УКРАЇНА

(19) UA (11) 51220 (13) U

(51) МПК (2009)
G01N 33/53
A61K 39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під відповідальність власника патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КЛАТРАТНИХ КОМПЛЕКСІВ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ З НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНИМИ РЕЧОВИНАМИ

(21) u200913496
(22) 24.12.2009
(24) 12.07.2010
(46) 12.07.2010, Бюл.№ 13, 2010 р.
(72) СМІЛЯНСЬКА МАЙЯ ВОЛОДИМИРІВНА, ПЕРЕМОТ СВІТЛАНА ДМИТРІВНА, МАРТИНОВ АРТУР ВІКТОРОВИЧ, КАШПУР НАТАЛІЯ ВАЛЕРІЇВНА, ВОЛЯНСЬКИЙ АНДРІЙ ЮРІЄВИЧ, РОМАНОВА ОЛЕНА АНАТОЛІЇВНА, ІГУМНОВА НАТАЛІЯ ІВАНІВНА, СИДОРЕНКО ТАТЯНА АДІКОВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб отримання клатратних імуноглобулінів з низькомолекулярними речовинами, який **відрізняється** тим, що суміш імуноглобулінів та низькомолекулярної речовини піддають п'ятикратному заморожуванню і розморожуванню, після чого ліофілізують.

Корисна модель належить до біоорганічної хімії та може бути використана для одержання діагностичних засобів, що містять антитіла в якості носія, який забезпечує селективне накопичення активної речовини в сайті біоспецифічного зв'язування. Зокрема, 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 мічених антитіл є чутливими та експресними, але речовини, що використовуються як флюорофори є нестабільними щодо світла, коштовними та токсичними. Найпоширеніший флюорофором до цього часу с флюороресцеїнізотіоцианат (ФІТЦ). Він залишається стабільним протягом року після кон'югації з антитілами та не змінює спектр флюоресценції після взаємодії. Але інколи ФІТЦ призводить до втрати антитілами специфічності завдяки утворенню біскон'югатів. Окрім того. заряд молекули не дає утворити різноманітні по співвідношенню кон'югати, тобто співвідношення ФІТЦ та антитіл може бути не більше ніж 3:1. При збільшенні концентрації ФІТЦ, хімічна кон'югація з Fab-частинами антитіл призводить до повної втрати специфічності [1, 2].

Найближчим аналогом є метод отримання флуоресцентних антитіл альдегідною кон'югацією з хелатними комплексами рідкоземельних металів. Хелатні комплекси (хлорофіли та ін.) містять альдегідну групу, яка утворює азометани з епсілон-аміногрупами імуноглобулінів [1, 3].

Недоліками даного методу є те, що введення хелатного комплексу призводить до інактивації Fab-частини антитіла та часткової втрати селективності цими антитілами. Окрім цього, метод є дуже коштовним, бо потребує осадження флуоресцентних антитіл після реакції сульфатом амонію, очистки від вільного хелатного комплексу та вільних антитіл.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб отримання клатратних комплексів імуноглобулінів з флюороресцеїнізотіоцианатом (ФІТЦ), в якому шляхом створення кон'югату без ковалентного зв'язку забезпечується збереження третинної структури антитіла, його специфічності, підвищення чутливості люмінесцентного аналізу.

Поставлена задача вирішується шляхом п'ятикратного заморожування - розморожування водної суміші антитіл з ФІТЦ. Антитіла та ФІТЦ не мають ковалентних зв'язків в утвореному клатратному комплексі. Антитіла мають гідрофобні області. При заморожуванні відтаюванні ФІТЦ потрапляють в гідрофобні зони білку завдяки утво-

(19) UA (11) 51220 (13) U

ренню іонних зв'язків, де щільно розташовуються при наступному заморожуванні. При цьому зберігається специфічність антитіл та флуоресцентні властивості ФІТЦ.

Можливість здійснення корисної моделі та вплив суттєвих ознак рішення, що заявляється, на отримуваний технічний результат ілюструється наступними прикладами.

Отримання клатратних комплексів. 0,1моль ФІТЦ розчиняють у 50мл 0,9% розчину натрію хлориду, там же розчиняють 0,5мл ліофілізованих імуноглобулінів діагностичних антивидових проти імуноглобулінів людини. Отриману суміш фільтрують через мембранний фільтр з метою стерилізації. Потім заморожують до -25°С та розморожують при 35,5°С у термостаті. Процедуру заморожування-розморожування повторяють іще 4 рази.

В експерименті для вибору оптимальної кількості заморожувань суміш антитіл діагностичних антивидових проти імуноглобулінів людини та ФІТЦ у кон'югації, отриманої способом, що пропонується, вивчали інтенсивність флюоресценції у порівнянні з контролем на приладі ФМЕЛ-1 [4]. Інтенсивність вимірювали у мВ та виражали в умовних одиницях флюоресценції (УОФ) F, де $F = \overline{F} / \overline{F}_{ф}, \overline{F}$ - середнє значення інтенсивності флюоресценції 10 клітин; $\overline{F}_{ф}$ - середнє значення інтенсивності флюоресценції фону. У якості контролю використовували імуноглобуліни діагностичні флюоресциюючі антивидові проти імуноглобулінів людини (виробник НІІЕМ ім. Н.Ф.Гамалеї). Отриманні показники приведенні у таблиці 1.

Таблиця 1

Інтенсивність флюоресценції клатратних комплексів (F)

Кількість заморожувань								Контроль
	0	1	2	3	4	5	6	
Інтенсивність флюоресценції F (УОФ)	1,86	1,91	1,94	1,98	2,5	2,9	1,35	2,7

Визначення активності клатратних кон'югатів. Для визначення активності клатратних кон'югатів проводять титрування на інфекційному матеріалі, в якому наявність маркерів вірусів встановлена реакцією імунофлюоресценції та полімеразноцепною реакцією за допомогою стандартних комерційних діагностикумів. Реакцію непрямої імунофлюоресценції (РНІФ) проводять за стандартною методикою, клатратні кон'югати використовують в двократному розведенні (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256). В якості специфічних сироваток використовували поліклональні антитіла проти Herpes simplex virus-1, Cytomegalovirus, Trichomonas vaginalis фірми Santa Cruz Biotechnology, Inc. Дослідження проводять за стандартною схемою постановки РНІФ [5]. Для порівняння використовують імуноглобуліни діагностичні флюоресциюючі антивидові проти імуноглобулінів людини (виробник НІІЕМ ім. Н.Ф.Гамалеї). При проведенні обліку та оцінці результатів РНІФ визначають робочий титр кон'югатів, який склав 1:128, тоді як робочий титр стандартних діагностичних імуноглобу-лінів - 1:64.

Визначення специфічності клатратних кон'югатів. Для визначення специфічності клотратних кон'югатів проводять дослідження інфекційного матеріалу. Порівняльні дослідження проводять використовуючи стандартні комерційні тест-системи (виробник 000 "БТК ЛАБдиагностика").

В якості специфічних сироваток використовували поліклональні антитіла проти Herpes simplex virus-1, Cytomegalovirus, Trichomonas vaginalis фірми Santa Cruz Biotechnology, Inc. Дослідження проводять за стандартною схемою постановки РНІФ [5].

Таблиця 2

Детекція інфекційних агентів за допомогою клатратних комплексів

	Відсоток виявляємості (%)	
	Клатратні кон'югати	Стандартні діагностичні імуноглобуліни
Herpes simplex virus	87±1,9	83±1,8
Cytomegalovirus	89±2,0	87±1,9
Trichomonas vaginalis	82±1,7	76±1,5

Таким чином, клатратні комплекси імуноглобулінів з флюорореcцеїнізотіоцианатом (ФІТЦ) підвищує чутливість люмінесцентного аналіза. Окрім того, речовина є стабільною до світла та окислення.

Відповідно, використання цього комплексу є економічно вигідно.

Джерела інформації:

1. Патент США №4341957:(G01N 021/64; G09K 003/00); Композиція антитіл, що флюоресцюють для імунофлуоресцентних реакцій.// Benz; William H.; Schneck, Jr.; Thomas; Dixon; Harold A.;

2. Патент США №5877310: (C07H 021/02; C07H 017/08; 007H 021/04;

G01N 033/53); Конюговані з флуоресцентною міткою полісахаридні реагенти.// Nixon & Vanderhye; Higel; Floyd D.

3. Патент США №3853987 (A61K 027/04; G01N 031/22;) Імунологічний реагент для радіоімунної проби.// Haefliger; William W.; Padgett; Benjamin R.;

4. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М.: Наука, 1980. - 320с.

5. Гирін В.М., Порохницький В.Г., Вороненке С.Г. Посібник з медичної вірусології. К.: Здоровя, 1995. - 368с.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко Підписне Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601