



УДК 547-386[577.112.4+577.175.53]

ФУНКЦИОнализированные металлохелаты на основе диэтиленetriаминтетрауксусной кислоты для химической модификации белков и малых биомолекул

© 2015 г. О. С. Куприенко[#], Л. В. Дубовская, П. С. Шабуня,
С. А. Фатыхова, О. В. Свиридов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2

Поступила в редакцию 05.02.2015 г. Принята к печати 01.07.2015 г.

Синтезированы бифункциональные реагенты на основе диэтиленetriаминтетрауксусной кислоты, содержащие связанный ион Eu^{3+} и реакционноспособную группу для взаимодействия с белками и низкомолекулярными соединениями, для использования в лантанидном иммунофлуориметрическом анализе с применением диссоциативно-усиливающего раствора (ЛИФМА). Комплексонат Eu^{3+} и N^1 -(2-аминоэтиламида) диэтиленetriаминпентауксусной кислоты (ДТРА) получен путем ацилирования *N*-Вос-1,2-этилендиамин диангидридом ДТРА с последующими деблокированием аминогруппы и хелатированием ионов Eu^{3+} . Металлохелат использован при синтезе конъюгатов с пероксидазой хрена и 3-(*O*-карбоксиметил)оксимом 17 α -гидроксипрогестерона. В иммунохимической системе ЛИФМА показано, что конъюгат 3-(*O*-карбоксиметил)оксима 17 α -гидроксипрогестерона с металлохелатом сохраняет сродство к соответствующим антителам. Ацилированием аминоконкомплексоната ди-*N*-сукцинимидным эфиром *n*-фталевой кислоты получен комплексонат Eu^{3+} и N^1 -[2-(*n*-(сукцинимидилкарбоксо)бензоиламино)этиламида] ДТРА, который был использован при синтезе конъюгатов с человеческим сывороточным альбумином и иммуноглобулинами класса G. Количество связавшегося с модифицированным белком Eu^{3+} определяли по флуоресценции растворов конъюгатов в диссоциативно-усиливающем растворе. Показано, что полученные по предложенному методу конъюгаты моноклональных антител обеспечивают необходимые характеристики интенсивности флуоресценции, фона, чувствительности и специфичности для ЛИФМА.

Ключевые слова: комплексонат европия, диэтиленetriаминтетрауксусная кислота, лантанидный иммунофлуориметрический анализ.

DOI: 10.7868/S013234231506007X

ВВЕДЕНИЕ

Комплексы лантанидов с органическими лигандами способны к долгоживущей флуоресценции с высоким квантовым выходом и большим стоксовым сдвигом. На этом явлении основан метод флу-

ориметрии с отложенной во времени регистрацией излучения (TRF) [1]. TRF позволяет детектировать сигнал в условиях затухающей фоновой флуоресценции, что обеспечивает высокую чувствительность метода. Этот вид флуориметрии лежит в основе лантанидного иммунофлуориметрического анализа с применением диссоциативно-усиливающего раствора (ЛИФМА), который используется в биохимических исследованиях и клинической лабораторной практике.

ЛИФМА включает взаимодействие между определяемым соединением, играющим роль антигена, и специфичным к нему антителом, а в качестве детектируемого соединения выступает комплексонат лантанида, введенный в качестве метки в один из компонентов реакции. Метод по чув-

Сокращения: ЛИФМА – лантанидный иммунофлуориметрический анализ с применением диссоциативно-усиливающего раствора; МАт – моноклональное антитело; ПАББ-А – плазматический ассоциированный с беременностью белок-А; св.бета-ХГЧ – свободная бета-субъединица хориогонадотропина; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; ДТРА – диэтиленetriаминпентауксусная кислота; ДТТА – диэтиленetriаминтетрауксусная кислота; ESI – электро-спрей-ионизация; ICP-MS – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой; TRF – флуориметрия с отложенной во времени регистрацией излучения.

[#] Автор для связи (тел.: +375 17 2637275; эл. почта: olga_garbuz@iboch.bas-net.by).

ствительности превосходит ИФА и не уступает радиоиммунным методам анализа [2]. В ЛИФМА чаще всего применяют комплексоны Eu^{3+} , реже Sm^{3+} , Tb^{3+} и Dy^{3+} . Благодаря узким полосам флуоресценции и существенным различиям в длинах волн излучения лантаниды могут быть использованы для одновременного определения нескольких антигенов [3]. Для анализа используют металлохелаты на основе бифункциональных производных полиаминополикарбонновых кислот, ковалентно связанных с антителом, определяемым соединением или другой биомолекулой. Перед регистрацией сигнала в систему добавляют раствор, вызывающий диссоциацию конъюгата с выходом лантанида и образованием интенсивно флуоресцирующего комплекса с компонентами раствора [4]. Высокая чувствительность анализа и возможность мультипараметрического определения делают ЛИФМА наиболее востребованной модификацией флуоресцентного иммуноанализа. Он используется во многих клинических центрах мира при количественном определении маркеров врожденного гипотиреоза [5, 6] и гиперплазии коры надпочечников [7, 8], а также при проведении пренатального скринингового обследования на синдром Дауна [9].

С момента разработки технологии ЛИФМА проводится поиск бифункциональных соединений, прочно связывающих ионы лантанидов и содержащих реакционноспособную группу для взаимодействия с биомолекулами. В настоящее время для модификации белков часто используют комплексы 1-(4-изотиоцианобензил)диэтилентриаминтетрауксусной кислоты (ДТТА) с Eu^{3+} [10] или проводят двухстадийный синтез конъюгата – введение в белок комплексона и хелатирование иона металла – с применением диангирида диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА) (I) [11]. Оба реагента обладают рядом существенных недостатков, главными из которых являются в первом случае – формирование чрезвычайно лабильных N,N'-дизамещенных тиомочевин [12], в случае диангирида ДТРА – образование димеров (олигомеров) модифицированного белка и снижение иммунореактивности [13]. Как следствие, наблюдается уменьшение удельной активности конъюгатов (мольного содержания связанного с белком комплексона металла) и увеличение неспецифического связывания, что негативно влияет на результаты анализа и ограничивает срок эксплуатации лабораторных тест-систем или коммерческих наборов реагентов. Имеются литературные данные [14] о синтезе N-сукцини-

мидных эфиров комплексонов на основе полиаминополикарбонновых кислот, крипатов и других макроциклических соединений. Использование таких активированных эфиров не приводит к сшивке полипептидных цепей, а образующаяся амидная связь обеспечивает прочное удерживание комплексона биомолекулой. Однако N-сукцинимидные эфиры комплексонов часто не выделяют из реакционной среды, что существенно затрудняет их применение и ограничивает срок хранения. Для получения прочной связи между комплексоном и биомолекулой также используют хелаты, содержащие в структуре первичную аминогруппу. Такими соединениями модифицируют карбоксильные или альдегидные группы биомолекул. Описаны хелаты N-(p-аминобензил)-ДТТА и других полиаминополикарбонновых кислот с реакционноспособной аминогруппой [10, 14–16].

Целью настоящей работы являлся синтез новых производных лантанидохелатов на основе ДТТА, для чего предложен простой способ получения комплексонов Eu^{3+} с N'-[2-(аминоэтиламинидом) ДТРА и N'-[2-(n-(сукцинимидилкарбоксии)бензоиламино)этиламинидом] ДТРА. Разработаны методики конъюгирования комплексонов Eu^{3+} с биологически активными макромолекулами и низкомолекулярными соединениями на примере человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), иммуноглобулинов класса G, пероксидазы хрена (гликопротеин) и 17 α -гидроксипрогестерона. Показано, что полученные соединения могут быть использованы в ЛИФМА для медицинской диагностики и для характеристики процессов в биохимических системах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что для ЛИФМА наиболее пригодны асимметричные производные комплексонов на основе ДТТА, содержащие заместители при атоме N1 [10]. В качестве исходного соединения в данной работе был выбран диангирид ДТРА (I) и далее проводилась его последовательная модификация с целью селективного получения монозамещенных по N1 производных ДТТА (III)–(V) и соответствующих комплексонов Eu^{3+} (VI)–(VIII) (схема 1).

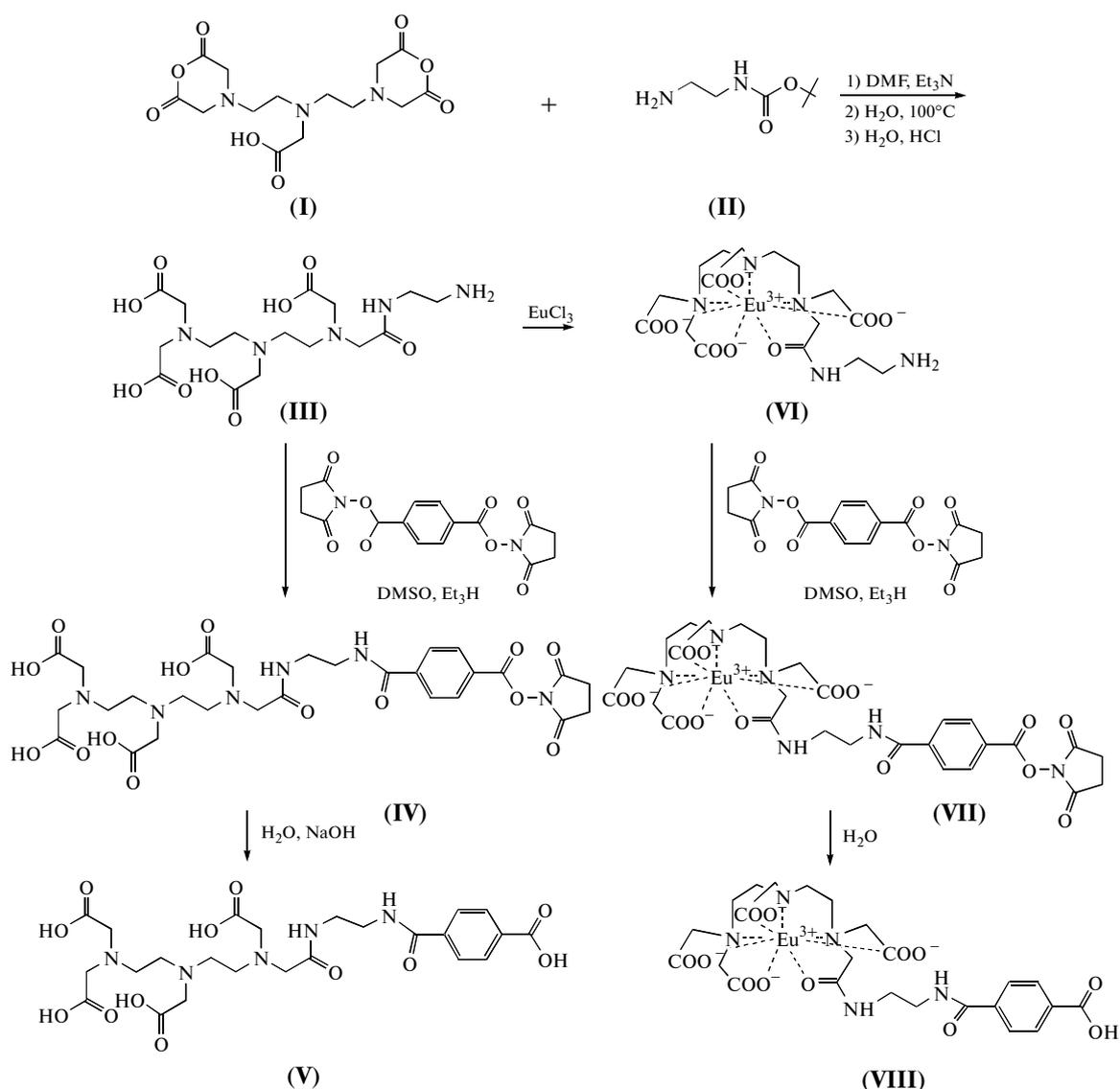


Схема 1. Синтез комплексов (III)–(V) и комплексов Eu³⁺ (VI)–(VIII).

Аминопроизводное ДТТА (III) синтезировали по модифицированной схеме, предложенной в работе [17]. В качестве растворителя на стадии ацилирования ангидрида (I) использовали DMF, в котором ангидрид растворялся лучше, чем в хлороформе. Для депротонирования аминогруппы монозамещенного диамина (II) в реакционную смесь добавляли триэтиламин. В работе [18] показано, что в данных условиях в реакцию вступает одна ангидридная группа соединения (I), поэтому оставшиеся реакционноспособные группы гидролизуют кипячением промежуточного продукта в воде. Вос-защитную группу удаляли обработкой водным раствором HCl, после чего аминопроизводное (III) очищали с помощью анионообменной хроматографии. Структура амина (III) была подтверждена данными физико-химических исследований. В масс-спектре наблюдали пик с

m/z 436.2, соответствующий молекулярному иону $[M + H]^+$. Суммарная интегральная интенсивность сигналов в ¹H-ЯМР-спектре и их мультиплетность соответствовали количеству метиленовых групп в производном ДТТА (III) и их ближайшему окружению.

N-Сукцинимидный эфир карбоксипроизводного ДТТА (IV) получали ацилированием амина (III) ди-*N*-сукцинимидным эфиром *p*-фталевой кислоты в DMSO в присутствии триэтиламина. Реакционноспособные *N*-сукцинимидные эфирные группы гидролизуют в присутствии NaOH и полученный комплексон (V) очищали методом анионообменной хроматографии. Структура производного ДТТА (V) подтверждена данными ¹H-ЯМР и масс-спектрометрии. В ¹H-ЯМР-спектре наблюдали два дублета одинаковой суммарной интегральной интенсивности в области, харак-

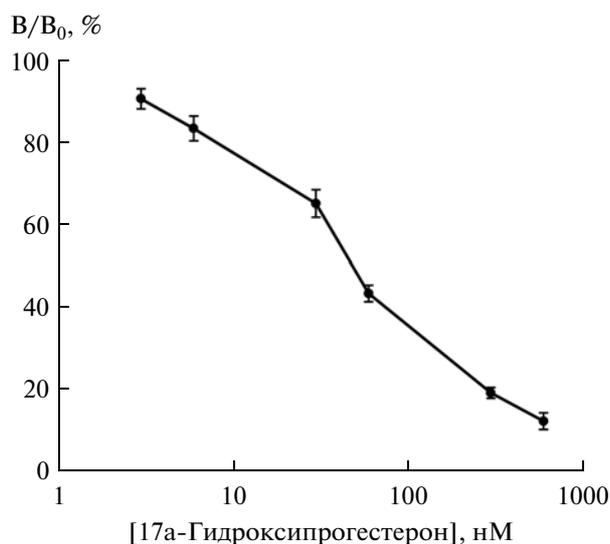


Рис. 1. Зависимость относительного сигнала от концентрации стероида в конкурентном ЛИФМА 17α-гидроксиprogестерона. В и B₀ – флуоресцентные сигналы связанного антителом конъюгата соответственно в присутствии и в отсутствие немеченого 17α-гидроксиprogестерона.

терной для протонов бензольного кольца. Расположение сигналов метиленовых групп, их мультиплетность и суммарная интегральная интенсивность соответствовали структуре комплексона (V). В масс-спектре производного ДТТА (V) присутствует как молекулярный ион, соответствующий $[M + H]^+$, так и ионы $[M + Na]^+$ и $[M + K]^+$, являющиеся результатом присоединения ионов Na⁺ и K⁺.

Комплексопат Eu³⁺ (VI) получали путем добавления небольшого избытка EuCl₃ к аминопроизводному ДТТА (III) при pH 6, который поддерживали добавлением триэтиламина или 1 М раствора NaOH. Использование триэтиламина позволило получить хорошо растворимый в DMSO комплексонат, который применяли в синтезе N-сукцинимидного эфира (VII) и производного 17α-гидроксиprogестерона (X). NaOH использовали для модификации биомолекул в водной или водно-органической среде.

Реакцию ацилирования аминоксепсоната (VI) активированным диэфиром *n*-фталевой кислоты проводили аналогично синтезу комплексона (IV).

Металлохелаты (VI) и (VII), предназначенные для модификации биомолекул, характеризовали методом ВЭЖХ-МС. Примерно равная распространенность в природе двух изотопов Eu (¹⁵¹Eu – 47.81% и ¹⁵³Eu – 52.19%) [19] обусловила присутствие в масс-спектрах полученных комплексонатов двух однозарядных молекулярных ионов, *m/z* которых различаются на 2 единицы. На хроматограмме амина (VI) наблюдали один пик. В масс-спектре

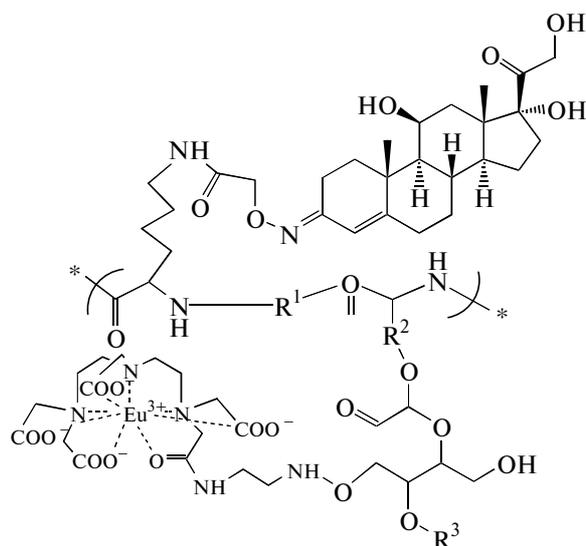


Рис. 2. Схематическое изображение комбинированного конъюгата пероксидазы хрена с комплексонатом Eu³⁺ и кортизолом. R¹, R² и R³ – фрагменты углеводной и полипептидной цепей.

проявились одно- и двухзарядные молекулярные ионы $[M + 2H]^+$ и $[M + 3H]^{2+}$ соответственно.

На хроматограмме N-сукцинимидного эфира (VII) наблюдали два пика, первый из которых соответствует продукту гидролиза активированного эфира – комплексонату (VIII) с рассчитанными молекулярными массами 730.1 и 732.1 Да. Масс-спектр содержит также пики с *m/z* 732.1 и 734.2 ионов $[M + 2H]^+$, 366.7 и 367.4 ионов $[M + 3H]^{2+}$. Время выхода целевого N-сукцинимидного эфира комплексоната (VII) составило 2.7 мин, соединение имело корректный масс-спектр. Целевой N-сукцинимидный эфир (VII) оказалось невозможным выделить в виде индивидуального соединения с помощью ВЭЖХ из-за частичного отщепления активированных групп, и, поскольку основная примесь (VIII) не содержит реакционноспособных групп, комплексонат использовали для модификации белков непосредственно после удаления из реакционной среды DMSO и промывки продукта THF.

Полученные комплексонаты (VI) и (VII) были изучены с точки зрения их пригодности для модификации биологически активных молекул и проведения ЛИФМА. Комплексонат (VI) с реакционноспособной аминогруппой использовали для синтеза конъюгата с карбоксипроизводным 17α-гидроксиprogестерона (X) (схема 2), в котором между комплексонатом и стероидом образовывалась устойчивая амидная связь. Анализ конъюгата (X) методом ВЭЖХ-МС показал отсутствие примеси свободного стероида, при этом в масс-спектре присутствовали соответствующие одно- и

двухзарядные молекулярные ионы. В ходе ЛИФМА было найдено, что стероидный фрагмент конъюгата (X) сохранял сродство к антителам, специфичным к 3-(*O*-карбоксиметил)оксиму 17 α -гидрокси-

прогестерона (рис. 1). Ион Eu^{3+} прочно удерживался в составе конъюгата (X) в условиях анализа и высвобождался при добавлении диссоциативно-усиливающего раствора с pH 3.2.

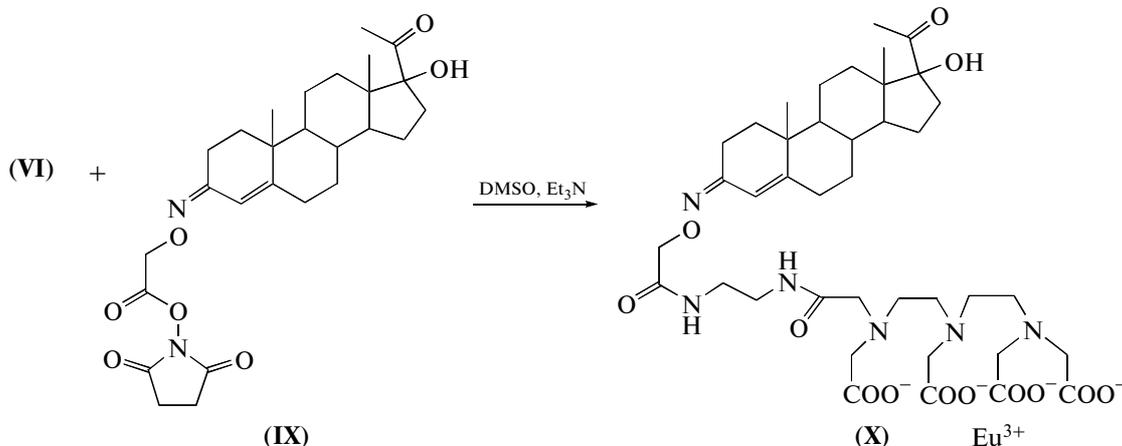


Схема 2. Синтез конъюгата комплексоната Eu^{3+} с 3-(*O*-карбоксиметил)оксимом 17 α -гидроксипрогестерона

Аминопроизводное (VI) вводили в реакцию с окисленными гидроксильными группами олигосахаридных цепей гликопротеина с последующим восстановлением чувствительной к гидролизу иминовой связи боргидридом Na. Таким способом была получена новая ферментно-флуоресцентная метка на основе пероксидазы хрена с удельной активностью 2–3 иона Eu^{3+} на молекулу фермента. Незатронутую полипептидную часть пероксидазы дополнительно модифицировали по аминогруппам остатков лизина с помощью *N*-сукцинимидного эфира 3-(*O*-карбоксиметил)оксима кортизола (рис. 2). Степень включения стероида в молекулу гликопротеина, рассчитанная по поглощению конъюгата при 250 нм, составила 3 молекулы кортизола на молекулу пероксидазы. Данный комбинированный конъюгат использовали в качестве детектируемого соединения при определении концентрации кортизола методами ЛИФМА и ИФА [20].

Наиболее часто используемым методом получения конъюгатов белков является модификация ϵ -аминогрупп остатков лизина полипептидной цепи. Для реализации такого подхода, как правило, проводится несложная подготовка белка, а реакция конъюгирования занимает одну стадию. Активированные *N*-сукцинимидные эфиры, взаимодействующие с первичными аминогруппами с образованием амидной связи, широко используются при проведении таких синтезов. Модификацию ЧСА и IgG комплексонатом (VII) проводили путем прибавления свежеприготовленного раствора активированного эфира к раствору белка в

Na-бикарбонатном буфере, pH 8.3. На примере ЧСА было показано, что в выбранных условиях реакция практически завершается в течение 0.5 ч и далее уже не наблюдается существенного прироста удельной активности получаемых конъюгатов, что хорошо согласуется с литературными данными [12].

Очистка конъюгатов белок-металлохелат с помощью традиционной гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25 не обеспечивает полного отделения белка от свободного комплексоната Eu^{3+} [21]. Это не дает возможности определить степень включения Eu^{3+} в молекулу белка и может приводить к существенному увеличению фонового сигнала при проведении ЛИФМА. При гель-фильтрации модифицированных белков на колонке с Superose 12 конъюгат и низкомолекулярные примеси выходили в объеме 4–5 мл, разделенные объемом элюата не менее 1 мл.

В результате химической модификации белков возможно протекание побочной реакции образования высокомолекулярных олигомеров, что оценивали с помощью SDS-электрофореза в ПААГ. Ранее мы показали [21], что при мольном соотношении диангида (I) и IgG 20 : 1 наблюдается частичная сшивка полипептидных цепей, а при соотношении 100 : 1 практически весь белок находился в виде олигомеров. В данной работе на электрофореграммах конъюгатов, синтезированных с использованием 10–100-кратных мольных избытков эфира (VII), не выявлено интенсивных белковых полос, которые соответствовали бы олигомерным полипептидам (рис. 3), а обнаруживались только минор-

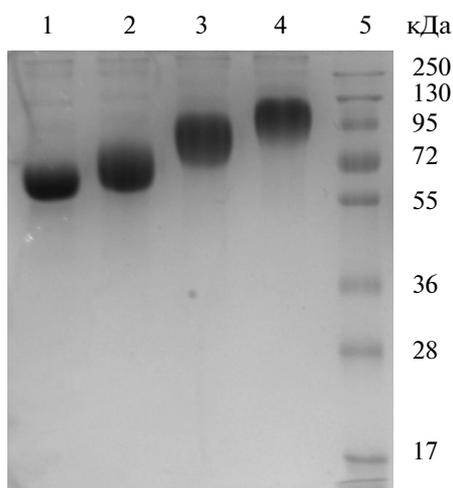


Рис. 3. Электрофореграмма конъюгатов ЧСА с Eu^{3+} в 10% ПААГ. 1 – ЧСА до модификации; 2,3,4 – конъюгаты ЧСА, содержащие 3, 10 и 15 моль Eu^{3+} /моль белка; 5 – белковые стандарты молекулярных масс

ные полосы белков с молекулярной массой более 95 кДа, присутствующие в исходном ЧСА. Возможность неспецифического связывания комплексоната Eu^{3+} с белками оценивали с использованием ЧСА, для чего белок обрабатывали 50-кратным избытком комплексоната (VIII), полученного в результате гидролиза активированного эфира (VII). Фоновая флуоресцентная активность ЧСА, очищенного на Superose 12, оказалась примерно в 100 раз меньше специфической активности контрольного конъюгата.

Удельную активность конъюгатов белков определяли, сравнивая их флуоресценцию в диссоциативно-усиливающем растворе с флуоресценцией растворов Eu^{3+} с известной концентрацией, которую измеряли с помощью комплексонометрического титрования. Также количество Eu^{3+} в конъюгате определяли методом ICP-MS. Оба подхода дали близкие значения (рис. 4). На рис. 5, а представлена зависимость степени замещения от соотношения реагент/белок на примере IgG. Ранее было показано [22], что на связывание комплексоната влияет не только избыток модифицирующего реагента, но и исходная концентрация белка. В нашем случае увеличение концентрации ЧСА с 1 до 10 мг/мл позволило примерно в 1.5–2 раза повысить удельную активность конъюгата (рис. 5, б).

При получении реагентов для тест-систем ЛИФМА, используемых в медицинской диагностике [23], комплексонат (VII) вносили в раствор белка в 50–200-кратном мольном избытке. Синтезированные конъюгаты МАТ к тиреотропному гормону (ТТГ), свободной бета-субъединице хоригонадотропина (св. бета-ХГЧ), плазматическому ассоциированному с беременностью белку-А (ПАББ-А), исследованы в соответствующих набо-

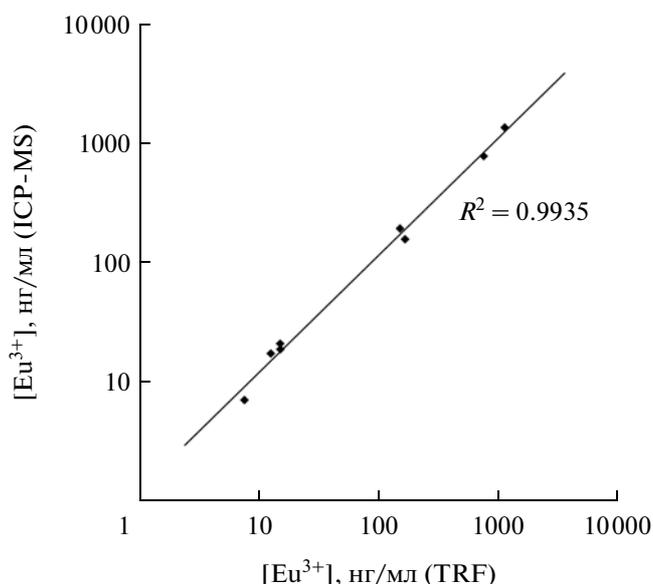


Рис. 4. Корреляция результатов определения концентрации ионов Eu^{3+} в конъюгатах ЧСА методами TRF и ICP-MS

рах реагентов для ЛИФМА. Найденные технико-аналитические характеристики, которые представлены в таблице, соответствуют показателям наборов фирмы PerkinElmer (США), широко используемым в мировой клинико-диагностической практике. Характеристики всех белковых конъюгатов несущественно изменялись после хранения концентрата растворов в течение года при температуре 2–8°C. Низкая неспецифическая адсорбция и высокая удельная флуоресцентная активность меченных Eu^{3+} МАТ обеспечивали высокую чувствительность анализа и хорошую воспроизводимость результатов во всем динамическом диапазоне.

Таким образом, нами предложен новый способ синтеза функционализированных металлохелатов для модификации белков и низкомолекулярных биологически активных соединений. Рассмотрены примеры использования данных реагентов при получении лантанидных меток для ЛИФМА. Замена амина (II) на монозамещенный 1,6-гексаметилендиамин позволила синтезировать соединение, аналогичное комплексонату (VII), которое было использовано при получении конъюгатов белков с удлиненным линкером между полипептидной цепью и поликарбоксилатным комплексом. Как на стадии синтеза конъюгата, так и в ЛИФМА не выявлено разницы в свойствах меченых белков с двумя или с шестью метиленовыми группами в алифатическом участке присоединения комплексоната Eu^{3+} (данные не представлены).

Функционализированные комплексонаты (VI) и (VII), описанные в данной работе, просты и удобны в использовании, могут быть применены для модификации amino- и карбоксильных групп

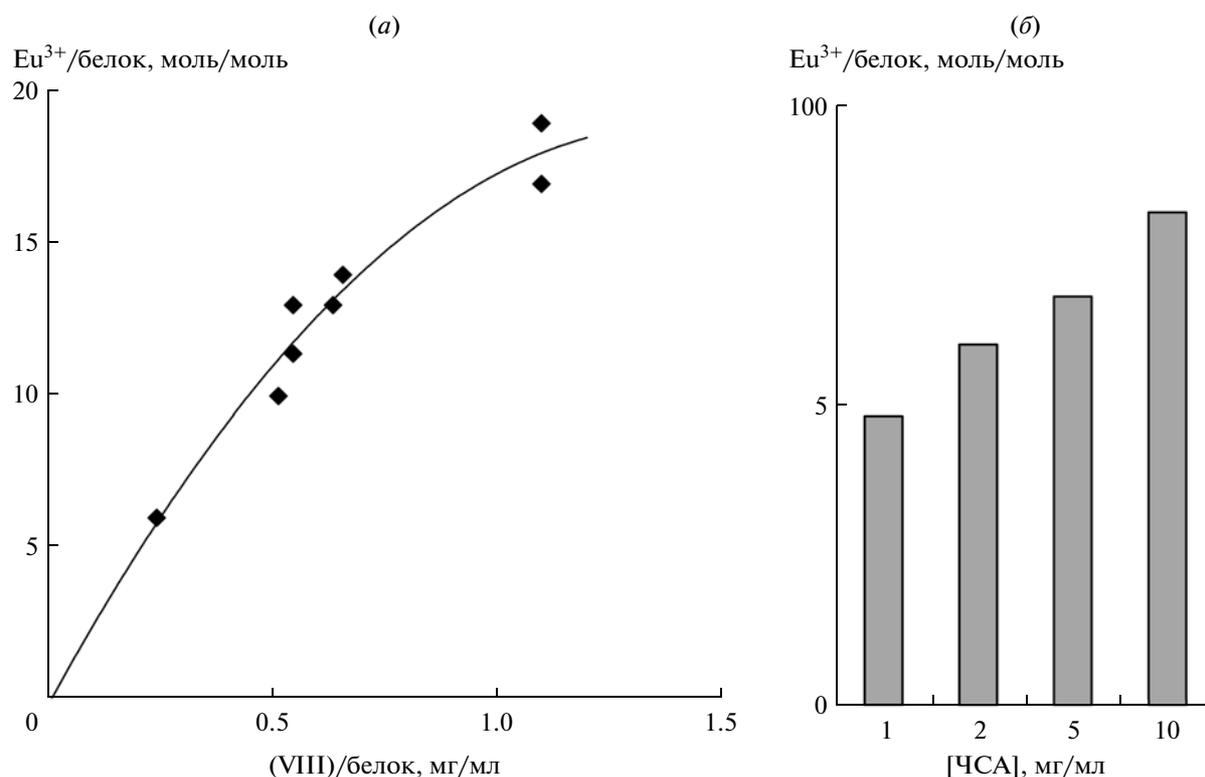


Рис. 5. Зависимость удельной активности конъюгата белка с комплексонатом Eu^{3+} от соотношения реагент : белок для IgG в концентрации 3 мг/мл (а) и от концентрации белка для ЧСА при соотношении реагент : белок 50 : 1 (б)

белков и малых биомолекул, а также для получения конъюгатов гликопротеинов. Металлохелат (VI) может храниться при комнатной температуре без доступа влаги в течение длительного времени. Комплексонат (VII) устойчив при хранении в сухом виде при -20°C не менее полутора лет. Методики получения и использования комплексонатов (VI) и (VII) могут служить прототипами для синтеза других активированных металлохелатов и

их биоконъюгатов, предназначенных для научных исследований и медицинской практики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали диангидрид ДТРА, *N*-Вос-1,2-этилендиамин, БСА, DMF (Sigma-Aldrich, США), триэтиламин (Acros, Бельгия), DMSO (Applichem, США), пероксидазу хрена (Диаэм, Рос-

Технико-аналитические характеристики наборов ЛИФМА с использованием конъюгатов МАт с комплексонатом Eu^{3+} (VII)

МАт	Содержание Eu^{3+} , моль Eu^{3+} /моль белка	Отношение интенсивностей флуоресценции для калибровочных проб А и Е ¹ , B_E/B_A	Чувствительность ²	Коэффициент вариации ³ , %	Коэффициент корреляции ⁴ , r
Анти-ТТГ	18.0	40–50	1.1–1.5 мкМЕ/мл	7.6–10.5	0.88
Анти-св. бета-ХГЧ	12.5	3200–3300	0.03–0.05 нг/мл	1.6–3.0	0.98
Анти-ПАББ-А	10.0	2900–3000	3.0–5.0 мМЕ/л	2.0–3.1	0.93

¹Калибровочные пробы: проба А – негативный контроль, не содержащий определяемого вещества; проба Е – положительный контроль с максимальной концентрацией определяемого вещества;

²Минимальная достоверно определяемая концентрация вещества, рассчитанная на основании удвоенного значения среднего квадратичного отклонения от среднего арифметического значения интенсивности флуоресценции, измеренной в пробе А;

³Повторяемость результатов измерений;

⁴Сравнение результатов анализа, полученных с использованием конъюгатов МАт-комплексонат (VII) и соответствующих коммерческих наборов реагентов фирмы PerkinElmer (США).

сия), МАт к ТТГ (Fitzgerald Industries International, США), МАт к св.бета-ХГЧ и МАт к ПАББ-А (ХЕ-МА-Медика, Россия), наборы реагентов “DELFLIA neonatal hTSH”, “DELFLIA hAFP/Free hCG β Dual” и “DELFLIA PAPP-A”, а также диссоциативно-усиливающий раствор от компании “PerkinElmer” (США). Для определения характеристик конъюгатов МАт с комплексономатом Eu^{3+} использовали готовые реагенты наборов “ЛИФМА–нео-ТТГ”, “ЛИФМА–св.бета-ХГЧ” и “ЛИФМА–ПАББ-А” (УП “ХОП ИБОХ НАН Беларуси”). ЧСА предоставлен РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Беларусь. *N*-Сукцинимидные эфиры 3-(*O*-карбоксиметил)оксимов кортизола и 17 α -гидроксипрогестерона синтезировали по общей для Δ^4 -3-кетостероидов методике [24] с некоторыми модификациями [25]. Ди-*N*-сукцинимидный эфир *n*-фталевой кислоты получали в результате взаимодействия соответствующего дихлорангидрида с избытком *N*-гидроксисукцинимидом [23]. Сыворотка кролика, содержащая антитела к 17 α -гидроксипрогестерону, и антитела овцы к иммуноглобулину кролика получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Для ЛИФМА применяли микропланшеты фирмы “Biomat” (Италия). Концентрацию Eu^{3+} в рабочем растворе EuCl_3 определяли методом комплексонометрического титрования с использованием Трилона Б и ксиленолового оранжевого в качестве индикатора [26]. На всех стадиях синтеза и в ЛИФМА применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США). Для проведения анионообменной хроматографии использовали сорбент Dowex 1X4 (Serva, Германия). Аналитическую ТСХ проводили на пластинках с закрепленным слоем силикагеля “Sorbfil” (Россия) в системе 10% ацетат аммония–MeOH 1 : 3. Аминосодержащие соединения детектировали по цветной реакции с нингидрином, производные стероидов выявляли по окрашиванию продуктов их взаимодействия с анисовым альдегидом, хромофоры определяли по поглощению УФ-света. Электрофорез белков до и после химической модификации проводили в 10% ПААГ. Для выявления белковых полос применяли окрашивание Кумасси R-250.

Спектры ^1H -ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) получали для растворов в D_2O на приборе фирмы “Bruker Bio-Spin” AVANCE 500 (Германия) с рабочей частотой 500 МГц. Химические сдвиги определяли относительно сигнала внутреннего стандарта ацетона (δH 2.22 м.д.). Масс-спектры получали с использованием масс-селективного детектора Agilent 6120 в комплексе с жидкостным хроматографом Agilent 1200. ВЭЖХ-МС проводили на колонке Zorbax XDB C18, 4.6 × 50 мм, 1.8 мкм. В качестве элюентов использовали: раствор А – 8 мМ ацетат аммония в воде и раствор Б – ацетонитрил, элю-

цию проводили в линейном градиенте изменения концентрации раствора Б от 10% до 60% за 15 мин при скорости потока 0.5 мл/мин. Концентрацию Eu^{3+} в растворах конъюгатов определяли с помощью масс-спектрометра Agilent 7500сх ICP-MS. Высушивание из замороженного состояния под вакуумом выполняли на установке для лиофильной сушки VirTis 6211 (США). Флуоресценцию при длине волны возбуждения и регистрации соответственно 340 и 615 нм с временной задержкой 400 мкс измеряли в микропланшетном флуориметре DELFLIA 1234 фирмы “Wallac Oy” (Финляндия). Для очистки конъюгатов белков проводили гель-фильтрацию на колонке (1.0 × 30 см) с сорбентом Superose 12 при скорости потока 12 мл/ч в системе быстрой хроматографии белков фирмы “Pharmacia Biotech” (Швеция).

N^1 -(2-Аминоэтиламин) ДТРА (III). К раствору 254 мг (0.71 ммоль) диангидрида (I) в 6 мл DMF, полученном при нагревании до 60°C, при интенсивном перемешивании в течение 20 мин вносили раствор 80 мг (0.50 ммоль) *N*-Вос-1,2-этилендиамина (II) в 2.5 мл DMF и добавляли 0.4 мкл (2.85 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали в течение 8 ч при комнатной температуре, после чего растворитель упаривали. Остаток растворяли в 3 мл воды, перемешивали при нагревании на кипящей водяной бане в течение 1.5 ч, затем лиофилизовали. Сухой остаток растворяли в 0.2 мл воды и обрабатывали 0.2 мл концентрированной соляной кислоты в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь нейтрализовали 5 М раствором NaOH до pH 6. Смесь наносили на колонку с Dowex 1X4 (в форме ацетата), промытую и уравновешенную водой. Элюцию проводили сначала водой, затем 1 М уксусной кислотой, собирая фракции по 5 мл. Фракции, содержащие по данным ТСХ целевое соединение, объединяли и лиофилизовали. Получали 60 мг (27%) амина (III). ТСХ: R_f 0.32. Масс-спектр (ESI): m/z 436.2 [$M + H$] $^+$. $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_9$. Вычислено. 435.2. Спектр ^1H -ЯМР: 3.20 (т, 2H, J 5.6, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 3.27–3.36 (м, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2-\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 3.45 (т, 2H, J 6., $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2-\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.58 (м, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 3.63 (т, 2H, J 6.1, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2-\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.68 (с, 2H, $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{COOH})-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 3.76 (с, 2H, $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), 3.84 (с, 2H, $>\text{N}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$), 3.92 (с, 4H, $-\text{N}-(\text{CH}_2-\text{COOH})_2$).

N^1 -[2-(*n*-Карбоксибензоиламино)этиламин] ДТРА (V). К раствору 26 мг (73 мкмоль) ди-*N*-сукцинимидного эфира *n*-фталевой кислоты в 1.0 мл DMSO добавляли 24 мг (56 мкмоль) комплексона (III) в 1.0 мл DMSO и 0.05 мл (360 мкмоль) триэтиламина и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Промежуточ-

ный продукт (IV) выделяли осторожным наслаиванием диэтилового эфира на раствор в DMSO с последующей промывкой THF. Остаток раствора в 1 мл воды, добавляли 1 М раствор NaOH до pH 10 и выдерживали в течение 18 ч при комнатной температуре, после чего доводили pH раствора до 6 с помощью 1 М раствора уксусной кислоты. Раствор наносили на колонку с Dowex 1X4 (в форме ацетата), промытую и уравновешенную водой. Элюцию проводили последовательно водой, 1 М растворами уксусной и соляной кислот. Фракции, содержащие по данным ТСХ комплексон (V), объединяли, растворитель упаривали. Получали 25 мг (77%) комплексона (V). ТСХ: *Rf* 0.55. Масс-спектр (ESI): *m/z* 584.3 [*M* + H]⁺, 606.2 [*M* + Na]⁺, 622.1 [*M* + K]⁺. C₂₄H₃₃N₅O₁₂. Вычислено. 583.2. Спектр ¹H-ЯМР: 3.11–3.21 (м, 4H), 3.43 (м, 2H), 3.48 (т, 2H, *J* 5.5), 3.51–3.60 (м, 4H), 3.65 (с, 2H), 4.02 (с, 2H), 4.07 (с, 2H), 4.10 (с, 4H), 7.82 (д, 2H, *J* 7.6), 8.08 (д, 2H, *J* 7.6).

Комплексонат Eu³⁺ с N¹-(2-аминоэтиламидом) ДТРА (VI). К раствору 20 мг (46 мкмоль) амина (III) в 0.2 мл деионизованной воды добавляли 0.5 мл (50 мкмоль) 0.1 М раствора EuCl₃, доводили pH до 6 с помощью 1 М раствора триэтиламина или 1 М раствора NaOH и перемешивали реакционную смесь в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее доводили pH реакционной смеси до 10, добавляя 1М раствор триэтиламина (или 1 М раствор NaOH), перемешивали 30 мин при комнатной температуре и отделяли выпавший осадок гидроксида Eu³⁺ центрифугированием. Воду удаляли, комплексонат (VI) использовали на следующих стадиях без дополнительной очистки. ТСХ: *Rf* 0.32. ВЭЖХ-МС: *Rt* 1.0 мин. Масс-спектр (ESI): *m/z* 584.2/586.1 [*M* + 2H]⁺, 292.7/293.6 [*M* + 3H]²⁺. C₁₆H₂₅EuN₅O₉⁻. Вычислено. 582.1/584.1.

Комплексонат Eu³⁺ с N¹-[2-(*n*-(сукцинимидил-карбокси)бензоиламино)этиламидом] ДТРА (VII). К раствору 16 мг (44 мкмоль) ди-*N*-сукцинимидного эфира *n*-фталевой кислоты в 0.6 мл DMSO добавляли 35 мг (36 мкмоль) комплексоната Eu³⁺ (VI) в 0.6 мл DMSO и 0.03 мл (216 мкмоль) триэтиламина и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 2 ч. Продукт выделяли осторожным наслаиванием диэтилового эфира на реакционную смесь с последующей промывкой THF. Комплексонат (VII) использовали на следующих стадиях без дополнительной очистки. ТСХ: при проведении ТСХ соединение разлагается, *Rf* продуктов разложения 0.55 и 0.75. ВЭЖХ-МС: *Rt* 2.7 мин. Масс-спектр (ESI): *m/z* 829.2/831.1 [*M* + 2H]⁺, 415.1/416.1 [*M* + 3H]²⁺. C₁₆H₂₅EuN₅O₉⁻. Вычислено. 827.1/829.1.

Конъюгат 17α-гидроксипрогестерона с комплексономатом Eu³⁺ (X). К раствору 10 мг (10 мкмоль) ком-

плексоната Eu³⁺ (VI) в 0.4 мл DMSO добавляли раствор 5 мг (10 мкмоль) *N*-сукцинимидного эфира 3-(*O*-карбоксиметил)оксима 17α-гидроксипрогестерона (IX) в 0.2 мл диоксана и 0.01 мл (100 мкмоль) триэтиламина в 0.3 мл DMSO и перемешивали реакционную смесь в течение 4 ч при комнатной температуре. Растворитель удаляли, к остатку приливали 1 мл воды и добавляли 1М раствор NaOH до полного растворения осадка. Раствор дважды экстрагировали этилацетатом, водный слой лиофилизировали. Получали 8 мг конъюгата (X). ТСХ: *Rf* 0.60. ВЭЖХ-МС: *Rt* 9.9 мин. Масс-спектр (ESI): *m/z* 969.5/971.3 [*M* + 2H]⁺, 985.3/986.0 [*M* + 3H]²⁺. C₁₆H₂₅EuN₅O₉⁻. Вычислено. 967.3/969.3.

ЛИФМА с использованием конъюгата (X). В лунки планшета с предварительно иммобилизованными антикроличьими антителами овцы (из раствора с концентрацией 5 мг/л) вносили 0.2 мл сыворотки крови кролика (титр 1 : 25000), содержащей антитела к 17α-гидроксипрогестерону. Инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Содержимое лунок удаляли, вносили 0.1 мл раствора 17α-гидроксипрогестерона в концентрациях 0, 3, 6, 30, 60, 300 и 600 нМ и 0.1 мл 30 нМ раствора комплексоната (X) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре со встряхиванием. Далее промывали планшеты раствором для ЛИФМА (0.35 мл × 6), вносили по 0.2 мл/лунку диссоциативно-усиливающего раствора и инкубировали 10 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Через 20 мин измеряли флуоресцентный сигнал в микропланшетном флуориметре DELFIA 1234.

Комбинированный конъюгат пероксидазы хрена с комплексономатом Eu³⁺ и кортизолом. К 1 мл раствора пероксидазы в воде с концентрацией 3.8 г/л добавляли 0.2 мл свежеприготовленного 0.2 М раствора NaIO₄ и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 45 мин. Очистку полученного продукта проводили на колонке, заполненной Sephadex G-25, элюируя его 1 мМ Na-ацетатным буферным раствором с pH 4.5. Получали 2.1 мл раствора пероксидазы (1.4 г/л). К 0.05 мл 14 мМ раствора комплексоната (VI) добавляли 0.08 мл 0.2 М раствора Na₂CO₃, pH 9.5, и 0.7 мл раствора пероксидазы. Реакционную смесь инкубировали в течение 18 ч при 10°C с непрерывным встряхиванием без доступа света, затем добавляли 0.04 мл 0.1 М раствора NaBH₄ и выдерживали в течение 2 ч при тех же условиях. Раствор конъюгата концентрировали до объема 0.15 мл и очищали с помощью гель-фильтрации на колонке с Superose 12, используя для элюции 0.15 М раствор NaCl. Фракции, содержащие модифицированную пероксидазу, объединяли. Концентрацию белка определяли по величине оптического поглощения при 280 нм количество связанного комплексоната Eu³⁺ – по величине флуоресценции

раствора конъюгата в диссоциативно-усиливающем растворе. Полученный конъюгат содержал 2.7 моль Eu^{3+} /моль белка.

К 0.1 мл раствора (содержание белка 2 мг/мл) конъюгата пероксидазы с комплексоном Eu^{3+} в 0.1 М NaHCO_3 добавляли 0.01 мл 23 мМ раствора *N*-сукцинимидного эфира 3-(*O*-карбоксиметил)окси-ма кортизола в DMSO. Выдерживали в течение 2 ч при комнатной температуре без доступа света. Очищали полученный комбинированный конъюгат методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25. Концентрацию кортизола в конъюгате рассчитывали по поглощению полученного раствора при 250 нм, измеренному относительно раствора конъюгата пероксидазы хрена с комплексоном Eu^{3+} , с использованием молярного коэффициента экстинкции $\epsilon = 15900$ (моль/л) $^{-1}$ см $^{-1}$ [27].

Конъюгаты белков с комплексоном Eu^{3+} . К 0.1–0.2 мл раствора белка (2.5–15 мг/мл) в 0.1 М растворе NaHCO_3 добавляли 0.025 мл свежеприготовленного раствора комплексона (VII) и инкубировали 18 ч при 4°C. Конъюгаты очищали методом гель-фильтрации на колонке с сорбентом Superose 12, используя для элюции буферный раствор 0.05 М Tris-HCl, pH 7.8, 0.15 М NaCl, 0.05% NaN_3 при скорости потока 12 мл/ч. Фракции, содержащие белок, объединяли. Концентрацию белка определяли по величине оптического поглощения при 280 нм, используя соответствующий удельный коэффициент поглощения (E_{280} нм, (г/л) $^{-1}$ см $^{-1}$): 1.35 для IgG и 0.53 для ЧСА. Флуоресцентную активность конъюгата измеряли в диссоциативно-усиливающем растворе и определяли концентрацию Eu^{3+} , используя для калибровки раствора с известным содержанием Eu^{3+} .

ЛИФМА с использованием конъюгатов МАт с комплексоном Eu^{3+} . Анализ выполняли в соответствии с инструкциями к наборам “ЛИФМА-ПАББ-А”, “ЛИФМА-св.бета-ХГЧ”, “ЛИФМА-нео-ТТГ” [28–30].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н. Г.Г. Сивцу за важные замечания, сделанные при обсуждении и написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Егорова А.В., Скрипинец Ю.В., Александрова Д.И., Антонович В.П. // Методы и объекты химического анализа. 2010. Т. 5. С. 180–201.
- Diamandis E.P. // Clin. Biochem. 1988. V. 21. P. 139–150.
- Xu Y.-Y., Pettersson K., Blomberg K., Hemmilä I., Mikola H., Lövgren T. // Clin. Chem. 1992. V. 38. P. 2038–2043.
- Hemmilä I., Dakubu S., Mikkala V.-M., Siitari H., Lövgren T. // Anal. Biochem. 1984. V. 137. P. 335–343.
- Torresani T. E., Scherz R. // Clin. Chem. 1986. V. 32. P. 1013–1016.
- Жердева В.В., Чудинов А.В., Савицкий А.П. // Биомедицинская химия. 2003. Т. 49. С. 70–79.
- Kamp H.J., Wit J.M. // Eur. J. Endocrinol. 2004. V. 151. P. U71–U75.
- Бекман Н.И., Ларичева С.Ю., Помелова В.Г., Осин Н.С. // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. С. 33–35.
- Cowans N.J., Stamatopoulou A., Hellström J., Mäkelä M.-M., Spencer K. // Prenat. Diagn. 2010. V. 30. P. 127–132.
- Mikkala V.-M., Mikola H., Hemmilä I. // Anal. Biochem. 1989. V. 176. P. 319–325.
- Соколова М.В., Помелова В.Г., Чудинов А.В., Гайдарович С.Я., Леонов С.В., Харитоненков И.Г., Быченко Т.А., Бусел Е.П., Злобин В.Н. // Вопросы вирусологии. 1991. Т. 36. № 2. С. 140–142.
- Banks P.R., Paquette D.M. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 447–458.
- Paik C.H., Ebbert M.A., Murphy P.R., Lassman C.R., Reba R.C., Eckelman W.C., Pak K.Y., Powe J., Steplewski Z., Koprowski H. // J. Nucl. Med. 1983. V. 24. P. 1158–1163.
- Charbonnière L. // Curr. Inorg. Chem. 2011. V. 1. P. 2–16.
- Mikola H., Sundell A.-C., Hänninen E. // Steroids. 1993. V. 58. P. 330–334.
- Mikola H., Hedlöf E. // Steroids. 1994. V. 59. P. 472–478.
- Essien H., Lai J.Y., Hwang K.J. // J. Med. Chem. 1988. V. 31. P. 898–901.
- Ge P., Selvin P.R. // Bioconjug. Chem. 2004. V. 15. № 5. P. 1088–1094.
- Laeter J.R., Böhlke J.K., De Bièvre P., Hidaka H., Peiser H.S., Rosman K.J.R., Taylor P.D.P. // Pure Appl. Chem. 2003. V. 75. P. 683–800.
- Куприенко О.С., Дормешкин Д.О., Свиридов О.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. // Материалы VIII Московского международного конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы развития”, 17–20 марта 2015 г. 2015. Т. 2. С. 230–231.
- Гарбуз О.С., Вашкевич И.И., Свиридов О.В. // Весці НАН Беларусі. Сер. хим. навук. 2014. С. 85–90.
- Hnatowich D.J., Layne W.W., Childs R.L. // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1982. V. 33. P. 327–332.
- Гарбуз О.С., Дубовская Л.В., Свиридов О.В. // Доклады НАН Беларусі. Т. 58. С. 68–74.
- Janoski A., Shulman F., Wright G. // Steroids. 1974. V. 23. P. 49–64.
- Гарбуз О.С., Семенов Д.А. // Молодежь в науке – 2013: прил. к журн. “Весці НАН Беларусі”. В 5 ч. Ч. 1. 2014. С. 13–19.
- Lyle S.J., Rahman Md.M. // Talanta. 1963. V. 10. P. 1177–1182.
- Blanford A.T., Wittman W., Stroupe S.D., Westphal U. // J. Ster. Biochem. 1987. V. 9. P. 187–201.
- Инструкция по применению набора реагентов для определения ассоциированного с беременностью белка-А плазмы в сыворотке крови человека мето-

- дом лантанидного иммунофлуориметрического анализа “ЛИФМА-ПАББ-А”. Регистрационное удостоверение № ИМ–7.99707 от 17.12.2012 г. Выдано министерством здравоохранения Республики Беларусь.
29. Инструкция по применению набора реагентов для определения свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека методом лантанидного иммунофлуориметрического анализа “ЛИФМА-св.бета-ХГЧ”. Регистрационное удостоверение № ИМ–7.99706 от 17.12.2012 г. Выдано министерством здравоохранения Республики Беларусь.
30. Инструкция по применению набора реагентов для определения тиреотропного гормона в сухом пятне крови новорожденных методом лантанидного иммунофлуориметрического анализа “ЛИФМА-нео-ТТГ”. Регистрационное удостоверение № ИМ–7.97079 от 02.11.2010 г. Выдано министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Functionalized Metal Chelates Based on Diethylenetriaminetetraacetic Acids for Chemical Modification of Proteins and Small Biomolecules

O. S. Kuprienko[#], L. V. Dubovskaya, P. S. Shabunya, S. A. Fatykhava, O. V. Sviridov

[#] Phone: +375 17 2637 275; e-mail: olga_garbuz@iboch.bas-net.by

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, 220141, Minsk, 5/2 Kuprevich Str.

Bifunctional reagents based on diethylenetriaminetetraacetic acid containing a bound metal ion and a reactive functional group for the interaction with proteins and low-molecular-weight substances have been synthesized. An Amino-derivative of a complexonate was obtained by acylation of monosubstituted diamine with diethylenetriaminopentaacetic acid dianhydride followed by deprotection of the amino group, purification by anion exchange chromatography and chelation of Eu^{3+} . This metal chelate derivative was used for labeling 17α -hydroxyprogesterone 3-(*O*-carboxymethyl)oxime and horseradish peroxidase. The enzyme modified with the Eu^{3+} complexonate at the carbohydrate component and with a cortisol derivative at the polypeptide chain was used in a dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassay (DELFIА) as well as in an enzyme immunoassay of the steroid hormone. DELFIА showed that labeled 17α -hydroxyprogesterone retained the affinity for corresponding antibodies. A Eu^{3+} -complexonate carboxy-derivative N-succinimide ester was obtained by acylation of the aminochelate with *p*-phthalic acid di-N-succinimide ester. It was used for modification of amino groups of lysine residues in polypeptide chains of human serum albumin and some immunoglobulins G. Purification of Eu^{3+} complexonate-protein conjugates by gel-chromatography on a Superose-12 column allowed to separate the modified proteins from unreacted low molecular weight Eu^{3+} -derivatives and to determine a degree of lanthanide inclusion into a protein. The amount of Eu^{3+} covalently attached to a protein was determined by measuring the fluorescence of a conjugate in the dissociative-enhancement solution. The obtained values correlated well with the results of ICP-MS determination of Eu^{3+} concentration in a conjugate solution. It was shown that conjugates of monoclonal antibodies obtained by the proposed method possessed the required characteristics of fluorescence intensity, signal-to-noise ratio, sensitivity and specificity in DELFIА medical diagnostic systems.

Keywords: europium, diethylenetriaminetetraacetic acid, DELFIА