



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 231 366** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 51/08, G 01 N 33/569**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2002113997/14, 29.05.2002
(24) Дата начала действия патента: 29.05.2002
(43) Дата публикации заявки: 20.12.2003
(46) Дата публикации: 27.06.2004
(56) Ссылки: **Иммунологические методы**. /Под ред. М. ФРИМЕЛЯ. - М.: Мир, 1978. RU 2092853 C1, 10.10.1997. RU 2142807 C1, 20.12.1999. US 4489158 A, 18.12.1984.
(98) Адрес для переписки:
119991, Москва, ул. Косыгина, 4, ИБХФ РАН

(72) Изобретатель: **Леонова В.Б. (RU), Розенфельд М.А. (RU)**
(73) Патентообладатель:
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (RU)

(54) ИММУНОДИАГНОСТИКУМ НА ОСНОВЕ ПОЛИСТИРОЛЬНОГО ЛАТЕКСА

(57)
Изобретение относится к области медицины, в частности к средствам экспресс-диагностики широкого спектра заболеваний, и представляет собой иммунодиагностикум на основе модифицированного полистирольного латекса, содержащий балластный белок для насыщения вакантных центров связывания, при этом содержит в качестве балластного белка α -казеин коровьего молока в равных объемах с модифицированным полистирольным латексом при концентрации α -казеина 0,4 мг/мл на основе модифицированного полистирольного латекса, содержащего в качестве балластного

белка α -казеин коровьего молока. Данный иммунодиагностикум характеризуется пролонгированным сроком годности и высокой чувствительностью, позволяющей проводить определения в разбавленных пробах, что препятствует возникновению неспецифической агглютинации и обеспечивает получение достоверных результатов. В зависимости от природы иммобилизованного на поверхности латекса специфического белка может быть получен широкий спектр диагностикумов, предназначенных, например, для количественного определения продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ) и ревматоидного фактора (R_f) в сыворотке и в плазме крови человека. 5 табл.

RU 2 231 366 C2

RU 2 231 366 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 231 366** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 51/08, G 01 N 33/569**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002113997/14, 29.05.2002
(24) Effective date for property rights: 29.05.2002
(43) Application published: 20.12.2003
(46) Date of publication: 27.06.2004
(98) Mail address:
119991, Moskva, ul. Kosygina, 4, IBKhF RAN

(72) Inventor: Leonova V.B. (RU),
Rozenfel'd M.A. (RU)
(73) Proprietor:
Institut biokhimicheskoy fiziki im. N.M.
Ehmanuehlja RAN (RU)

(54) **POLYSTYRENE LATEX-BASE IMMUNODIAGNOSTICUM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to agents used for express-diagnosis of the broad spectrum of diseases and represents immunodiagnosticum based on modified polystyrene latex that comprises cow milk α -casein as an inert protein for saturation of vacant binding centers. Immunodiagnosticum comprises cow milk α -casein as an inert protein taken in the equal volume with modified polystyrene latex in the concentration of α -casein 0.4 mg/ml. This immunodiagnosticum shows the

prolonged time fitness and high sensitivity that provides carrying out assay in diluted samples that inhibits arising nonspecific agglutination and preparing reliable results. Depending on the nature of specific protein immobilized on the latex surface the broad spectrum of diagnostica can be obtained that are designated for quantitative determination of fibrin/fibrinogen degradation products and rheumatic factor (R_f) in human serum and plasma blood.

EFFECT: valuable medicinal properties of immunodiagnosticum.

5 tbl

RU 2 2 3 1 3 6 6 C 2

RU 2 2 3 1 3 6 6 C 2

Изобретение относится к медицине, а именно к средствам экспресс-диагностики широкого спектра заболеваний, основанным на реакции агглютинации полистирольного латекса.

Иммунолатексные диагностикумы широко используются в клинико-лабораторной практике, так как они характеризуются высокой чувствительностью, строгой специфичностью, простотой выполнения анализа, быстрой получением результата [1].

Диагностика основана на количественном определении в биологических жидкостях (кровь, моча, цереброспинальная жидкость) белков-маркеров (антител, бактериальных антигенов, белков острой фазы и т.д.), содержание которых изменяется при возникновении и развитии тех или иных заболеваний. Белки-маркеры избирательно взаимодействуют с иммобилизованными на полимерную матрицу специфическими белками (антителами или антигенами), что приводит к наглядному склеиванию (агглютинации) полимерного носителя. В качестве полимерного носителя используют сферические частицы полистирольного латекса, поверхность которых для достижения более надежной адсорбции белков модифицируют различными химическими группами, например карбоксилируют [2]. При получении диагностикума после иммобилизации специфического белка на полимер на поверхности полистироловых частиц остаются вакантные центры связывания, которые необходимо заполнить балластным белком для обеспечения строгой специфичности определения. Обычно в качестве балластного белка используют бычий сывороточный альбумин (БСА).

Известен иммунодиагностикум SPLI-PREST (фирма Diagnostica Stago) для экспресс-диагностики тромбозов, ДВС-синдрома и других заболеваний, сопровождающихся накоплением продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ), содержащий в качестве балластного белка БСА [3]. БСА - гидрофильный белок, активно взаимодействующий с ионогенными группами, расположенными на поверхности полимера, но не проявляющий сродства к неполярным группировкам полистиролового латекса. Поэтому для более полного насыщения свободных центров связывания приходится использовать БСА в количествах, на порядок больших, чем иммобилизуемый специфический белок [4]. Конкуренция между БСА и специфическим белком за центры связывания вызывает нежелательную десорбцию с поверхности полистирола уже иммобилизованных антител (антигенов) в раствор, что приводит к снижению предельной чувствительности диагностикума, которая составляет 2 мкг/мл. Этой чувствительности достаточно для диагностирования указанных заболеваний в неосложненных стандартных случаях. Однако, когда в крови больного присутствуют повышенные количества липидов, иммунных комплексов, криоглобулинов и других веществ, придающих ей повышенную вязкость и адгезивную способность, происходит неспецифическое склеивание латексных частиц, провоцирующее получение ложноположительного результата. В этом

случае ограниченная чувствительность диагностикума вступает в противоречие с необходимостью использования высоких разведений исследуемых образцов.

Аналогичным недостатком обладает иммунолатексный диагностикум "Ревмотест" (Каунасское предприятие по производству сывороточных и бактериальных препаратов) для количественного определения ревматоидного фактора - индикатора возникновения ревматоидного артрита, склеродермии и других аутоиммунных заболеваний, содержащий в качестве балластного белка БСА, и поэтому характеризуется теми же недостатками. Общим недостатком обоих диагностикумов является относительно короткий срок использования, связанный с десорбцией специфического белка с поверхности полимера.

Предлагаемое изобретение решает задачу получения иммунодиагностикума, обладающего более высокой чувствительностью, позволяющего более достоверно диагностировать заболевания за счет возможности анализа более разбавленных образцов и характеризующегося более длительным сроком использования.

Эта задача решается тем, что в качестве балластного белка используется α -казеин коровьего молока. Как и большинство белков, обладая положительно заряженными ионогенными группами, α -казеин способен взаимодействовать с отрицательно заряженными группами на поверхности модифицированного (карбоксилированного) полистирольного латекса. С другой стороны, α -казеин проявляет ярко выраженный гидрофобный характер и прочно связывается также с неполярными участками полимера, в результате чего обеспечивается полное заполнение вакантных центров связывания при концентрациях на порядок ниже, чем при использовании БСА. Это приводит к уменьшению десорбции специфического белка с поверхности носителя, и следовательно, к увеличению чувствительности диагностикума. Более высокая чувствительность позволяет анализировать более разбавленные образцы, что снижает вероятность ложноположительной реакции вследствие неспецифического склеивания и повышает надежность диагностирования заболеваний. Замена БСА на α -казеин приводит к уменьшению десорбции специфического белка, в результате чего повышается стабильность диагностикума и пролонгируется срок его годности (см. табл. 1).

Таблица 1
Изменение чувствительности иммунолатексных диагностикумов в зависимости от сроков хранения

Диагностикум	Чувствительность в зависимости от срока хранения			
	12 мес.	18 мес.	20 мес.	24 мес.
ПДФ-латтест	0,8 мкг/мл	0,8 мкг/мл	1,6 мкг/мл	1,6 мкг/мл
SPLI-PREST	2 мкг/мл	4 мкг/мл	4 мкг/мл	8 мкг/мл
R _g -латтест	1 : 320	1 : 320	1 : 320	1 : 320
"Ревмотест"	1 : 160	1 : 160	1 : 80	1 : 40

Представленные в табл.1 данные показывают, что полученные нами препараты обладают пролонгированным сроком годности, сохраняя свои исходные характеристики неизменными, в то время как

коммерческие препараты за тот же срок хранения снижают чувствительность определения в два раза.

Для получения иммунодиагностикума в соответствии с предлагаемым изобретением к 2%-ной суспензии сферических частиц (\varnothing -0.5 мкм) полистирольного карбоксилированного латекса с иммобилизованным на их поверхности специфическим к данному заболеванию белком в 0.1 М глициновом буфере рН 8,2 (буфер) [4] прибавляют равный объем раствора α -казеина (10 мг/мл) в буфере, приготовленного следующим образом: α -казеин растворяют в рассчитанном количестве Буфера, прогревают 30 минут при 37°C, раствор осветляют центрифугированием в течение 15 мин при 5000 об/мин. Оптимальная концентрация раствора α -казеина для насыщения свободных центров связывания 0,4 мг/мл. Смесь латексной суспензии с раствором α -казеина тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут, после чего помещают в холодильник (4°C). Через 24 часа иммунодиагностикум готов.

Описанный общий подход позволяет получать широкий спектр диагностикумов, отличающихся только специфическим белком, иммобилизованным на поверхности полимера, и предназначенных для экспресс-диагностики различных заболеваний.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют возможность получения и использования иммунодиагностикумов в соответствии с предлагаемым изобретением.

Пример 1

ПДФ-латтест - иммунодиагностикум для количественного определения белков, указывающих на развитие патологий системы свертывания крови, количественно определяющий содержание продуктов деградации фибрина/фибриногена (ПДФ) в сыворотке крови человека.

Получение ПДФ-латтеста

К 2 мл 2%-ной суспензии полистирольного карбоксилированного латекса с иммобилизованными антителами к фибриногену человека (250 мкг) и антителами к фрагменту Е (150 мкг) в буфере прибавляют равный объем раствора α -казеина 0,4 мг/мл в буфере, смесь тщательно встряхивают и после выдерживания при комнатной температуре в течение 30 мин и оставляют на 24 часа в холодильнике при 4°C. Чувствительность полученного диагностикума, определенная методом титрования [4], составила 0,8 мкг/мл, что в 2,5 раза выше, чем чувствительность коммерческого препарата SPLI-PREST, используемого в настоящее время для определения ПДФ.

Применение ПДФ-латтеста для определения ПДФ в сыворотке крови

Образцы сыворотки крови для анализа готовили по стандартной методике [3]. Для проведения определения в агглютинационном планшете делали двукратные разведения сыворотки на буфере: 1/2, 1/4, 1/8 и т.д. Дозатором на стеклянную пластину переносили по 10 мкл как цельной сыворотки, так и каждого ее разведения. В каждую каплю

добавляли равный объем иммунодиагностикума, тщательно перемешивали и при непрерывном покачивании наблюдали за развитием агглютинации. Через 2 минуты учитывали результат. Содержание ПДФ (мкг/мл) в образце определяли как произведение фактора последнего разведения, еще дающего агглютинацию, на 0,8 (чувствительность диагностикума). Для количественного определения концентрации ПДФ в сыворотке крови делали дополнительные разведения образца, например, если разведение 1/16 давало положительную реакцию, а разведение 1/32 - отрицательную, то делали разведение 1/24, определяя таким образом фактор разведения более точно. По той же методике проводили определение с помощью иммунолатексного диагностического набора SPLI-PREST.

Описанным способом проведено определение ПДФ в образцах сыворотки крови трех здоровых доноров и четверых больных людей с диагнозом инсульт. ДВС-синдром был верифицирован у всех больных по известным клиническим и лабораторным критериям. Образцы крови данной группы больных не обладали повышенной вязкостью, провоцирующей неспецифическую агглютинацию. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2
Сравнение результатов количественного определения ПДФ в образцах сыворотки крови, полученных с помощью предлагаемого ПДФ-латтеста и коммерческого иммунолатексного диагностического набора SPLI-PREST. Образцы не обладали повышенной вязкостью.

Образцы сыворотки крови	ПДФ-латтест	SPLI-PREST
Доноры:		
Донор 1	1.6 мкг/мл	Не обнаружен
Донор 2	6.4 мкг/мл	4.0 мкг/мл
Донор 3	9.6 мкг/мл	8.0 мкг/мл
Больные:		
Больной 1	36.4 мкг/мл	40.0 мкг/мл
Больной 2	76.8 мкг/мл	64.0 мкг/мл
Больной 3	51.2 мкг/мл	48.0 мкг/мл
Больной 4	43.5 мкг/мл	44.0 мкг/мл

Из данных табл. 2 видно, что в неосложненных случаях предлагаемый иммунодиагностикум дает результаты, сопоставимые с результатами, полученными с помощью коммерческого диагностикума. Кроме того, ПДФ-латтест позволяет определять меньшие количества белков-маркеров, чем используемый в настоящее время диагностикум.

В табл. 3 приведены результаты анализа образцов плазмы крови больных, страдающих выраженной формой атеросклероза. Независимыми методами в этих образцах было выявлено повышенное содержание компонентов, провоцирующих неспецифическую агглютинацию.

Таблица 3
Сравнение результатов количественного определения ПДФ в образцах сыворотки крови, полученных с помощью предлагаемого ПДФ-латтеста и коммерческого иммунолатексного диагностического набора SPLI-PREST. Образцы обладали повышенной вязкостью.

Образцы сыворотки крови	ПДФ-латтест	SPLI-PREST
Больной 1	12.0 мкг/мл	Не обнаружен
Больной 2	16.0 мкг/мл	Не обнаружен

Такое различие результатов для данной группы больных обусловлено высоким содержанием у них в крови липопротеидов низкой плотности. Так как последние провоцируют неспецифическую

агглютинацию, необходимо разводить тестируемую сыворотку не менее чем в 10 раз, вследствие чего конечная концентрация ПДФ в сыворотке оказывается ниже чем 2 мкг/мл и не может быть выявлена при применении диагностикума SPLI-PREST. ПДФ-латтест в этих условиях позволяет выявить даже сравнительно низкие концентрации белка-маркера.

Пример 2

R_f-латтест - диагностикум для быстрого обнаружения и полуколичественного определения в плазме крови ревматоидного фактора (R_f), являющегося иммунным комплексом антител к собственным иммуноглобулинам и служащего надежным индикатором возникновения заболеваний аутоиммунного происхождения, таких как ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена и др. [1].

Получение R_f-латтеста

К 2 мл 2%-ной суспензии полистирольного карбоксилированного латекса с иммобилизованным Fc фрагментом IgG человека в буфере прибавляют равный объем раствора α-казеина 0.4 мг/мл в буфере, смесь тщательно встряхивают и оставляют на 24 часа в холодильнике при 4 °С. Чувствительность полученного диагностикума, определенная титром реакции - последним разведением стандартного образца плазмы крови, который дает агглютинацию с латексной суспензией, составила 1:320, что в 2 раза выше, чем чувствительность коммерческого препарата "Ревмотест", используемого в настоящее время для определения R_f.

Применение R_f-латтеста для определения ревматоидного фактора в плазме крови

Для определения использовали цитратную плазму крови. К 0,1 мл 0,11 М раствора цитрата натрия прибавляли 0.9 мл крови, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, осадок отбрасывали. Плазму разводили буферным раствором в соотношениях 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320. Методика проведения реакции агглютинации аналогична той, которую использовали для определения ПДФ в сыворотке крови. Оценку содержания ревматоидного фактора (R_f) в плазме осуществляли полуколичественно путем определения его титра, т.е. последнего разведения исследуемой плазмы, еще дающего агглютинацию латекса.

Определение ревматоидного фактора проводили в образцах плазмы крови двух доноров и трех больных ревматоидным артритом, в крови которых независимым методом было выявлено повышенное содержание компонентов, провоцирующих неспецифическую агглютинацию. Результаты определения сравнивали с результатами, полученными с помощью коммерческого диагностикума для определения ревматоидного фактора "Ревмотест", производимого Каунасским предприятием по производству сывороточных и бактериальных препаратов (Литва) (см. табл. 4).

Таблица 4

Сравнение результатов полуколичественного определения R_f в образцах плазмы крови доноров, полученных с помощью предлагаемого R_f-латтеста и коммерческого иммунолатексного диагностикума "Ревмотест". Образцы обладали повышенной вязкостью.

Образцы плазмы крови	Разведение образца	Результаты определения	
		R _f -латтест	"Ревмотест"
Донор 1	Неразведенный	отрицательный	положительный
	1 : 5	отрицательный	положительный
	1 : 10	отрицательный	положительный
	1 : 20	отрицательный	отрицательный
Донор 2	Неразведенный	отрицательный	положительный
	1 : 5	отрицательный	положительный
	1 : 10	отрицательный	отрицательный
	1 : 20	отрицательный	отрицательный

Представленные в табл. 4 результаты показывают, что при наличии в плазме крови компонентов, вызывающих неспецифическую агглютинацию (липидов, криоглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов), в неразведенных образцах и в образцах со степенью разведения 1:5-1:10 использование "Ревмотеста" приводит к получению ложноположительного результата. При более высоком разведении отрицательный результат связан с недостаточной чувствительностью диагностикума. Предлагаемый R_f-латтест во всех случаях обеспечивает достоверный отрицательный результат.

В табл.5 представлены результаты обнаружения R_f-фактора в плазме крови больных ревматоидным артритом, содержащей компоненты, способствующие агглютинации с латексной суспензией.

Таблица 5

Сравнение результатов полуколичественного определения R_f в образцах плазмы крови больных ревматоидным артритом, полученных с помощью предлагаемого R_f-латтеста и коммерческого иммунолатексного диагностикума "Ревмотест". Образцы обладали повышенной вязкостью.

Образцы плазмы крови	R _f -латтест	"Ревмотест"
Больной 1	1:320	1:160
Больной 2	1:160	1:80

Данные табл.5 показывают, что, если в крови содержатся компоненты, придающие ей повышенную вязкость, применение предлагаемого иммунолатексного диагностикума R_f-латтест обеспечивает более точное определение R_f, чем коммерческий диагностикум "Ревмотест", за счет возможности анализа более разбавленных образцов.

Таким образом, предложенный иммунодиагностикум на основе модифицированного полистирольного латекса, содержащий в качестве балластного белка α-казеин коровьего молока, характеризуется пролонгированным сроком годности и высокой чувствительностью, позволяющей проводить определения в разбавленных пробах, что препятствует возникновению неспецифической агглютинации и обеспечивает получение достоверных результатов.

Литература

1. Энциклопедия клинических лабораторных тестов./Под ред. Н.Тица., Москва. Лаб. Информ. 1997.
2. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир. 1991.

3. Manual of clinical laboratory immunology. Eds. Rose N.R., Fridman A., Fahey M. Washington, DC, American society for microbiology. 1986.

4. Иммунологические методы./Под ред. М.Фримеля., М., Мир. 1978.

Формула изобретения:

Иммунодиагностикум на основе

модифицированного полистирольного латекса, содержащий балластный белок для насыщения вакантных центров связывания, отличающийся тем, что в качестве балластного белка он содержит α -казеин коровьего молока в равных объемах с модифицированным полистирольным латексом при концентрации α -казеина 0,4 мг/мл.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2 2 3 1 3 6 6 C 2

RU ? 2 3 1 3 6 6 C 2