

Настоящее изобретение относится к анализу клинических проб на гомоцистеин.

Гомоцистеин – это промежуточная аминокислота, которая образуется, когда метионин перерабатывается в цистеин. Обычно гомоцистеин, образующийся в организме, быстро преобразуется одним из двух способов: (1) конденсируется с серином, образуя цистатион, или (2) превращается в метионин, – и его содержание (и содержание его окисленной формы гомоцистина) в живом организме при нормальных условиях пренебрежимо мало.

Однако в некоторых случаях содержание гомоцистеина в биологических пробах может иметь клиническое значение, так как гомоцистеин играет важную роль в сложной совокупности процессов, из которых складывается обмен аминокислоты сульфгидрила, и его накопление может свидетельствовать о различных нарушениях в ходе этих процессов, в том числе о некоторых врожденных дефектах обмена. Так, например, гомоцистинурия (ненормально высокое содержание гомоцистеина в моче) известна как расстройство аминокислотного обмена, возникающее в результате недостатка ферментов цистатион β синтетазы или метилтетрагидрофолевой кислоты метилтрансферазы (которая катализирует метилирование гомоцистеина и превращение его в метионин).

Обмен аминокислоты сульфгидрила тесно связан с обменом фолиевой кислоты и витамина В₁₂ (кобаламина), которые действуют как субстраты или ко-факторы в различных преобразованиях, происходящих в рамках обмена сульфгидрила. Поэтому предложено считать накопление гомоцистеина свидетельством дисфункции кобаламина или фолат-зависимых ферментов или же других расстройств или заболеваний, связанных с обменом кобаламина или фолиевой кислоты.

Более того, поскольку превращение гомоцистеина в метионин основано на реакции, в которой в качестве донора метила выступает S-метил тетрагидрофолат, на обмен гомоцистеина могут оказать влияние антифолатные препараты, например, метотрексат, используемые для борьбы с другими расстройствами, такими как рак. Поэтому предложено использовать контроль над содержанием гомоцистеина при лечении злокачественных заболеваний антифолатными препаратами.

В последнее время повышение уровня гомоцистеина в крови стали соотносить с развитием атеросклероза (см. Clarke и др., *New Eng. J. Med.* 324: 1149-1155 (1991)), и даже умеренная гомоцистеинемия рассматривается теперь как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Поэтому измерение уровней гомоцистеина в крови, или в плазме крови, или в жидкой части лимфы также важно для диагностики и лечения сосудистых заболеваний.

Хотя иммунологических способов непосредственного определения гомоцистеина не существует, поскольку нет возможности обнаружить антитела к гомоцистеину, предложен ряд других способов обнаружения гомоцистеина в клинических пробах. Эти способы предусматривают выделение путем хроматографии и, как правило, основаны на одном из трех следующих принципов:

- (1) классический хроматографический анализ аминокислот,
- (2) реакция гомоцистеина, содержащегося в пробе, с ферментом S-аденозил-L-гомоцистеин гидролазой в присутствии меченого радиоактивностью или другим способом S-аденозин ко-субстрата, с последующим выделением и количественным анализом продукта (S-аденозил-L-гомоцистеин, S-АГ). Обычно производится выделение путем хроматографии (жидкостной высокого разрешения, ЖХВР, или тонкослойной, ТСХ) и измерение радиоактивности (см. Refsum и др., *Clin. Chem.* 31: 624–628 (1985); Kredich и др. *Anal. Biochem.* 116:503–510 (1981); Chui, *Am. J. Clin. Path.* 90(4): 446–449 (1988); Totani и др., *Biochem. Soc.* 14(6):1172–9 (1988) и Schimizu и др., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 8:153–159 (1986)),
- (3) реакция гомоцистеина, содержащегося в пробе, с люминофором, с последующим выделением путем ЖХВР и флуориметрией (см. Refsum и др., *Clin. Chem.* 35(9): 1921–1927 (1989)).

Эти способы отнимают много времени, очень трудоемки и все основаны на непосредственном количественном анализе. В частности, хроматографическое выделение, которое является составной частью всех известных способов, требует сложного специализированного оборудования.

Использование такого оборудования не принято в повседневной практике клинических лабораторий, и, следовательно, автоматизировать эти процессы в средней клинической лаборатории нельзя.

Поэтому существует необходимость в способе анализа на гомоцистеин – простом, точном, не требующем много времени, легко приспособляемом к условиям клинических лабораторий и, самое главное, не требующем дорогостоящего и длительного хроматографического выделения. Настоящее изобретение посвящено разработке такого способа.

Итак, один из аспектов настоящего изобретения охватывает способ обнаружения гомоцистеина в пробе; способ, который заключается в том, что пробу подвергают реакции с ферментом, преобразующим гомоцистеин, например, с S-аденозил гомоцистеин (S-АГ) гидролазой, и хотя бы одним субстратом к упомянутому ферменту, отличным от гомоцистеина, и без хроматографического выделения (реагентов или продуктов реакции) оценивают (предпочтительно фотометрически) немеченое анализируемое вещество, которое выбирают из ко-субстрата к гомоцистеину и продуктов ферментной переработки гомоцистеина упомянутым ферментом.

После реакции пробы с ферментом, преобразующим гомоцистеин, и субстратом пробу, прежде чем подвергнуть последующим стадиям анализа, желательно выдержать хотя бы 30 секунд, а лучше – хотя бы 5 минут.

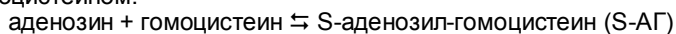
В предпочтительных случаях в качестве фермента, преобразующего гомоцистеин, используется S-АГ гидролаза, но могут быть использованы и другие ферменты. В качестве таковых упомянем бетаин-гомоцистеин метил трансферазу и другие ферменты, участвующие в преобразованиях гомоцистеина (например, описанные у Graham, *Trends Cardiovasc Med.* 1:244–249 (1991)).

Ко-субстрат к гомоцистеину, оцениваемый по способу, предложенному настоящим изобретением, – это соединение, которое реагирует с гомоцистеином в присутствии катализатора – фермента, преобразующего гомоцистеин, например S-АГ гидролазы.

Термин "оценка" в настоящем документе обозначает и количественное и качественное определение в смысле получения абсолютного значения количества или концентрации анализируемого вещества, например, ко-субстрата к гомоцистеину, содержащемуся в пробе, а также в смысле получения коэффициента, соотношения, процентной доли, визуальной или другой величины, указывающей на уровень анализируемого вещества в пробе. Оценка может быть непосредственной и косвенной, а зарегистрированное химическое соединение – это не обязательно само анализируемое вещество, это может быть, например, его производное или продукт дальнейших преобразований, как будет показано ниже.

Способ анализа, предложенный настоящим изобретением, предусматривает использование ферментного либо иммунологического методов оценки анализируемого вещества. Предпочтительный ферментный метод предусматривает реакцию анализируемого вещества с другим ферментом, для которого оно служит субстратом. Оценке подлежит либо ко-субстрат, либо прямой или косвенный продукт реакции преобразования анализируемого вещества этим другим ферментом. Предпочтительный иммунологический метод включает процедуру, предусматривающую конкурентное связывание с антителом анализируемого вещества и другого гаптена (например, полигаптена или меченого аналога анализируемого вещества), и оценку связанного или несвязанного гаптена.

В предпочтительных случаях в качестве фермента, преобразующего гомоцистеин, настоящим изобретением предписана S-аденозил-гомоцистеин гидролаза (S-АГ гидролаза), которая катализирует реакцию с гомоцистеином:



с постоянной равновесия $K = 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Реакция проходит в том или другом направлении в зависимости от условий среды, концентрации реагирующих веществ и т.д.

В приведенной выше схеме аденозин выступает в качестве ко-субстрата гомоцистеина. Для анализа, предложенного настоящим изобретением, могут быть использованы и другие ко-субстраты, например, аналоги аденозина или родственные соединения.

Способ анализа, предложенный настоящим изобретением, имеет особое достоинство: гомоцистеин является ингибитором S-АГ гидролазы и подавляет реакцию гидролиза, в результате которой образуется гомоцистеин и аденозин, сдвигая равновесие реакции в сторону синтеза S-АГ.

Таким образом, количество гомоцистеина в пробе косвенно влияет на образование и расход ко-субстрата к гомоцистеину, например, аденозина, при участии S-АГ гидролазы, т.е., на его окончательную концентрацию в реагирующей смеси. В рамках настоящего изобретения окончательная концентрация или изменение концентрации ко-субстрата к гомоцистеину, например, аденозина, в реагирующей смеси может использоваться как показатель исходной концентрации гомоцистеина в пробе. Таким образом, если анализируемое вещество – ко-субстрат, то способ анализа, предложенный настоящим изобретением, отличается от существующих тем, что гомоцистеин оценивают не непосредственно, а косвенно – путем определения концентрации его ко-субстрата в реакции его ферментного преобразования. Это дает возможность использовать методы оценки, принятые в обычных клинических лабораториях и непригодные для осуществления уже известных способов анализа на гомоцистеин, например, фотометрические, т.е. применять способ, предложенный настоящим изобретением, в рутинной клинической практике.

В предпочтительных случаях используется способ, основанный на реакции с S-АГ гидролазой, проходящей в любом направлении. При этом если проба реагирует с S-АГ гидролазой и аденозином, расходуются количество аденозина, соответствующее количеству израсходованного гомоцистеина, и количество гомоцистеина в пробе можно определить по изменению концентрации аденозина. Вместо самого аденозина можно использовать его аналоги или вещества, из которых получается аденозин.

В других предпочтительных случаях можно использовать обратное направление реакции. Пробу подвергают реакции с S-АГ (обычно в избытке) и S-АГ гидролазой. Гомоцистеин и аденозин образуются в результате гидролиза S-АГ. Гомоцистеин, содержащийся в пробе изначально, будет тормозить эту реакцию, т.е. тормозить образование аденозина, количество которого контролируется.

В качестве субстратов к S-АГ гидролазе можно использовать S-АГ, аденозин, а также их аналоги и предшественники.

В сложной совокупности процессов обмена аминокислоты сульфгидрила и реакциях трансметилирования задействовано множество ферментов. Эти процессы и реакции были предметом исследований, в процессе которых изучались регуляторные функции ферментов. Роль одного такого фермента, S-АГ гидролазы описана в обзоре у Ueland, *Pharmacological Reviews* 34: 223–253 (1982). Trewyn и др., в *J. Biochem. Biophys. Met.* 4: 299–307 (1981) описывают изучение регуляторной роли S-АГ гидролазы и предлагают анализ ферментной активности S-АГ гидролазы. Garras и др. в *Analytical Biochem.* 199: 112–118 (1991) описывают другие пути преобразований гомоцистеина и, в частности, предлагают опыт по преобразованию гомоцистеина в присутствии метионин синтазы. Как уже сказано, Graham (выше) описывает дальнейшие ферментные преобразования гомоцистеина. Ко-субстраты и продукты этих реакций можно использовать в качестве анализируемых веществ по способу, предложенному настоящим изобретением, особенно, если применяются иммунологические методы оценки.

Пробы для анализа по способу настоящего изобретения можно отбирать из любой биологической жидкости или тканевого экстракта и подвергать предварительной обработке. Как правило используется плазма крови, жидкая часть лимфы или моча.

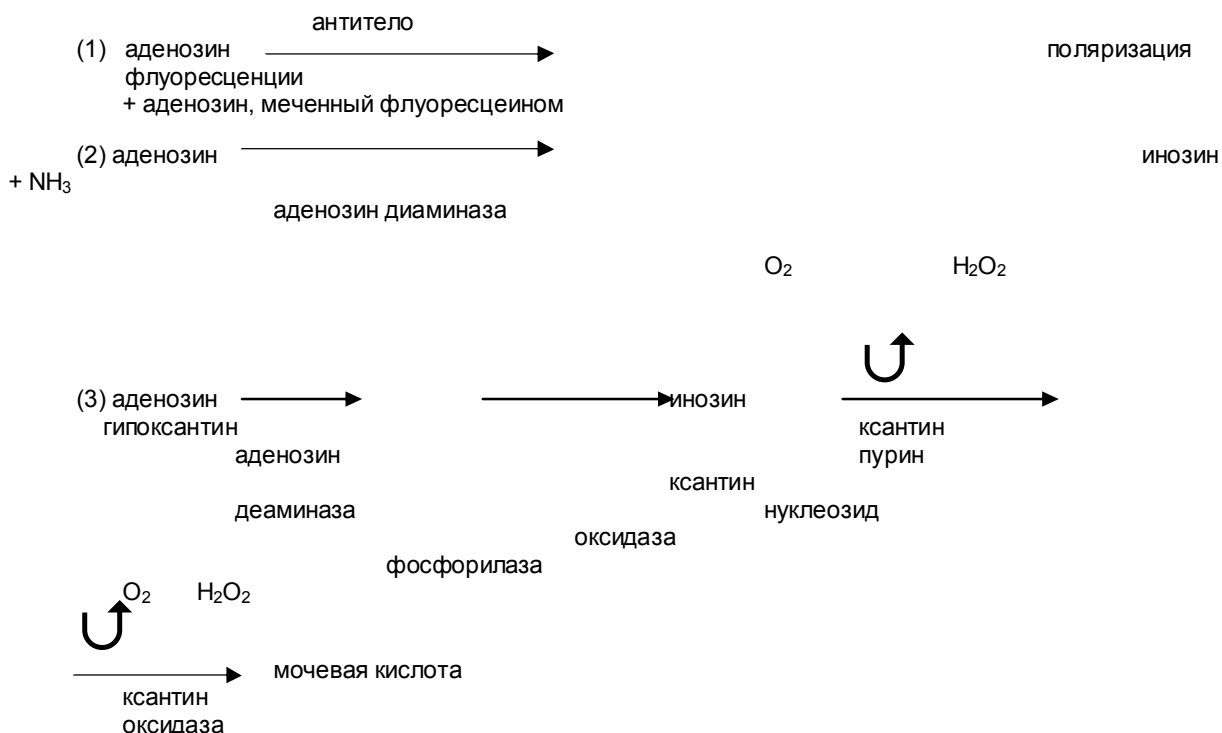
В плазме крови, в жидкой части лимфы или в моче значительная доля гомоцистеина может связываться дисульфидными связями с циркулирующими белками, например, альбумином; кроме того, гомоцистеин может присутствовать в них в виде других дисульфидных производных (обычно в виде конъюгата гомоцистеин-цистеин). Для того, чтобы оценить общее содержание гомоцистеина в пробе, может потребоваться обработка пробы восстановителем для разъединения дисульфидных связей и высвобождения гомоцистеина.

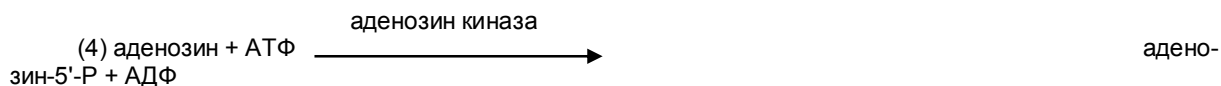
Дисульфиды легко и специфично восстанавливаются тиолами (например, дитиотреитолом ДТТ, дитиозеритритолом ДТЭ, 2-меркапто-этанолом, цистеин - тиогликолатом, тиогликолевой кислотой, глутатионом и подобными соединениями). Непосредственное химическое восстановление можно осуществить с помощью борогидридов (например, натриевого борогидрида) или амальгам (например, натриевой амальгамы) или более специализированных реактивов, например, фосфинов или фосфоротиоатов. Восстановление дисульфидов обзорно описано у Jocelyn, *Methods of Enzymology* **143**: 243–256 (1987), где перечислено множество приемлемых восстановителей.

Аденозин и другие ко-субстраты гомоцистеина могут оцениваться известными способами. Обычно предпочтительными являются способы, основанные на фотометрическом (например, колориметрическом, спектрофотометрическом и флуорометрическом) анализе, и иммунологические методы, поскольку их легко приспособить к условиям клинических лабораторий. Особо предпочтительными являются способы, основанные на ферментных реакциях или реакциях с моно- или поликлональными антителами, – простые, быстрые и сравнительно недорогие. Так, например, оценка анализируемого вещества может производиться путем контроля реакции с ферментами, которые превращают его, прямо или косвенно, в вещества, которые можно зарегистрировать фотометрически, например, спектрофотометрически. К приемлемым ферментам, которые, конечно, не должны реагировать с другими субстратами к ферменту, преобразующему гомоцистеин, в частности, с гомоцистеином, относятся аденозин деаминаза (превращает аденозин в инозин) и аденозин киназа (превращает аденозин и АТФ в АДФ и фосфорилированный аденозин). Такие ферменты можно комбинировать с ферментами, которые преобразуют полученные продукты в другие поддающиеся регистрации продукты.

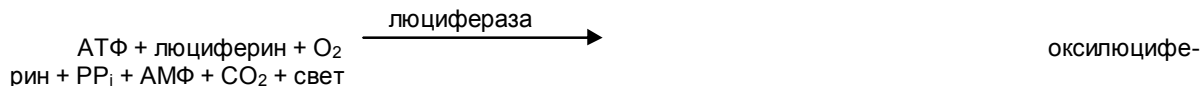
Примерами иммунологических методов могут служить методы, предусматривающие реакцию анализируемого вещества с антителами, специфичными для него, которые либо поддаются непосредственной оценке, либо могут быть преобразованы в поддающиеся регистрации продукты, например, посредством сэндвич-анализа. Один очень привлекательный иммунологический метод предусматривает использование меченного люминофором аналога анализируемого вещества, предпочтительно ко-субстрата, например, меченного флуоресцеином аденозина. Этот последний и немеченое анализируемое вещество подвергают реакции с антителом к анализируемому веществу. Если полученный продукт подвергнуть флуоресцентной поляризации с использованием поляризованного возбуждающего излучения, то показатель концентрации немеченого анализируемого вещества можно вывести из степени деполяризации флуоресцентного излучения. Антитела к аденозину имеются на рынке (например, в фирме Paessel & Lorei GmbH, Франкфурт, Германия и Serotech Ltd., Оксфорд, Великобритания), а технология опыта с поляризацией флуоресценции (FPIA) хорошо отработана (см., например, US-A- 4420568 и US-A-4593089 и другие публикации Abbott Laboratories, в которых идет речь о разработанной там технологии TDx).

Итак, к схемам анализа, пригодным для использования в рамках настоящего изобретения, относятся



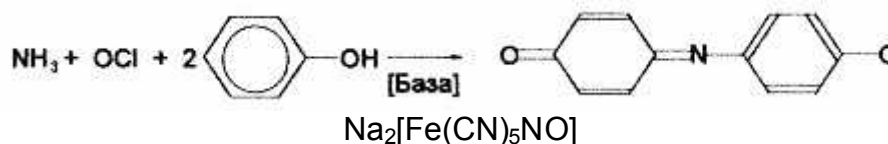


вместе с конкурентной хемотропной реакцией с участием АТФ, например



или с меченым люминофором аденозином, который конкурирует за АТФ/аденозин киназу, причем оценка здесь проводится путем измерения поляризации флуоресценции.

Что касается схем (2) и (3), то инозин и мочевая кислота имеют четко выраженное свойство поглощать ультрафиолетовое излучение и поэтому их можно контролировать спектрофотометрически, путем кинетических измерений. Однако, регистрация мочевой кислоты и инозина с помощью ультрафиолетового излучения имеет определенные ограничения, так как чувствительность этого способа невысока и для него требуется источник ультрафиолетовых лучей и посуда, прозрачная для них. Поэтому удобнее будет прибегнуть к колориметрической регистрации или к использованию электронных датчиков, что обычно и делают в клинических лабораториях, отдавая предпочтение колориметрии. В этой связи реакция, описанная схемой (2) особенно удобна, так как аммиак, образующийся в ходе реакции с аденозин деаминазой легко регистрируется посредством известных колориметрических способов. Так, например, аммиак можно подвергнуть реакциям, дающим окрашенные продукты, которые можно зарегистрировать спектрофотометрически. Один из таких способов, описанный в *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer) Vol. 1: 1049–1056 (1970) основан на реакции аммиака с фенолом в присутствии гипохлорита в щелочных условиях, при которых образуется краситель индофенол:



Натрия нитроцианид можно использовать в качестве катализатора. Возможны модификации этого способа с использованием, например, производных фенола.

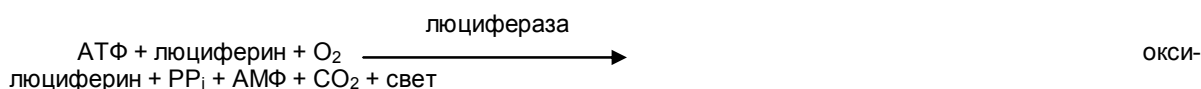
Окрашенный конечный продукт образуется в количестве, прямо пропорциональном концентрации аммиака, а, следовательно, концентрации аденозина в пробе.

В схеме (3) реакция с ксантин оксидазой поддается контролю посредством флуорогенов или хромогенов, например, индикаторов окисление-восстановление, с помощью оценки окислительно-восстановительного потенциала, или путем измерения расхода O_2 , точнее образование H_2O_2 , например, при помощи электронных датчиков. Для этой цели можно использовать различные индикаторы окисления-восстановления, а в литературе описано множество способов определения O_2 и H_2O_2 в растворах. В клинических анализах H_2O_2 определяют очень часто.

К приемлемым индикаторам относятся метиленовый синий, 2,6-дихлорфенол, индофенол и различные индикаторы окисления-восстановления, перечисленные в таблице 1 каталога № 53 Kodak Laboratory & Research Products. Можно использовать и другие. Для облегчения окислительно-восстановительных реакций к реагентам можно добавлять ферменты с пероксидазной активностью, например, хренную пероксидазу.

Если нужен хромоген, выпадающий в осадок, можно использовать МТТ тетразол в сочетании с ксантин оксидазой или другими подобными ферментами. При использовании выпадающего в осадок флуорогена или хромогена получается неподвижное значение цвета или свечения, т.е., визуальный показатель концентрации гомоцистеина.

Схема (4) описывает хемотропную реакцию с участием АТФ, используемую для оценки концентрации аденозина. Анализы, основанные на хемотропности, обладают большим потенциалом благодаря низким порогам чувствительности и сравнительной простоте используемого оборудования. Хемотропные реакции можно использовать для регистрации таких веществ как АТФ или H_2O_2 . Одна из наиболее эффективных и известных реакций этого типа – реакция свечения светляков:



Люциферин светляков – это соединение на основе бензотриазола, но известны люциферины из других биологических источников, имеющие другое строение. В аналитических целях АТФ, люциферин и люциферазу можно оценивать непосредственно по этой реакции. Другая хемотропная реакция, которую можно использовать (при ней образуется H_2O_2 , как и в схеме (3)), – это реакция люминола (люминол – это 5-амин-2,3-дигидро-фталазин-1,4-дион) с катализатором водородной пероксидазой, при которой излучается свет с длиной волны 425 нм.

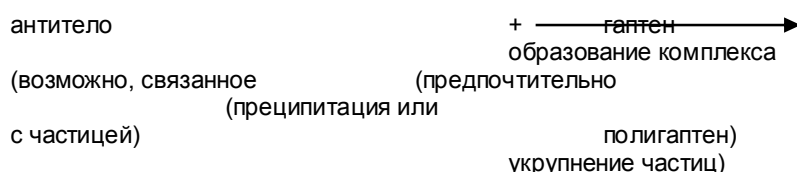
Перекись водорода (по схеме (3), например) также можно оценить по неферментным хемолуминисцентным реакциям пероксиоксалата и эфиров акридина, последние в водных растворах при нейтральном pH.

Использование в реакции по схеме (4) меченого люминофором аденозина и оценка по поляризации флуоресценции целесообразны благодаря относительно широкой специфичности аденозин киназы по отношению к субстратам. Эту широкую специфичность, кроме того, можно использовать для компенсации эндогенного аденозина (или других нуклеозидных субстратов аденозин киназы) путем добавления аденозин киназы в пробу в ходе подготовки ее к анализу, в сочетании с восстановителем, например, ДТТ.

Такая подготовка проб к анализу весьма желательна, поскольку во многих воплощениях настоящего изобретения анализируемое вещество (например, аденозин) уже присутствует в пробах в различных количествах и является потенциальным источником ошибки. Фоновое содержание анализируемого вещества можно компенсировать, проводя анализ части пробы без использования фермента, преобразующего гомоцистеин (например, S-АГ гидролазы); однако, эта процедура отнимает много времени и делает анализ более трудоемким. Выход заключается в предварительной обработке пробы средством, которое бы уничтожало или преобразовывало эндогенное анализируемое вещество, например, таким ферментом как аденозин киназа или аденозин деаминаза, которые уничтожают фоновый аденозин.

Как сказано выше, чтобы неоправданно не увеличивалась продолжительность анализа, такая обработка пробы может осуществляться одновременно с обработкой ее восстановителем, высвобождающим гомоцистеин.

Для оценки анализируемого вещества, кроме колориметрии, можно использовать и другие методы фотометрии. К числу особенно удобных относятся методы агглютинации частиц и иммунопреципитации. Если используются поликлональные антитела, то можно производить непосредственную агглютинацию частиц или иммунопреципитацию, хотя если в качестве фермента, преобразующего гомоцистеин, используется S-АГ гидролаза, это обычно нежелательно. Однако, можно применить ингибированные преципитации или агглютинации частиц. Оно основано на использовании комбинаций антител/гаптен, при конъюгации которых происходит преципитация или укрупнение частиц, регистрируемые турбидиметрическим или нефелометрическим способом. Если образование комплекса антител/гаптен тормозится анализируемым веществом, например S-АГ, то содержание S-АГ можно оценить по ослаблению преципитации/укрупнения. Реакцию можно изобразить так:



Если в качестве фермента, преобразующего гомоцистеин, используется S-АГ гидролаза, то лучше хранить S-АГ гидролазу в присутствии восстановителя или обрабатывать ее восстановителем перед анализом. Выяснилось, что если хранить S-АГ гидролазу иначе, она инактивируется, а использование восстановителя предупреждает инактивацию или же активирует фермент перед анализом.

Можно использовать различные восстановители (например, ДТТ, цистеин, меркаптоэтанол, дитиозэритритол, натрия борогидрид и т.д.), однако ДТТ лучше подходит для этой цели, например, в концентрации около 5 mM. Сам ДТТ следует хранить при низком pH, поэтому в набор для анализа можно включить ДТТ с низким pH (например, около 3), но с низкой буферной способностью и отдельный раствор S-АГ гидролазы, частично или полностью инактивированной, с нейтральным pH и желательно в буфере. Когда эти растворы соединяют, фермент реактивируется при нейтральном pH. Если нужно, растворы можно соединять в присутствии анализируемой пробы или же добавлять пробу вскоре после соединения, чтобы одновременно происходило высвобождение гомоцистеина. Можно использовать и другие восстановители, упомянутые выше, для стабилизации/активации S-АГ гидролазы и для восстановления пробы до высвобождения гомоцистеина.

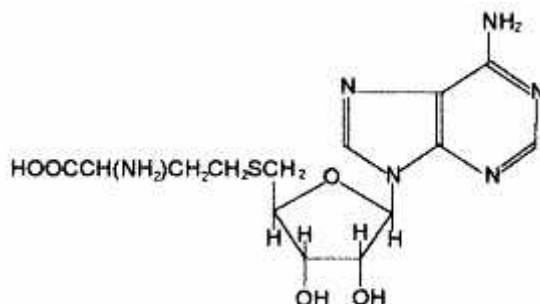
Другой аспект настоящего изобретения заключается именно в использовании восстановителей для реактивации инактивированных форм S-АГ гидролазы. Кроме того, следующий аспект настоящего изобретения охватывает набор реактивов, в первом отделении которого находится инактивированная S-АГ гидролаза, а во втором – восстановитель, например, ДТТ в кислой среде (например, pH 3). Используя этот набор, S-АГ гидролазу смешивают с восстановителем, таким образом реактивируя ее, непосредственно перед анализом.

Для повышения устойчивости S-АГ гидролазы при хранении и во время анализа можно использовать и другие добавки. К ним относятся NAD^+ , глутатион, многоатомные спирты и сахара (инозит, сорбит, ксилит, эритрит, глицерин, этиленгликоль, сахароза, лактит и т.д.), растворимые полимеры, например, некоторые декстраны, и белки (например, носители).

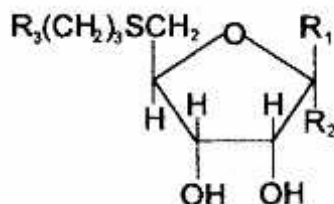
Антитела, используемые в рамках настоящего изобретения, могут быть поликлональными, но лучше – моноклональными. Если нужных антител нет в продаже, их можно изготовить стандартными методами. Антитела можно выращивать в организмах животных или гибридах, моноклональных или поликлональных, например, как описано у James Gooding в "Monoclonal antibodies, principle and practice", Academic Press, London, 1983, глава 3. Моноклоны следует сортировать, чтобы отделять клоны, которые отличают нужный гаптен от других субстратов к ферментам, например, аденозин от S-АГ. Поликлональные антитела,

реагирующие только с анализируемым веществом (например, S-АГ), следует очищать для удаления перекрестно реагирующих антител, то есть тех, которые реагируют с другими субстратами, кроме анализируемого, т.е. и с аденозином, и с S-АГ. Это можно сделать с помощью аффинной хроматографии, т.е. там, где анализируется S-АГ, используется иммобилизованный аденозин.

При производстве антител в качестве гаптена используется либо само анализируемое вещество, либо другая молекула, включающая часть анализируемого вещества, которая считается наиболее удобной площадкой для связывания, т.е. часть, удаленную от участков, задействованных в ферментной реакции. Гаптен удобно связать с макромолекулой, такой как BSA (бычий сывороточный альбумин) или гемоцианин. Для S-АГ удобный эпитоп расположен предпочтительно в окрестности тиозфирного мостика, поэтому в то время как сама S-АГ



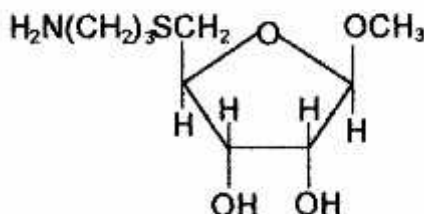
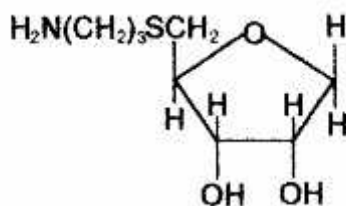
используется в комплексе с макромолекулой, желательно использовать "упрощенную" молекулу, такую, как описана формулой (1)

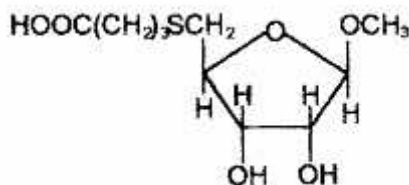
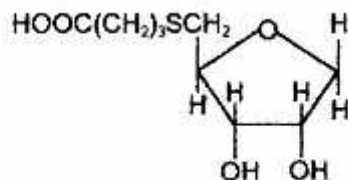
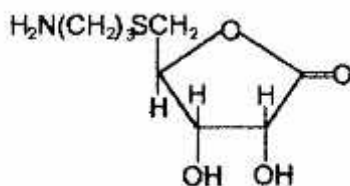


(I)

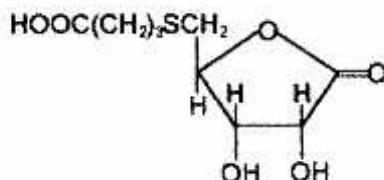
(где R_1 и R_2 – одинаковые или разные – это атомы водорода или группы OR_4 (где R_4 – это короткая (например, C_{1-6} , особенно C_{1-4}) алифатическая группа, например, алкил, а предпочтительно метил или этил), или же R_1 и R_2 вместе обозначают атом кислорода; R_3 – это амин или карбоксильная группа), или ее соль или эфир (например, с C_{1-4} алканолом) в комплексе с макромолекулой.

Примерами веществ, описываемых формулой (I) и пригодных к использованию в качестве гаптен, могут служить

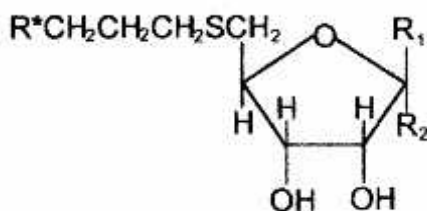




и



Эти "упрощенные" соединения можно также преобразовать в меченые аналоги, упомянутые выше и используемые в процедурах, в которых анализируемое вещество и меченый аналог вступают в конкурентную реакцию связывания с антителом. Сигнальную группу R^* , которую выбирают из числа люминофоров, хромофоров, радиометок, ферментных, хемолюминисцентных и других меток, обычно используемых в иммунных анализах, можно присоединить к анализируемому веществу, например, $R^*-S-AГ$, или к упрощенной, содержащей эпитоп, молекуле, например

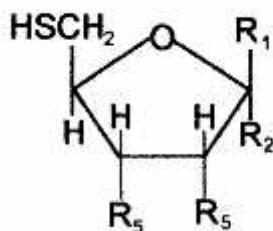


Такие меченые группы можно, разумеется, присоединять к частицам, полимерам, белкам и другим материалам.

Меченые 6-тиозфиры фуранозы и соединения, соответствующие формуле I, являются новыми и входят в число предметов настоящего изобретения.

Следующий аспект настоящего изобретения рассматривает процесс приготовления соединений, соответствующих формуле I, состоящий из таких шагов:

(а) реакция соединения, описанного формулой II



(II)

где R_1 и R_2 определены выше, а каждая R_5 – это защищенная гидроксильная группа или вместе R_5 обозначают алкилендиоксигруппу (т.е. защищенную бис-гидроксильную группу, такую как $-\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$), с пропил галогенидом, соответствующим формуле III



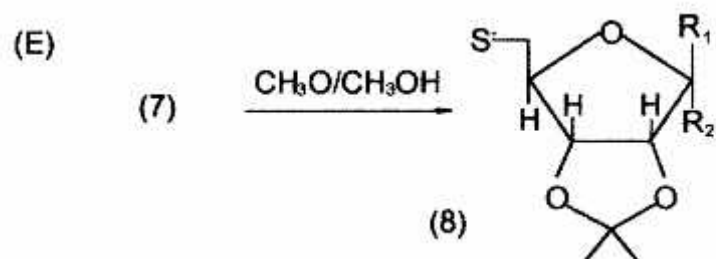
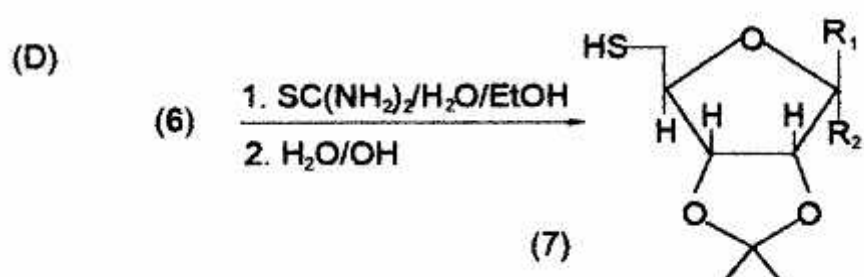
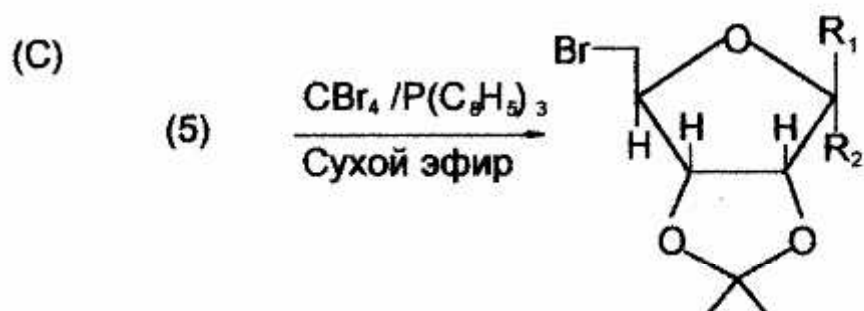
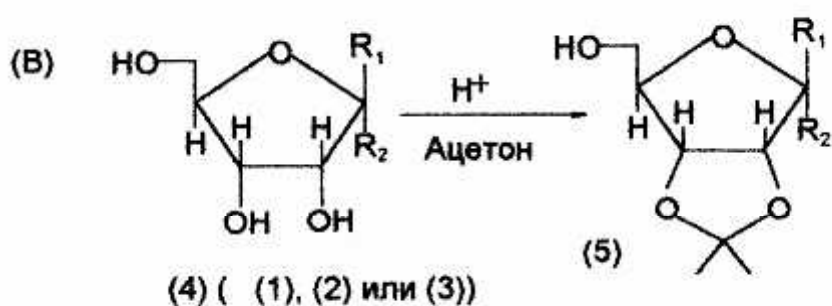
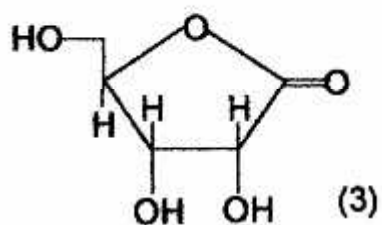
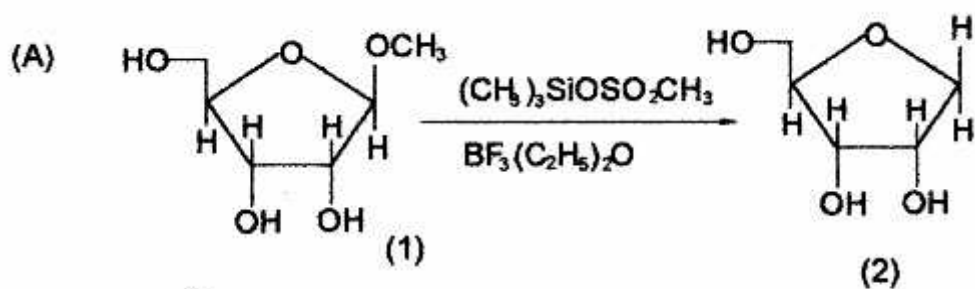
(где R_6 – это группа R_3 или защищенная группа R_3 , а Hal – атом галогена, например, брома), с последующим удалением любой защитной группы, которую требуется удалить;

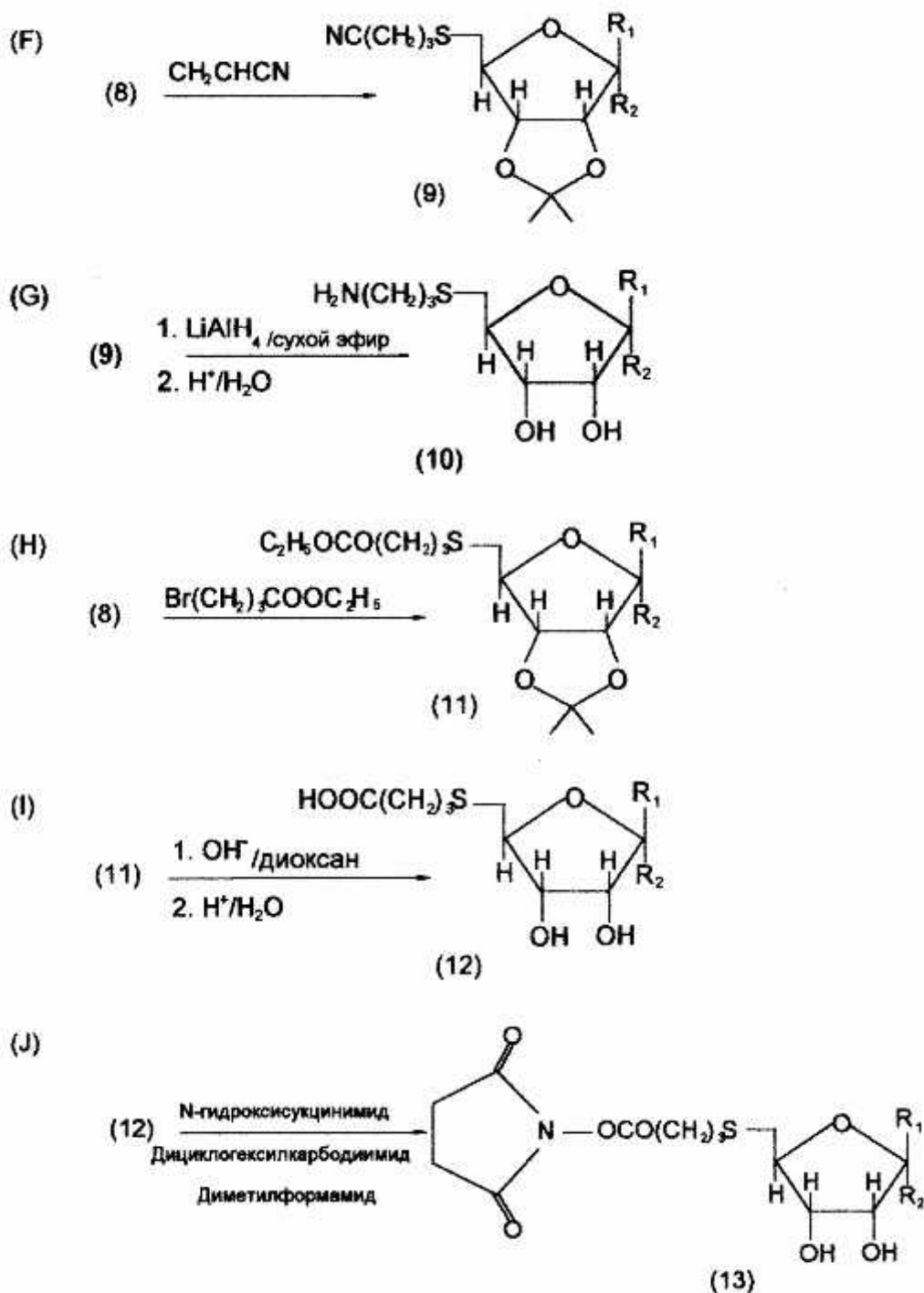
(b) (для получения соединения состава I, где R_3 – это аминогруппа) реакция соединения состава II с акрилонитрилом и восстановление и удаление защитных групп у полученного цианпропил тиоэфира;

(c) этерификация соединения состава I, где R_3 – это карбоксильная группа.

Исходные вещества состава III можно приготовить стандартными методами или методами, описанными в литературе. Исходные вещества состава II можно приготовить из соответствующих I-гидроксиметилфураноз путем защиты цис-гидроксильной группы, бромирования, а затем реакции с тиомочевинной и гидролиза. В I- гидроксиметилфуранозах защитить цис-гидроксильную группу можно посредством реакции с известным средством защиты для гидроксила, например, ацетоном.

К примерам схем реакций по приготовлению соединений состава I относятся следующие (соединения (1) и (3) имеются в продаже).





Поглощение ультрафиолетового излучения, поглощение видимого света, флуоресценция веществ, присутствующих в реагирующей смеси, выпавших в осадок или выделившихся иным путем, измеряется в конечной точке реакции (когда сигнал стабилен) или в один или несколько заданных моментов времени; кроме того, можно провести кинетические измерения, при которых делают несколько замеров в разные моменты времени.

Для проведения анализа по способу, предложенному настоящим изобретением, необходимые реагенты следует добавлять в реагирующую смесь один за другим или ввести все одновременно. Однако, в ряде предпочтительных воплощений одна или несколько реакций проводятся за некоторое время до последующих. Например, когда проба реагирует с аденозином и S-АГ гидролазой, реакции образования S-АГ из гомоцистеина и аденозина дают пройти и только после этого приступают к оценке аденозина. В клиническом химическом анализе повсеместно принято использование стандартных калибровочных кривых. Та-

ким образом, при анализе по способу настоящего изобретения для построения стандартной кривой сигнал/ответ можно использовать не клинические пробы, а образцы с известным содержанием гомоцистеина, а затем по готовой кривой способом интерполяции вывести содержание гомоцистеина в неисследованных пробах. При этом точный количественный анализ молекул, испускающих сигнал, или точная оценка окислительно-восстановительного потенциала становятся необязательными.

Способ анализа, предложенный настоящим изобретением, может быть использован для диагностики и контроля патологических и потенциально патологических состояний, вызванных содержанием гомоцистеина в биологических жидкостях и тканях или отражающихся на нем. К этим состояниям относится атеросклероз, заболевания крови, авитаминозы и/или врожденные нарушения обмена веществ. Этот способ анализа можно также использовать для оценки эффекта фармацевтических препаратов, например, антифолатных средств.

Еще один аспект настоящего изобретения рассматривает приспособление для анализа, например, в виде набора реактивов, в который входит: фермент, преобразующий гомоцистеин; субстрат к этому ферменту, отличный от гомоцистеина; средство подачи сигнала; и, возможно, средство оценки сигнала.

В одном из предпочтительных случаев в набор реактивов входят:

фермент, преобразующий цистеин, например, S-аденозил-гомоцистеин гидролаза;

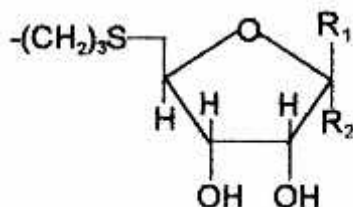
один или несколько субстратов к упомянутому ферменту, отличных от гомоцистеина;

средства приготовления поддающегося регистрации производного от анализируемого вещества, которое выбирают из числа ко-субстрата к гомоцистеину и продуктов ферментного преобразования гомоцистеина;

и, возможно, средства спектрометрической или колориметрической оценки упомянутого поддающегося регистрации производного, с помощью которых получают показатель содержания гомоцистеина в пробе.

В другом случае в набор входят аденозин; S-аденозил-гомоцистеин гидролаза; фермент, преобразующий аденозин; возможно, ко-субстрат к упомянутому ферменту, преобразующему аденозин; и средства выработки фотометрически регистрируемого ответного сигнала от упомянутого ко-субстрата или от продукта ферментного преобразования аденозина упомянутым аденозин-преобразующим ферментом. Например, в качестве фермента, преобразующего аденозин, можно взять аденозин киназу, а в качестве средств выработки ответа – АТФ, люциферин и люциферазу. Можно также использовать аденозин деаминазу, а в качестве средств выработки ответа – нуклеозид фосфорилазу, ксантиноксидазу и пероксидазу.

В другом воплощении настоящего изобретения в набор входят: аденозин; S-аденозил-гомоцистеин; антитело к S-аденозил-гомоцистеину, возможно, связанное с матричной частицей; полигаптен к упомянутому антителу; и, возможно, средства для фотометрической оценки агглютинации или преципитации комплексов антитело:полигаптен. В этом воплощении полигаптен может быть приготовлен из полимера-основы, к которой присоединяют 6-тиоэфиры фуранозы, т.е. относительно подвижные остатки состава



Их можно приготовить, например, путем реакции карбоновой кислоты, описанной формулой I (или ее ангидрида или кислотного галогенида), с полимером, к которому присоединен ряд аминов (например, полилизин), или путем реакции амина формулы I с полимером, к которому присоединены карбоксильные группы.

В наборах для анализа все или некоторые реактивы могут присутствовать в сухом виде, может присутствовать матрица/формат для проведения реакции. Также в набор для анализа, в качестве средства оценки поддающегося регистрации анализируемого вещества или производного от него, может входить сравнительно недорогой спектрометрический или колориметрический аппарат, например, источник света и детектор, предназначенный для измерения интенсивности света с длиной волны, соответствующей анализируемому веществу, и т.д., или даже простая колориметрическая таблица.

Ниже настоящее изобретение иллюстрируют, но не ограничивают, примеры. Пример 19 описывает особо предпочтительный способ анализа.

Пример 1.

Пробу (водный раствор гомоцистеина для калибровки или мочу, или плазму крови, или жидкую часть лимфы для клинического анализа) обработали восстановителем (например, 10 мМ дитиотреитолом). Эту пробу добавили, предпочтительно с доведением окончательной концентрации гомоцистеина до 10^{-6} – 10^{-5} моль/л, к раствору при 37°C, содержащему кроличий IgG 5 мг/мл, аденозин деаминазу 20 мЕг/мл, нуклеозид фосфорилазу 20 мЕг/мл, ксантин оксидазу 20 мЕг/мл, хренную пероксидазу 500 мЕг/мл, 10 ммоль/л дитиотреитола, 100 ммоль/л натрия фосфата, pH 7,40, и 100 мЕг S-аденозил-I- гомоцистеин гидролазы. Одновременно или вслед за этим, но предпочтительно через 10 минут (чтобы прошли превращения аденозина в пробе) добавили аденозин до окончательной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. В течение 10 минут из-

меряли поглощение ультрафиолетовых лучей, а ответ измеряли при 292 нм в кинетическом режиме, затем вычислили $\Delta A/\Delta t$.

В клинических анализах концентрация гомоцистеина может вычисляться путем интерполяции стандартной кривой, выполненной по известным образцам.

Пример 2.

Пробу (как в примере 1) обработали восстановителем (например, 10 мМ дитиотреитолом). Эту пробу добавили, предпочтительно с доведением окончательной концентрации гомоцистеина до 10^{-6} – 10^{-5} моль/л, к раствору при 37°C, содержащему кроличий IgG 5 мг/мл, аденозин деаминазу 20 мЕг/мл, ксантин оксидазу 20 мЕг/мл, нуклеозид фосфорилазу 20 мЕг/мл, хренную пероксидазу 500 мЕг/мл, 10 ммоль/л дитиотреитола, 100 ммоль/л натрия фосфата с pH доведенным до 7,40, и 20 мЕг S-аденозил-I-гомоцистеин гидролазы. Затем, предпочтительно через 10 минут, чтобы прошли превращения аденозина в пробе, добавили S-аденозил-I-гомоцистеин до окончательной концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и в течение 10 минут измеряли поглощение ультрафиолетового излучения. При 292 нм в кинетическом режиме вычислили $\Delta A/\Delta t$.

В клинических анализах концентрацию гомоцистеина можно вычислять путем интерполяции по стандартной кривой, построенной по стандартным образцам.

Пример 3.

Аналитический буфер.

0,1 М фосфатный буфер pH 7,4, содержащий 1 мг/мл кроличьего IgG и 10 ммоль/л дитиотреитола.

Процедура анализа.

К 150 мкл буфера добавили 3 мЕг S-аденозил-I-гомоцистеин гидролазы и пробу (предпочтительно обработанную как описано в примерах 1 и 2). Ферментную реакцию инициировали, добавив аденозин, растворенный в аналитическом буфере, с окончательной концентрацией $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Через 10 минут добавили 750 мкл раствора буфера, содержащего 20 мЕг аденозин деаминазы, 20 мЕг нуклеозид фосфорилазы, 20 мЕг ксантин оксидазы, 375 мЕг хренной пероксидазы. Поглощение ультрафиолетового излучения при 292 нм измеряли в течение 5 минут в кинетическом режиме. Вычисляли $\Delta A/\Delta t$. Параллельно анализ повторили, но без добавления S-аденозил-I-гомоцистеин гидролазы. Определяли разницу в значениях $\Delta A/\Delta t$ и вычислили концентрацию гомоцистеина путем интерполяции по стандартной кривой.

Пример 4.

Процедуру анализа проводили, как в примере 3, вплоть до первого перерыва. После этого 10-минутного перерыва добавили аналитический раствор, содержащий меченный флуоресцеином аденозин и моноклональные антитела к аденозину. Оставшийся аденозин и меченный флуоресцеином аденозин конкурируют за связывание с антителами. Количество меченого аденозина, связавшегося с антителами, оценили обычным способом поляризации флуоресценции, а концентрацию гомоцистеина вычислили путем интерполяции по стандартной кривой.

Пример 5.

Аналитический буфер.

0,1 М фосфатный буфер с pH 7,4, содержащий 1 мг/мл кроличьего IgG и 10 ммоль/л дитиотреитола.

Раствор S-АГ гидролазы

40 мЕг/мл S-аденозил-I-гомоцистеин гидролазы растворили в аналитическом буфере.

Раствор аденозина

$5 \cdot 10^{-8}$ моль/мл аденозина растворили в аналитическом буфере.

Раствор аденозин деаминазы

200 мЕг/мл аденозин деаминазы растворили в аналитическом буфере.

Раствор фенола/нитроцианида

10 мг/мл фенола и 50 мкг/мл натрия нитроцианида в воде.

Раствор гипохлорита

11 ммоль/л NaOCl растворили в 125 мМ NaOH.

Процедура анализа.

1. 75 мкл раствора аденозина и 75 мкл раствора S-АГ гидролазы смешали с пробой (предпочтительно обработанной, как описано в примерах 1–4) и выдержали при 37°C 10 минут.

2. 100 мкл раствора аденозин деаминазы добавили к смеси и выдержали ее при 37°C 5 минут.

3. Добавили 750 мкл раствора фенола/нитроцианида и 750 мкл раствора гипохлорита. Через 30 минут при 37°C измерили затухание при 628 нм. Параллельно опыт повторили, но без добавления S-АГ гидролазы. Нашли разницу между двумя значениями затухания при 628 нм и вычислили концентрацию гомоцистеина путем интерполяции этой разницы по стандартной кривой, полученной с использованием известных образцов.

Пример 6.

Приготовление меченного люминофором S-АГ.

Приготовили 10 ммоль/л раствор S-АГ в диметилформамиде и разбавили в соотношении 1:10 100 ммоль/л фосфатным буфером, pH = 7,5. К этому раствору добавили флуоресцеина изотиоцианат, с окончательной концентрацией 1 ммоль/л. Через 60 минут при температуре окружающей среды конъюгат S-АГ-флуоресцеин очистили путем ЖХВР в колонне Chromasil C-18 при 260 нм с градиентной смесью 25 мМ аммония ацетата (pH 7,0) и метанола.

Пример 7.

Приготовление антител к S-АГ.

а) приготовление антигена: к 1 ммоль/л раствору S-АГ в 25 ммоль/л фосфатного буфера pH = 7,4 (125 ммоль/л NaCl) добавили бычий сывороточный альбумин, с окончательной концентрацией 5 мг/мл. К этой смеси добавили бис (сульфосукцинимидил)субэрат с окончательной концентрацией 1 ммоль/л и оставили на 60 минут. (pH здесь поддерживали на низком уровне, чтобы стимулировать конъюгацию у аденозил-амин, а не у гомоцистеин амина). Белковую фракцию раствора – в которой также имеются конъюгаты бычьего сывороточного альбумина и S-АГ – выделяли путем хроматографии с исключением по размеру в колонне Pharmacia Superose 12 с физиологическим раствором в фосфатном буфере в качестве элюента.

б) приготовление гибридом: гибридомы с описанным выше антигеном готовят согласно процедуре, описанной у James W. Gooding (Джеймс. У.Гудинг) в "Monoclonal antibodies: Principle and Practice" (Моноклональные антитела: теория и практика), Academic Press, London, 1983, глава 3.

с) отбор гибридом

(i) гибридомы, продуцирующие антитела к S-АГ, идентифицируют следующим образом:

обычным способом твердофазного иммунного анализа измеряют содержание IgG в супернатанте гибридом. Затем супернатант смешивают в кювете с буфером, содержащим 50 ммоль/л фосфата, 120 ммоль/л NaCl, pH = 7,4 и 0,1 мг кроличьего IgG на мл, с окончательной концентрацией 0,1 мкмоль/л мышинового IgG. Добавляют меченный флуоресцеином S-АГ, приготовленный по примеру 6, с окончательной концентрацией 0,02 мкмоль/л. Через 10 минут измеряют степень поляризации. Используя спектрофлуорометр, снабженный устройством, поляризующим флуоресценцию, измеряют

A = интенсивность флуоресценции, когда плоскость поляризации падающего света параллельна плоскости поляризации фильтра, фильтрующего испускаемый свет,

B = интенсивность флуоресценции, когда плоскость поляризации падающего света перпендикулярна плоскости поляризации фильтра, фильтрующего испускаемый свет,

и при длине волны возбуждающего излучения 494 нм и регистрации испускаемого излучения с длиной волны 517 нм

вычисляют степень поляризации как $(A-B)/(A+B)$. Низкая степень поляризации свидетельствует о том, что многоканальные мышинные антитела не связываются с S-АГ.

(ii) Из гибридом, отобранных по (i), отбирают гибридомы, реагирующие с аденозином и/или гомоцистеином: моноклональные антитела к S-АГ из супернатанта гибридом наносят на поверхности микротитровальных лунок, как описано ниже, в примере 9. Аденозин (или гомоцистеин), меченный углеродом-14 (можно приобрести в Amersham Ltd, UK) в буфере, содержащем 25 ммоль/л фосфата, 120 ммоль/л NaCl и 1 мг/мл кроличьего IgG, pH = 7,4, добавляют в микротитровальные лунки. Через 60 минут лунки трижды промывают тем же буфером (разумеется, без аденозина или гомоцистеина). Высокие значения радиоактивности, оставшейся в лунках, свидетельствуют о том, что гибридомы продуцируют антитела, которые связываются с аденозином (или гомоцистеином) самим по себе. Эти антитела не используются для анализа.

(iii) приготовление моноклонального IgG: гибридомы, продуцирующие антитела, которые связываются с S-АГ, согласно (i), но не связываются с аденозином или гомоцистеином, согласно (ii), отбирают для приготовления моноклонального IgG. Отобранные гибридомы используют для развития асцитов у мышей или производства клеточных культур *in vitro* по стандартным технологиям. Моноклональные антитела выделяют из асцитов и клеточных культур по стандартным технологиям. См. Games W. Gooding "Monoclonal Antibodies", Academic Press, London, 1983.

Пример 8.

Иммунный анализ на L-гомоцистеин с поляризацией флуоресценции.

Раствор фермента.

50 ммоль/л фосфатный буфер pH = 7,4, содержащий 0,1 мг/мл кроличьего IgG, 120 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л дитиотрейтола, 10 Ег/л S-аденозил-L-гомоцистеин гидролазы и 0,1 ммоль/л аденозина.

Раствор меченного флуоресцеином S-АГ.

S-АГ в конъюгации с флуоресцеином (по примеру 6) растворяют с окончательной концентрацией 1 мкмоль/л в 50 ммоль/л фосфатного буфера pH = 7,4 с 125 ммоль/л NaCl и 0,2 мг/мл кроличьего IgG.

Раствор антител.

Моноклональные антитела к S-АГ (не реагирующие с аденозином и предпочтительно не реагирующие с гомоцистеином), например, приготовленные по примеру 7, растворяют с окончательной концентрацией 0,1 мкмоль/л в 50 ммоль/л фосфатного буфера pH = 7,4 с 125 ммоль на л NaCl и 0,2 мг/мл кроличьего IgG.

Процедура анализа.

В кювете 15 мкл плазмы крови или жидкой части лимфы (первоначально ряд проб с известным содержанием гомоцистеина) смешали с 100 мкл раствора фермента и выдержали 15 минут при 37°C. Добавили 100 мкл раствора меченного флуоресцеином S-АГ, затем, 1,0 мл раствора антител. С помощью спектрофлуорометра, снабженного приспособлением для поляризации флуоресценции, измерили степень поляризации, как описано в примере 7 (с)(i) и построили график ее зависимости от концентрации гомоцистеина.

Анализ можно выполнить, используя меченые гаптены и антитела из примеров 11 и 13 или 15 и 17 вместо описанных в примерах 6 и 7.

Пример 9.

Иммунный анализ связанного фермента микротитрованием.

(а) используется раствор фермента из примера 8;

(b) раствор меченного пероксидазой S-АГ: 0,5 мг хреновой пероксидазы растворили в 1 мл очищенной воды. 200 мкл раствора 0,02 моль/л натрия периодата добавили к смеси и перемешивали ее в течение 20 минут при температуре окружающей среды, затем диализовали в течение ночи с 10 мМ буфером из натрия

ацетата, pH = 4,4. Добавили S-АГ с окончательной концентрацией 0,1 ммоль/л и довели pH до 6,0. Раствор перемешивали 4 часа при температуре окружающей среды. Добавили 100 мкл свежеприготовленного водного раствора 4 мг/мл натрия борогидрида и выдерживали в течение 2 часов при 4°C. Peroксидазу и ее S-АГ конъюгаты выделяли путем хроматографии с исключением по размеру в колонне Superose 6 (фирмы Pharmacia, Швеция);

(с) антитела к S-АГ, нанесенные на поверхности микротитровальных лунок.

Поликлональный овечий IgG, от овец, иммунизированных мышинным IgG, растворили с окончательной концентрацией 1 мг/мл в 100 ммоль боратного буфера, pH = 9,0. По 300 мкл этого раствора налили в лунки микротитровальных планшетов из полистирола. Через 120 минут при 37 градусах Цельсия, лунки 5 раз промыли солевым раствором в фосфатном буфере. Затем приготовили моноклональные антитела к S-АГ из мышинного IgG по примеру 7 и растворили в солевом растворе, растворенном в фосфатном буфере, с окончательной концентрацией 50 мкг/мл. Добавили по 200 мкл этого раствора моноклонального IgG в каждую лунку и выдержали 120 минут при 37°C. Затем лунки промыли 5 раз солевым раствором в фосфатном буфере, содержащем 0,1 мг/мл кроличьего IgG.

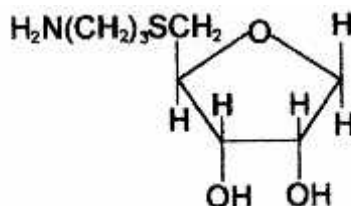
(d) Процедура анализа.

Пробу плазмы крови или жидкой части лимфы в 25 мкл (первоначально ряд проб с известным содержанием гомоцистеина) смешали с 500 мкл раствора фермента и выдержали при 37°C в течение 15 минут. Добавили 50 мкл раствора меченного пероксидазой S-АГ, перемешали и 250 мкл этой смеси добавили в лунку из микротитровальных лунок, покрытых антителами к S-АГ (приготовленными по п. (с)), предварительно с помощью буфера доведя pH смеси до 7,4. Через 60 минут при 37°C лунки трижды промыли солевым раствором в фосфатном буфере, содержащем 0,1 мг/мл кроличьего IgG. В каждую лунку добавили 100 мкл 1 мг/мл раствора ортофенилендиамина в 0,1 моль/л цитратном буфере, pH = 6,0, содержащего 0,015% перекиси водорода. Через 10–30 минут измерили поглощение света в каждой лунке при 450 нм. Выстроили график его зависимости от концентрации гомоцистеина.

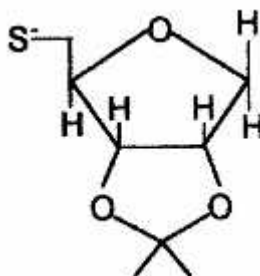
Пример 10.

Приготовление гаптенa.

3-S-(1-ангидро-D-рибофуранозил)-тиопропиламин



(a) Активированный гидрокси-защищенный меркаптан
(Соединение (8) на схеме (Е) выше)



Один эквивалент метил β-D-рибофуранозид (соединение (1), выше, имеющееся в продаже) реагировал со смесью 5 эквивалентов триметилселилметана сульфата и одного эквивалента бора трифторида этерата по процедуре Jun и др. (Carb. Res. 163: 247–261 (1987)). Добавили в виде мелкого порошка 0,5 эквивалента продукта 1-ангидро-D-рибозы (соединение (2)), небольшими порциями, при постоянном помешивании, в смесь ацетон/серная кислота, приготовленную путем добавления 6,3 мл концентрированной серной кислоты (медленно) к 100 мл только что дистиллированного ацетона на ледяной бане. Ледяную баню убрали, и реакция продолжалась при температуре окружающей среды в течение 8 часов. Полученное твердое белое кристаллическое вещество растворили в хлороформе, промыли водным гидроксидом натрия, разбавленной соляной кислотой и, наконец, водой, высушили и выпарили. Получили 2,3-изопропилиден-D-рибо-производное от 1-ангидро-D-рибозы (соединение (2)). Один эквивалент этого вещества и два эквивалента углерода тетрабромида растворили в сухом эфире и охладили на льду. При постоянном перемешивании и охлаждении на льду медленно добавили два эквивалента трифенилфосфина. Ледяную баню убрали, и смесь, нагреваясь до температуры окружающей среды, реагировала с постепенным выделением бромида водорода. По окончании реакции избыток реагента нейтрализовали, добавив метанол. Бромид-производное (соединение (6)) выделили путем фильтрации и выпаривания фильтрата. К бромид-производ-

ному добавили тиомочевину (один эквивалент), растворенную в теплой воде и разбавленную очищенным спиртом. Смесь довели до температуры испарения и периодически хорошо встряхивали в течение 30 минут после того, как бромид-производное растворилось. Смесь охладил на льду, профильтровали и получили твердое вещество, которое обработали щелочной водой. Получили гидроксил-защищенный меркаптан (соединение (7)) в органической фазе. Его перевели в активированную форму (соединение (8)), обработав метоксидом в метаноле. Дальше реакции проводили, как описано ниже.

(b) 3-S-(1-ангидро-D-рибофуранозил)-тиопропиламин.

Один эквивалент свежеприготовленного соединения (пример 10а, соединение (8)) реагировал с одним эквивалентом акрилонитрила с образованием тиоэфира (соединение (9)). Полученное соединение восстановили путем обработки LiAlH_4 в сухом эфире и выделили свободный, со снятой защитой, амин (соединение (10)) путем обработки водной соляной кислотой. Соответствующие аминопропилтиоэфиры, где R_1 и R_2 – это не водород, готовят аналогично, например, с использованием имеющихся в продаже соединений (1) и (3) в качестве исходных материалов.

Пример 11.

Меченые гаптены.

Раствор 50 ммоль/л соединения из примера 10 в диметилформамиде (ДМФ) разбавили в соотношении 1:5 (по объему) 0,1 М раствором бикарбоната (pH 9,2). К этому раствору добавили флуоресцеина изотиоцианат с окончательной концентрацией 12 ммоль/л. Через 60 минут при температуре окружающей среды конъюгат соединения из примера 10 с флуоресцеином очистили при помощи обращенно-фазной хроматографии в колонне Kromasil 100 A C-18 с градиентной смесью 20 мМ аммония ацетата (pH 7,0) и метанола.

Пример 12.

Приготовление антигенов.

К 1 ммоль/л раствору соединения из примера 10 в буфере из 50 ммоль/л фосфата, 125 ммоль/л NaCl (pH 7,4) добавили бычий сывороточный альбумин, с окончательной концентрацией 5 мг/мл. К этой смеси добавили бис(сульфосукцинимидил)субэрат с окончательной концентрацией 1,2 ммоль/л, и смесь реагировала 60 минут. Белковую фракцию, в которую входит конъюгат гаптен-бычий сывороточный альбумин, выделили путем хроматографии с исключением по размеру в колонне Pharmacia Superose 12 с солевым раствором в фосфатном буфере в качестве элюента.

Пример 13.

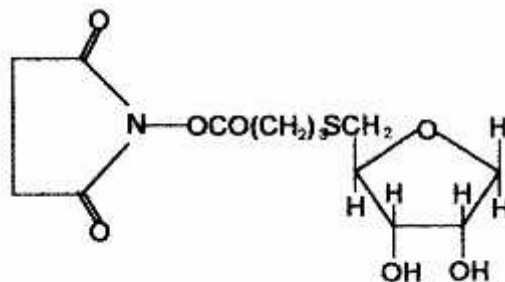
Приготовление антител.

Антитела к соединению из примера 10 готовятся, как описано в примере 7 с использованием антигена из примера 12. Антитела, не реагирующие с S-АГ и реагирующие с аденозином, не используются, а также – желательны – и антитела, реагирующие с гомоцистеином.

Пример 14.

Приготовление гаптенов.

N-гидрокси-сукцинимидил 3-S-(1-ангидро-D-рибофуранозил)тиобутанат.



Один эквивалент соединения из примера 10(а), свежеприготовленного, реагировал с одним эквивалентом этил 4-бром-бутирата с образованием эфира (11). Его гидролизовали до высвобождения кислоты путем основного гидролиза водным натрием гидроксидом в диоксане и сняли защиту путем обработки водной соляной кислотой. Получили незащищенную свободную кислоту (соединение (12)). Один эквивалент его смешали с двумя эквивалентами N-гидрокси-сукцинимидила в ледяном диметилформамиде и добавили туда 1,2 эквивалента дициклогексилкарбодиимидила при постоянном перемешивании. Реакции дали пройти, оставив ее при температуре окружающей среды на 18 часов, после чего охладил и добавили ледяной эфир. Выпавший в осадок NHS-эфир (соединение (13)) рекристаллизовали из ДМФ/эфира, высушили и хранили при 4°C над десикатором.

Соответствующие NHS-эфиры, где R_1 и R_2 – это не водород, готовят аналогично, например, с использованием имеющихся в продаже соединений (1) и (3) в качестве исходных материалов.

Пример 15.

Меченые гаптены.

Раствор 50 ммоль/л соединения из примера 14 в ДМФ разбавили в соотношении 1:5 (по объему) 0,1 М буферным раствором бикарбоната (pH 9,2). К этому раствору добавили 5-аминацетамид-флуоресцеин (флуоресцеинил глицин амид) с окончательной концентрацией 12 ммоль/л. Через 60 минут при температуре окружающей среды конъюгат флуоресцеина с 3-S-(1-ангидро-D-рибофуранозил) тиобутановой кислотой

очистили способом обращенно-фазной хроматографии в колонне Kromasil 100 A C-18 с градиентной смесью 20 мМ аммония ацетата (pH 7,0) и метанола.

Пример 16.

Приготовление антигенов.

К раствору бычьего сывороточного альбумина (5 мг/л в буфере из 50 ммоль/л фосфата, 125 ммоль/л NaCl (pH 7,4)) добавили соединение из примера 14, с окончательной концентрацией 1 ммоль/л. Смеси дали про-реагировать в течение 60 минут, затем отделили белковую фракцию, в которую входит конъюгат гаптен-бычий альбумин, способом хроматографии с исключением по размеру в колонне Pharmacia Superose 12 с солевым раствором в фосфатном буфере в качестве элюента.

Пример 17.

Приготовление антител.

Антитела к соединению из примера 14 готовят, как описано в примере 7 с использованием антигена из примера 12. Антитела, не реагирующие с S-АГ и реагирующие с аденозином, не используются, а также – желательны – антитела, реагирующие с гомоцистеином.

Пример 18.

Иммунный анализ с поляризацией флуоресценции.

Раствор фермента.

50 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 4 мг/мл казеина, 120 ммоль/л NaCl и 10 Ег/л S-аденозил-L-гомоцистеин гидролазы.

Раствор дитиотреитола ДТТ.

Дитиотреитол растворили в воде в концентрации 50 ммоль/л и довели pH до 3,0 при помощи HCl.

Раствор аденозина.

1,8 ммоль/л аденозина в 50 ммоль/л фосфатном буфере (pH 7,4).

Раствор меченного флуоресцеином S-АГ

50 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий S-АГ в конъюгации с флуоресцеином, приготовленный по примеру 6.

Раствор антител.

Моноклональные антитела к S-АГ (например, по примеру 7) растворили с окончательной концентрацией 0,1 мкмоль/л в 50 ммоль/л фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 120 ммоль/л NaCl и 1 мг/мл казеина.

Процедура анализа.

Этап 1

В кювете смешали 15 мкл пробы, 10 мкл раствора фермента и 10 мкл раствора аденозина с 10 мкл кислого раствора ДТТ и выдержали 15 минут при 37°C.

Этап 2

В кювету добавили 100 мкл меченного флуоресцеином S-АГ и 1,0 мл раствора антител. С помощью спектрофлуорометра, снабженного аппаратом для поляризации флуоресценции, измерили степень поляризации, как описано в примере 7 (с)(i), и выстроили график ее зависимости от концентрации гомоцистеина.

Пример 19.

Иммунный опыт с поляризацией флуоресценции.

Раствор фермента.

50 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мг/мл казеина, 120 ммоль/л NaCl и 10 Ег/л S-аденозил-L-гомоцистеин гидролазы.

Раствор дитиотреитола (ДТТ)

Дитиотреитол растворили в воде в концентрации 50 ммоль/л и довели pH до 3,0 с помощью HCl.

Раствор меченного флуоресцеином S-АГ/аденозина

50 ммоль/л фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 10 мкмоль/л S-АГ в конъюгации с флуоресцеином (приготовленного по примеру 6) и 1,8 ммоль/л аденозина.

Раствор антител.

Моноклональные антитела к S-АГ (например, приготовленные по примеру 7) растворили с окончательной концентрацией 0,1 мкмоль/л в 50 ммоль/л фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 120 ммоль/л NaCl и 1 мг/мл казеина.

Процедура анализа.

В кювете смешали 10 мкл плазмы крови (жидкой части лимфы), 100 мкл раствора фермента и 10 мкл раствора меченого S-АГ/аденозина с 30 мкл кислого раствора ДТТ и выдержали 15 минут при 37°C.

После этого добавили 1,0 мл раствора антител. С помощью спектрофлуорометра, снабженного устройством для поляризации флуоресценции, измерили степень поляризации (как описано в примере 7 (с)(i)) и выстроили график ее зависимости от концентрации гомоцистеина.

Анализ из примеров 18 и 19 можно проводить с использованием меченых гаптен и антител, описанных в примерах 11 и 13 или 15 и 17 вместо тех, что описаны в примерах 6 и 7.

Пример 20.

Люминесцентный анализ.

Аналитический буфер I.

50 мМ буфер Пайпса (Pipes) (pH 6,6), содержащий 1 мг/мл казеина, 10 мМ ДТТ, 0,5 мМ MgCl₂ и 30 мМ KCl.

Аналитический буфер II.

40 мМ буфер Гепеса (Hepes) (pH 7,75), содержащий 4 ммоль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты, 20 мМ магния хлорида и 0,36 ммоль/л ДТТ.

Аналитический буфер III.

40 мМ буфер Гепеса (pH 7,75), содержащий 1,6 мкг/мл люциферазы (от вида *Photinus pyralis*), 700 мкмоль/л D-люциферина, 20 ммоль/л магния хлорида, 4 ммоль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,36 ммоль/л ДТТ и 0,3 ммоль/л АМФ (адениловой кислоты).

Процедура анализа.

К 130 мкл аналитического буфера I добавили 3 Ег S-аденозил-I- гомоцистеин гидролазы, 20 мкл пробы и выдержали 15 минут при 37°C. Затем добавили аденозин, растворенный в аналитическом буфере I, с окончательной концентрацией 5×10^{-6} моль/л. Через 5 минут при 37°C добавили 750 мкл аналитического буфера I, содержащего $0,7 \times 10^{-5}$ моль/л АТФ и 1 мЕг аденозин киназы и выдержали при 37°C 5 минут. Этот раствор разбавили в соотношении 1:100 (по объему) аналитическим буфером II и 50 мкл этого разбавленного раствора тотчас же добавили к 500 мкл аналитического буфера III. Аналитические буферы II и III имели температуру окружающей среды (21°C). Полученную люминесценцию измеряли фотометром при 550 нм. Параллельно провели анализ без участия S-аденозил-I-гомоцистеин гидролазы. Для клинических анализов концентрацию гомоцистеина можно вычислить путем интерполяции по стандартной кривой разницы в люминесценции при реакциях с S-аденозил-I-гомоцистеин гидролазой и без нее.

Пример 21.

Приготовление поликлональных антител.

Кроличьи поликлональные антитела к антигенам из примеров 12 и 16 выращивали по процедуре, опубликованной *Dako Corporation, Copenhagen, Denmark*. Поликлональный IgG очищали от собранной антисыворотки в соответствии с той же процедурой. Поликлональные антитела очищали от антител, реагирующих с аденозином и остатками гомоцистеина, пропуская их через колонну Racti-Gel с иммобилизованными остатками аденозина и гомоцистеина (гель и процедура – продукты фирмы *Pierce Chemical Company, Belgium*). Антитела, не реагирующие с S-АГ, также исключали. Отобранные антитела можно использовать в анализах, описанных выше.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
