

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392191 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.28

(51) Int. Cl. G01N 33/50 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.01

(54) БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР

(31) 2021/004329

(72) Изобретатель:

(32) 2021.03.05

Биди Бюлент, Олгун Абдуллах (TR)

(33) TR

(86) PCT/TR2022/050179

(74) Представитель:

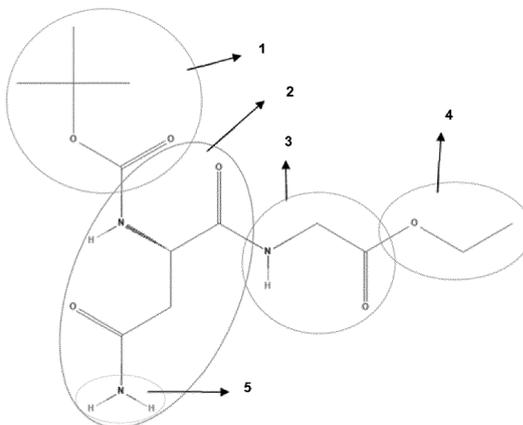
(87) WO 2022/186803 2022.09.09

Толыбаев Ж.М. (KZ)

(71) Заявитель:

АРГЕРОН МЕДИКАЛ АРАШТИРМА
САНАЙИ ВЕ ТИДЖАРЕТ АНОНИМ
ШИРКЕТИ (TR)

(57) Изобретение относится к набору для измерения скорости дезамидирования, который включает в себя исходный раствор соединения Вос-Asn-Gly-OEt в деионизированной/дистиллированной воде и исходный раствор соединения Вос-Asp-Gly-OEt в деионизированной/дистиллированной воде.



A1

202392191

202392191

A1

ОПИСАНИЕ

БИОХИМИЧЕСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ НАБОР

5 Область техники

Изобретение относится к набору, предназначенному для биологических образцов в области диагностики *in vitro* (биохимической медицинской диагностики и т.д.) или для использования в других областях (фармации, химии и т.д.).

10

В частности, изобретение относится к набору, предназначенному для использования для измерения влияния растворов на скорость дезамидирования белков, которые они содержат.

15

Уровень Техники

Белки являются одними из основных структурных и функциональных молекул, входящих в состав живых организмов. Белки — это крупные органические соединения, которые образуются в результате связывания аминокислот друг с другом в цепочки. Пептиды — это короткие полимеры, образующиеся путём связывания α -аминокислот в определённом порядке. Связь между двумя аминокислотными остатками известна как "амидная связь" или пептидная связь. Белки представляют собой полипептидные молекулы (или содержат множество полипептидных субъединиц). Основное различие заключается в том, что пептиды короткие, в то время как полипептиды/белки длинные.

Аспарагин (Asp, N) и глутамин (Gln, Q), две из 20 различных аминокислот в структуре белков, имеют амидные группы в своих боковых цепях. Удаление амидных групп в белках, содержащих эти аминокислоты, называется дезамидированием белка. Дезамидирование белка может происходить ферментативно или спонтанно. В результате дезамидирования происходят изменения в структуре и заряде белков. В результате дезамидирования, особенно в долгоживущих белках, обнаруженных в долгоживущих клетках, в частности нейронах, дезамидированные белки могут накапливаться с течением времени, вызывая структурные и функциональные нарушения в этих белках и, следовательно, в клетках, в которых эти белки присутствуют. В литературе имеется множество научных данных, подтверждающих

роль дезамидирования белков при болезни Альцгеймера, лобно-височной деменции и многих других хронических заболеваниях.

По этой причине необходимо определить факторы или вмешательства, которые влияют на скорость дезамидирования, разработать стратегии, которые могут предотвратить/замедлить дезамидирование, и определить показатели дезамидирования у отдельных лиц. Таким образом, ожидается, что они смогут внести значимый вклад в профилактику и отсрочку старения и возрастных заболеваний.

10 Дезамидирование является важным фактором не только старения, но и стабильности фармацевтических препаратов, содержащих белок (в частности вакцин). Необходимо измерить влияние растворов, в которых растворены эти препараты, на скорость дезамидирования белка и принять меры для замедления скорости дезамидирования при добавлении в растворы. В современном уровне техники существуют исследования на эту тему.

Патентная заявка США №US5273886 Изобретение относится к способам и средствам для количественного определения содержания изоаспартила в полипептидах путём селективного метилирования их фрагментов, катализируемого белковым ферментом L-изоаспартилметилтрансферазой. Поскольку дезамидирование боковых цепей аспарагина в определённых участках белка и результирующее образование изоаспартата, по-видимому, являются важным фактором, способствующим деградации белка в мягких условиях, изобретение также относится к методу количественной оценки деградации белка, связанной с образованием изоаспартата,

25

Несмотря на то, что в современном уровне техники существуют исследования на эту тему, они позволяют лишь косвенно анализировать компоненты, содержащиеся внутри чистых белков. Поскольку это может быть использовано только для измерения дезамидирования очищенных белков, это не может быть использовано для биологических образцов с более сложными матрицами, такими как плазма крови. До сих пор не существует метода тестирования, который можно было бы использовать для измерения влияния биологических образцов (сыворотки, плазмы, слюны, спинномозговой жидкости, синовиальной жидкости, мочи, экстрактов клеток/тканей/органов и т.д.) человека и других живых существ на скорость дезамидирования белка. По этой причине существует необходимость в разработке теста, который потенциально может быть использован в медицинских биохимических лабораториях для измерения влияния биологических образцов на скорость

35

дезамидирования белка и выявления вмешательств, влияющих на скорость деаминации.

5 В результате, ввиду описанных выше недостатков и неадекватности существующих решений по данному вопросу, возникла необходимость в разработке наборов, которые измеряют скорость деаминации.

Цель изобретения

10 Настоящее изобретение относится к набору для измерения скорости деаминации, который отвечает вышеупомянутым требованиям, устраняет все недостатки и дает некоторые дополнительные преимущества.

15 Основной целью изобретения является разработка набора, который измеряет влияние на скорость деаминации при добавлении в растворы, содержащие белковые фармацевтические препараты.

20 Одной из целей изобретения является разработка измерительного набора, который позволяет определять факторы, влияющие на скорость деаминации, исследовать корреляцию индивидуальных различий в скорости деаминации со старением и возрастными заболеваниями и выявлять заболевания, характеризующиеся увеличением скорости деаминации.

25 Для выполнения вышеописанных целей изобретение представляет собой набор для измерения скорости деаминации, содержащий исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Boc-Asn-Gly-OEt, и исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Boc-Asp-Gly-OEt.

30 Структурные и характерные особенности изобретения и все его преимущества будут понятны более четко благодаря подробному объяснению, приведённому ниже, и, следовательно, оценка должна производиться с учётом этого подробного объяснения.

Чертежи, поясняющие изобретение

35

Фиг. 1: Структура соединения Boc-Asn-Gly-OEt

Пояснение к ссылкам

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 | Вос- |
| 2 | Asn |
| 3 | Gly |
| 5 | 4 -Oet |
| 5 | Область, подлежащая дезамидированию |

Подробное описание изобретения

- 10 В этом подробном описании набор для измерения скорости дезамидирования, который является предметом изобретения, объясняется исключительно и без ограничений в целях лучшего понимания вопроса.

- Набор для измерения скорости дезамидирования, являющийся предметом
 15 изобретения, в его наиболее простой форме; содержит исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Вос-Asn-Gly-OEt (предпочтительно в диапазоне 0,000001 – 1000 ммоль, более предпочтительно в концентрации 0,25 ммоль) и исходный раствор в деионизированной/дистиллированной
 20 воде, содержащий соединение Вос-Asp-Gly-OEt (предпочтительно 0,000001 – 1000 ммоль) ммоль, более предпочтительно в концентрации 0,25 ммоль).

- Соединение Вос-Asn-Gly-OEt, образец которого представлен на Фиг. 1, используется как в качестве калибратора и аналитического стандарта при измерениях, так и в качестве дезамидированного элемента при добавлении в биологические образцы. Вос-
 25 (1) и –Oet (4) предназначены для блокирования дипептидов аспарагина (Asn) (2) и глицина (Gly) (3) соответственно, как подробно показано на чертеже. В дезамидированной области (5), показанной на чертеже, структура “NH₂” удаляется путём дезамидирования, в то время как вместо неё присоединяется структура “OH”. Таким образом, соединение Вос-Asn-Gly-OEt превращается в соединение Вос-Asp-Gly-
 30 OEt, и его молекулярная масса увеличивается примерно на 1 (0,98) г/моль. Структуры Вос- (1) и -OEt (4) - в структуре соединения Вос-Asn-Gly-OEt в растворе позволяют блокировать связывание дипептидов Asn (2) и Gly (3) с нежелательными химическими группами во время процесса. Дипептиды Asn (2) и Gly (3) являются одними из структур с самым быстрым из известных спонтанным дезамидированием. По этой причине это
 35 используется при измерениях в качестве калибратора/аналитического стандарта или соединения, подлежащего дезамидированию после добавления в биологические образцы. Поскольку Вос-Asn-Gly-OEt преобразуется в соединение Вос-Asp-Gly-OEt в

результате спонтанного дезамидирования, соединение Boc-Asp-Gly-OEt используется в качестве калибратора и аналитического стандарта при построении калибровочной кривой. Соединение Boc-Asp-Gly-OEt недоступно на рынке, однако оно было специально синтезировано. Деионизированная/дистиллированная вода позволяет
5 растворять соединения Boc-Asn-Gly-OEt и Boc-Asp-Gly-OEt и используется в качестве аналитического контроля.

В образце приложения изобретения, разработанный комплект измерения скорости дезамидирования включает в себя следующие этапы процесса: Приготовление
10 исходного раствора и серийных разведений соединения Boc-Asn-Gly-OEt в деионизированной/дистиллированной воде; Приготовление исходного раствора и серийных разведений соединения Boc-Asp-Gly-OEt в деионизированной/дистиллированной воде; Создание калибровочной кривой на инструменте для измерения с использованием серийных разведений исходного
15 раствора Boc-Asn-Gly-OEt; Создание калибровочной кривой на инструменте для измерения с использованием серийных разведений исходного раствора Boc-Asp-Gly-OEt; аликвотирование биологического образца, воздействие которого на скорость дезамидирования исследуется, в равных объёмах в три разные пробирки; добавление, предпочтительно в диапазоне 1/1000 - 1/2 от конечного объёма реакционной смеси
20 (более предпочтительно в диапазоне 1/10), исходных растворов Boc-Asn-Gly-OEt и Boc-Asp-Gly-OEt (в качестве внутреннего стандарта) в разные пробирки и деионизированной/дистиллированной воды в другую пробирку в качестве контроля; в начале измерений, выполнение измерений из всех трех пробирок, предпочтительно методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией; после инкубации
25 измерение из всех трех пробирок, предпочтительно методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией; вычитание результатов измерений в пробирках с добавлением Boc-Asn-Gly-OEt и Boc-Asp-Gly-OEt от результатов измерений в пробирке с деионизированной/дистиллированной водой; определение скорости дезамидирования путём измерения Boc-Asp-Gly-OEt, образующегося в
30 результате спонтанного дезамидирования в пробирке с добавлением Boc-Asn-Gly-OEt.

Настоящее изобретение основано на принципе спонтанного дезамидирования соединения Boc-Asn-Gly-OEt в растворе в соединении Boc-Asp-Gly-OEt и измерения полученного соединения Boc-Asp-Gly-OEt соответствующим аналитическим методом.
35 Раствор Boc-Asn-Gly-OEt добавляют к любому образцу, влияние которого на скорость спонтанного дезамидирования необходимо измерить. Обеспечивается спонтанное дезамидирование Boc-Asn-Gly-OEt в данной смеси, которую выдерживают при

температуре от 1 до 100°C в течение 1 минуты - 1 месяца. В течение инкубационного периода в результате дезамидирования дипептида Boc-Asn-Gly-OEt в смеси группа —NH₂ [Фиг. 1:(5)] спонтанно высвобождается из молекулы, в то время как аспарагин в соединении превращается в изоаспартат или аспартат с добавлением группы —OH, и происходит увеличение молекулярной массы приблизительно на 1 (0,98) г/моль. Это изменение массы, то есть результирующие Boc-Asp-Gly-OEt и Boc-Isoasp-Gly-OEt, могут быть измерены с помощью масс-спектрометрии, а также с помощью всевозможных оптимизированных методов, основанных на различных химических свойствах группы —NH₂ в аспарагине соединения и группы —OH новообразованного аспартата в соединении.

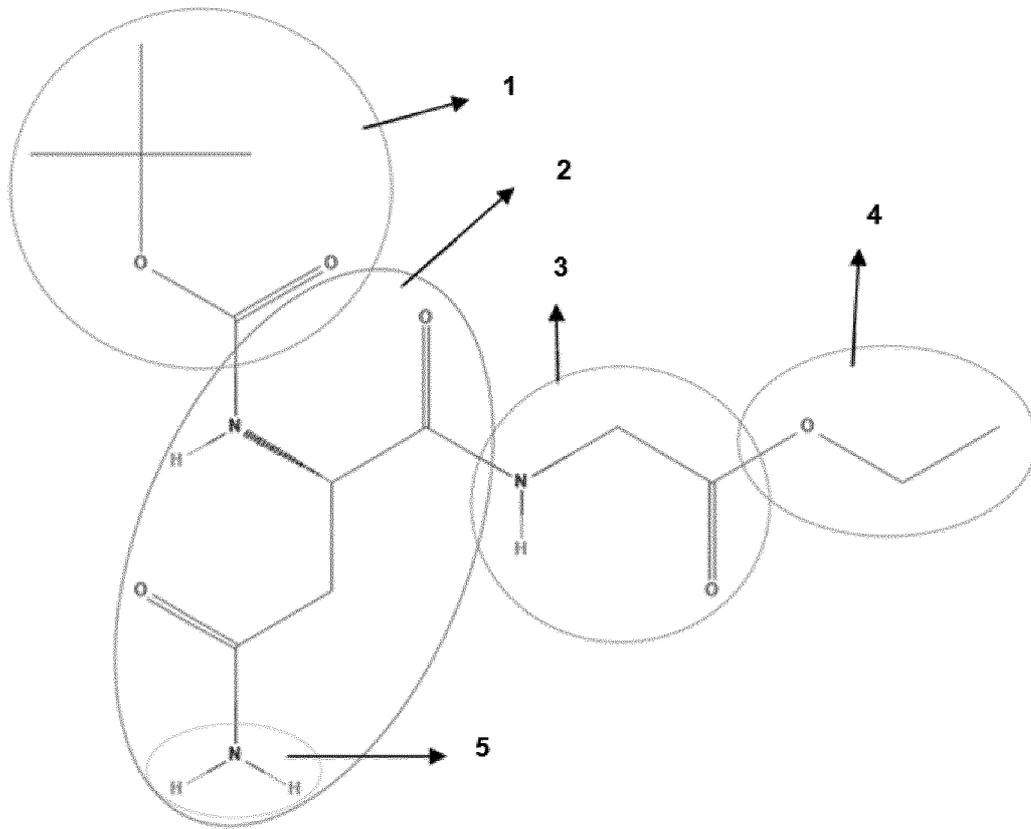
Путём измерения влияния биологических образцов, взятых у отдельных лиц/пациентов, на скорость дезамидирования с использованием теста для измерения скорости дезамидирования, являющегося предметом настоящего изобретения, и путём изучения корреляции индивидуальных различий, которые могут быть обнаружены и которые влияют на скорость дезамидирования, со старением и возрастными заболеваниями, и если обнаружатся заболевания, характеризующиеся повышением скорости дезамидирования, тест представляется для использования в качестве маркера для определения восприимчивости к данным заболеваниям и для их ранней диагностики.

ФОРМУЛА

1. Это набор для измерения скорости дезамидирования, и его особенность заключается в том, что он содержит исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Boc-Asn-Gly-OEt, и исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Boc-Asp-Gly-OEt.
2. Это набор согласно пункту 1 формулы, особенностью которого является исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Boc-Asn-Gly-OEt в диапазоне концентраций 0,000001 – 1000 ммоль.
3. Это набор согласно пункту 2 формулы, и его особенностью является то, что его концентрация составляет 0,25 ммоль.
4. Это набор согласно пункту 1 формулы, особенностью которого является то, что он представляет собой исходный раствор в деионизированной/дистиллированной воде, содержащий соединение Boc-Asp-Gly-OEt в диапазоне концентраций 0,000001 – 1000 ммоль.
5. Это набор согласно пункту 4 формулы, и его особенностью является то, что его концентрация составляет 0,25 ммоль.
6. Это метод измерения скорости, выполненный с использованием набора для измерения скорости дезамидирования согласно любому из пунктов 1–5 формулы, и его особенностью является;
 - Приготовление исходного раствора и серийных разведений соединения Boc-Asn-Gly-OEt в деионизированной/дистиллированной воде;
 - Приготовление исходного раствора и серийных разведений соединения Boc-Asp-Gly-OEt в деионизированной/дистиллированной воде;
 - Создание калибровочной кривой на инструменте для измерения с использованием серийных разведений исходного раствора Boc-Asn-Gly-OEt;
 - Создание калибровочной кривой на инструменте для измерения с использованием серийных разведений исходного раствора Boc-Asp-Gly-OEt;
 - Аликвотирование биологического образца, воздействие которого на скорость дезамидирования исследуется, в равных объемах в три разные пробирки;
 - Добавление, в диапазоне 1/1000 - 1/2 от конечного объема реакционной смеси, исходных растворов Boc-Asn-Gly-OEt и Boc-Asp-Gly-OEt (в качестве внутреннего

стандарта) в разные пробирки и деионизированной/дистиллированной воды в последнюю пробирку в качестве контроля;

- Выполнение измерений во всех трёх пробирках в начале измерения;
 - Измерение во всех трех пробирках после инкубации;
- 5
- Вычитание результатов измерений в пробирках с добавлением Woc-Asn-Gly-OEt и Woc-Asp-Gly-OEt от результатов измерений в пробирке с добавлением деионизированной/дистиллированной воды;
 - Определение скорости дезамидирования путём измерения Woc-Asp-Gly-OEt , образующегося в результате спонтанного дезамидирования в пробирке с добавлением Woc-Asn-Gly-OEt ,
- 10
7. Это метод согласно пункту 6 формулы, и его особенность заключается в том, что измерения производятся методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией.
8. Это метод согласно пункту 6 формулы, и его особенность заключается в том, что
- 15
- реакционный объём составляет 1/10.



Фиг. 1