



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37622 (13) A

(51) 6 G01N33/532

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) 1,5-ПІПЕРИДИЛ-3,7-БІС(ДІЕТАНОЛАМІНУ)-ПІРИМІДИЛ ІЗОВАЛЕРІАНАТ, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ**

(21) 2000031385

(22) 10.03.2000

(24) 15.05.2001

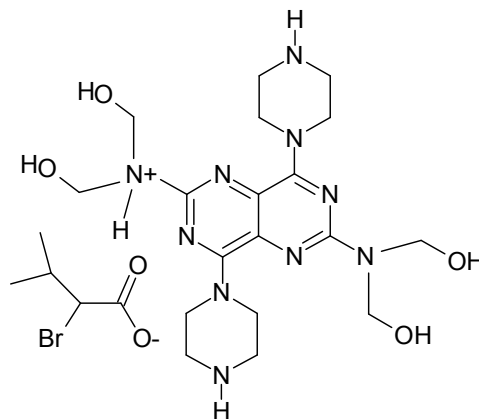
(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Мартинов Артур Вікторович, Бабкін Михайло Валерійович, Прохорятова Олена Валентинівна, Смілянська Майя Володимирівна, Перемот Світлана Дмитрівна, Гадзевич Дмитро Вікторович, Стеценко Олександр Володимирович, Волкова Вікторія Володимирівна, Руденко Максим Володимирович

(73) Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини

(57) 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідил ізовалеріанат із загальною структурною формулою:



що використовується для діагностики вірусних інфекцій.

Винахід відноситься до ветеринарії та медицини, а конкретно - до вірусології, та може бути використаний в діагностиці вірусних інфекцій.

Вірусні хвороби складають більше 90% всієї зареєстрованої інфекційної патології. В системі протиепідемічних лікувально-профілактичних заходів при вірусних захворюваннях головна роль належить лабораторній діагностиці. Тому збільшився інтерес до швидких, точних та простих вірусологічних методів, доступних для використання в практиці.

Методи флуоресцентних зондів та мічених антитіл є чутливими та експресними, але речовини, що використовуються як флюорофори є нестабільними щодо світла, коштовними та токсичними. Найпоширенішим флюорофором до цього часу є флюоресцеїнізотіоціанат (ФІТЦ). Останній залишається стабільним протягом року після кон'югації з антитілами та не змінює спектр флуоресценції після взаємодії. Але цей флюорофор має ряд недоліків: нестабільність на світлі, довгий процес кон'югації, інколи ФІТЦ призводить до втрати антитілами специфічності завдяки утворенню біс-кон'югатів; невеликий квантовий вихід флуоресценції (до 1,2), низький коефіцієнт екстинкції. Окрім того, заряд молекули не дає утворювати різноманітні по співвідношенню кон'югати, тобто співвідношення ФІТЦ та антитіл може бути не більш ніж

3:1. При збільшенні концентрації ФІТЦ, хімічна кон'югація з Fab-частинами антитіл призводить до повної втрати специфічності. Окрім того, ФІТЦ не може бути використаний якості флуоресцентний зонд, тому що він реакційно активний завдяки ізо-тіоціанатній групі [1].

Серед інших речовин, що запатентовані в останній час, також знайдено багато флюорофорів [2, 3, 4, 5]. Але всі вони мають спільні недоліки: нестабільність до світла, складна багатостадійна методика кон'югації, використання коштовних компонентів (платини та ін.) для синтезу флуоресцентної мітки.

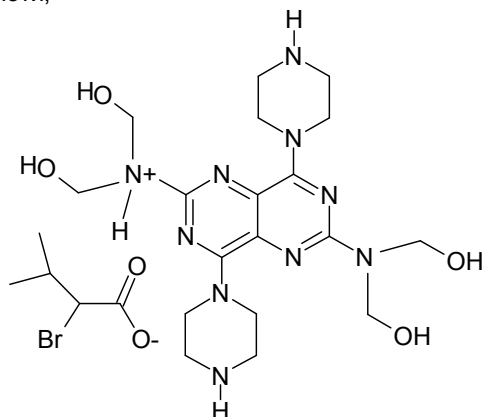
Найближчим аналогом речовини, що патентується, є маркер для люмінесцентного аналізу, що представляє собою порфіриновий комплекс з платиною, який має здатність до флуоресценції та кон'югований з антитілами забарвлює мішені з більшою інтенсивністю [6].

Серед недоліків цієї речовини слід виділити: зміну спектру флуоресценції при утворенні комплексу антиген-антитіло, нестабільність кон'югату щодо світла, складну технологію утворення кон'югатів та неможливість використання цієї речовини в якості флуоресцентного зонду, коштовний синтез завдяки використанню платини як компоненту синтезу, велику молекулярну масу речовини. Останній факт не дає можливості утворювати комплекси

порфірин-антитіло у співвідношенні, більшому ніж 1:1.

В основу винаходу поставлено завдання - шляхом синтезу сполуки досягти: підвищення чутливості люмінесцентного імуноаналізу; зменшення терміну затухання люмінесценції у водному розчині; збільшення чутливості методу та збільшення квантового виходу люмінесценції завдяки використанню новосинтезованої речовини групи піримідинів.

Поставлена задача вирішується синтезом сполуки 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідил ізовалеріанату з - 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідину та 2-бром-ізовалеріанової кислоти,



що використовується для діагностики вірусних інфекцій.

Синтез речовини, що патентується, проводили з - 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідину та 2-бром-ізовалеріанової кислоти.

Приклад 1. - 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідил ізовалеріанат

450 мг (1 моль) 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідину розчиняють у 20 мл метанолу, додають 180 мг (1 моль) метанольного розчину 2-бром-ізовалеріанової кислоти, перемішують на магнітній мішалці на холод до випадання осаду. Потім розчин залишають на добу для випадіння всього осаду. Осад відфільтровують та висушують.

Електронний спектр (етанол), γ -max, $\epsilon \cdot 10^{-3}$ нм, 380,2 (288); 510,3 (18,8); 587,5 (48).

ІЧ-спектр в таблетці калію хлориду, δ , cm^{-1} : 1770 (COO-), 1215 (N=).

Розраховано, %: C 43,8; H 6,08; Br 12,67; N 22,21; O 15,23.

$\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{BrN}_{10}\text{O}_6$.

Знайдено, %: C 43,6; H 6,11; Br 12,69; N 22,22; O 15,19.

Утворення кон'югатів між флюорофором та антитілами проводили з використанням діхлорангідриду глутарової кислоти стандартним методом [7].

Приклад 2

Для визначення специфічності світіння анти-тіл, з'єднаних з флюорофором проводять фарбування тест-об'єктів. Як тест-об'єкти використовують перещеплювану культуру клітин, яку інфікують специфічними та гетерологічними до флуоресціюючих антитіл вірусами, а також використовують інтактні клітини.

Для підготовки тест-об'єктів клітини перещеплюваної культури вирощують у пробірках із скляними пластинами і на фазі 100% формування моношару проводять інфікування вірусами (сем. Birno-viridae, Coronaviridae та Herpesviridae). Після зараження клітин пробірки інкубують у термостаті протягом 30 годин при 38°C.

Скляні пластини з інфікованими та інтактними клітинами через 30 годин культивування виймають з пробірок і після підсушування на повітрі (до повного висихання) фіксують охолодженим ацетоном протягом 20 хвилин.

Скляні пластини з фіксованими клітинами фарбують флуоресціюючими антитілами протягом 30 хвилин у вологій камері при температурі 37°C. Після чого змивають флуоресціюючі антитіла дистильованою водою і промивають в забуференому фізіологічному розчині (pH 7,2-7,4). Після просушування тест-об'єкти досліджують в люмінесцентному мікроскопі у синьо-зеленому спектрі променів. При обліку та оцінці результатів реакції імунофлуоресценції в уражених клітинах, що містять специфічний вірусний антиген (вірус), встановлюють специфічну флуоресценцію. Яку спостерігають у вигляді яскраво-зеленого світіння специфічного антигену в цитоплазмі або в ядрі клітини (залежно від виду вірусу). Уражені клітини виявляють поодинокими або невеликими групами з кольором дифузного світіння від яскраво-зеленого до зелено-жовтого, на фоні ледве помітної архітекtonіки тканини (не уражені клітини).

При постановці реакції імунофлуоресценції з тест-об'єктами, що готують з інтактних клітин та з клітин інфікованих гетерологічними вірусами відносно до флуоресціюючих антитіл, спостерігають відсутність специфічного світіння - ледве профарбовані клітини, що доказує специфічність світіння.

Для визначення активності флуоресціюючих антитіл проводять титрування кон'югатів на тест-об'єктах. Як тест-об'єкти використовують також перещеплювану культуру клітин, яка була вирощена на скляних пластинах в пробірках і інфікована гомологічними до флуоресціюючих імуноглобулінів вірусами. На поверхню фіксованих тест-об'єктів наносять флуоресціюючі імуноглобуліни в двократному розведенні (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64). В подальшому проводять РІФ, як було описано раніше. При проведенні обліку та оцінці отриманих результатів РІФ визначають робочий титр кон'югатів.

Таким чином, 1,5-піперидил-3,7-біс(діетаноламіну)-піримідил ізовалеріанат є маркером, який забезпечує підвищення чутливості люмінесцентного імуноаналізу, зменшує термін затухання люмінесценції у водному розчині та збільшує квантовий вихід люмінесценції. Окрім того, речовина є стабільною до світла та окислення.

Відповідно, використання цієї речовини є економічно вигіднішим ніж використання ФІТЦ.

Реагент буде використаний в імуноаналізі як люмінесцентний маркер антигенів та антитіл.

Джерела інформації

1. Антитела. Методы: Кн. 2 / Под ред. Д. Кэтти. - М.: Мир, 1991. - С. 273-274.

2. Patent WO 92/06378. - Self-assembling fluorescent diagnostic agents. - Murashige K et al. GO1N33/53, A61K 49/00.

3. Патент СССР; № 4413962/28-14 от 20.04.88
Способ получения флуоресцентно меченых
антител.

4. Иммунологические методы исследований /
Под ред. И. Лефковитса, Б. Пернуса. - М.: Мир,
1988. - С. 332-334.

5. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Соловьев Б.В.
и др. Методы лабораторной диагностики вирусных

болезней животных. - М.: Агропромиздат, 1986. -
С. 177-198.

6. Патент СССР № 4813086/13 от 23.01.1992,
заявка от 10.04.1990, C07D487/22, C09B47/00,
G01N33/54. Маркер для люминисцентного имму-
ноанализа // Н.С. Осин, В.Д. Румянцева, Е.Ю. Про-
шина, А.Ф. Миронов.

7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Спра-
вочник биохимика. - М.: Мир, 1991. - 544 с.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60х84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22
