



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **87138**

(13) **U**

(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 09091**

(22) Дата подання заявки: **19.07.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.01.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.01.2014, Бюл.№ 2**

(72) Винахідник(и):

**Стегній Борис Тимофійович (UA),
Михайлова Світлана Анатоліївна (UA),
Попова Олена Миколаївна (UA),
Коваленко Лариса Володимирівна (UA),
Куцан Олександр Тихонович (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОН'ЮГАТІВ ГАПТЕН-БІЛОК

(57) Реферат:

Спосіб одержання кон'югатів гаптен-білок включає спільну реакцію білка-носія (бичачого сироваткового альбуміну) і гаптена (зеараленон) в лужному розчині боратного буфера. Проводять безпосереднє ковалентне зв'язування активних альдегідних груп молекули токсину з аміногрупами білка-носія. Як зшивний реагент використовують активні альдегідні групи глютарового альдегіду без додавання спеціальних стабілізаторів і без використання ацилювання ангідридами двоосновних кислот, карбоксиметилювання амінооцтовою кислотою та каталітичною гідратацією.

UA 87138 U

Корисна модель належить до біохімії, а саме до способів синтезу речовин, що використовуються для отримання кон'югатів (білок-фермент, білок-гаптен) за імуноаналізом антитіл у імуоферментній реакції. Для високочутливих методів ІФА необхідні кон'югати (білок-фермент, білок-гаптен), де білок зберігає імунологічну активність для подальшого його використання. З реакційного розчину кон'югати відділяють діалізом або гел'фільтрацією, іноді використовують афінну хроматографію.

Відомі способи синтезу кон'югатів гаптен-білок за основою реакції вільних альдегідних груп гаптена з вільними аміногрупами білка (И.Е. Ковалев, О.Ю. Полевая. Биохимические методы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. М., 1985, с. 14-21). Недоліком способу є довготривалість, багатостадійність та трудомісткість.

Існує спосіб одержання кон'югатів фермент-білок за методом Накане (Теория и практика иммуноферментного анализа, М., 1991, с. 182-183; Цей метод одержання кон'югатів фермент-білок здійснюється (за лужними умовами) при додаванні до розчину білка-носія розчинів гаптена та глютарового альдегіду. Одержаний продукт діалізують і обробляють стабілізатором (боргідрід натрію). Недоліком способу є довготривалість, багатостадійність та трудомісткість.

Найбільш близьким аналогом до запропонованого способу є спосіб одержання кон'югата гаптен-білок (Патент РФ № 2141114, МПК G01N33/50, Способ получения конъюгата гаптен-белок). Цей спосіб здійснюється при проведенні спільної реакції гаптена і білка-носія в лужному розчині і відновлення кон'югату в реакційному розчині з додаванням боргідріда натрію в присутності сполуки, блокуючого утворення нерозчинної полімерної фракції, при молярному співвідношенні білка і блокуючого з'єднання 1:100-1:1000 відповідно. При цьому як блокуючий розчин пропонується використовувати сполуку, взятую з групи похідні іодооцтової кислоти, похідні акрилової кислоти, ненасичені похідні гетероциклічних сполук, циклічні іміни, оксирани.

Недоліком способу є зменшення імунологічної активності білка за рахунок відновлення дисульфідних зв'язків у білку-носії з утворенням тіолових груп, а також довготривалість, багатостадійність та трудомісткість.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання кон'югатів гаптен-білок, що дозволить швидко одержати добре розчинні кон'югати гаптен-білок при мінімальній кількості полімерних продуктів.

Поставлена задача вирішується у запропонованому способі, що включає спільну реакцію білка-носія (бичачого сироваткового альбуміну) і гаптена (зеараленон) в лужному розчині 0,1 М боратного буфера (при рН 8,1-8,3) шляхом безпосереднього ковалентного зв'язування активних альдегідних груп молекули токсину з аміногрупами білка-носія та використання як зшивного реагента - активних альдегідних груп 10 % глютарового альдегіду, без додавання спеціальних стабілізаторів і без використання ацилювання ангідридами двоосновних кислот, карбоксиметилування амінооцтовою кислотою та каталітичною гідратацією, щоб забезпечити ефективність способу.

Порівняльний аналіз з найближчим аналогом дозволяє зробити висновок, що безпосереднє ковалентне зв'язування молекули токсину з білком-носієм при використанні активних альдегідних груп глютарового альдегіду забезпечує одержання стійких та добре розчинних кон'югатів гаптен-білок, що містять мінімальні кількості полімерних продуктів, стійкі без спеціальних стабілізаторів. Спосіб дозволяє швидко одержати добре розчинні кон'югати гаптен-білок, що містять мінімальні кількості полімерних продуктів, стійкі без спеціальних стабілізаторів і без використання ацилювання ангідридами двоосновних кислот, карбоксиметилування амінооцтовою кислотою та каталітичною гідратацією.

Спосіб виконують таким чином.

Для отримання кон'югата до розчину білка-носія (за лужними умовами) додають розчин гаптена, що має активні альдегідні групи з подальшим використанням альдегідних груп глютарового альдегіду. Через 1-3 години утворюється стійкий кон'югат з ковалентними зв'язками між аміногрупами білка і альдегідними групами гаптена і глютарового альдегіду.

Приклад 1. Для отримання кон'югату гаптен-білок: до розчину БСА (13 мг бичачого сироваткового альбуміну у 63,0 мл 0,1 М боратного буфера при рН 8,2) додавали по краплях, при перемішуванні і охолодженні, 0,47 мл зеараленону (3 мг зеараленону в 0,47 мл ацетону) і потім 6,3 мл 10 % глютарового альдегіду. Після двогодинного перемішування за температури 4° проводять діаліз проти 0,1 М боратного буфера і одержують стійкий кон'югат гаптен-білок. Зберігають розчин кон'югата за температури 20 °С, як мінімум протягом півроку.

Приклад 2. Аналогічно прикладу 1, але з використанням 10 мг БСА, отримують кон'югат, за властивостями аналогічний кон'югату прикладу 1 (10 мг бичачого сироваткового альбуміну у 50,0 мл 0,1 М боратного буфера при рН 8,2) додають по краплях, при перемішуванні і охолодженні, 0,47 мл зеараленону (3 мг зеараленону в 0,47 мл ацетону) і потім 5,0 мл 10 % глютарового

альдегіду. Після двогодинного перемішування за температури 4 °С проводять діаліз проти 0,1 М боратного буфера і одержують стійкий кон'югат гаптен-білок. Зберігають розчин кон'югата за температури -20 °С, як мінімум протягом півроку.

5 Таким чином, отриманий зазначеним способом кон'югат гаптен-білок являє собою стійкий та добре розчинений кон'югат гаптен-білок, який містить мінімальні кількості полімерних продуктів, стійкий без спеціальних стабілізаторів і без використання ацилювання ангідридами двоосновних кислот, карбоксиметилування амінооцтовою кислотою та каталітичною гідратацією. Запропонований спосіб можна використовувати в біохімічних лабораторіях науково-дослідних установ.

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання кон'югатів гаптен-білок, що включає спільну реакцію білка-носія (бичачого сироваткового альбуміну) і гаптена (зеараленон) в лужному розчині 0,1 М боратного буфера (при рН 8,1-8,3), який **відрізняється** тим, що проводять безпосереднє ковалентне зв'язування активних альдегідних груп молекули токсину з аміногрупами білка-носія, як зшивний реагент використовують активні альдегідні групи 10 % глютарового альдегіду без додавання спеціальних стабілізаторів і без використання ацилювання ангідридами двоосновних кислот, карбоксиметилування амінооцтовою кислотою та каталітичною гідратацією.

20

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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