



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований
и производства

Инфекционные
болезни



Иммунология и
серология



Реагенты для иммуноанализов на антитела и антигены SARS-CoV-2



SARS-CoV-2 — это новый коронавирус, вызывающий COVID-19. В марте 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила о вспышке COVID-19 пандемии.

SARS-CoV-2 (рис.1) принадлежит к крупному семейству вирусов с одноцепочечной РНК (+ ssRNA). Бета-коронавирусы, такие как SARS-CoV, могут преодолевать видовые барьеры и вызывать у людей различные заболевания

- от простуды до куда более тяжелых болезней вроде тяжелого острого респираторного синдрома (SARS, выявлен в 2003 году) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS, выявлен в 2012 году).

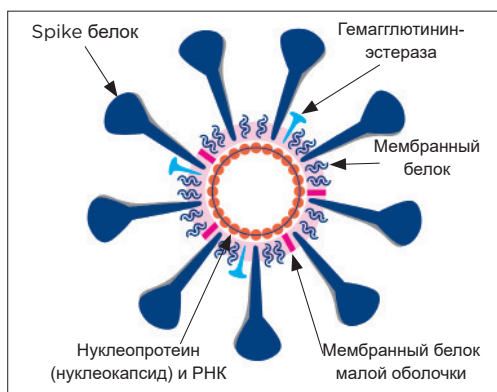


Рис. 1. Схематическое изображение SARS-CoV-2.

Антигенные тесты COVID-19

Тесты на антиген COVID-19 используются для обнаружения вирусных антигенов в клинических образцах. Подобные тесты уже сертифицированы и активно используются в диагностике COVID-19 в США, Европе и России.

Хотя ПЦР тесты являются основным инструментом для диагностики COVID-19, специфичность лучших тестов на антигены уже не уступает им. В целом чувствительность несколько ниже, однако простота в использовании и



КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- ✓ Серологические тесты (антитела) на SARS-CoV-2
- ✓ Тесты на антигены SARS-CoV-2

быстрый результат тестов на антигены позволяют считать их реальной альтернативой для диагностики и скрининга вируса.

Серологические тесты на COVID-19

Серологические тесты (антитела) используются для мониторинга наличия антител, специфичных к SARS-CoV-2, в клинической пробе. В ходе инфицирования В-клетки вырабатывают антитела (иммуноглобулины) разных классов. Обычно антитела IgM могут быть обнаружены на более раннем сроке, тогда как антитела класса IgG появляются несколько позже (см. Рис 2). Антитела IgM и IgG являются наиболее частыми объектами анализа, однако новые исследования показывают, что измерение наличия антител класса IgA может повысить чувствительность тестов (1,2).

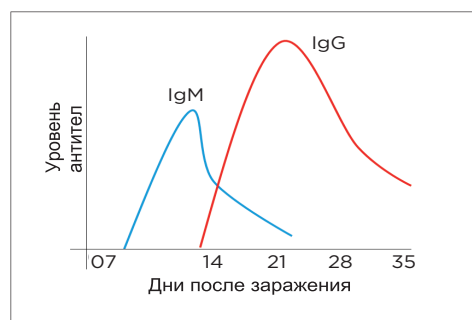


Рис. 2. Сероконверсия после типичной инфекции.

Ссылки

1. Yu, H. et al. Eur Respir J 2001526 (2020) doi:10.1183/13993003.01526-2020.
2. Tan, C. W. et al. Nat Biotechnol 38, 1073-1078 (2020).
3. Ma, H. et al. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.17.20064907> (2020) doi:10.1101/2020.04.17.20064907.

Реагенты для разработки анализов

Мы предлагаем несколько моноклональных антител (MoAt), специфичных к нуклеопротеину SARS-CoV-2 и Spike RBD SARS-CoV-2 и пригодных для разработки тестов определения антигенов COVID-19. Взаимодействие всех рекомендованных пар антител протестировано на образцах пациентов и/или вирусными лизатами. Мы рекомендуем тестировать различные комбинации антител, поскольку эффективность их работы в тестах зависит от платформы.

Мы также производим четыре рекомбинантных антигена SARS-CoV-2, которые можно использовать при разработке тестов на антитела COVID-19 и проверки результатов тестов на следующие антигены - Spike RBD, два различных антигена на нуклеопротеин и ACE2-Fc.

Кроме того, в списке нашей продукции есть MoAt, специфичные к различным классам Ig IgA, IgG и IgM, которые могут применяться в качестве вторичных антител в серологических анализах.

Помимо моноклональных антител, мы разработали козы поликлональные антитела, специфичные к нуклеопротеину SARS-CoV-2.

Таблица 1. Кросс-реактивность выбранных пар антител к NP SARS-CoV-2 с рекомбинантным нуклеопротеином MERS-CoV.

Подложка	Детекция	MERS-COV NP (His-tag)
C518	C524	-
C518	C706	-
C524	C527	-
C524	C706	-
C527	C715	-
C706	C518	-
C715	C518	-
C715	C706	-

Моноклональные антитела, специфичные к нуклеопротеину SARS-CoV-2

Мы предлагаем несколько мышинных и кроличьих моноклональных антител, специфичных к нуклеопротеину SARS-CoV-2.

Исследование кросс-реактивности MoAt

Несколько комбинаций пар MoAt были протестированы на кросс-реактивность с рекомбинантными нуклеопротеинами MERS (см. Таблицу 1). Эти же пары не показали перекрестной реакции с некоторыми другими вирусами респираторных заболеваний, в т. ч. сезонные коронавирусы, вирусы гриппа А и В, респираторно-синцитиальный вирус человека и аденовирус (см. Таблицу 2).

Таблица 2. Те же пары, что и в таблице 1, были протестированы на кросс-реактивность с несколькими сезонными коронавирусами и другими вирусами, вызывающими респираторные заболевания. Кросс-реактивности не обнаружено.

Рекомбинантные антигены (компания Sino Biological)
Вирус гриппа В (B/Florida/4/2006) Нуклеопротеин (His Tag) 40438-V08B
Вирус гриппа А H1N1 (A/California/07/2009) Нуклеопротеин (His Tag) 40205-V08B
Коронавирус человека (HCoV-HKU1) Нуклеопротеин (His Tag) 40642-V07E
Коронавирус человека (HCoV-OC43) Нуклеопротеин 40643-V07E
Коронавирус человека (HCoV-229E) Нуклеопротеин (His Tag) 40640-V07E
Коронавирус человека (HCoV-NL63) Нуклеопротеин (His Tag) 40641-V07E

Лизаты вирусов
HCoV E229
HCoV OC43
Парагрипп Тип 1
Парагрипп Тип 2
Парагрипп Тип 3
Вирус гриппа А (H2N2)
Вирус гриппа А (H7N9)
Вирус гриппа А (H1N1) pdm09 Guangdong-Maonan
Вирус гриппа А (H3N2) HongKong/2671/2019
Вирус гриппа А (H5N1)
Вирус гриппа В Washington 02/2019
Вирус гриппа В Phuket
Респираторно-синцитиальный вирус человека
Аденовирус

Предполагаемые области эпитопов

Точные области эпитопов не определены, однако на данный момент мы смогли разделить все антитела к нуклеопротеидам на три группы эпитопов в рамках N-конца или аминоконца (см. Рисунок 3). Все антитела из N-конца связываются с участком N47-A173 нуклеопротеина. C524, C706, C518 и C715 распознают структурные эпитопы в N-концевой части нуклеопротеина. C527 распознает линейный эпитоп R89-W108.

Антитела, принадлежащие к разным группам, способны образовывать пары. Для выявления эпитопной специфичности моноклонов требуется их дальнейшее исследование.



Рис. 3. Предполагаемые эпитопные области антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2. Изображение не является точной иллюстрацией эпитопов или их границ. Оно демонстрирует, как, в нашем понимании, антитела формируют три группы в рамках N-конца.

Рекомендованные пары антител

Рекомендованные пары представлены в таблицах 3 и 4. Обращаем ваше внимание на то, что это только наши предположения, основанные на результатах наших внутренних исследований и отзывах клиентов. Мы постоянно опрашиваем наших клиентов и продолжаем собственное тестирование, поэтому эти данные могут поменяться в будущем. Мы считаем, что важно проверять взаимодействие сразу нескольких пар, так как результат зависит от множества факторов, в т.ч. платформа, буферы, условия проведения тестов и т.д.

Таблица 3. Предварительные рекомендованные пары для сэндвич-иммуноанализов.

Детекторные антитела конъюгированы с HRP		Детекторные антитела конъюгированы с биотином	
Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
C524	C706	C524	C706
C518	C524	C706	C518
C524	C527	C715	C518
C715	C706	PSN5	C518
C527	C715	PSN5	C524
		C524	C527
		C518	C706
		C524	C518

Таблица 4. Предварительные рекомендации по парам антител для обнаружения нуклеопротеина SARS-CoV-2 в ИХА.

1+1		Улучшенные варианты	
Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
C715	C706	C706	C518+C524
C706	C524	C706	C518+C524+C715
C706	C518	C706+C518	C524
PSN5	C518	C706+C518	C524+C715
PSN5	C524	C518+C524	C706
PSN5	C706	C518+C524+C715	C706
C518	C706	C524+C715	C706+C518
C524	C706	C518+C524+C715	C706+C527
C706	C715	C706+PSN5	C518+C524

Моноклональные антитела, специфичные к Spike RBD SARS-CoV-2.

Мы предоставляем шесть МоАт, специфичных для RBD-области Spike 1. Рекомендации по парам показаны в таблицах 5 и 6.

Таблица 5. Рекомендации пар для сэндвич-иммуноанализов для обнаружения Spike RBD SARS-CoV-2.

Детекторные антитела конъюгированы с HRP		Детекторные антитела конъюгированы с биотином	
Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
RBD5305	RBD1106	RBD1106	RBD5313
RBD5308	RBD5305	RBD1106	RBD5305
RBD5324	RBD5308	RBD5305	RBD1106
		RBD5308	RBD5313
		RBD5308	RBD5305

Таблица 6. Рекомендации по парам для обнаружения Spike RBD SARS-CoV-2 в ИХА.

Подложка	Конъюгат	Подложка	Конъюгат
RBD5308	RBD5324	RBD5324	RBD5308
RBD5308	RBD5313	RBD5313	RBD5308

Клон R107 обладает нейтрализующими свойствами.

Один из моноклонов к Spike RBD, клон R107, продемонстрировал сильные нейтрализующие свойства в рамках теста по нейтрализации вирусов, аналогичного описанному Tan et al. (3). R107 эффективно ингибировал взаимодействие между рекомбинантным RBD и ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) (см. Таблицу 7). Было установлено, что данное взаимодействие играет важную роль в процессе проникновения коронавируса в клетки.

Обратите внимание! Мы не рекомендуем использовать R107 в тестах на антиген COVID-19, поскольку он не позволяет эффективно выявлять южноафриканский штамм. Однако из-за его способности эффективно ингибировать взаимодействие ACE2-RBD его можно использовать в анализах нейтрализации антител в качестве калибратора.

Таблица 7. Эксперимент по нейтрализации вируса с рекомбинантными антигенами ACE2 и spike RBD показал, что клон R107 способен ингибировать взаимодействие между ACE.

Образец	OD	% ингибирования
RBD1106	1.4614	22.8
R107	0.0635	96.6
Пациент с высоким титром нейтрализующих антител	0.2	89.4
Отрицательный контроль	1.9156	-1.2
Отрицательный контроль	1.8689	1.2
Положительный контроль	0.1465	92.3

Рекомбинантные антигены SARS-CoV-2

Spike RBD представляет собой фрагмент Arg319-Phe541 поверхности гликопротеина Spike и содержит рецептор-связывающий домен вируса. Он экспрессируется в клетках млекопитающих, его чистота составляет более 95%. Нуклеопротеин – это полноразмерный нуклеокапсид SARS-CoV-2, экспрессируемый в *E. coli*. Чистота белка более 95%.

Рекомбинантный ACE2 человека

Ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) представляет собой рецептор клеточной мембраны, который способствует проникновению SARS-CoV-2 в клетки после привязки домена RBD вируса к рецептору.

Мы предлагаем рекомбинантный человеческий ACE2 (кат. № 8AE5). Белок состоит из внеклеточного домена ACE2 и кристаллизующегося фрагмента иммуноглобулина (Fc-fragment) человеческого IgG1 на С-конце. Он связывается с рекомбинантным RBD и может быть использован в т.ч. в тестах по нейтрализации вирусов.

Антитела к иммуноглобулинам для серологических тестов.

Мы также предлагаем антитела против IgM, IgG и IgA, подходящие для разработки серологических тестов.

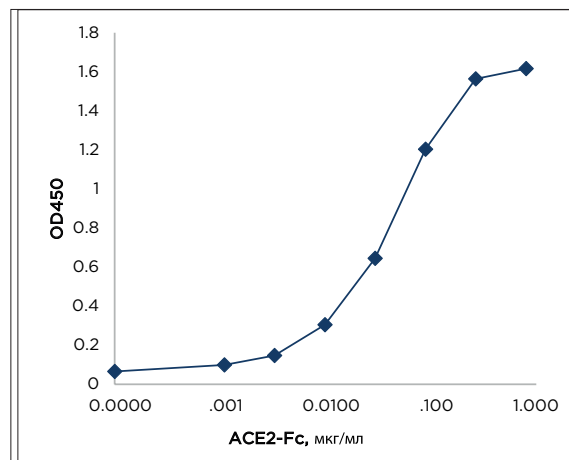


Рисунок 4. Кривая титрования ACE2-Fc показывает связывание с рекомбинантным RBD, нанесенным на лунки микропланшета (1 мкг на лунку).

Информация для заказа

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Имя продукта	Кат. №	Иммунный класс	Специфичность	Примечания
Spike RBD SARS-CoV-2	3CV2	R107	IgG1	ИФА, нейтрализующее антитело
		RBD1106	IgG1	ИФА
		RBD4319	IgG1	ИФА, ИХА, гетерогрибридное антитело крысы-мыши
		RBD5305	IgG1	ИФА, ИХА, рекомбинантное химерное антитело
		RBD5308	IgG1	ИФА, ИХА, рекомбинантное химерное антитело
		RBD5313	IgG1	ИФА, ИХА, рекомбинантное химерное антитело
		RBD5324	IgG1	ИФА, ИХА, рекомбинантное химерное антитело
Нуклеопротеин SARS-CoV-2	3CV4	C706	IgG	ИФА, ИХА, рекомбинантное кроличье антитело
		C715	IgG	ИФА, ИХА, рекомбинантное кроличье антитело
		C518	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ИХА
		C524	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ИХА
		C525	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ИХА
		C527	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ИХА
		NP1510	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ИХА
Иммуноглобулины A (IgA)	1A1cc	3B7cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, РПГА, Fc-фрагмент
		1H9cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, РПГА, Fc-фрагмент
Иммуноглобулины G (IgG)	1G1cc	5A9cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ВБ, ИД, Fc-фрагмент, Рап γ (Сγ 2 домен), нет к/р с IgA, IgM
		3D3cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, ИД, Fc-фрагмент, Рап γ (Сγ 3 домен), нет к/р с IgA, IgM
Иммуноглобулины M (IgM)	1M3cc	2B9cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ВБ, ИФА, FC, μ-цепь, Fc-фрагмент

ПОЛИКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО

Название продукта	Кат. №	Животное-хозяин	Примечания
Нуклеопротеин SARS-CoV-2	PSN5	Коза	ИФА, ИХА

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2)	8AE5	>95%	Рекомбинантный
Нуклеопротеин SARS-CoV-2, рекомбинантный	8COV1	>95%	Рекомбинантный
Spike RBD SARS-CoV-2, рекомбинантный	8COV3	>95%	Рекомбинантный
Фрагмент нуклеопротеина SARS-CoV-2 N47-A173, рекомбинантный	8COV5	>95%	Рекомбинантный