



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69284** (13) **U**
(51) МПК
A61K 39/44 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 11736**
(22) Дата подання заявки: **05.10.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.04.2012**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.04.2012, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):
Комісаренко Сергій Васильович (UA),
Луговської Едуард Віталійович (UA),
Колеснікова Ірина Миколаївна (UA),
Співак Микола Якович (UA),
Гриценко Павло Григорович (UA),
Ганова Лариса Олександрівна (UA),
Луговська Наталія Едуардівна (UA),
Литвинова Людмила Михайлівна (UA),
Ляшко Катерина Дмитрівна (UA),
Костюченко Олена Петрівна (UA),
Позняк Тетяна Анатоліївна (UA),
Гоголинська Генрієтта Казимирівна (UA),
Ковтонюк Галина Володимирівна (UA),
Терещенко Михайло Іванович (UA)

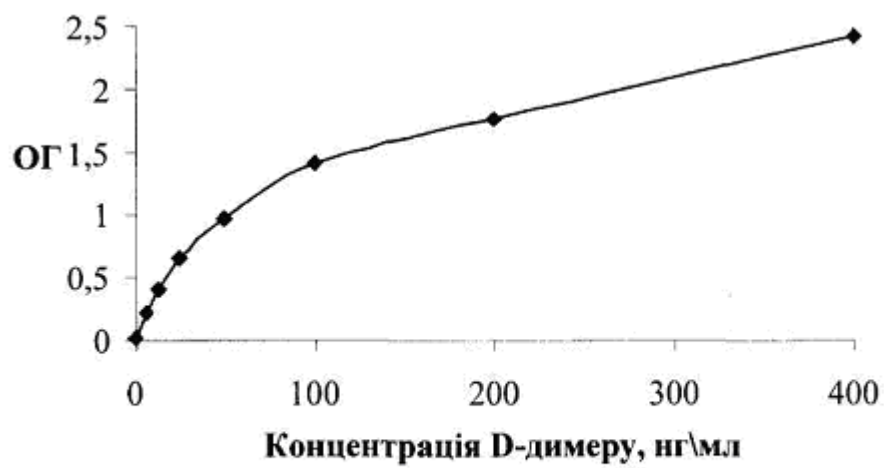
(73) Власник(и):
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA),
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ
ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. акад. Заболотного, 154, м. Київ, 03143 (UA)

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ІМУНОФЕРМЕНТНА ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ D-ДИМЕРУ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Тест-система імуноферментна для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини методом бісайтового твердофазного імуноферментного аналізу, що включає імуносорбент, кон'югат моноклональних антитіл із біотином та набір реагентів для імуноферментного аналізу. Імуносорбент і кон'югат з біотином виготовляють на основі власних моноклональних антитіл III-3b та II-4d.

UA 69284 U



Корисна модель належить до біотехнології, імунохімії та медицини і може бути використана для визначення методом бісайтового твердофазного імуноферментного аналізу (т-ІФА) кількості D-димеру (основного молекулярного маркера утворення й руйнування тромбу) в плазмі крові людини з метою діагностики стану системи гемостазу.

За останній час в Україні різко зросла смертність від серцево-судинних захворювань, викликаних патологічним тромбоутворенням. Насамперед, це такі тяжкі хвороби, як інфаркт міокарда, ішемічний інсульт головного мозку, тромбоемболія легеневих артерій та інші. Для своєчасного виявлення наявності або утворення тромбу в кров'яному руслі суттєве значення належить визначенню в плазмі крові одного з основних молекулярних маркерів системи гемостазу - D-димеру [1, 2]. D-димер - найбільший кінцевий продукт плазмінового розщеплення фібрину, стабілізованого фактором XIIIa, включає два D-домени двох молекул фібрину, сполучених між собою ізопептидними зв'язками (A α 105-206, B β 134-461, γ 63-411)₂ [2]. У здорових донорів 18-22 років концентрація D-димеру в плазмі крові варіює в діапазоні 0-100 нг/мл. З віком рівень D-димеру може підвищуватися. Головне діагностичне значення D-димеру полягає в наступному. Якщо концентрація D-димеру в плазмі крові людини не перевищує пороговий рівень 500 нг/мл, то це майже на 98-100 % дозволяє виключити такі діагнози, як тромбоз глибоких вен і тромбоемболія легеневих артерій [3, 4]. Підвищена концентрація D-димеру може мати місце при названих вище діагнозах, а також при інфаркті міокарда, ішемічному інсульті головного мозку, ДВЗ-синдромі, цукровому діабеті, післяопераційних станах, онкологічних захворюваннях та інших патологіях і вказувати на підвищену активність системи зсідання крові або на наявність чи утворення в кров'яному руслі твердофазного фібрину, який складає каркас тромбу.

D-димер у плазмі крові визначають за допомогою імунохімічних методів із використанням D-димер-специфічних моноклональних антитіл [5].

В Україні та в країнах СНД немає жодної імунохімічної тест-системи вітчизняного виробництва для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини.

Відома тест-система для кількісного визначення D-димеру - набір «TECHNOZYM D-Dimer ELISA» (Technoclone GmbH, Austria) [6], заснованого на методі бісайтового т-ІФА, в якому моноклональні антитіла, специфічні до D-димеру, використані в складі імуносорбенту та пероксидазного кон'югату. Проте ця система розроблена для експериментальних науково-дослідних робіт і, до того ж, її вартість досить висока.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлена задача створити високочутливу специфічну тест-систему імуноферментну для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини на основі специфічних моноклональних антитіл вітчизняного виробництва.

Поставлену задачу вирішують шляхом застосування одержаних в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України моноклональних антитіл, що з високою специфічністю та афінністю реагують із D-димером [7, 8] та не реагують із фібриногеном і фібрином людини [7]. Принцип аналізу в тест-системі, що заявляється, базується на методі бісайтового т-ІФА з використанням комплексу біотин-стрептавідин-пероксидаза для підсилення сигналу, причому тест-система визначає D-димер як у вільному стані, так і в складі олігомерних продуктів розщеплення твердофазного фібрину плазміном.

Суть корисної моделі полягає в створенні тест-системи імуноферментної, де в складі імуносорбенту використовуються одержані в Інституті біохімії НАН України високоспецифічні до D-димеру моноклональні антитіла III-3В, епітоп для яких знаходиться в N-кінцевій ділянці β -ланцюга D-димеру [7, 9], а в складі кон'югату з біотином - одержані також в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України моноклональні антитіла II-4d, епітоп для яких знаходиться в іншому сайті D-домена фібрин(оген)у людини [8, 10]. Відсутність перехресної реакції моноклональних антитіл III-3В, що входять до складу імуносорбенту, з фібриногеном і фібрином забезпечує високу специфічність тест-системи, що заявляється. Перехресна реакція моноклональних антитіл II-4d з фібрин(оген)ом не заважає визначенню D-димеру в досліджуваній плазмі крові людини, оскільки з імуносорбентом фібрин(оген) не зв'язується. Для збільшення чутливості тест-системи застосовують комплекс біотин-стрептавідин-пероксидаза, який підсилює сигнал.

Тест-систему імуноферментну, що заявляється, використовують наступним чином.

Приклад 1. Визначення кількості D-димеру в плазмі крові хворого А. з геморагічними ускладненнями відразу після проведення операції та на третю добу після нього.

Визначення проводять згідно з методикою, заснованою на т-ІФА [11, 12]. Для цього ліофілізований калібратор розчиняють в 200 мкл буферного розчину для розведення досліджуваних зразків. Після чого 100 мкл розведеного калібратора вносять до першої лунки 1-го ряду імуносорбенту та далі титрують його двократно (в семи лунках) до кінця ряду в об'ємі

100 мкл в розчині для розведення досліджуваних зразків. У лунку з 90 мкл розчину для розведення досліджуваних зразків додають 10 мкл зразка плазми хворого (досліджуваний зразок аналізують у двох повторях). Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 37 °С протягом 30 хв. При цьому D-димер зв'язується з моноклональними антитілами адсорбованими на твердій фазі, утворюючи комплекс антиген-антитіло. Після шестикратного відмивання планшету до лунок додають по 100 мкл біотинильованого кон'югату моноклональних антитіл II-4d та інкубують при температурі 37 °С протягом 15 хв. Після шестикратного відмивання у лунки додають по 100 мкл розчину стрептавідину, міченого пероксидазою. Планшет інкубують при температурі 18-22 °С протягом 15 хв. Потім планшет відмивають шість разів, додають до лунок по 100 мкл розчину проявника (субстрат і хромоген) та інкубують при температурі 18-22 °С у темряві протягом 30 хв. Зупиняють розвиток кольорової реакції додаванням до всіх проб по 100 мкл стоп-реагенту. Не більш як через 5 хв. після зупинки кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) в лунках у двохвильовому режимі (450 нм і 620 нм) за допомогою спектрофотометра. Оптична густина суміші в лунках прямо пропорційна концентрації D-димеру в зразках плазми крові. Результат кількісного аналізу D-димеру в досліджуваному зразку плазми розраховують за калібрувальною кривою, при побудові якої на осі X відкладають значення концентрації D-димеру в нг/мл, а на осі Y - відповідні їм значення ОГ, які отримано в т-ІФА (фіг.). Для розрахунку кількості D-димеру в нг/мл у досліджуваному зразку плазми крові людини, значення концентрації D-димеру, яке отримано за калібрувальною кривою, множать на 10.

Плазма крові хворого А. містить D-димер у концентраціях: відразу після операції - 1766,4 нг/мл, через 3 доби після операції - 241 нг/мл.

Приклад 2. Визначення кількості D-димеру в плазмі крові хворого В. з тромбозом глибоких вен нижніх кінцівок і тазу до операції та через 1 місяць після операції.

Аналіз проводять аналогічно прикладу 1.

Плазма крові хворого В. містить D-димер у концентраціях: до операції - 771,2 нг/мл, через 1 місяць після операції - 435,2 нг/мл.

Приклад 3. Визначення кількості D-димеру в 18 зразках плазми крові здорових донорів.

Аналіз проводять аналогічно прикладу 1.

Кількість D-димеру в дослідженому матеріалі від здорових донорів не перевищує значень норми та в усіх 18 зразках становить (в середньому) менше 100 нг/мл (креслення).

Перевагами тест-системи імуноферментної, що заявляється, є:

- використання високоспецифічних до D-димеру моноклональних антитіл III-3В власного виробництва;

- висока чутливість бісайтового т-ІФА методу визначення D-димеру в плазмі крові людини з використанням тест-системи, що заявляється;

- автоматичне кількісне визначення D-димеру;

- стабільність імуносорбента при зберіганні;

- швидке виконання аналізу;

- простота та надійність в роботі.

Таким чином, тест-система, що заявляється, забезпечує швидке кількісне визначення в плазмі крові людини D-димеру - основного молекулярного маркера утворення та руйнування розчинного олігомерного фібрину та/або твердофазного фібринового каркасу тромбу, що має суттєве значення для діагностики стану системи гемостазу, своєчасного виявлення передтромботичних та тромботичних станів та діагностики таких захворювань, як тромбоемболія легеневих артерій і тромбоз глибоких вен. Одночасне визначення концентрації D-димеру та розчинного фібрину в динаміці є одним із обов'язкових критеріїв моніторингу стану системи зсідання крові хворих на серцево-судинні захворювання, післяопераційних хворих, а також ефективності антитромботичної та фібринолітичної терапії.

Джерела інформації:

1. Walker J. B. The molecular weights, mass distribution, chain composition and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin / J. B. Walker, M. E. Nesheim // J. Biol. Chem. -1999. - V. 274, № 8. - P. 5201-5212.

2. Луговской Э.В. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза - Киев: Наукова думка. - 2003. - 220 с.

3. Structure of the fibrin protofibril / W.E. Fowler., R.R. Hantgan, J. Hermans [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1981. - V. 78, № 8. - P. 4872-4876.

4. Biochemical markers for the diagnosis of venous thromboembolism: the past, present and future. / G. Lippi, G. Cervellin, M. Franchini [et al.] // J. Thromb. Thrombolysis. - 2010. - Mar 6. [Epub ahead of print].

5. Молекулярный состав растворимого фибрина и продуктов расщепления фибрина. Методы их количественного определения / Э.В. Луговской, П.Г. Гриценко, Н.Э. Луговская, И.Н. Колесникова, С.В. Комисаренко // Трансфузиология и гематология. - 2006. - № 5. - С. 39-43.

6. Инструкция по применению тест-системы «TECHNOZYM D-Dimer ELISA» (Technoclone GmbH, Austria). - 2006. - 4 с.

7. Пат. 73823 UA. - Опубл. 15.09.2005, Бюл. № 9.

8. Пат. 73232 UA. - Опубл. 15.06.2005, Бюл. № 6

9. A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin / E.V. Lugovskoy, I.N. Kolesnikova, P.G. Gritsenko, E.N. Zolotareva, P. Gaffney, W. Nieuwenhuizen, S. V. Komisarenko // Thromb. Res. - 2002. - 107, № 3-4. - P. 151-156.

10. Two monoclonal antibodies to D-dimer-specific inhibitors of fibrin polymerization / E.V. Lugovskoy, P.G. Gritsenko, I.N. Kolesnikova, E.N. Zolotarova, V.I. Chernishov, W. Nieuwenhuizen, S.V. Komisarenko // Thromb. Res.-2004.-113, № 3-4.-P. 251-259.

11. Співак М.Я. «Практичний посібник з імуноферментного аналізу» // Київ: Полімед. - 2003. - 48 с.

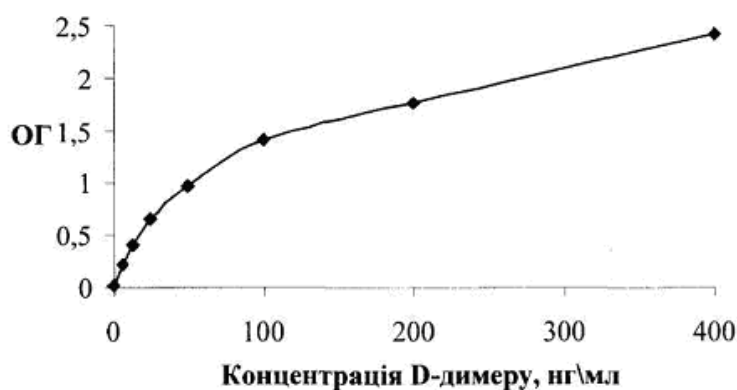
12. Количественное определение D-димера и растворимого фибрина в плазме крови человека при ишемической болезни сердца и гипертонической болезни / Э.В. Луговской, И.Н. Колесникова, Н.Э. Луговская, Л.М. Литвинова, П.Г. Гриценко, Г.К. Гоголинская, Е. Д. Ляшко, Е.П. Костюченко, Г.А. Ремизовский, В.Н. Педченко, С.В. Комисаренко // Укр. биохим. журн. - 2004. - 76, № 6. - С. 136-141.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Тест-система імуноферментна для кількісного визначення D-димеру в плазмі крові людини методом бісайтового твердофазного імуноферментного аналізу, що включає імуносорбент, кон'югат моноклональних антитіл із біотином та набір реагентів для імуноферментного аналізу, яка **відрізняється** тим, що імуносорбент і кон'югат з біотином виготовляють на основі власних моноклональних антитіл III-3b та II-4d.

2. Тест-система імуноферментна за п. 1, яка **відрізняється** тим, що моноклональні антитіла III-3b, які входять до складу імуносорбенту, з високою специфічністю та афінністю реагують із D-димером як у вільному стані, так і з D-димером у складі олігомерних продуктів розщеплення твердофазного фібрину плазміном без перехресної реакції з фібриногеном і фібрином.

3. Тест-система імуноферментна за п. 1, яка **відрізняється** тим, що до складу кон'югату з біотином входять моноклональні антитіла II-4d, які з високою афінністю реагують із D-димером і не конкурують із моноклональними антитілами III-3b за місце зв'язування на антигені.



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