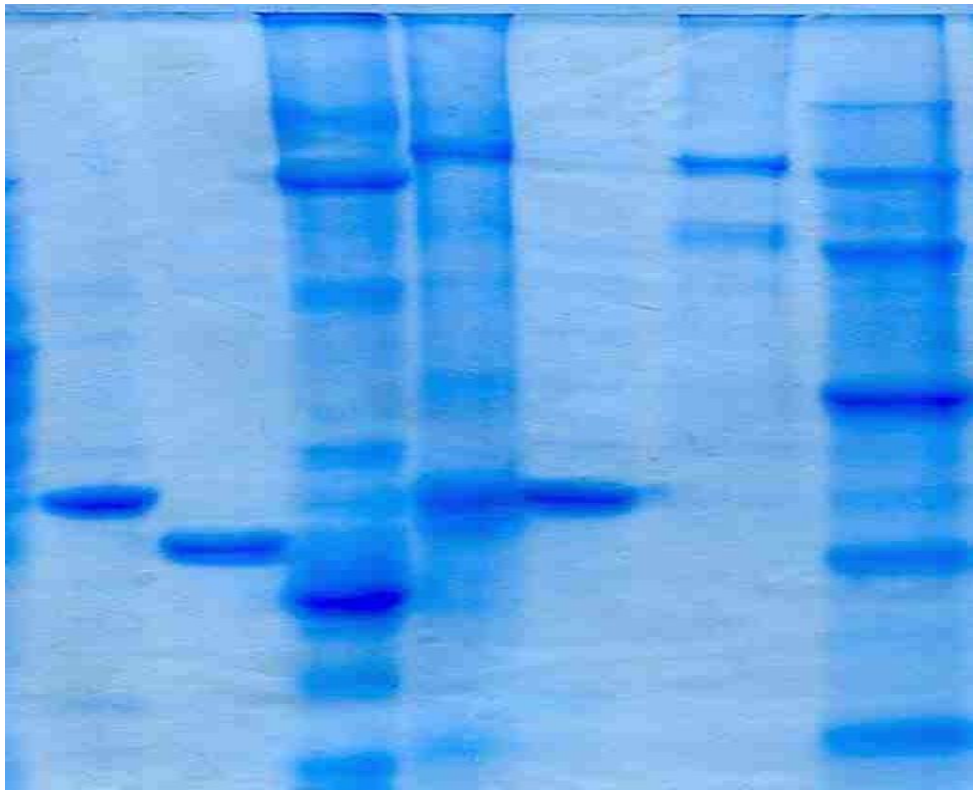
Примечание: [a] рекомбинантные белки были очищены, используя Ni-NTA хроматографию (QIAGEN), разделены в 12% ПААГ-ЭФ и визуализированы окрашиванием с Кумасси синим; [b] определяли путем компьютерного анализа аминокислотной последовательности рекомбинантных белков.

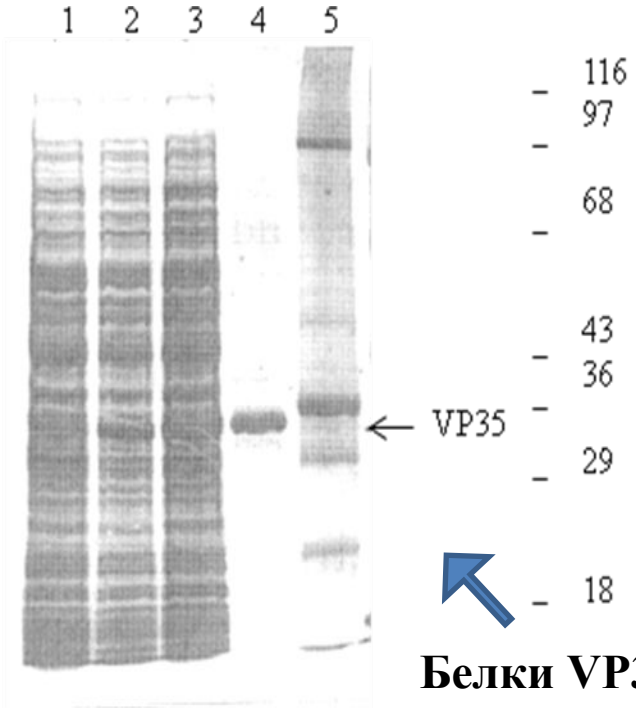
Таблица 3. Использование рекомбинантных белков в качестве антигена в ТИФА для выявления IgG, специфичных к вирусу Марбург

Источник антител	Титры специфических IgG (обратные величины)						
	Антигены (концентрация нг/лунку)						
	вирус Марбург (200 нг/лунка)	рек. GP (200 нг/лунка)	рек. NP (200 нг/лунка)	рек. VP40 (200 нг/лунка)	рек. VP35 (200 нг/лунка)	рек. белки (400 нг/лунка) ***	pQE (400 нг/лунка)
ЧС (1990 г.)	24300	900	24300	8100	2700	24300	<100
ЧС (1996 г.)	200	<100	400	400	<100	800	<100
IgG - лошадь	218700	13500	121500	40500	13500	364500	<100
МАС–ВМ №1	8100	<100	2700	2700	<100	8100	<100
МАС-ВМ №2	24300	900	24300	24300	8100	72900	<100
МАС–рек.GP*	8100	656100	<100	<100	<100	72900	<100
МАС–рек.NP*	72900	<100	72900	<100	<100	24300	<100
МАС–рек.VP35*	24300	<100	<100	<100	656100	218700	<100
МАС–рек.VP40*	72900	<100	<100	1968300	<100	218700	<100
отрицательные контроли**	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Примечание: ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ;
ЧС – сыворотка человека, переболевшего геморрагической лихорадкой Марбург (в скобках указана дата забора крови);
IgG – очищенные IgG лошадей, иммунизированных инфекционным вирусом Марбург (ВЦ НИИМ МО РФ, г. С. Посад);
МАС – мышиные антисыворотки;
PQE – лизат *E.coli* (отрицательный контроль для рекомбинантных белков); проводили обработку (истощение) исследуемых моноспецифических сывороток в присутствии 1 % -го раствора лизата *E.coli* клеток 20 мин при 37 ^{0} С;
**** – в качестве отрицательного контроля использовали нормальные сыворотки человека (5 сывороток), лошади (1 сыворотка), мыши (5 сывороток);**
***** – смесь рекомбинантных белков GP, NP, VP35, VP40 по 100 нг/лунку каждого.**

Электрофореграмма очищенных вирусов Марбург, Эбола и рекомбинантных филовирусных белков





Белки VP35 вируса Эбола

1. **рекомбинантный белок VP35 вируса Марбург (5 мкл);**
2. **рекомбинантный белок VP40 вируса Марбург (5 мкл);**
3. **препарат инактивированного вируса Марбург (10 мкл);**
4. **препарат инактивированного вируса Эбола (10 мкл);**
5. **рекомбинантный белок VP40 вируса Эбола (5 мкл);**
6. **рекомбинантный нуклеопротеин вируса Эбола(5 мкл);**
7. **белковые маркеры молекулярного веса (10 мкл), (Bio-Rad).**

Рекомбинантные белки получены в экспрессионной системе *E.coli.* Качко А.В., Ивановой А.В., Сорокиным А.В.
Инактивированый вирус Марбург любезно предоставлен доктором Белановым Е.Ф.
Инактивированый вирус Эбола любезно предоставлен доктором Чепурновым А.А.

Таблица 5. Исследование иммунохимических свойств и перекрестной активности МКА с гетерологичными вирусными и рекомбинантными белками

№ п/п	Названи-ие МКА	Специ-фичность (вирус)	Белок-мишень	Класс IgG	Концент-рация очищен-ных МКА/мл	Титры очищенных МКА в ТИФА с вирусными антигенами и рекомбинантными аналогами					
						вирус Марбург	рек.VP40 Марбург	рек.VP35 Марбург	вирус Эбола	рек.VP40 Эбола	рек.NP Эбола
1	3F9	Марбург	VP35	IgG1	11,8	656100	-	729000	-	-	-
2	9D8	Марбург	VP35	IgG1	5,7	729000	-	656100	-	-	-
3	8G3	Марбург	VP35	IgG2a	6,0	218700	-	72900	-	-	-
4	5G9	Марбург	VP40	IgG2b	7,2	729000	72900	-	-	-	-
5	7H10	Марбург	VP40	IgG1	8,0	729000	729000	-	-	-	-
6	9G6	Марбург	VP40	IgG1	6,8	218700	218700	-	-	-	-
7	6B7	Марбург	VP40	IgG1	6,8	656100	656100	-	-	-	-
8	1C12	Марбург	VP40	IgG1	3,6	24300	24300	-	-	-	-
9	10E11	Марбург	VP40	IgG1	5,3	24300	24300	-	-	-	-
10	7D8	Марбург	VP40	IgG1	5,9	2187000	243000	-	-	-	-
11	5G8	Марбург	VP40	IgM	1,4	656100	656100	-	-	-	-
12	7C4	Марбург	VP40	IgG1	6,7	2187000	729000	-	-	-	-
13	5F11	Марбург	NP	IgG1	3,6	2187000	-	-	-	-	-
14	9C7	Марбург	NP	IgG1	8,7	6561000	-	-	-	-	-
15	5H7	Марбург	NP	IgG1	7,7	2187000	-	-	-	-	-
16	3A5	Марбург	NP (?)	IgG1	4,3	218700	-	-	-	-	-

Примечания: NP (?) – белок –мишень не определяется в иммуноблоттинге;
- нет реакции в данном методе;
концентрация антигенов - 100 нг/лунка ;
Вирус Эбола и его рек.белки - гетерологичные антигены для исследования перекрестной активности МКА.

Таблица 5 (продолжение). Исследование иммунохимических свойств и перекрестной активности МКА с гетерологичными вирусными и рекомбинантными белками

№ п/п	Название МКА	Специфич-ность (вирус)	Белок-мишень	Класс IgG	Концент-рация очищен-ных МКА/мл	Титры очищенных МКА в ТИФА с вирусными антигенами и рекомбинантными аналогами					
						вирус Марбург	рек.VP40 Марбург	рек.VP35 Марбург	вирус Эбола-IS	рек.VP40 Эбола	рек.NP Эбола
17	1C7	ВЭ-IS	VP35	IgG1	7,8	-	-	-	2187000	-	-
18	6F7	ВЭ -IS	VP35	IgG1	8,3	-	-	-	729000	-	-
19	1C1	ВЭ-8МС	VP40	IgG1	14,5	-	-	-	6561000	6561000	-
20	4A2	ВЭ-IS	VP40	IgG1	7,7	-	-	-	6561000	6561000	-
21	1E6	ВЭ-8МС	VP40	IgG1	1,5	-	-	-	72900	656100	-
22	3D9	ВЭ-8МС	VP40	IgM	7,0	-	-	-	729000	218700	-
23	1B5	ВЭ-8МС	VP40	IgG2a	5,7	-	-	-	72900	656100	-
24	5C10	ВЭ-IS	VP40	IgG1	6,3	-	-	-	24300	13500	-
25	2E12	ВЭ-IS	VP40	IgG2a	3,6	-	-	-	24300	13500	
26	1B2	ВЭ-IS	NP	IgG1	8,9	-	-	-	2187000	-	2187000
27	7B11*	ВЭ-IS	NP	н.о.	7,2	-	-	-	512000	-	656100
28	1E5	ВЭ-IS	NP	IgG1	6,3	-	-	-	218700	-	243000
29	4B9	ВЭ-IS	NP	IgG1	7,4	-	-	-	656100	-	2187000
30	9A7	ВЭ-IS	NP	IgG2b	4,3	-	-	-	24300	-	72900
31	4A8	ВЭ-IS	NP	IgG1	7,2	-	-	-	2187000	-	121500
32	10B4	ВЭ-IS	NP	IgG1	9,0	-	-	-	2187000	-	729000
33	6G8	ВЭ-IS	NP	IgG1	6,8	2700	-	-	24300	-	243000
34	6A8	ВЭ-IS	NP	IgG1	4,3	-	-	-	72900	-	40500
35	10A8	ВЭ-IS	NP	IgG1	7,2	-	-	-	218700	-	218700

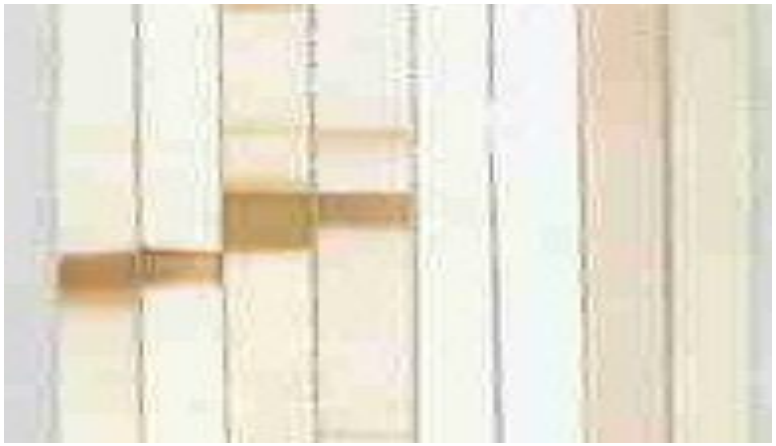
Примечания: ВЭ-IS – исходный штамм ВЭ-Заир;
8МС – штамм ВЭ-Заир, адаптированный к морским свинкам, на 8 пассаже вызвал гибель животных (Volchkov V.E. et al., 2000) ;
МКА 7B11* - продукт секреции гибридомы крысиного происхождения (автор гибридомы доктор Перебоев А.В.);
-нет реакции в данном методе; концентрация антигенов 100 нг/лунка .
Вирус Марбург и его рек. белки – гетерологичные антигены для исследования перекрестной активности МКА.

Иммуноблоттинг нативных и рекомбинантных белков вирусов Марбург и Эбола с моноклональными антителами

a. **1** **2** **3** **4**

a.
все полоски мебраны обработаны препаратом очищенных МКА 3F9 в разведении 1/500;
1 – препарат вируса Марбург;
2 - препарат вируса Эбола (отриц. контроль на антиген);
3 – лизат *E.coli* (отриц. котроль для рекомбинантного белка);
4 – очищенный рекомбинантный белок VP35.

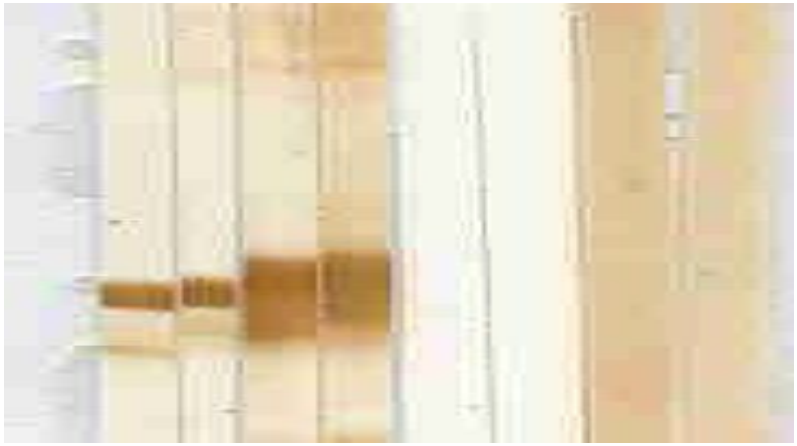
b. **1** **2** **3** **4** **5** **6** **7** **8**



b.
1 - препарат вируса Марбург обработан МКА 7H10 в разведении 1/500;
2 - препарат вируса Марбург обработан МКА 7D8 в разведении 1/500;
3 - рекомбинантный белок VP40 обработан МКА 7H10 в разведении 1/500;
4 - рекомбинантный белок VP40 обработан МКА 7D8 в разведении 1/500;
5 - препарат вируса Эбола обработан МКА 7H10 в разведении 1/500 (отриц. контроль);
6 - препарат вируса Эбола обработан МКА 7D8 в разведении 1/500 (отриц. контроль);
7 - лизат *E.coli* обработан МКА 7H10 в разведении 1/500 (отриц. контроль);
8 - лизат E.coli обработан МКА 7D8 в разведении 1/500 (отриц. контроль).

Иммуноблоттинг нативных и рекомбинантных белков вирусов Марбург и Эбола с моноклональными антителами

c. 1 2 3 4 5 6 7 8

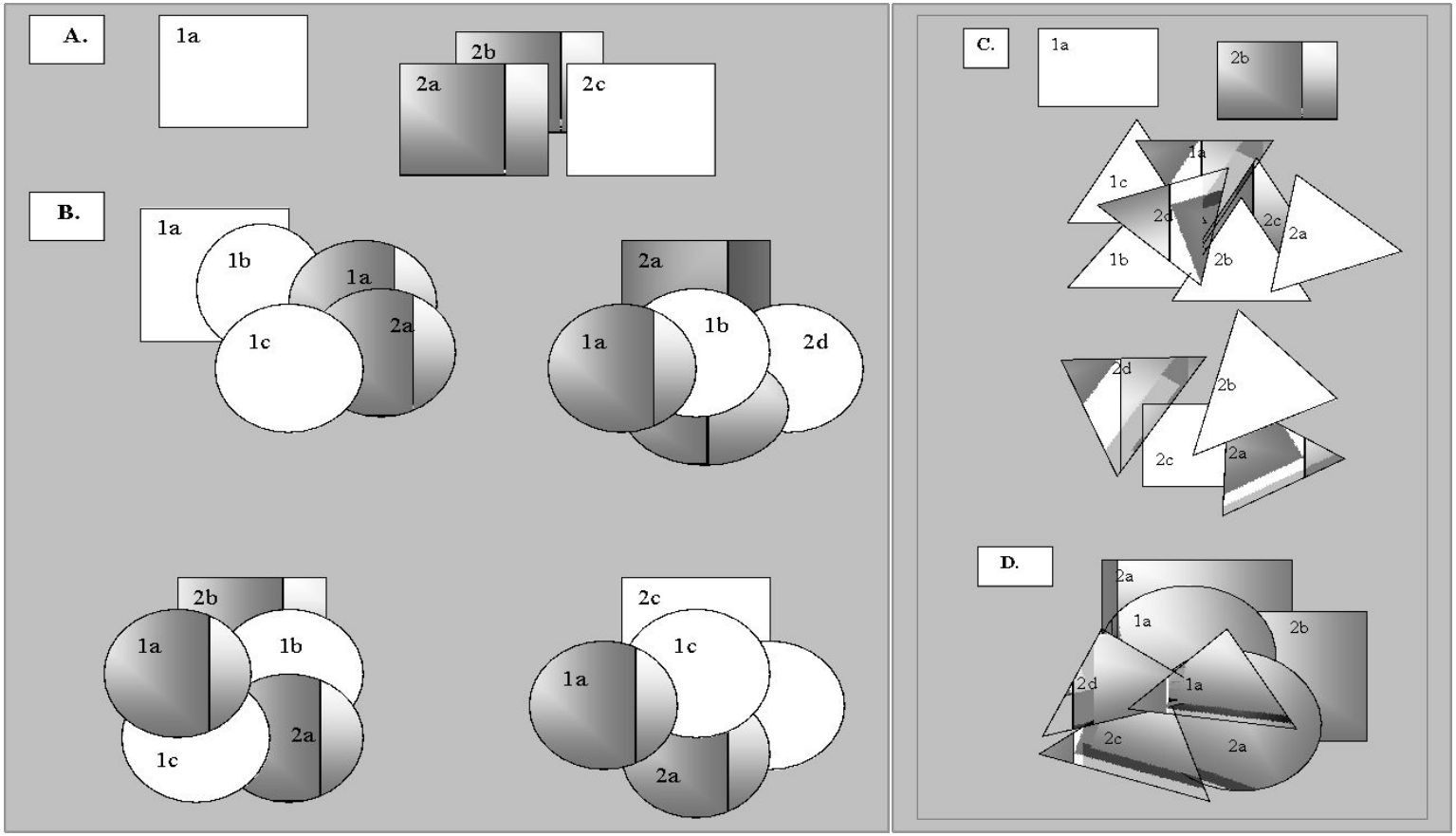


c.
1 - препарат вируса Эбола обработан МКА 4А2 в разведении 1/10000;
2 - препарат вируса Эбола обработан МКА 1С1 в разведении 1/10000;
3 - рекомбинантный белок VP40 обработан МКА 4А2 в разведении 1/10000;
4 - рекомбинантный белок VP40 обработан МКА 1С1 в разведении 1/10000;
5 - препарат вируса Марбург обработан МКА 4А2 в разведении 1/10000 (отриц. контроль);
6 - препарат вируса Марбург обработан МКА 1С1 в разведении 1/10000 (отриц. контроль);
7 - лизат *E.coli* обработан МКА 4А2 в разведении 1/10000 (отриц. контроль);
8 - лизат *E.coli* обработан МКА 1С1 в разведении 1/10000 (отриц. контроль).

d. 1 2 3 4 5 6 7 8

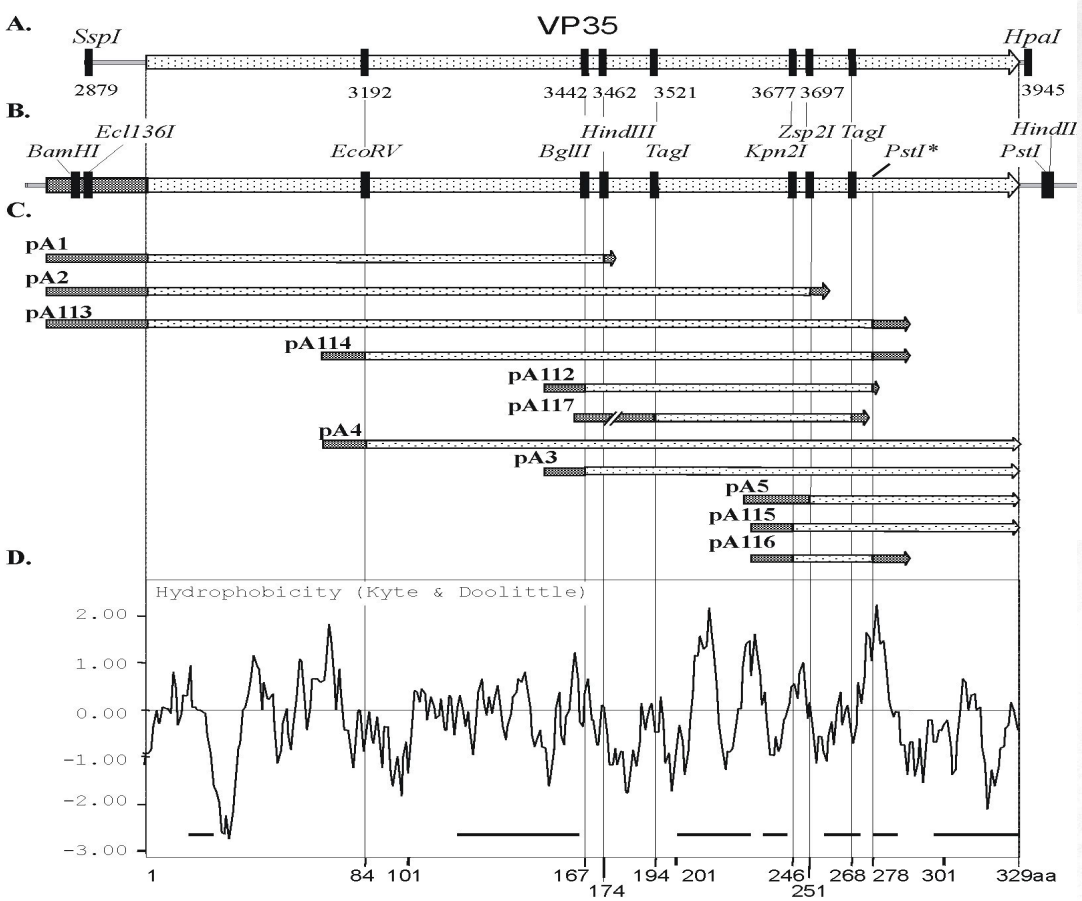
d.
1 - препарат вируса Эбола обработан МКА 1В2 в разведении 1/500;
2 - препарат вируса Эбола обработан МКА 7В11 в разведении 1/500;
3 - рекомбинантный NP обработан МКА 1В2 в разведении 1/500;
4 - рекомбинантный NP обработан МКА 7В11 в разведении 1/500;
5 - препарат вируса Марбург обработан МКА 1В2 в разведении 1/500 (отриц. контроль);
6 - препарат вируса Марбург обработан МКА 7В11 в разведении 1/500 (отриц. контроль);
7 - лизат *E.coli* обработан МКА 1В2 в разведении 1/500 (отриц. контроль);
8 - лизат *E.coli* обработан МКА7В11 в разведении 1/500 (отриц. контроль).

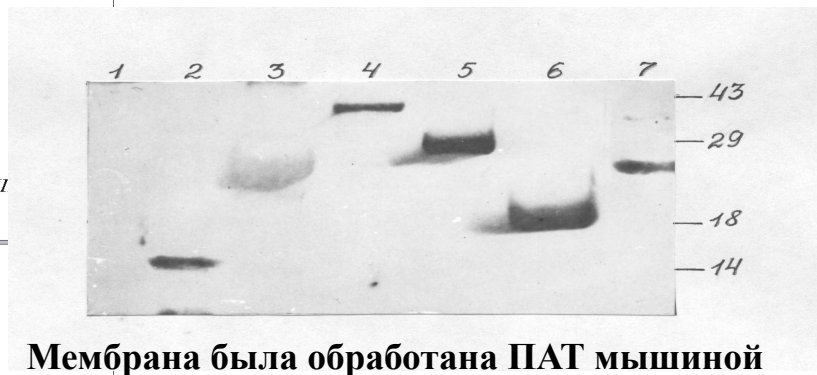
Эпитопное картирование белков на основе результатов конкурентного ИФА и биологических свойств МКА с инфекционным вирусом Марбург



А – эпитопы нуклепротеина обозначены квадратами;
В – эпитопы белка VP35 обозначены кругами;
С – эпитопы белка VP40 обозначены треугольниками;
Эпитопы для МКА, вызывающих лизис инфицированных вирусом Марбург клеток Vero, выделены темным цветом;
D – функциональный участок, состоящий из эпитопов трех белков, вызывающих индукцию МКА, участвующих в АЗКОЛК.

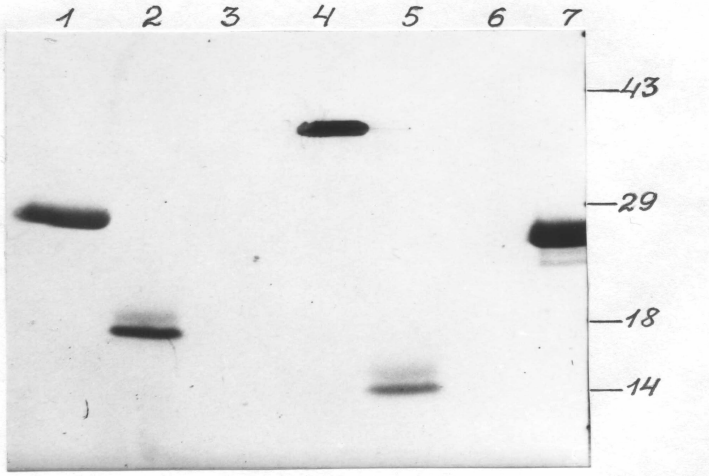
Схема получения фрагментов рекомбинантного белка VP35 вируса Марбург.





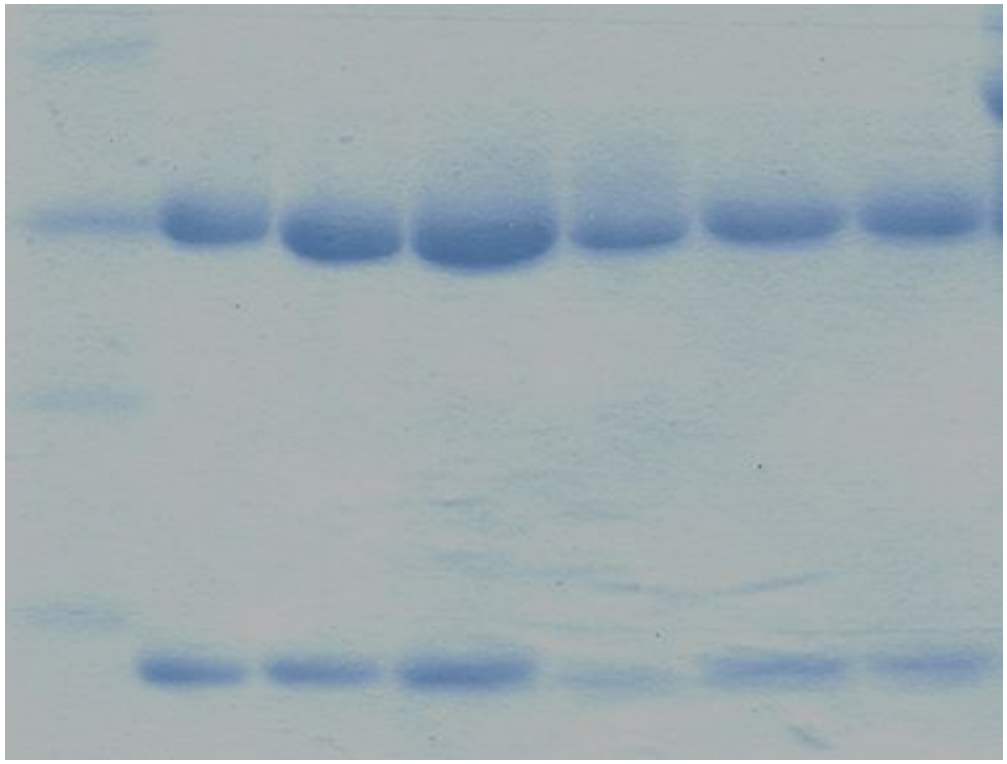
Мембрана была обработана ПАТ мышиной сыворотки в разведении 1:3000 и раствором коньюгата антивидовых АТ с пероксидазой. 1. *E. coli*–pQE31 клеточный лизат; 2. pA112 (167–278a.o.); 3. pA114 (84–278.a.o.); 4 pA113 (1–278a.o.); 5. pA4 (84 – 329a.o.); 6, pA3 (167–329 a.o.); 7. pA1 (1–174a.o.).

.



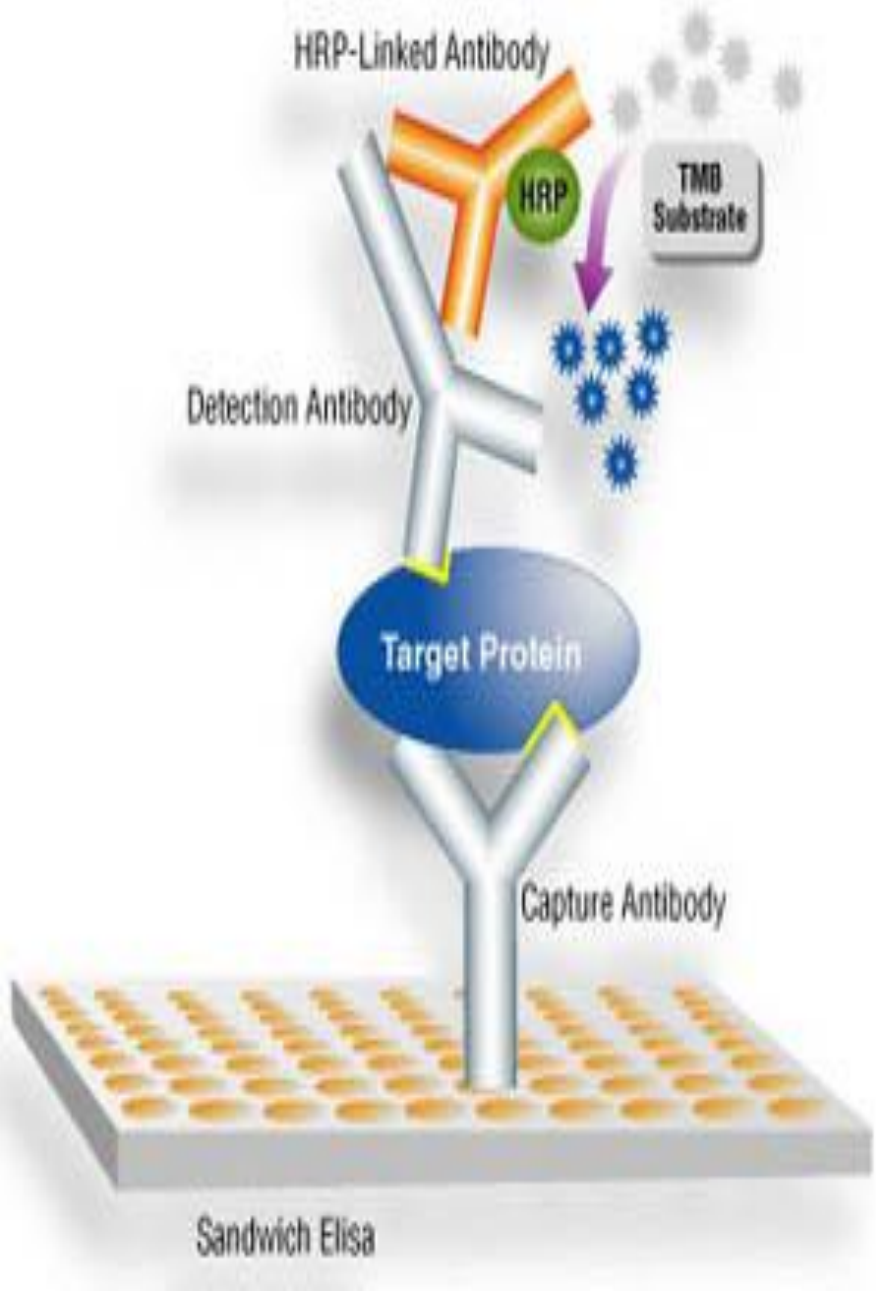
Взаимодействие МКА с фрагментами рек.VP35 ВМ в иммуноблоте. Мембрана с очищенные полипептидами была обработана раствором очищенных МКА 3F9 в концентрации 1 мкг/мл. 1. pA4 (84–329 a.o.); 2. pA3 (167–329 a.o); 3. pA1 (1–174a.o.); 4. pA113 (1–278 a.o.); 5, pA112 (167–278a.o.); 6. pA2 (1–251a.o.); 7. pA114 (84–278a.o.).

Электрофореграмма моноклональных антител, очищенных каприловой кислотой с последующим высаливанием сульфатом аммония по методу *(Bazin H. et al.,1990)*.



1 - белковые маркеры молекулярной массы (10 мкл), (Bio-Rad);
2,3,4 - препараты очищенных МКА 3F9, 7D8, 7H10, специфичные к вирусу Марбург (по 1 мкл);
5,6,7 – препараты очищенных МКА 1C1, 4A2, 1B2, специфичные к вирусу Эбола (по 1 мкл);
стрелками обозначены цепи иммуноглобулинов.

Метод ИФА “двойная антигенная ловушка” – “сэндвич”



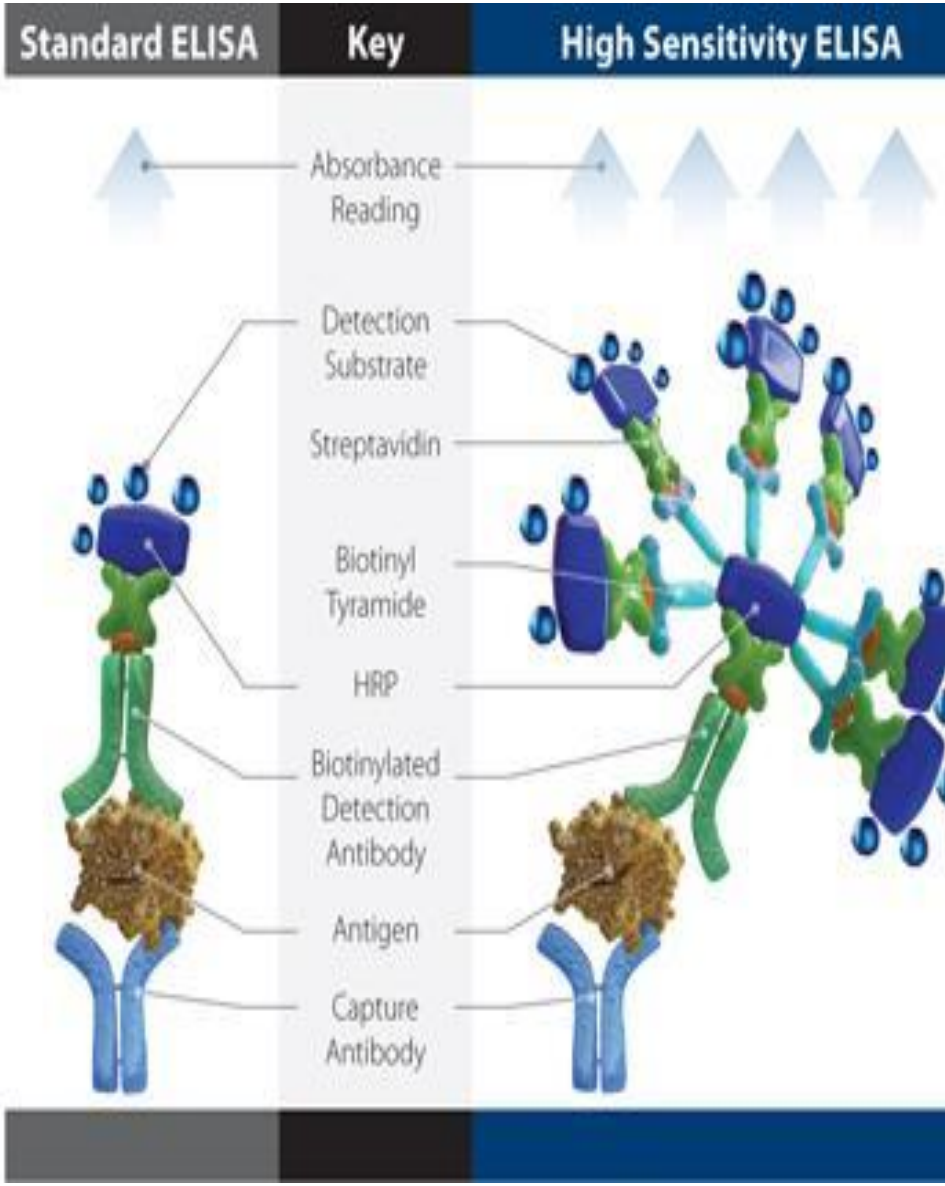


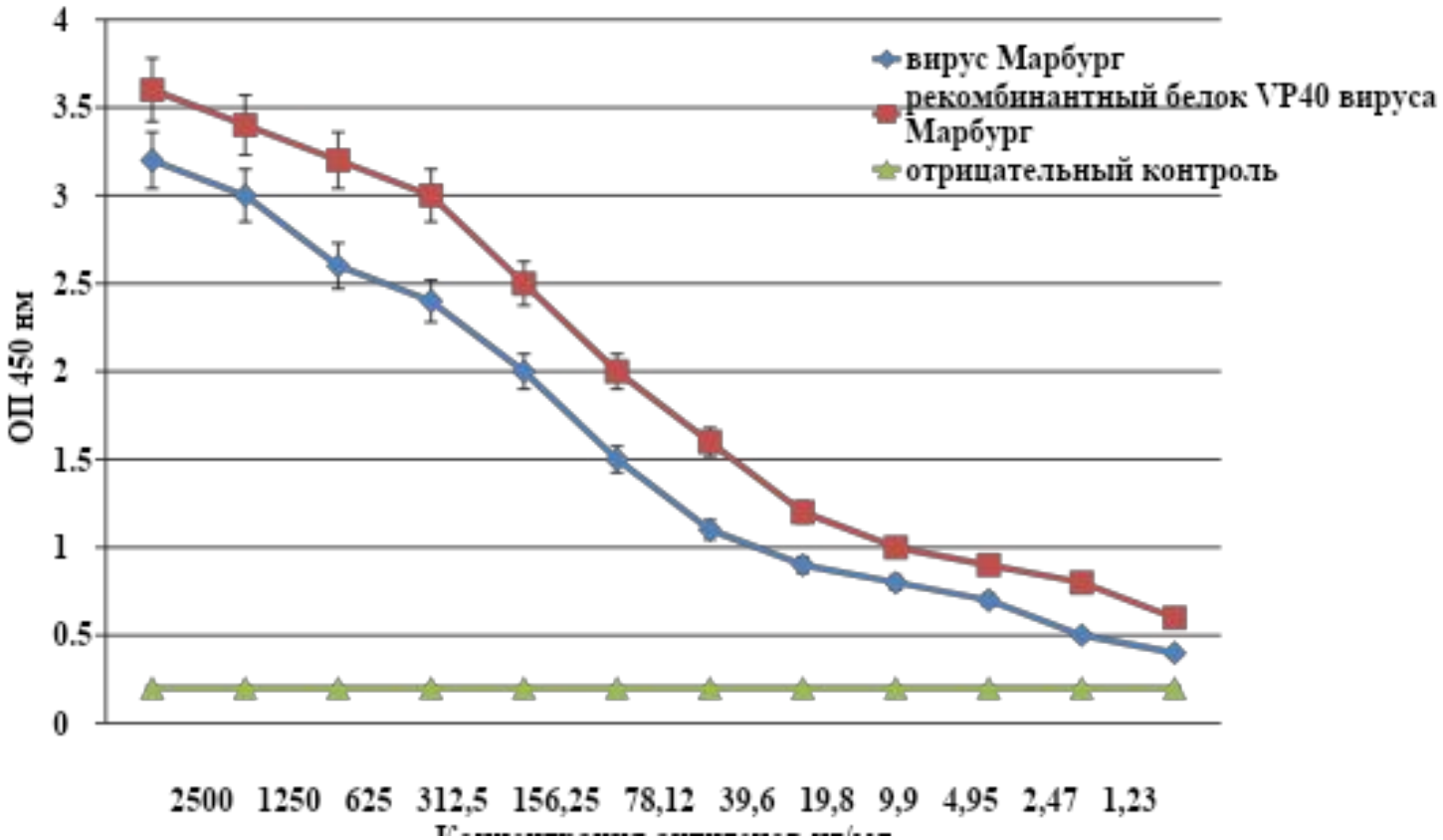
Таблица 6. Данные по количеству пар МКА, исследованных в двухцентровом ИФА формата “сэндвич” для выявления антигенов вирусов Марбург и Эбола

Общее количество исследован-ных видов МКА	Количество исследован-ных сочетаний пар	Количество пар МКА, выявляющих инактиви-рованный антиген	Количество пар МКА, выявляющих рек. белок VP40 вируса Марбург (совпадающих по выявлению АГ ВМ)	Количество пар МКА, выявляющих рек. белок VP35 вируса Марбург (совпадающих по выявлению АГ ВМ)	Количество пар МКА, выявляющих рек. белок VP40 вируса Эбола (совпадающих по выявлению АГ ВЭ)	Количество пар МКА, выявляющих рек. белок NP вируса Эбола (совпадающих по выявлению АГ ВЭ)
Из 16 видов МКА к вирусу Марбург: 3 – к белку VP35; 9 - к белку VP40; 3 – к NP; 1 – NP (?)	224	74	33 (11)	5 (4)	-	-
Из 21 вида МКА к вирусу Эбола: 2 – к белку VP35; 9 - к белку VP40; 10 – к NP	399	115	-	-	51 (17)	42 (14)

№ п/п	МКА “подложка” для антигена	“Идикаторные” МКА меченные биотином										
		МКА – VP35			МКА – VP40						МКА - NP	
		3F9*	9D8*	8G3*	5G9**	7H10**	9G6**	6B7**	1C12**	10E11**	5F11***	9C7***
1	3F9 *	2,7	1,3	2,8	2,6	0,9	1,1	1,3	0,1	0,1	0,9	1,4
2	9D8*	1,0	1,7	2,7	2,5	0,9	0,4	1,1	0,1	0,2	0,8	1,2
3	8G3*	0,4	1,2	2,0	3,3	0,5	0,6	0,6	0,1	0,1	0,9	0,5
4	5G9**	2,1	1,2	3,5	3,3	2,4	2,9	1,2	0,1	0,2	1,0	0,6
5	7H10**	1,7	н.о	1,5	2,9	1,3	1,8	0,6	0,4	1,2	0,1	0,4
6	9G6**	0,5	н.о	0,8	0,1	0,2	0,7	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
7	6B7**	0,4	0,4	0,9	2,7	0,2	0,1	0,2	0,6	1,0	0,8	0,1
8	1C12**	1,0	1,5	3,1	3,1	1,6	2,4	1,8	0,1	0,4	0,2	0,6
9	10E11**	1,3	1,5	3,1	3,3	1,4	2,5	2,1	0,2	0,4	0,7	0,8
10	7D8**	1,4	2,8	2,8	3,5	2,8	2,5	0,2	0,9	1,1	2,0	0,2
11	7C4**	2,3	н.о	0,1	2,9	1,7	2,1	0,3	0,1	0,1	1,0	1,0
12	5F11***	1,2	1,7	2,7	2,2	0,6	1,0	0,3	0,1	0,1	0,4	0,6
13	9C7***	0,9	0,1	1,5	3,4	0,1	0,1	0,3	2,4	0,1	2,2	0,3
14	5H7***	1,9	2,2	2,8	3,1	0,4	0,8	0,6	1,1	1,0	1,8	0,4
15	3A5	н.о	0,1	0,9	н.о	н.о	н.о	н.о	н.о	1,0	н.о	н.о
16	АС-ВМ*	1,2	0,1	1,1	3,3	0,9	1,8	0,8	1,4	0,8	1,9	0,2
17	АС- рек.VP40	1,3	н.о	1,1	2,8	0,4	0,8	0,8	1,8	1,4	1,9	0,2
18	IgG	0,3	0,1	0,8	2,7	0,1	0,4	0,3	0,7	0,9	1,4	0,5
19	4A2 - ВЭ-IS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
отриц. контроли		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

№	МКА “подложка” для антигена	“индикаторные” МКА меченые биотином												
		1C7 ***	6F7 ***	1C1 **	4A2 **	1E6 **	3D9 **	1B5 **	3C12 **	3C7 **	5C10 **	2E12 **	AC*	AC **
1	1C7***	0,14	0,10	0,10	1,26	0,20	1,92	0,78	0,81	0,30	0,98	0,29	0,37	1,89
2	6F7***	0,16	0,08	0,01	2,22	0,70	1,42	1,58	0,68	0,63	0,54	0,44	0,51	3,27
3	1C1**	0,33	0,27	0,59	2,93	0,70	1,85	0,92	0,92	0,23	0,74	0,57	0,30	1,00
4	4A2**	0,23	0,12	3,42	1,51	2,33	1,57	0,84	0,83	0,19	0,64	0,94	0,20	0,59
5	1E6**	0,23	0,28	0,22	1,93	0,48	1,23	0,91	0,77	0,28	0,49	0,27	0,21	1,79
6	3D9**	0,88	0,70	1,30	2,21	0,34	2,99	1,21	1,17	0,50	1,96	1,15	0,62	0,30
7	1B5**	0,42	0,38	0,78	2,02	0,82	1,98	1,00	1,03	0,52	0,79	0,32	0,46	0,42
8	5C10**	0,03	0,10	0,21	0,76	0,29	1,67	0,61	0,50	0,13	0,73	0,13	0,42	0,63
9	2E12**	0,22	0,15	0,06	0,90	0,24	2,10	1,01	0,77	0,25	0,83	0,13	0,48	0,82
10	1B2*	0,16	0,09	0,90	1,21	0,56	1,40	0,74	0,68	0,10	0,49	0,76	0,26	0,71
11	7B11*	0,11	0,18	0,81	0,98	0,49	1,30	0,65	0,76	0,18	0,61	0,38	0,26	0,60
12	1E5*	0,07	0,06	1,13	1,90	0,28	2,43	1,58	0,55	0,96	0,77	0,12	1,23	2,13
13	4B9*	2,09	0,02	1,43	0,78	0,22	1,45	0,94	2,10	0,15	0,63	1,44	0,13	0,47
14	9A7*	0,44	0,45	1,57	2,16	1,49	2,02	1,02	1,49	1,29	0,94	1,14	1,26	0,91
15	4A8*	0,35	1,15	0,42	2,02	1,54	1,73	1,07	2,24	0,92	0,60	0,86	1,25	2,52
16	10B4*	1,05	0,02	0,86	2,22	1,73	1,52	0,93	1,54	0,29	1,63	1,26	0,09	2,03
17	6G8*	0,40	0,29	0,41	1,26	0,83	2,06	0,91	1,25	0,51	1,60	0,31	0,48	1,65
18	6A8*	0,24	0,47	0,18	1,19	0,97	1,99	1,03	0,92	0,23	0,70	0,52	0,45	0,58
19	10A8*	0,49	0,25	0,07	1,98	0,90	1,80	1,13	1,16	0,54	0,52	0,32	0,23	2,92
20	AC *	0,98	0,23	1,11	1,32	1,44	1,76	1,69	1,71	1,13	1,38	1,41	0,78	2,73
21	AC**	0,50	0,29	0,15	1,14	0,40	1,52	0,56	0,81	0,27	0,65	0,61	0,18	1,19
22	IgG	0,13	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
23	5H7* отриц. контроль	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
24	7C4**отриц. контроль	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
25	9D8***отриц. контроль	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Титрование антигена вируса Марбург и рекомбинантного белка VP40 парой МКА 7D8 и 7H10* в двухцентровом ИФА “сэндвич”



Примечания: 7H10* - индикаторные МКА меченные биотином;
исходная концентрация препаратов антигенов 1 мг/мл,
первая точка титрования в разведении 1/400 соответствует концентрации 2500 нг/мл;
концентрация МКА для “захвата” антигенов – 10 мкг/мл;
концентрация индикаторных МКА, меченных биотином – 1 мкг/мл.
Определение концентрации белковых препаратов выполняли с использованием набора “Protein Assay Kit” (Bio-Rad, США) на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 495 нм.
В качестве отрицательного контроля в ИФА использовали пару МКА 4А2 и 1С1*, специфичные к белку VP40 вируса Эбола.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2395575

ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО Mus musculus L. - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА МАРБУРГ (ШТАММ Popp) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАТРИКСНОГО БЕЛКА VP40 ВИРУСА МАРБУРГ (ШТАММ Popp)

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2008149310

Приоритет изобретения **15 декабря 2008 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации *27 июля 2010 г.*

Срок действия патента истекает **15 декабря 2028 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 395 575** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2008149310/13, 15.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 15.12.2008

(45) Опубликовано: 27.07.2010 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2186107 C1, 27.07.2002. WO 2007044731 A2, 19.04.2007. JP 2006083166 A, 30.03.2006.

Адрес для переписки:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово, ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, зав. патентным отделом Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):
Казачинская Елена Ивановна (RU),
Сорокин Александр Владимирович (RU),
Иванова Алла Владимировна (RU),
Качко Алла Васильевна (RU),
Беланов Евгений Федорович (RU),
Разумов Иван Алексеевич (RU),
Локтев Валерий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)

(54) ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО Mus musculus L. - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА МАРБУРГ (ШТАММ Popp) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МАТРИКСНОГО БЕЛКА VP40 ВИРУСА МАРБУРГ (ШТАММ Popp)

(57) Формула изобретения

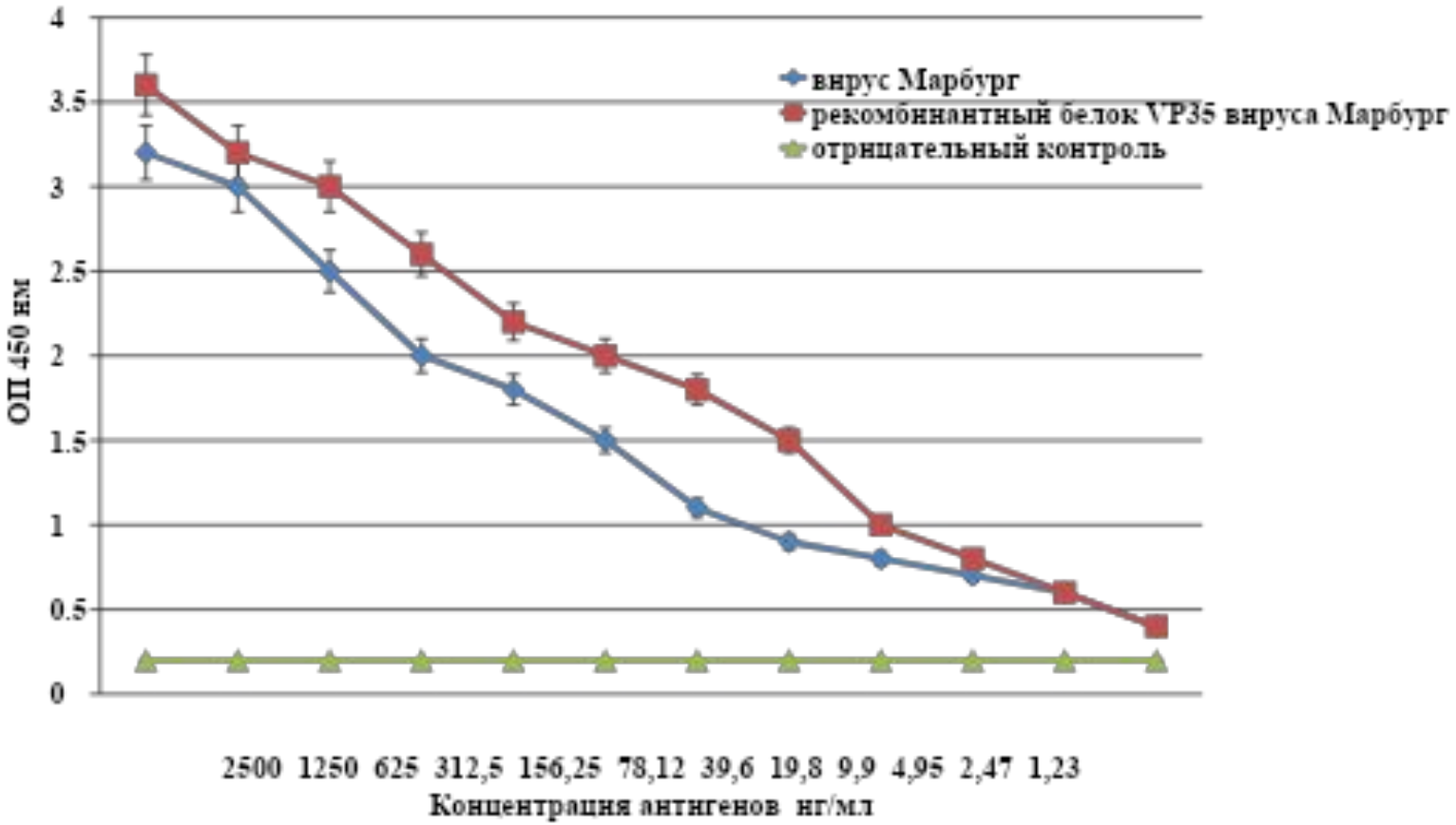
1. Штамм гибридных клеток животного Mus musculus L. 7D8, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к матриксному белку VP40 вируса Марбург (штамм Popp) и используемых в качестве захватывающих антиген в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления матриксного белка VP40 вируса Марбург (штамм Popp).

2. Моноклональное антитело 7D8, продуцируемое штаммом гибридных клеток животного Mus musculus L. 7D8 (субкласс иммуноглобулинов IgG1), имеющие тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи и используемые в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления матриксного белка VP40 вируса Марбург (штамм Popp).

3. Штамм гибридных клеток животного Mus musculus L. 7H10, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к матриксному белку VP40 вируса Марбург (штамм Popp) и используемых в качестве индикаторных,

RU 2395575 C1

Титрование антигена вируса Марбург и рекомбинантного белка VP35 парой МКА 3F9 и 3F9* в двухцентровом ИФА “сэндвич”



Примечания: 3F9* - индикаторные МКА меченные биотином;
исходная концентрация препаратов антигенов 1 мг/мл,
первая точка титрования в разведении 1/400 соответствует концентрации 2500 нг/мл;
концентрация МКА для “захвата” антигенов – 10 мкг/мл;
концентрация индикаторных МКА, меченных биотином – 1 мкг/мл.
Определение концентрации белковых препаратов выполняли с использованием набора “Protein Assay Kit” (Bio-Rad, США) на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 495 нм.
В качестве отрицательного контроля в ИФА использовали захватывающие антиген МКА 1С7, специфичные к белку VP35 вируса Эбола.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2393220

ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО MUS MUSCULUS L. 3F9 - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЕ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP35 ВИРУСА МАРБУРГ, И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА 3F9, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ УКАЗАННЫМ ШТАММОМ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2008149308

Приоритет изобретения **15 декабря 2008 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации *27 июня 2010 г.*

Срок действия патента истекает **15 декабря 2028 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 393 220** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2008149308/13, 15.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 15.12.2008

(45) Опубликовано: 27.06.2010 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2186107 C1, 27.07.2002. WO 2007044731 A2, 19.04.2007. JP 2006083166 A, 30.03.2006.

Адрес для переписки:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово, ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, зав. патентным отделом, Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):
Казачинская Елена Ивановна (RU),
Сорокин Александр Владимирович (RU),
Иванова Алла Владимировна (RU),
Качко Алла Васильевна (RU),
Беланов Евгений Федорович (RU),
Разумов Иван Алексеевич (RU),
Локтев Валерий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)

(54) ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО MUS MUSCULUS L. 3F9 - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЕ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP35 ВИРУСА МАРБУРГ, И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА 3F9, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ УКАЗАННЫМ ШТАММОМ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК

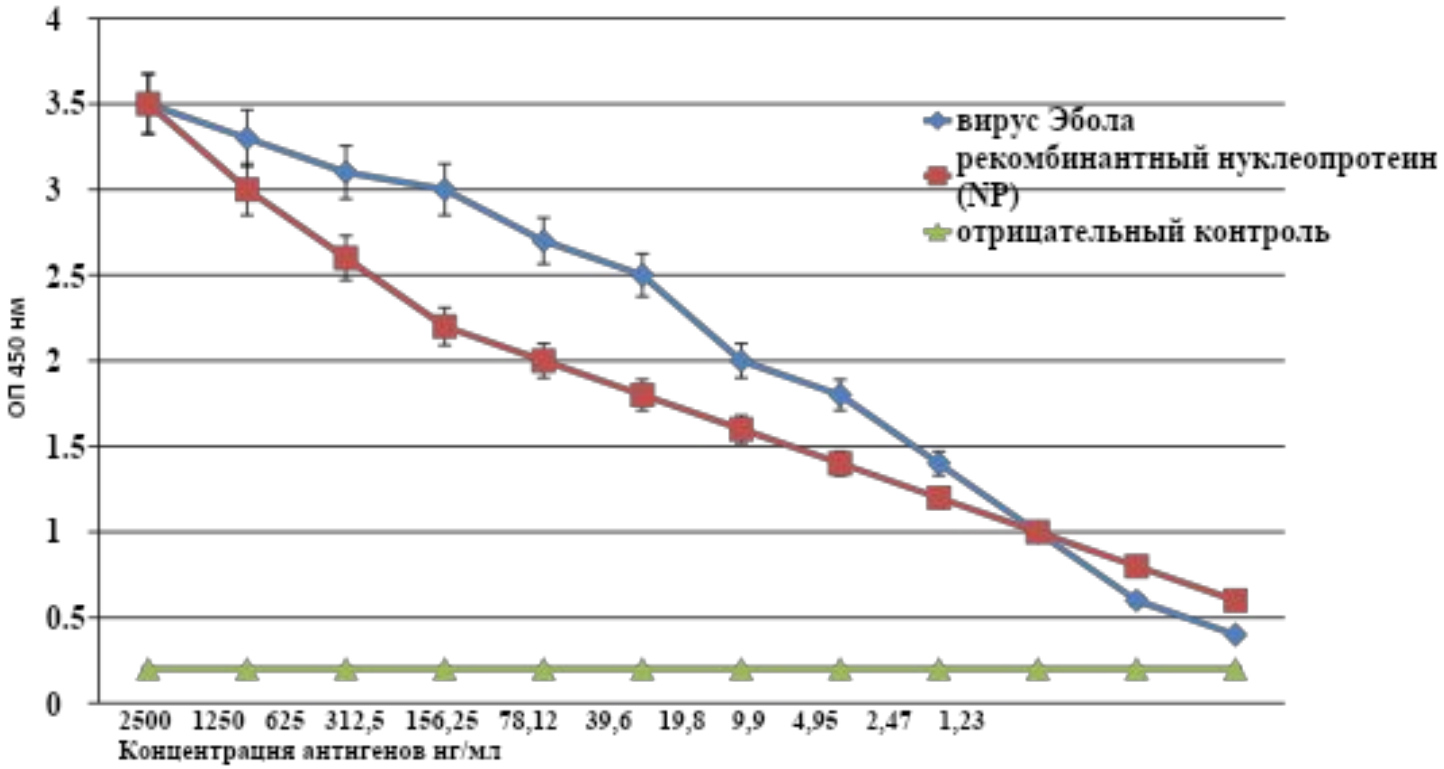
(57) Формула изобретения

1. Штамм гибридных клеток животного Mus musculus L. 3F9, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к белку VP35 вируса Марбург (штамм Popp).

2. Моноклональные антитела 3F9, продуцируемые штаммом гибридных клеток животного Mus musculus L. 3F9, относящиеся к субклассу иммуноглобулинов IgGI, имеющие тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи и обладающие уникальной особенностью выявления белка VP35 вируса Марбург (штамм Popp) в иммуноферментной системе формата "сэндвич" с одновременным их использованием как в качестве "захватывающих" антиген, так и в качестве "индикаторных", меченных биотином.

RU 2393220 C1

Титрование антигена вируса Эбола и рекомбинантного нуклеопротеина парой МКА 1В2 и 7В11* в двухцентровом ИФА “сэндвич”



Примечания: 7В11* - индикаторные МКА меченные биотином;
исходная концентрация препаратов антигенов 1 мг/мл, первая точка титрования в разведении 1:400 соответствует концентрации 2500 нг/мл;
концентрация МКА для “захвата” антигенов – 10 мкг/мл;
концентрация индикаторныхМКА, меченных биотином – 1 мкг/мл.
Определение концентрации белковых препаратов выполняли с использованием набора “Protein Assay Kit” (Bio-Rad, США) на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 495 нм.
В качестве отрицательного контроля использовали пару МКА 9С7 и 5F11*, специфичных к нуклеопротеину вируса Марбург.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2395576

ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО Mus musculus L.1B2 - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga)

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № **2008149653**

Приоритет изобретения **16 декабря 2008 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации *27 июля 2010 г.*

Срок действия патента истекает **16 декабря 2028 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 395 576** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2008149653/13, 16.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 16.12.2008

(45) Опубликовано: 27.07.2010 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: JP 2002306164 A, 22.10.2002. JP 2004315394 A, 11.11.2004. RU 2285043 C2, 10.10.2006. RU 2186106 C1, 27.07.2002. WO 2007044731 A2, 19.04.2007.

Адрес для переписки:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово, ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, зав. патентным отделом Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):
Казачинская Елена Ивановна (RU),
Перебоев Александр Владимирович (RU),
Иванова Алла Владимировна (RU),
Качко Алла Васильевна (RU),
Субботина Екатерина Леонидовна (RU),
Чепурнов Александр Алексеевич (RU),
Разумов Иван Алексеевич (RU),
Локтев Валерий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)

RU 2395576 C1

(54) ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО Mus musculus L.1B2 - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga)

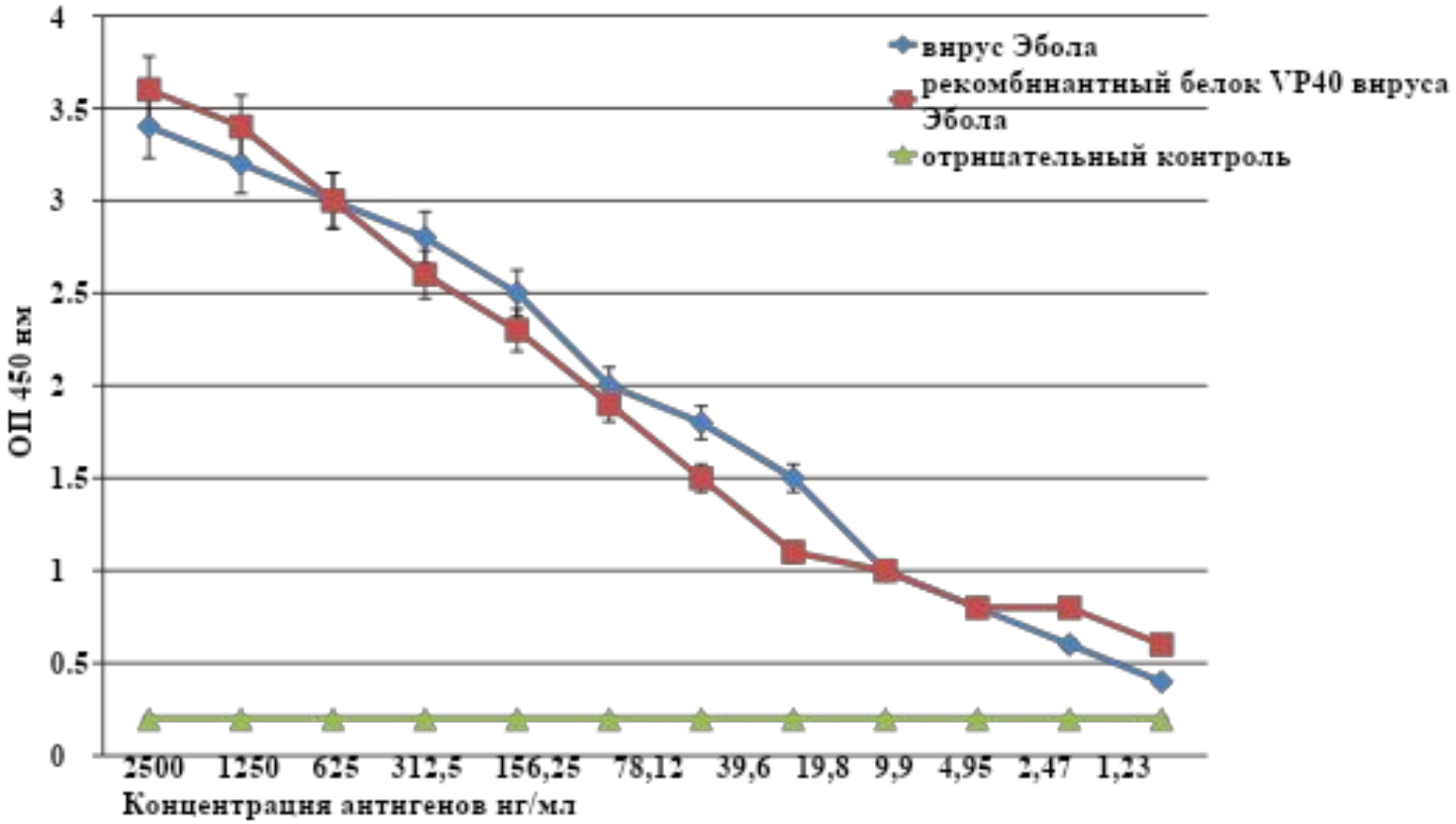
(57) Формула изобретения

1. Штамм гибридных клеток животного Mus musculus L. 1B2, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga) и используемых в качестве захватывающих антиген в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

2. Моноклональное антитело 1B2, продуцируемое штаммом гибридных клеток животного Mus musculus L. 1B2 (субкласс иммуноглобулинов IgG1, имеющие тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи), используемые в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления нуклеопротеина вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

3. Штамм гибридных клеток животного Rattus Norvegicus 7B11, депонированный в Коллекции клеточных культур ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину

Титрование антигена вируса Эбола и рекомбинантного белка VP40 парой МКА 4А2 и 1С1* в двухцентровом ИФА “сэндвич”



Примечания: 1С1* - индикаторные МКА меченные биотином;
исходная концентрация препаратов антигенов 1 мг/мл,
первая точка титрования в разведении 1/400 соответствует концентрации 2500 нг/мл;
концентрация МКА для “захвата” антигенов – 10 мкг/мл;
концентрация индикаторных МКА, меченных биотином – 1 мкг/мл.
Определение концентрации белковых препаратов выполняли с использованием набора “Protein Assay Kit” (Bio-Rad, США) на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 495 нм.
В качестве отрицательного контроля в ИФА использовали пару МКА 7D8 и 7H10*, специфичные к белку VP40 вируса Марбург.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2395577

ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО Mus musculus L.- ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), И НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga)

Патентообладатель(ли): ***Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2008150265**

Приоритет изобретения **18 декабря 2008 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***27 июля 2010 г.***

Срок действия патента истекает **18 декабря 2028 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ, ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 395 577** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 5/18 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2008150265/13, 18.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 18.12.2008

(45) Опубликовано: 27.07.2010 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: JP 2002306164 A, 22.10.2002. JP 2004315394 A, 11.11.2004. RU 2285043 C2, 10.10.2006. RU 2186106 C1, 27.07.2002. WO 2007044731 A2, 19.04.2007.

Адрес для переписки:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово, ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора, зав. патентным отделом Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):
Казачинская Елена Ивановна (RU),
Иванова Алла Владимировна (RU),
Качко Алла Васильевна (RU),
Субботина Екатерина Леонидовна (RU),
Чепурнов Александр Алексеевич (RU),
Разумов Иван Алексеевич (RU),
Локтев Валерий Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное учреждение науки "Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН ГНЦ ВБ "Вектор" Роспотребнадзора) (RU)

(54) ШТАММ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО Mus musculus L.- ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga) (ВАРИАНТЫ), МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО, ПРОДУЦИРУЕМОЕ ШТАММОМ (ВАРИАНТЫ), И НАБОР ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ФОРМАТА "СЭНДВИЧ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА VP40 ВИРУСА ЭБОЛА, СУБТИП ЗАИР (ШТАММ Mainga)

(57) Формула изобретения

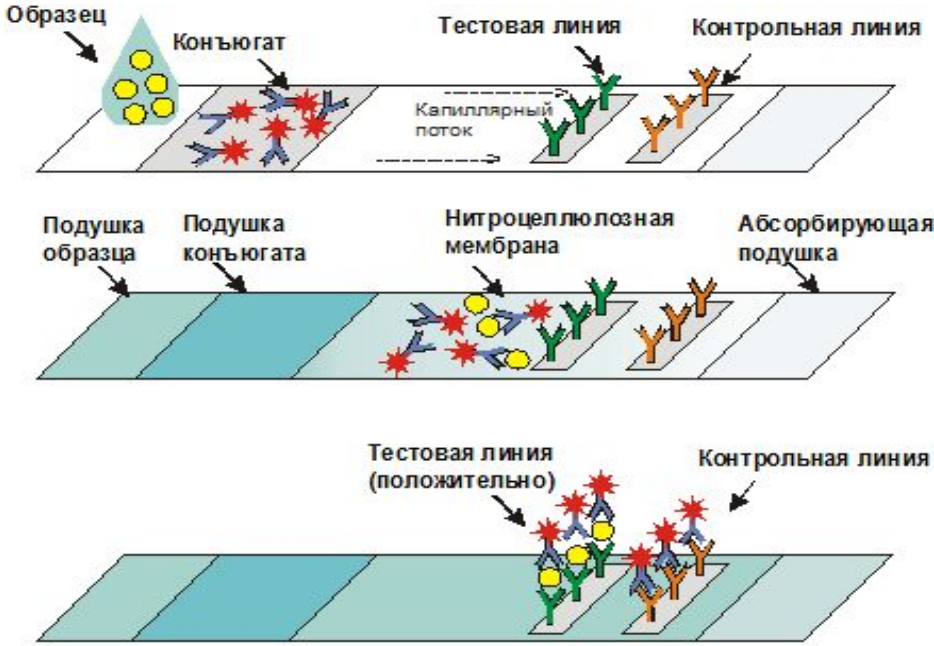
1. Штамм гибридных клеток животного Mus musculus L. 4A2, депонированный в Коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ "Вектор", являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к матриксному белку VP40 вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga), и используемых в качестве захватывающих антиген в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления матриксного белка VP40 вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

2. Моноклональное антитело 4A2, продуцируемое штаммом гибридных клеток животного Mus musculus L. 4A2 (субкласс иммуноглобулинов IgG1, имеющие тяжелую 55 кДа и легкую 25 кДа цепи), используемые в иммуноферментной системе формата "сэндвич" для выявления матриксного белка VP40 вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga).

3. Штамм гибридных клеток животного Mus musculus L. 1C1, депонированный в Коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ "Вектор", являющийся продуцентом моноклональных антител, специфичных к матриксному белку VP40 вируса Эбола, субтип Заир (штамм Mainga), и используемых в качестве индикаторных меченных

RU 2395577 C1

Пара МКА, специфичных к белку VP40 вируса Эбола, “захватывает” вирусный антиген



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2144565

На основании Патентного закона Российской Федерации, введенного в действие 14 октября 1992 года, Российским агентством по патентам и товарным знакам выдан настоящий патент на изобретение

РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pQ_F35, КОДИРУЮЩАЯ ГИБРИДНЫЙ ПОЛИПЕПТИД f35, ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИГЕННЫМИ И ИММУНОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ БЕЛКА VP35 ВИРУСА МАРБУРГ, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ШТАММ БАКТЕРИЙ Escherichia coli - - СВЕРХПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА f35

Патентообладатель(ли):

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

по заявке № 98120373, дата поступления: 12.11.1998

Приоритет от 12.11.1998

Автор(ы) изобретения:

см. на обороте

Патент действует на всей территории Российской Федерации в течение 20 лет с **12 ноября 1998 г.** при условии своевременной уплаты пошлины за поддержание патента в силе

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации

г. Москва, ***20 января 2000 г.***

Генеральный директор

А.Д. Корчагин

(19) RU (11) 2144565 (13) C1

(51) 7 C 12 N 15/40, 1/21

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
О ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(54) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Российской Федерации

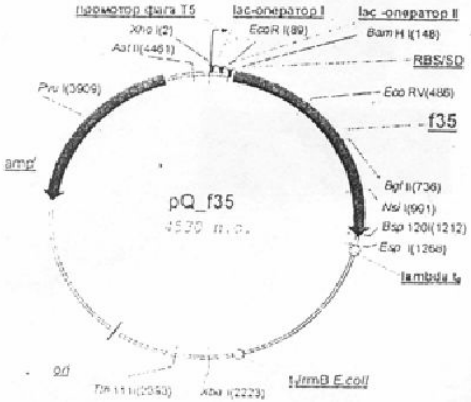
1

1) 98120373/13 (22) 12.11.1998
4) 12.11.1998
5) 20.01.2000 Бюл. № 2
2) Сорокин А.В., Разумов И.А., Казачинская Е.И., Качко А.В., Иванова А.В., Шипин В.П., Букреев А.А., Беланов Е.Ф., Актев В.Б., Нетесов С.В.
) (73) Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"
6) RU 2031949 C1, 27.03.95. RU 2043414 C1, 10.09.95. RU 2071502 C1, 10.01.97. RU 2101487 C1, 27.09.97. EP 0068693 A2, 05.01.83. WO 8800973 A1, 11.02.88. WO 9410321 A1, 11.05.94.
) 633159, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, ПГТ Кольцово, ГНЦВБ "Вектор", патентный отдел, Мистюрину Г.П.
) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК PQ_F35, КОДИРУЮЩАЯ ГИБРИДНЫЙ ПОЛИПЕПТИД F 35, ОБЛАДАЮ-

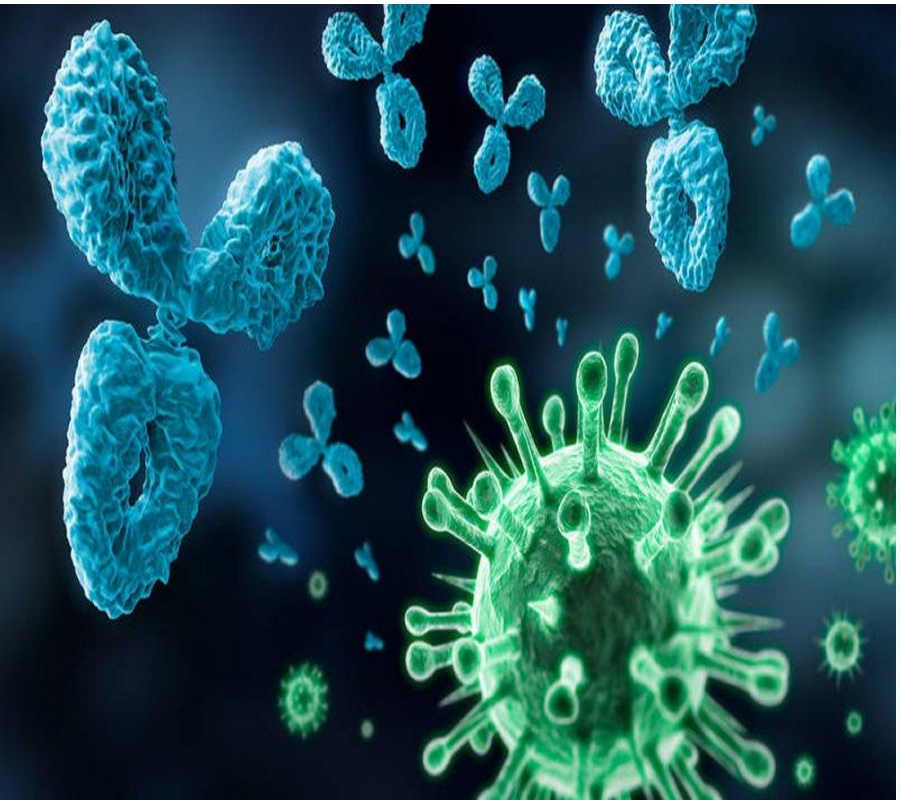
2

ЩИЙ АНТИГЕННЫМИ И ИММУНОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ БЕЛКА VP 35 ВИРУСА МАРБУРГ, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - СВЕРХПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА F 35

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии и медицине, конкретно к медицинской вирусологии и иммунологии, и может быть использовано для проведения иммунодиагностики геморрагической лихорадки Марбург, а также для получения специфических антител к вирусу Марбург и генно-инженерных вакцин против вируса Марбург. Сконструированы рекомбинантная плазмидная ДНК pQ_f35, кодирующая полипептид f35 с антигенными свойствами белка VP 35 вируса Марбург, и рекомбинантный штамм бактерий E.coli jM103 [pQ_f35], обеспечивающий при



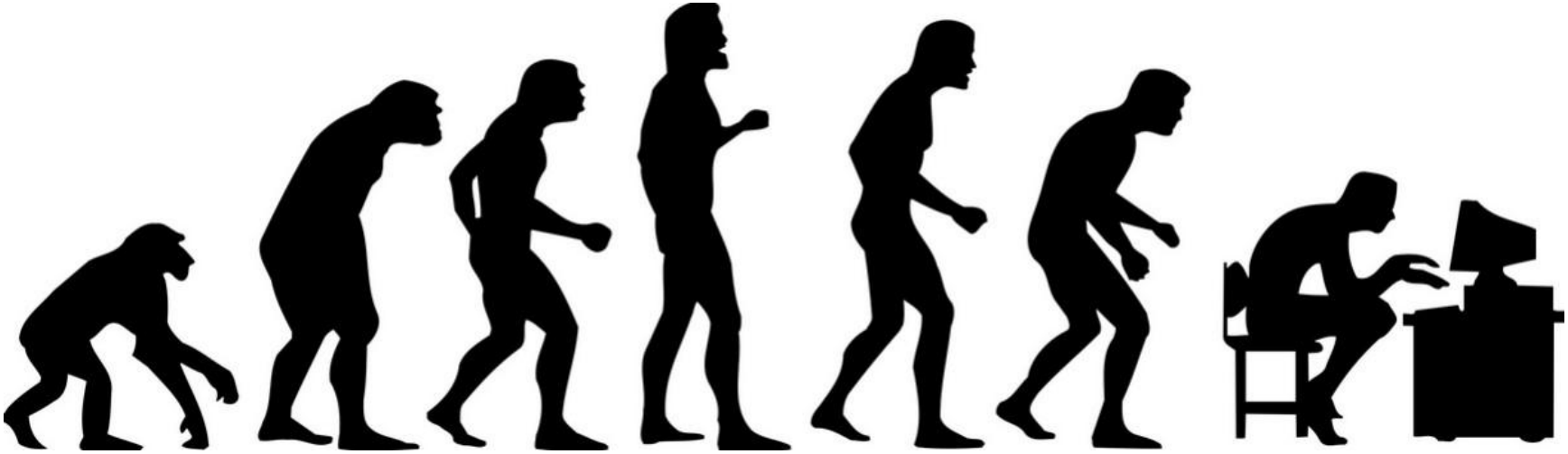
RU 2144565 C1

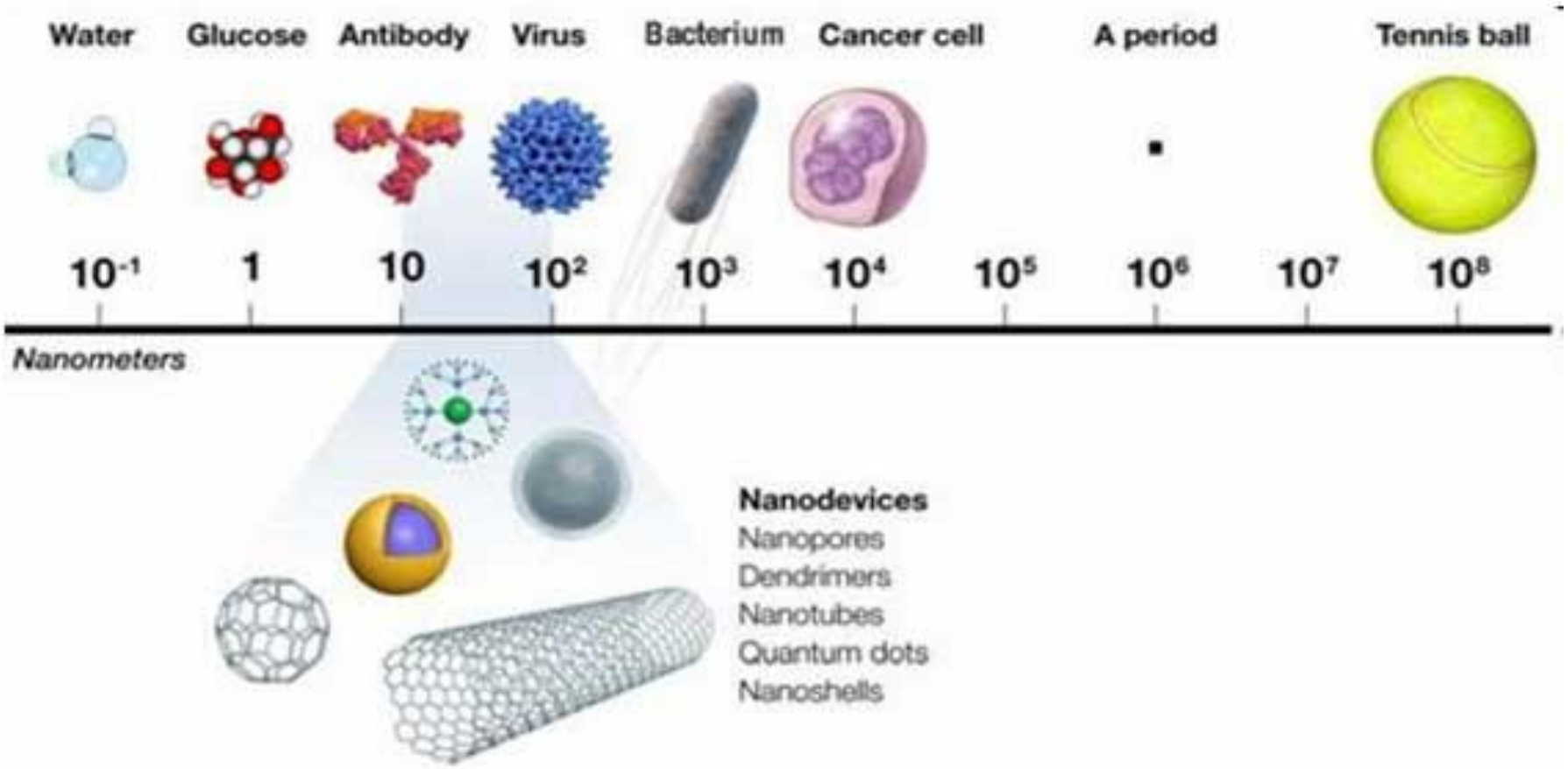


Будьте здоровы и счастливы!!!

Спасибо за внимание!

http://aida.ucoz.ru



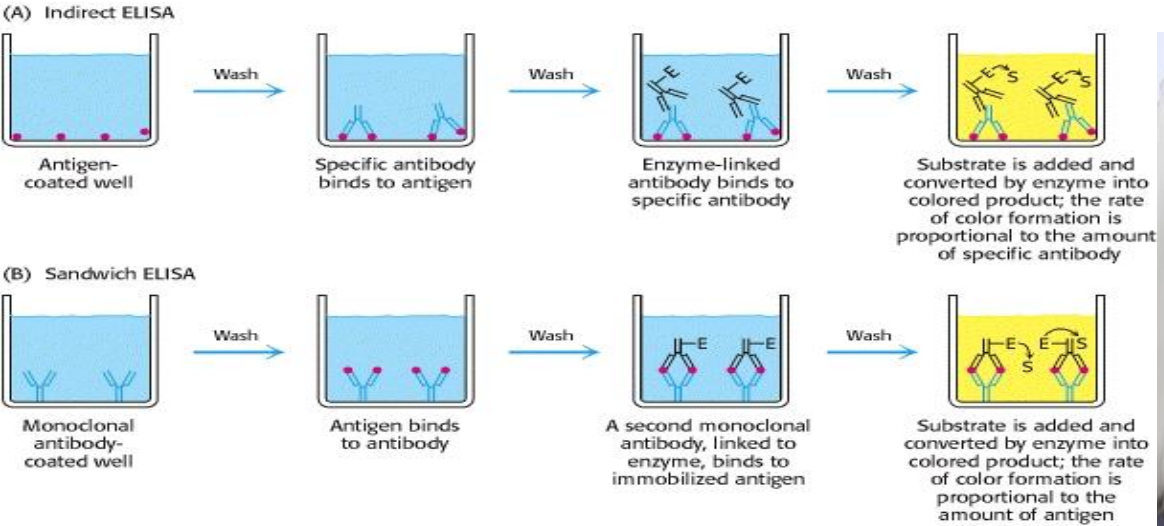

Water
Glucose
Antibody
Virus
Bacterium
Cancer cell
A period
Tennis ball
10^{-1}
1
10
10^{2}
10^{3}
10^{4}
10^{5}
10^{6}
10^{7}
10^{8}
Nanometers
Nanodevices
Nanopores
Dendrimers
Nanotubes
Quantum dots
Nanoshells

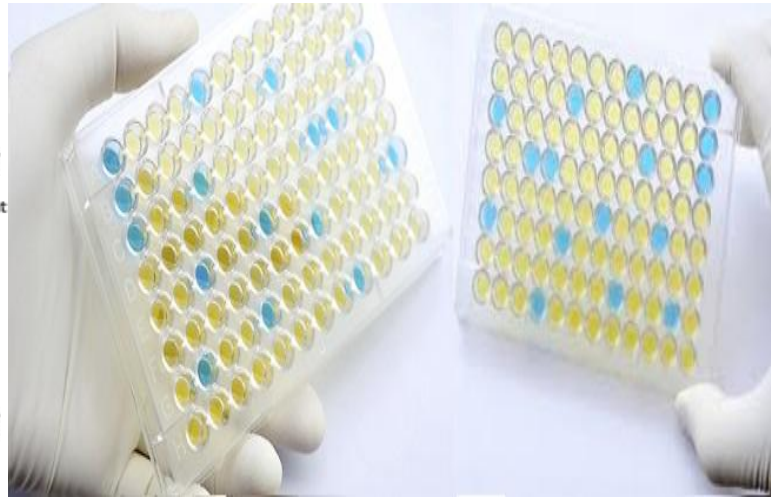
1. Иммунохимическая реакция протекает в растворе.
2. Обратимое образование комплекса АГ+АТ 1:1
3. В качестве субстратов ферментов используют вещества, продукты превращения которых являются окрашенными соединениями или, наоборот, окраска самих субстратов изменяется в процессе реакции. Окрашенные соединения поглощают видимый свет , т. е. электромагнитное излучение с длинами волн 400–700 нм. Поглощение света подчиняется [закону Бугера-Ламберта-Бера](), в соответствии с которым оптическая плотность раствора в
определённом диапазоне прямо пропорциональна концентрации вещества. Для измерения оптической плотности используется спектрофотометр.

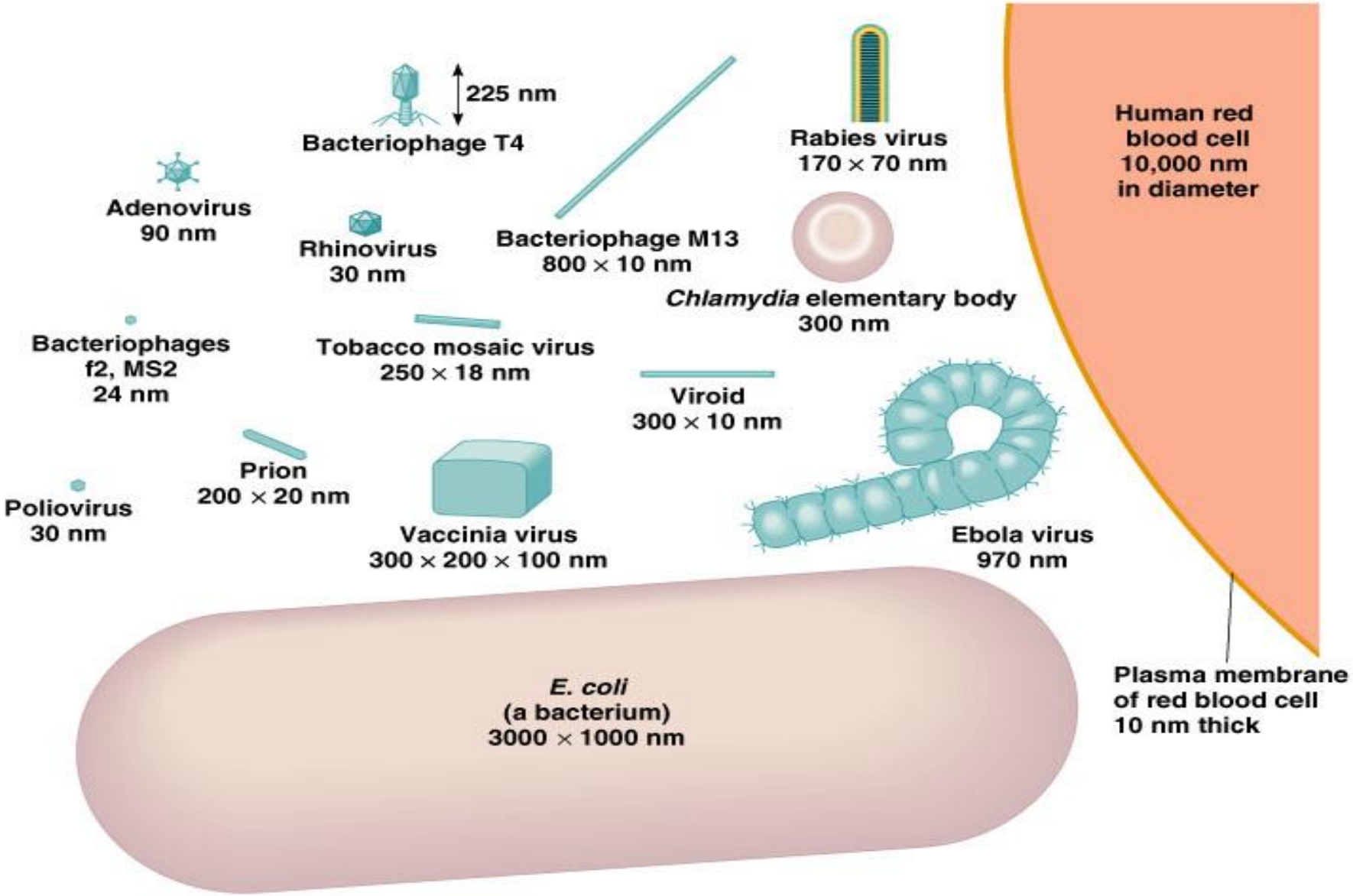
ТМБ (тетраметилбензидин)

Пероксидаза хрена

H_2O_2







Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.