

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 547-386:[577.112.4 + 577.175.53 + 577.175.1 + 577.182.46]

КУПРИЕНКО
ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА

**СИНТЕЗ И СВОЙСТВА КОНЬЮГАТОВ БЕЛКОВ И
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ С КОМПЛЕКСОНАТОМ ЕВРОПИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2016

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Свиридов Олег Васильевич,**
доктор химических наук, заведующий
лабораторией химии белковых гормонов
Института биоорганической химии НАН
Беларуси

Официальные оппоненты: **Кисель Михаил Александрович,**
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией химии липидов
Института биоорганической химии НАН
Беларуси
Ольховик Вячеслав Константинович,
кандидат химических наук, заведующий
лабораторией полисопряженных
органических соединений Института химии
новых материалов НАН Беларуси

Оппонирующая организация: Учреждение БГУ «Научно-
исследовательский институт физико-
химических проблем»

Защита состоится «17» января 2017 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. +375(17)267 85 53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я.Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан «13» декабря 2016 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук



С.В. Бабицкая

ВВЕДЕНИЕ

В биохимических исследованиях и в биотехнологии широко используются белки и низкомолекулярные биологически активные вещества, модифицированные комплексными соединениями европия. Ион Eu^{3+} , как и ряд других лантанидов, в составе комплексов с некоторыми органическими лигандами обладает способностью к интенсивной долгоживущей флуоресценции в дальней длинноволновой области видимого спектра с большим стоксовым сдвигом. Такие спектральные характеристики соединений европия позволяют осуществлять регистрацию флуоресценции с задержкой по времени относительно импульса возбуждения, что приводит к существенному снижению неспецифического фонового сигнала. В связи с этим использование биомолекул, меченных комплексообразователем Eu^{3+} , в лантанидном иммунофлуориметрическом анализе (ЛИФМА), основанном на иммунохимическом связывании полученных конъюгатов с антителами или антигенами, обеспечивает высокие аналитические параметры данного метода (чувствительность, точность, диапазон измеряемых концентраций).

Научная актуальность диссертации обусловлена необходимостью получения новых знаний о синтезе производных комплексообразователя европия на основе диэтилентриаминтетрауксусной кислоты, способах их конъюгирования с белками и низкомолекулярными биорегуляторами, свойствах полученных флуоресцентных конъюгатов в системах ЛИФМА. Кроме того, в последнее время возникла необходимость расширения ассортимента выпускаемых иммунодиагностик Унитарного предприятия «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» для повышения конкурентоспособности предприятия на внутреннем рынке и увеличения экспортного потенциала. Решение этих задач связано с разработкой собственных технологий и новой продукции в виде наборов реагентов для ЛИФМА, что и составило производственную актуальность данного диссертационного исследования.

Работа имеет высокую медико-социальную мотивацию, поскольку областью применения результатов является диагностика генетических патологий плода и врожденных заболеваний в рамках действующей программы скрининговых обследований беременных женщин и новорожденных детей. Помимо этого синтезированные производные биомолекул с установленными свойствами могут стать основой новых систем ЛИФМА, предназначенных для обеспечения безопасности продуктов питания и защиты окружающей среды. Полученные результаты носят выраженный инновационный характер, поскольку созданные нами новшества уже внедрены в промышленное производство и медицинское применение.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами.

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585): 2.2 биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты; 2.7 новые лекарственные средства и биокорректоры различных заболеваний, фармацевтические субстанции, современные диагностические тест-системы, технологии их производства, оценки качества и безопасности; 4. Лечебные, диагностические, профилактические и реабилитационные технологии, клеточные и молекулярно-биологические технологии в медицине, аппараты и приборы медицинского назначения;

и приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190): 2 Химический синтез и продукты; 3 Биологические системы и технологии.

Диссертационное исследование выполнено в лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси и тесно связано с выполнением следующих трех тем государственных программ научных исследований (ГПНИ), двух заданий государственных программ (ГП) и одного научного проекта.

ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация» на 2011-2013 годы, подпрограмма «Химфармсинтез», задание 2.16 «Разработка методов выделения, химическая модификация и исследование свойств специфических гликопротеинов плазмы крови и тканей человека для целей создания и производства иммунодиагностических реагентов» (№ госрегистрации 20114753).

ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» на 2014-2015 годы, подпрограмма «Химфармсинтез», задание 4.13 «Получение и структурно-функциональная характеристика белково-гормональных компонентов иммунохимических систем» (№ госрегистрации 20141726).

ГПНИ «Химические технологии и материалы» на 2016-2020 годы, подпрограмма «Биологически активные вещества», задание 2.17 «Химический синтез, биотехнологические методы получения и исследование взаимодействий

производных малых биомолекул и белков в иммуноаналитических и биохимических системах» (№ госрегистрации 201609950).

ГП «Импортозамещающая фармпродукция» на 2010-2014 годы и на период до 2020 года, подпрограмма «Диагностикумы», задание Д 14 «Разработка и освоение технологии производства наборов реагентов для определения свободной бета-субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека методами лантанидного иммунофлуориметрического и иммуноферментного анализа для пренатальной диагностики врожденных патологий развития плода» (№ госрегистрации 20102601); задание Д 15 «Разработка и освоение технологии производства наборов реагентов для определения белка беременности А в сыворотке крови человека методами лантанидного иммунофлуориметрического и иммуноферментного анализа для пренатальной диагностики врожденных патологий развития плода» (№ госрегистрации 20102600).

Кроме того диссертационное исследование поддержано грантом Национальной академии наук Беларуси на выполнение НИР аспиранткой Гарбуз О.С. «Синтез и иммунохимические свойства конъюгатов антител и низкомолекулярных антигенов с поликарбоксилатными комплексонатами редкоземельных элементов» (№ госрегистрации 20132235).

Цель и задачи исследования. Цель работы – разработка новых способов получения реагентов для лантанидного иммунофлуориметрического анализа.

Поставленная цель достигалась в результате решения следующих задач.

1. Синтезировать новые функционализированные производные комплексоната европия на основе диэтилентриаминтетрауксусной кислоты, содержащие реакционноспособные группы для взаимодействия с белками и низкомолекулярными биологически активными соединениями.

2. Разработать методики синтеза конъюгатов белков и низкомолекулярных биорегуляторов с производными диэтилентриаминтетраацетата Eu^{3+} (ДТТА/ Eu^{3+}), изучить возможность использования полученных конъюгатов в системах ЛИФМА.

3. Осуществить синтез конъюгатов моноклональных антител с производными ДТТА/ Eu^{3+} для использования в системах ЛИФМА, необходимых для осуществления медицинских программ пренатального и неонатального скрининга с целью выявления врожденных заболеваний.

Объект исследования – новые иммунореагенты и вспомогательные компоненты систем ЛИФМА на основе белков и низкомолекулярных биорегуляторов, ковалентно связанных с комплексоном европия.

Предмет исследования – методы синтеза новых конъюгатов белков и низкомолекулярных биологически активных соединений с комплексоном

европия и их применение в экспериментальных и клинико-диагностических системах ЛИФМА.

Научная новизна

1. Разработан способ синтеза, получены и охарактеризованы экспериментальные образцы новых реагентов для химической модификации белков и низкомолекулярных биологически активных соединений производными комплексоната европия в исследовательских целях и для практики ЛИФМА.

2. Созданы новые методики синтеза и изготовлены экспериментальные образцы конъюгатов производных комплексоната европия с биоактивными соединениями различных групп: полипептидами, гликопротеином, стероидами и антибиотиком.

3. Получены новые знания об особенностях и количественных параметрах взаимодействия модифицированных комплексоном европия антигенов со специфическими антителами.

Положения, выносимые на защиту

1. Способ синтеза реагентов для химической модификации белков и низкомолекулярных биологически активных соединений производными комплексоната европия (амино-ДТТА/ Eu^{3+} и сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+}), заключающийся в проведении последовательных реакций ацилирования монозамещенного диамина диангидридом диэтилентриаминпентауксусной кислоты, деблокирования аминогруппы продукта, образования комплекса с ионами европия и взаимодействия аминоксидного комплексоната с ди-N-гидроксисукцинимидным эфиром дикарбоновой кислоты.

2. Установление зависимости степени модификации белков производными комплексоната европия от концентрации макромолекул, количества используемого сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} и других условий проведения реакции, определение антиген- и лигандсвязывающей активности модифицированных белков в системах ЛИФМА.

3. Методики получения конъюгатов низкомолекулярных биологически активных соединений в реакциях N-гидроксисукцинимидных эфиров их карбоксипроизводных с амино-ДТТА/ Eu^{3+} , а также с полипептидами, ацилированными сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} по аминоксуппам, или с гликопротеинами, модифицированными аминоксид-ДТТА/ Eu^{3+} по альдегидным группам окисленных олигосахаридных цепей, установление параметров взаимодействия синтезированных конъюгатов с антителами.

4. Новые конъюгаты белков и низкомолекулярных биологически активных соединений с комплексоном европия как базовые компоненты при

промышленном производстве ЛИФМА-наборов для медицинской диагностики и как экспериментальные образцы для лабораторных тест-систем.

Личный вклад соискателя. Синтез производных комплексонов европия и модифицированных ими биомолекул проводились автором самостоятельно. Планирование экспериментов, теоретическое обсуждение и оформление результатов в виде статей в научных журналах и сборниках осуществлялось совместно с научным руководителем д.х.н. О.В. Свиридовым. Характеристика конъюгатов моноклональных антител в ЛИФМА-наборах для медицинской диагностики проводилась совместно со с.н.с. Л.В. Дубовской. Синтез некоторых производных стероидов выполнен совместно с д.х.н. В.Н. Жабинским и н.с. А.Л. Савчук. При проведении отдельных видов работ, а также при обсуждении полученных результатов соискатель пользовался методической и консультативной помощью к.х.н. И.И. Вашкевич, к.х.н. В.П. Мартинович и к.х.н. Т.С. Серчени.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы были представлены на Республиканской научной конференции студентов и аспирантов высших учебных заведений Республики Беларусь «НИРС-2011» (Минск, 18 октября 2011 г.), международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2012» (Минск, 17-20 апреля 2012 г.), IV международной научной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 17-19 октября 2012 г.), международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 22-23 ноября 2012 г.), VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Уфа, 11-15 июня 2013 г.), международной научной конференции «Актуальные проблемы развития биоорганической химии» (Ташкент, 15-16 ноября 2013 г.), международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2013» (Минск, 19-22 ноября 2013 г.), V международной научной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 4-6 июня 2014 г.), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 17-20 марта 2015 г.), Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2015» (Минск, 1-4 декабря 2015 г.), Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» и XII съезде Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 28-30 июня 2016 г.), I Белорусском биохимическом конгрессе «Современные проблемы биохимии» (Гродно, 5-6 июля, 2016 г.). Материалы диссертации неоднократно обсуждались на семинарах лаборатории химии белковых гормонов Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Использование результатов диссертационной работы. По технологическим регламентам и инструкциям, разработанным с

использованием созданных методик, получают конъюгаты моноклональных антител с комплексоном европия в качестве компонентов ЛИФМА-наборов, которые серийно выпускаются УП «ХОП ИБОХ НАН Беларусь».

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 8 статей в научных журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь», общим объемом 4,3 авторских листа, 1 статья в рецензируемом научном журнале, 4 статьи в сборниках конференций, тезисы 8 докладов и 1 заявка на патент РБ (получено решение о выдаче патента).

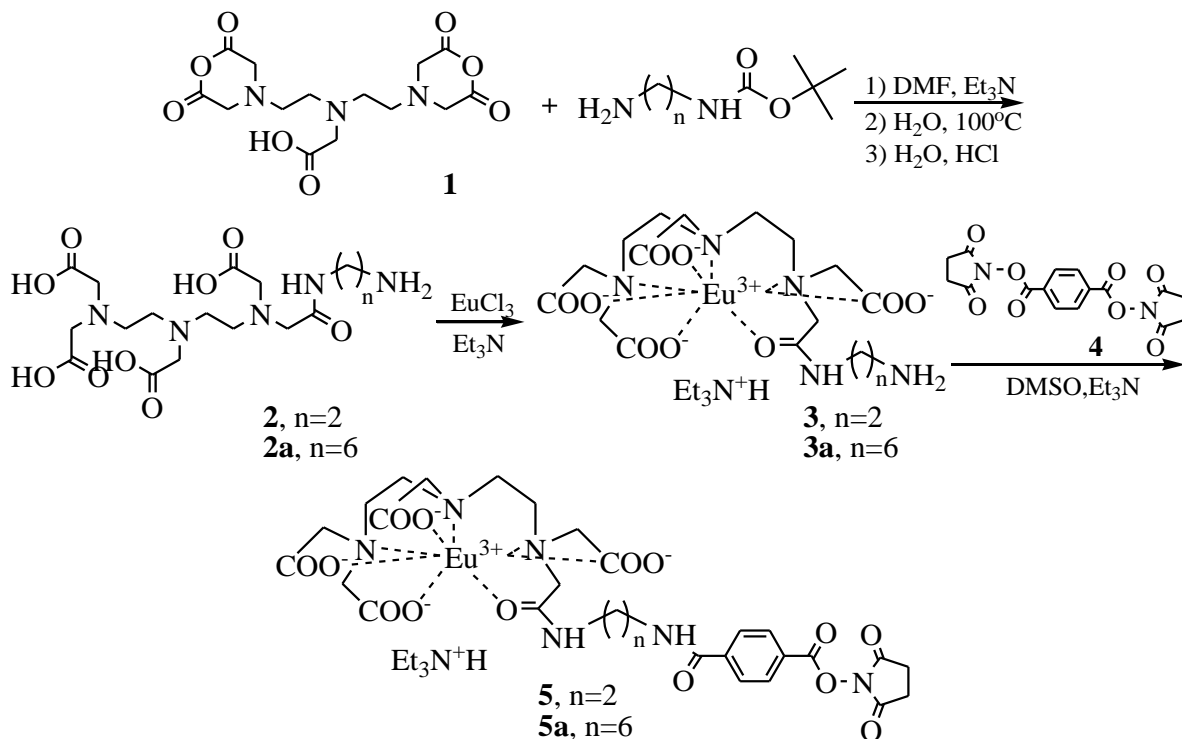
Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, библиографического списка и приложений. В главе 1 приводится обзор литературных данных о современных видах иммуноанализа, в которых используется явление люминесценции. В главах 2, 3 и 4 описаны и обсуждаются способ синтеза новых производных комплексогена европия, методики модификации ими белков и низкомолекулярных биорегуляторов, а также результаты применения полученных конъюгатов в системах ЛИФМА. Глава 5 содержит перечень использованных материалов, методы исследования и экспериментальные данные. Полный текст диссертации составляет 170 страниц, в том числе 40 рисунков на 20 страницах, 11 таблиц на 9 страницах; библиографический список состоит из списка источников, который включает 255 наименования на 20 страницах и списка публикаций соискателя (22 наименования на 4 страницах); приложения занимают 17 страниц.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В главе 1 охарактеризованы этапы развития иммунохимических методов исследования и приведен аналитический обзор литературы по теме диссертации. Анализ имеющейся информации о видах флуоресцентных меток и разнообразии подходов к проведению флуоресцентного иммуноанализа позволил выявить преимущества и ограничения их использования. Установлено, что ЛИФМА с применением диссоциативно-усиливающего раствора характеризуется высокими технико-аналитическими параметрами и востребован при проведении исследований в клинко-диагностических лабораториях, а также в ходе осуществления контроля безопасности продуктов питания и при проведении мероприятий по защите окружающей среды.

В главе 2 рассмотрена методика синтеза реагентов для модификации биомолекул комплексоном Eu^{3+} . N^1 -(2-аминоэтиламин) диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПК) 2 получали путем

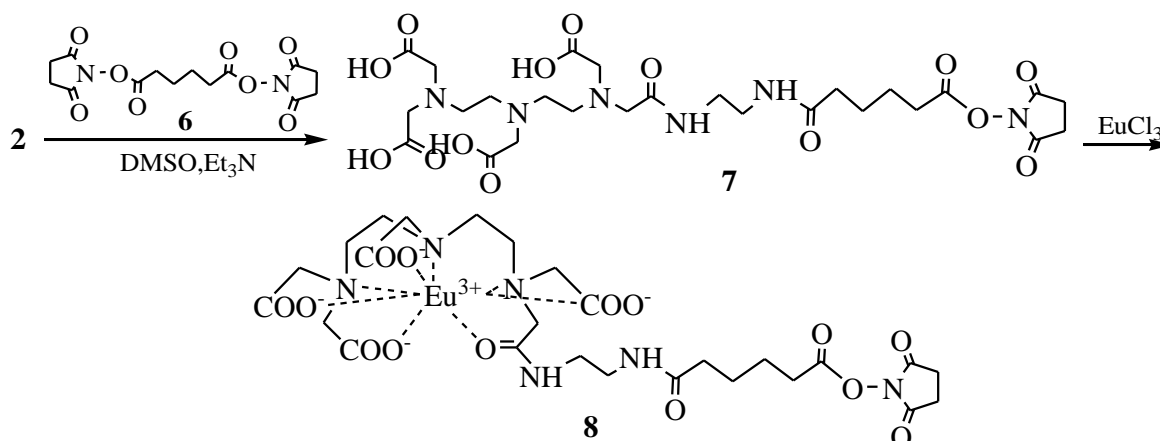
последовательной модификации диангирида ДТПК **1** и очищали методом ионообменной хроматографии. Амино-ДТТА/ Eu^{3+} **3** получали с использованием избытка ионов Eu^{3+} , который удаляли подщелачиванием раствора триэтиламино. Реакцию ацилирования соединения **3** диэфиром **4**, синтезированным из дихлорангирида *n*-фталевой кислоты, проводили в диметилсульфоксиде. Продукт реакции, сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5**, выпадал в виде кристаллического вещества по мере удаления из реакционной смеси растворителя. Исследование соединения **5** методом ВЭЖХ-МС показало, что продукт представляет собой смесь целевого сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5** и продукта его гидролиза. Лабильность сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5** в водном растворе не позволила выделить его в чистом виде. Основная присутствующая примесь (кислота, образующаяся в результате гидролиза эфира **5**) не содержит активных групп, которые могут взаимодействовать с полипептидной цепью, поэтому сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5** использовали для модификации белков без дополнительной стадии очистки.



N^1 -(6-аминогексиламид) ДТПК **2a**, амино-ДТТА/ Eu^{3+} **3a** и сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5a** получали по аналогичной схеме.

Диэфир **6** синтезировали из адипиновой кислоты и *N*-гидроксисукцинимида в присутствии карбодиимида. В результате ацилирования амина **2** диэфиром **6** получали соединение **7**, которое очищали методом ионообменной хроматографии. Хелатирование ионов Eu^{3+} эфиром **7** проводило к образованию сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **8**, который использовали для модификации белков без дополнительной очистки, поскольку

выделенный продукт не содержит примесей, способных взаимодействовать с полипептидной цепью.



Амино-ДТГА/Eu³⁺ **3**, сукцинимидилкарбокси-ДТГА/Eu³⁺ **5**, **5a** и **8** использовали для синтеза прямых или комбинированных конъюгатов, в которых биологически активная молекула непосредственно связана с производным комплексоната или присоединена к нему через инертный белок-носитель (таблица 1).

Таблица 1. – Конъюгаты биомолекул с комплексонатом Eu³⁺

Прямые конъюгаты		Комбинированные конъюгаты	
Препараты белков		Низкомолекулярные биорегуляторы	
<ul style="list-style-type: none"> • Альбумин человека • Стрептавидин 	<ul style="list-style-type: none"> • Моноклональное антитело <ul style="list-style-type: none"> - к тиреотропину; - к свободной бета-субъединице хориогонадотропина; - к плазматическому белку беременности А • Поликлональные антитела барана к иммуноглобулинам мыши • F(ab)₂-фрагмент моноклонального антитела к тиреотропину 	<ul style="list-style-type: none"> • 17α-гидроксипрогестерон • 24-эпикастерон • Хлорамфеникол 	<ul style="list-style-type: none"> • 17α-гидроксипрогестерон-альбумин • 24-эпикастерон-альбумин • Хлорамфеникол-альбумин • Кортизол-пероксидаза из корней хрена

Глава 3 посвящена получению и характеристике конъюгатов белков с комплексоном Eu^{3+} . Очистку конъюгатов проводили методом гелефильтрации на колонке с сорбентом Superose 12 (1 x 30 см), что позволило полностью отделить не присоединившийся к белкам комплексонат. Степень модификации белков в синтезированных конъюгатах рассчитывали по флуоресценции их растворов в диссоциативно-усиливающем растворе, обеспечивающем образование интенсивно флуоресцирующих комплексов Eu^{3+} . При этом использовали найденную зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации ионов Eu^{3+} в диссоциативно-усиливающем растворе. Результаты ЛИФМА с применением как конъюгатов белков, так и низкомолекулярных биорегуляторов, описанных в главе 4, регистрировали после добавления в систему диссоциативно-усиливающего раствора.

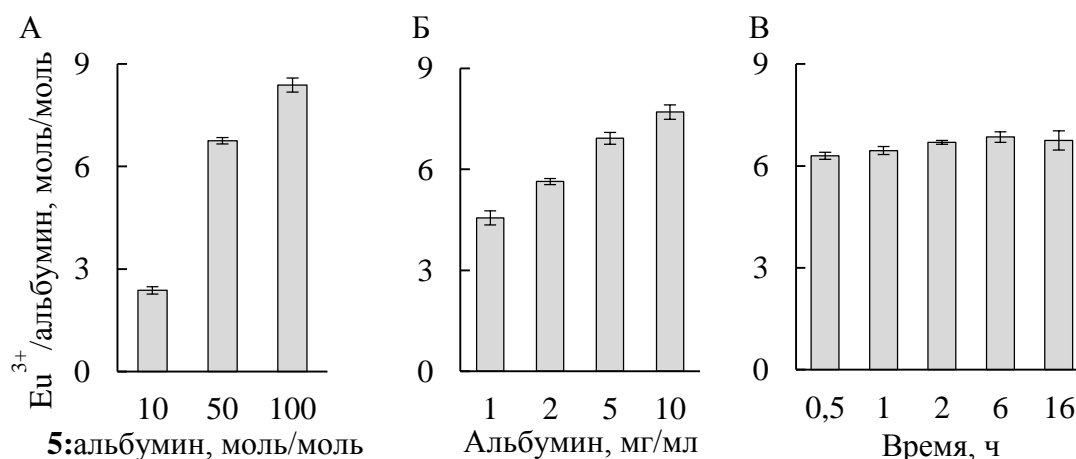
Рассмотрена возможность получения конъюгатов белков с комплексоном Eu^{3+} с использованием диангида ДТПК **1**. Применение диангида ДТПК ограничено необходимостью проведения реакции в две стадии и высокой вероятностью образования внутри- и межмолекулярных сшивок. Не зафиксировано образования сшивок полипептидных цепей иммуноглобулинов только при использовании двукратного мольного избытка диангида **1**. В конъюгате, синтезированном в таких условиях, на одну молекулу белка приходится менее одного иона Eu^{3+} , что делает затруднительным его использование в высокочувствительных системах ЛИФМА.

Альтернативный подход к получению модифицированных комплексоном Eu^{3+} белков заключается в одностадийном синтезе с использованием моно-N-гидроксисукцинимидных эфиров производных комплексоном Eu^{3+} . Сукцинимидилкарбоксии-ДТТА/ Eu^{3+} **8** применяли для модификации стрептавидина и иммуноглобулинов. В полученных конъюгатах степень включения ионов Eu^{3+} в макромолекулу оказалась существенно ниже ожидаемой. Причиной этого может быть низкое содержание соединения **8** в смеси, которую применяли для модификации белка, из-за значительного гидролиза эфира **8** в процессе его получения. Схема синтеза сукцинимидилкарбоксии-ДТТА/ Eu^{3+} **5** и **5a** не предполагает использование воды на стадии получения и выделения из реакционной смеси активированных эфиров. Поэтому применение такой схемы позволило решить проблему деактивации N-гидроксисукцинимидных эфиров производных комплексоном Eu^{3+} . С использованием (10 – 400)-кратных мольных избытков сукцинимидилкарбоксии-ДТТА/ Eu^{3+} **5** или **5a** получены производные альбумина человека, иммуноглобулинов класса G животных, микробного белка стрептавидина, содержащие от 2 до 30 ионов Eu^{3+} в одной макромолекуле. Не установлено различий в степени модификации белков при использовании для

синтеза конъюгатов соединений **5** и **5a**. Показано, что сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5** и продукты его разложения не образуют нековалентных комплексов с альбумином и иммуноглобулинами.

На электрофореграммах конъюгатов, синтезированных с использованием (10 – 200)-кратных мольных избытков соединения **5**, не выявлены интенсивные белковые полосы, которые соответствовали бы олигомерным формам полипептидов. Вместе с тем в конъюгатах, в которых на одну молекулу белка приходится более 5 ионов Eu^{3+} , наблюдали уменьшение электрофоретической подвижности полипептидных цепей. Вероятной причиной этого является некоторое увеличение линейных размеров полипептидной цепи и изменение профиля гидрофобности полипептида, которое приводит к снижению способности связывать додецилсульфат-анион в сайтах модификации, и, следовательно, к уменьшению удельного заряда образованной мицеллы.

На примере альбумина человека исследовано влияние условий проведения реакции конъюгирования с использованием соединения **5**, на степень модификации белка (рисунок 1).



Соотношение ДТТА/ Eu^{3+} **5 : альбумин 50 : 1, моль/моль, концентрация альбумина 5 г/л, время инкубации реакционной смеси 16 ч, если другое не указано на рисунке**

Рисунок 1. – Зависимость степени модификации альбумина человека от условий протекания реакции

Увеличение соотношения сукцинимидилкарбокси-ДТТА/ Eu^{3+} **5** : альбумин приводило к закономерному возрастанию степени включения комплексоната в молекулу белка. Использование раствора альбумина с исходной концентрацией 10 мг/мл вместо 1 мг/мл позволило примерно в 1,5 раза повысить количество присоединившегося к белку комплексоната Eu^{3+} . Это связано с тем, что при ацилировании соединением **5** аминокрупп полипептидной цепи в слабощелочной среде, являющейся оптимальной для

данной реакции, происходит гидролиз активированного эфира. В результате увеличения концентрации белка увеличивается скорость модификации макромолекулы и уменьшается вероятность протекания побочной реакции. Установлено, что реакция конъюгирования завершается в течение 2 ч, в последующий период не наблюдали увеличения степени модификации белка.

С использованием примерно 400-кратного мольного избытка соединения **5** получали конъюгат поликлональных антител барана к иммуноглобулинам мыши, одна молекула которого содержит $30,2 \pm 1,0$ иона Eu^{3+} . На рисунке 2 представлена электрофореграмма этого конъюгата, на которой отчетливо наблюдаются две полосы, соответствующие легким и тяжелым цепям иммуноглобулинов, сдвинутые в область более высоких молекулярных масс относительно подвижностей исходных антител. Биологическую активность синтезированного конъюгата поликлональных антител оценивали в системе ЛИФМА сэндвич-типа (рисунок 2, Б). Линейный диапазон определяемых концентраций мышинных антител в предложенной системе превышает 3 порядка (от 0,005 до 10 мг/л).

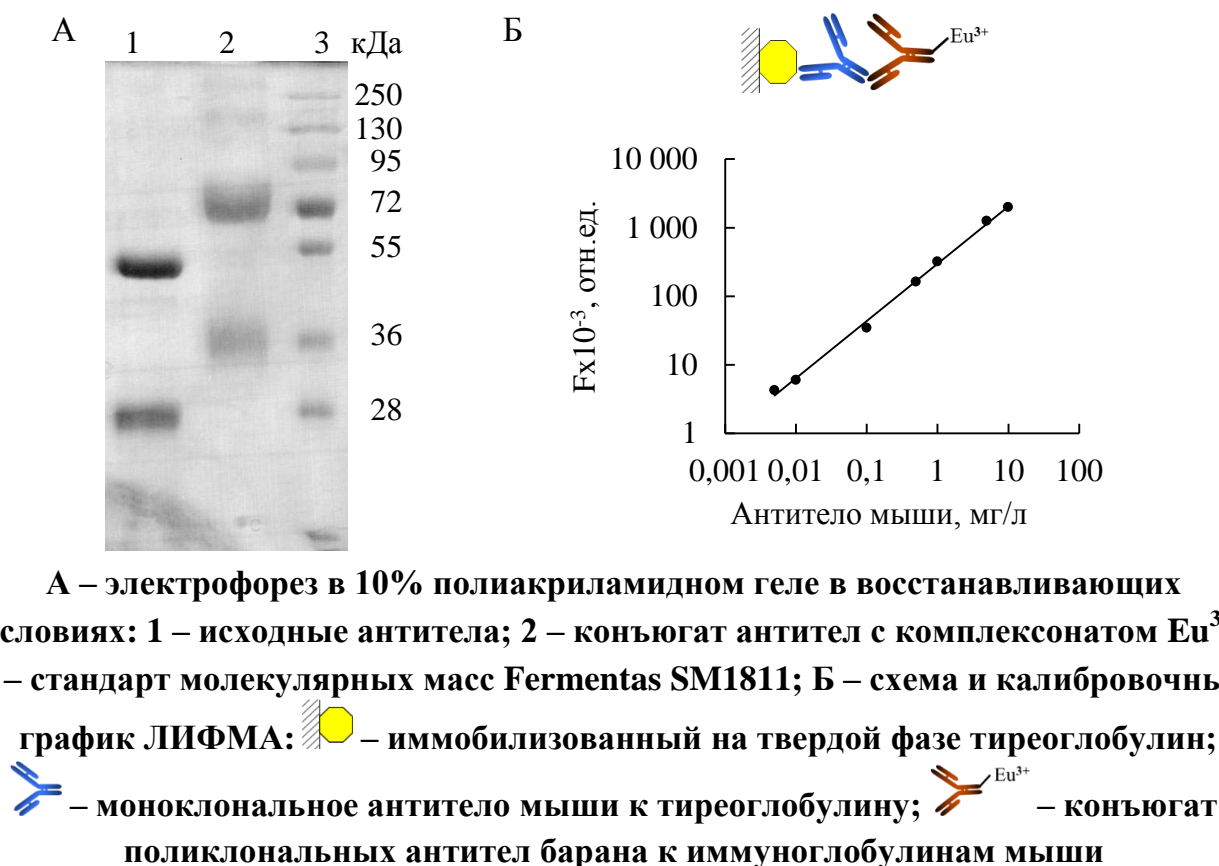


Рисунок 2. – Электрофореграмма конъюгата антивидовых антител, содержащего $30,2 \pm 1,0$ иона Eu^{3+} , и ЛИФМА сэндвич-типа с использованием данного конъюгата

СукцинимидилкарбокситТТА/ Eu^{3+} **5** применяли для модификации фрагмента F(ab)_2 моноклонального антитела к тиреотропину. Полученный конъюгат использовали в системе ЛИФМА сэндвич-типа, в которой определяли концентрацию тиреотропного гормона в 8 пробах сыворотки крови, содержащих от 0,44 до 12,2 мМЕ/л определяемого соединения. Коэффициент корреляции между измерениями, выполненными методами ЛИФМА и радиоиммунного анализа, составил 0,99. Согласованность методов между собой подтверждена с помощью метода Блэнда-Алтмана.

Конъюгат стрептавидина с комплексоном Eu^{3+} , одна молекула которого содержит $12,5 \pm 0,6$ иона Eu^{3+} , получали с использованием 50-кратного мольного избытка N-гидроксисукцинимидного эфира **5** и при исходной концентрации белка 10 мг/мл. Этот конъюгат может быть использован для детекции любых биотинилированных молекул, и его применяли в системе ЛИФМА, включающей конъюгат 17α -гидроксипрогестерона с биотином для определения 17α -гидроксипрогестерона в диапазоне концентраций от 1,5 до 100 нМ.

С использованием сукцинимидилкарбокситТТА/ Eu^{3+} **5** синтезировали конъюгаты моноклональных антител к свободной бета-субъединице хориогонадотропина и ассоциированному с беременностью белку А плазмы крови, в 1 молекуле которых содержится соответственно $15,4 \pm 0,3$ и $8,7 \pm 0,2$ иона Eu^{3+} . Эти конъюгаты нашли применение в качестве компонентов серийных наборов реагентов ЛИФМА-св.бета-ХГЧ (ТУ ВУ 100185093.062-2012) и ЛИФМА-ПАББ-А (ТУ ВУ 100185093.063-2012). Применение конъюгата моноклонального антитела к тиреотропину, содержащего $21,7 \pm 0,3$ иона Eu^{3+} , в наборе реагентов ЛИФМА-нео-ТТГ (ТУ ВУ 100185093.060-2010) позволило использовать этот диагностикум при определении концентрации тиреотропного гормона в пробе, представляющей собой сухое пятно 3-5 мкл крови новорожденного (вместо 25-50 мкл сыворотки крови, которые обычно используют при проведении иммуноанализа). Рассчитанный в результате клинических испытаний наборов реагентов ЛИФМА коэффициент вариации результатов измерения концентрации определяемого соединения не превысил 3,1 % в наборах, где анализируемым материалом является сыворотка крови, и 8,5 % при исследовании сухих пятен крови. Чувствительность систем составила 1,2 мкМЕ/мл для ЛИФМА-нео-ТТГ, 0,03 нг/мл для ЛИФМА-св.бета-ХГЧ, 3,0 мМЕ/л для ЛИФМА-ПАББ-А. Рассчитанные технико-аналитические характеристики соответствуют требованиям технических условий на данные наборы реагентов и параметрам лучшего зарубежного ЛИФМА-набора, предназначенного для проведения аналогичных медицинских исследований.

В главе 4 описаны методы получения и свойства конъюгатов низкомолекулярных биологически активных соединений с комплексоном Eu^{3+} . Прямые конъюгаты 17α -гидроксипрогестерона **9**, 24-эпикастастерона **10** и

хлорамфеникола **11** (рисунок 3) синтезировали в реакции амино-ДТТА/ Eu^{3+} **3** с N-гидроксисукцинимидными эфирами 3-О- или 6-О-карбоксиметил оксимо стероидов и 3-гемисукцината антибиотика. Очищали конъюгаты **9**, **10** и **11** методами экстракции, препаративной тонкослойной хроматографии и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии, соответственно.

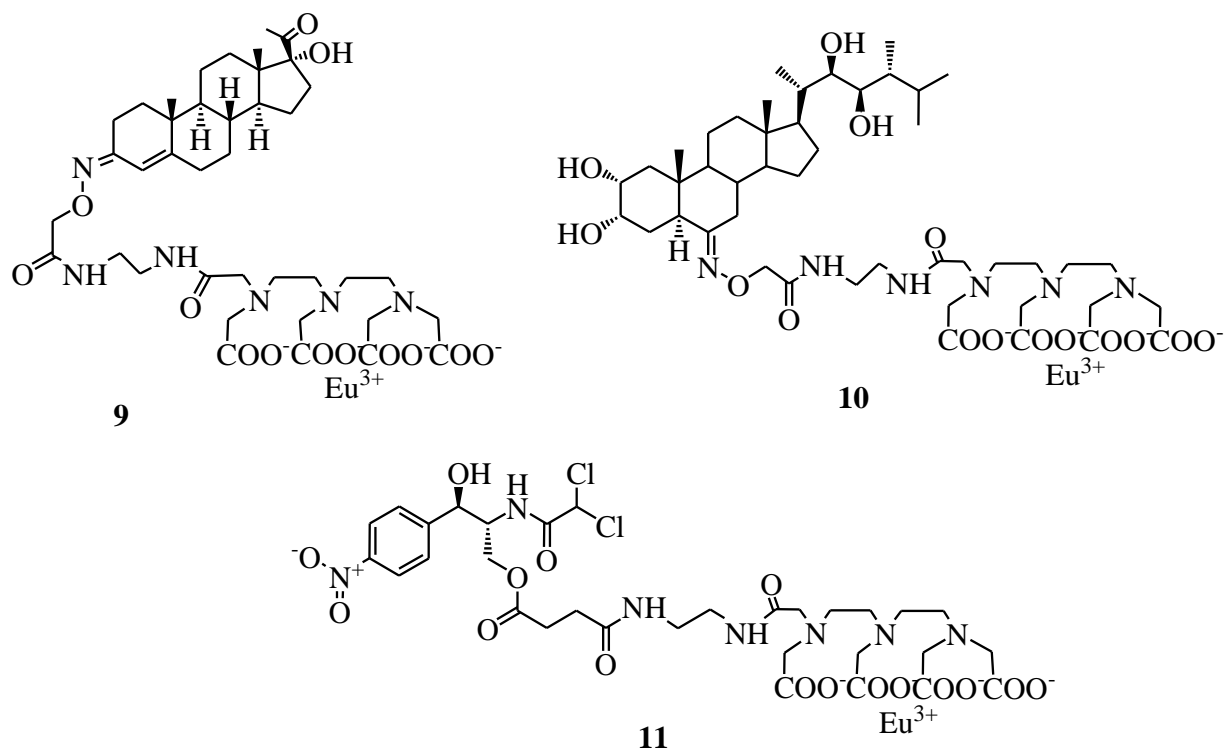


Рисунок 3. – Структурные формулы прямых конъюгатов низкомолекулярных биологически активных соединений с комплексоном Eu^{3+}

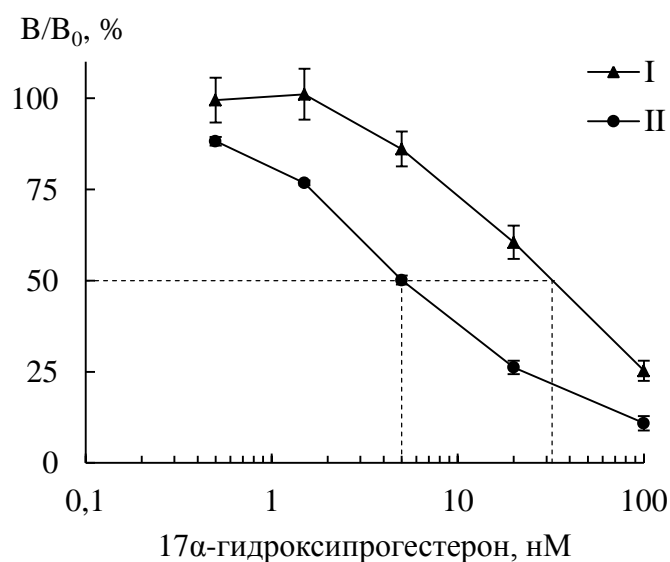
Комбинированные конъюгаты 17α -гидроксиprogестерона, 24-эпикастастерона и хлорамфеникола с комплексоном Eu^{3+} (таблица 1) получали в одну стадию путем одновременного прибавления производных низкомолекулярных биологически активных соединений и сукцинимидилкарбоксии-ДТТА/ Eu^{3+} **5** или последовательной модификацией белка-носителя. Очистку конъюгатов выполняли методом гель-фильтрации. Одна молекула белка в комбинированных конъюгатах 17α -гидроксиprogестерона, 24-эпикастастерона или хлорамфеникола содержит $6,5 \pm 0,3$, $6,6 \pm 0,2$ или $6,2 \pm 0,4$ иона Eu^{3+} .

Комбинированный конъюгат кортизола получали в результате направленной модификации углеводной и полипептидной цепей гликопротеина соответственно амино-ДТТА/ Eu^{3+} **3** и N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-(О-карбоксиметил)оксима кортизола. В синтезированном конъюгате одна молекула белка содержит $2,7 \pm 0,1$ иона Eu^{3+} . Применение детектируемого

соединения и антигена, содержащих различные реакционноспособные группы, может существенно упростить процесс получения комбинированных конъюгатов заданной стехиометрии за счет проведения реакции модификации по разным группам белка.

В системах твердофазного конкурентного ЛИФМА показано обратимое связывание прямых и комбинированных конъюгатов низкомолекулярных биорегуляторов с иммобилизованными специфическими антителами. В случае конъюгата кортизола также установлена возможность его использования при проведении иммуноферментного анализа.

Применение в системе ЛИФМА комбинированного конъюгата 17α -гидроксиprogестерона в 5 раз уменьшило концентрацию гормона, вызывающую 50 % ингибирование связывания конъюгата с антителами по сравнению с системой с использованием прямого конъюгата **9** (рисунок 4).



I – прямой конъюгат; II – комбинированный конъюгат; V_0 и V – связывание конъюгатов в отсутствие и в присутствии 17α -гидроксиprogестерона

Рисунок 4. – Связывание конъюгатов 17α -гидроксиprogестерона с иммобилизованными антителами в присутствии немодифицированного 17α -гидроксиprogестерона

Также изучены параметры взаимодействия со специфическими антителами конъюгатов 24-эпикастастерона и хлорамфеникола (таблица 2). Определено, что использование в системах ЛИФМА комбинированных конъюгатов, вместо соответствующих прямых, существенно увеличивает регистрируемый сигнал и повышает чувствительность определения в 2-8 раз (определено по величине интерсепт 80%).

Таблица 2. – Параметры связывания прямых и комбинированных конъюгатов низкомолекулярных соединений со специфическими антителами

Параметр	Конъюгаты низкомолекулярных биорегуляторов					
	17 α -гидроксипрогестерон		24-эпикастастерон		хлорамфеникол	
	I	II	I	II	I	II
Интерсепт 80 %, нМ	7,7	1,0	>5	1,5	0,9	0,4
Интерсепт 50 %, нМ	32,2	6,1	100,0	19,5	5,2	2,4
Интерсепт 20 %, нМ	134,3	35,1	-	260,2	39,6	14,8
V_0 , отн.ед.	79 200	235 800	31 000	159 000	64 000	104 000

Примечания.

1. I или II – прямой или комбинированный конъюгат биомолекулы.
2. Интерсепт 20, 50 и 80 % – концентрация 17 α -гидроксипрогестерона, 24-эпибрассинолида или хлорамфеникола, которая на графике зависимости связывания конъюгата с иммобилизованными антителами от концентрации немодифицированного низкомолекулярного биорегулятора, построенном в координатах logit-log, соответствует величинам V/V_0 20, 50 и 80 %.
3. В случае прямого конъюгата 24-эпикастастерона интерсепт 50 и 80 % определяли с использованием только 5 и 100 нМ растворов 24-эпибрассинолида.
4. V_0 и V – связывание конъюгатов в отсутствие и в присутствии 17 α -гидроксипрогестерона, 24-эпибрассинолида или хлорамфеникола.
5. Приведены средние значения, полученные на основании трех независимых экспериментов.

Конъюгат хлорамфеникола **11** использовали для вычисления равновесной константы ассоциации со специфическими к хлорамфениколу поликлональными антителами, иммобилизованными на поверхности лунок полистирольного планшета. Конъюгат **11** применяли в концентрации от 0,05 до 5 нМ. После удаления не вступивших в иммунохимическую реакцию с антителами компонентов системы количество связавшегося с антителами конъюгата **11** рассчитывали по графику зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации ионов Eu^{3+} в диссоциативно-усиливающем растворе. Равновесную константу ассоциации, величина которой составила $(6,2 \pm 0,5) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, определяли по методу Скэтчарда. В условиях гетерогенной системы, когда не все связывающие сайты иммобилизованных специфических антител одинаково доступны для взаимодействия с антигеном, измеренное значение константы может отличаться от истинного. Вместе с тем найденная величина отражает характеристику полезную для практики твердофазного иммуноанализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты исследования

1. Путем ацилирования диангидридом диэтилентриаминпентауксусной кислоты моно-N-Вос-замещенных диаминов с последующими стадиями деблокирования аминогруппы, хелатирования ионов Eu^{3+} , моноацилирования полученных аминокомплексонов ди-N-гидроксисукцинимидными эфирами дикарбоновых кислот синтезированы новые производные диэтилентриаминтетраацетата Eu^{3+} . Полученные амино-ДТТА/ Eu^{3+} и сукцинимидилкарбоксии-ДТТА/ Eu^{3+} содержат реакционноспособные группы, удаленные от комплексонов алифатическим или жирноароматическим фрагментами различной структуры, и при помещении в диссоциативно-усиливающий раствор обладают интенсивной долгоживущей флуоресценцией с большим стоксовым сдвигом [1, 2, 4, 5, 7, 17, 22].

2. Разработана методика химической модификации полипептидов синтезированными N-гидроксисукцинимидными эфирами карбоксипроизводных ДТТА/ Eu^{3+} , которая включает эффективную очистку полученных конъюгатов гель-фильтрацией и определение содержания Eu^{3+} в белке по интенсивности флуоресценции конъюгата в диссоциативно-усиливающем растворе. Установлена зависимость степени связывания комплексонов Eu^{3+} с полипептидной цепью от концентрации белка (альбумин человека, иммуноглобулины животных, микробный белок стрептавидин) в реакционной среде, избытка сукцинимидилкарбоксии-ДТТА/ Eu^{3+} и других условий проведения реакции. Использование новых производных комплексонов Eu^{3+} позволяет получать конъюгаты с различной степенью модификации белка (от 2 до 30 ионов Eu^{3+}). В сравнительных экспериментах показано, что в отличие от ацилирования диангидридом диэтилентриаминпентауксусной кислоты получение белков, меченных комплексоном Eu^{3+} , с помощью синтезированных реагентов протекает в одну стадию, позволяет получать конъюгаты с высокой степенью включения метки и не приводит к сшивке полипептидных цепей [3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 17, 21].

3. Получены конъюгаты моноклональных антител к свободной бета-субъединице хориогонадотропина, ассоциированному с беременностью белку А плазмы крови и тиреотропному гормону, в одной молекуле которых содержится соответственно $15,4 \pm 0,3$, $8,7 \pm 0,2$ и $21,7 \pm 0,3$ иона Eu^{3+} . Применение этих конъюгатов в наборах реагентов ЛИФМА, предназначенных для медицинской диагностики, обеспечило высокую чувствительность определения и повторяемость результатов анализа, проводимого в широком клинически значимом диапазоне измеряемых концентраций [5, 7, 10, 14, 16, 19, 22].

4. Разработаны методики синтеза и получены экспериментальные образцы прямых и комбинированных конъюгатов низкомолекулярных биологически активных соединений с комплексоном Eu^{3+} . Прямые конъюгаты синтезированы в реакциях N-гидроксисукцинимидных эфиров карбоксипроизводных 17α -гидроксиprogестерона, 24-эпикастастерона и хлорамфеникола с амино-ДТТА/ Eu^{3+} . Комбинированные конъюгаты получены в результате ацилирования первичных аминогрупп полипептидной цепи альбумина N-гидроксисукцинимидными эфирами карбоксипроизводных ДТТА/ Eu^{3+} и низкомолекулярных биологически активных молекул. По альтернативной схеме осуществлен направленный синтез комбинированного конъюгата кортизола и комплексономата Eu^{3+} на основе гликопротеиновой матрицы. Амино-ДТТА/ Eu^{3+} реагировал с альдегидными группами окисленного углеводного компонента пероксидазы из корней хрена, а полипептидная часть белка модифицировалась по аминогруппам N-гидроксисукцинимидным эфиром 3-(O-карбоксиметил)оксима кортизола. Параметры взаимодействия со специфическими антителами синтезированных конъюгатов низкомолекулярных биологически активных молекул с комплексоном Eu^{3+} определены в соответствующих системах ЛИФМА [3, 6, 7, 9, 11, 13, 18, 20].

5. Установлено, что применение комбинированных конъюгатов в системах ЛИФМА для определения концентраций низкомолекулярных биологически активных соединений обеспечивает более высокую интенсивность регистрируемого сигнала и в 2-8 раз увеличивает чувствительность системы по сравнению с использованием прямых конъюгатов [6, 18].

6. Показано, что прямые конъюгаты низкомолекулярных биологически активных соединений могут быть использованы для определения равновесных параметров лиганд-белкового связывания. Так в гетерогенной системе, включающей иммобилизованные поликлональные антитела и раствор конъюгата хлорамфеникол-ДТТА/ Eu^{3+} , константа ассоциации составила $(6,2 \pm 0,5) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ [9, 13].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Новые знания по объекту и предмету исследования, методики и экспериментальные образцы, рекомендуется использовать в производственных технологиях серийного выпуска отдельных компонентов и готовых наборов реагентов для лантанидного иммунофлуориметрического анализа.

Разработаны и прошли лабораторную и производственную апробацию три технологические инструкции по синтезу реагента для мечения белков

диэтиленetriаминтетраацетатом европия, получению конъюгатов белков с комплексоном европия и изготовлению диссоциативно-усиливающего раствора для ЛИФМА.

Актами № 1 и № 2 о практическом использовании результатов исследования подтверждается внедрение в производство УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» трех конъюгатов комплексогена Eu^{3+} с моноклональными антителами к свободной бета-субъединице хориогонадотропина, ассоциированному с беременностью белку А и тиреотропину в качестве компонентов серийно выпускаемых наборов реагентов ЛИФМА-св.бета-ХГЧ (ТУ ВУ 100185093.062-2012), ЛИФМА-ПАББ-А (ТУ ВУ 100185093.063-2012) и ЛИФМА-нео-ТТГ (ТУ ВУ 100185093.060-2010) для пре- и неонатальной диагностики врожденных патологий.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. **Гарбуз, О.С.** Лантанидный иммунофлуориметрический анализ: научные основы и технические принципы / О.С. Гарбуз, О.В. Свиридов // ARS Medica: Лабораторная диагностика. – 2011. – № 13. – С. 51-61.

2. **Гарбуз, О.С.** Синтез 6-аминогексиламида диэтиленetriаминпентауксусной кислоты для технологий лантанидного иммунофлуориметрического анализа / О.С. Гарбуз // Молодежь в науке – 2012: прил. к журн. «Весці НАН Беларусі». В 5 ч. Ч. 1. Серия химических наук // НАН Беларуси, Совет молодых ученых НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов (гл. ред.). – Минск: Беларуская навука, 2012. – С. 15-18.

3. **Гарбуз, О.С.** Eu^{3+} -комплексонат и биотинилированное производное 17-альфа-гидроксипрогестерона для лантанидного иммунофлуориметрического анализа / О.С. Гарбуз, Д.А. Семенов // Молодежь в науке – 2013: прил. к журн. «Весці НАН Беларусі». В 5 ч. Ч. 1. Серия химических наук // НАН Беларуси, Совет молодых ученых НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов (гл. ред.). – Минск: Беларуская навука, 2014. – С. 13-19.

4. **Гарбуз, О.С.** Химическая модификация белков поликарбоксилатным комплексоном европия / О.С. Гарбуз, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Весці НАН Беларусі. Серия химических наук. – 2014. – №1. – С. 85-90.

5. **Гарбуз, О.С.** Новый реагент для мечения белков ионами редкоземельных металлов / О.С. Гарбуз, Л.В. Дубовская, О.В. Свиридов // Доклады НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58, № 1. – С. 68-74.

6. Новый подход к иммунохимическому определению брассиностероидов / А.Л. Савчук, **О.С. Куприенко**, Р.П. Литвиновская,

О.В. Свиридов, В.А. Хрипач // Доклады НАН Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 1. – С. 63-67.

7. Functionalized Diethylenetriaminetetraacetic Acid-Based Metal Chelates for Chemical Modification of Proteins and Small Biomolecules / **O.S. Kuprienko**, L.V. Dubovskaya, P.S. Shabunya, S.A. Fatykhava, O.V. Sviridov // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2015. – Vol. 41, № 6. – P. 607-616.
Функционализированные металлохелаты на основе диэтиленetriаминтетрауксусной кислоты для химической модификации белков и малых биомолекул / **О.С. Куприенко**, Л.В. Дубовская, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, О.В. Свиридов // Биоорганическая химия. – 2015. – Т. 41, № 6. – С. 675-685.

8. **Куприенко, О.С.** Мечение фрагмента F(ab)₂ моноклонального антитела к тиреотропину новым производным диэтиленetriаминтетраацетата европия для лантанидного иммунофлуориметрического анализа / О.С. Куприенко // Молодежь в науке – 2015: прил. к журн. «Весці НАН Беларусі». В 5 ч. Ч. 1. Серия химических наук // НАН Беларуси, Совет молодых ученых НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2016. – С. 48-52.

9. Синтез и параметры взаимодействия с антителами нового биоконъюгата хлорамфеникол-диэтиленetriаминтетраацетат европия / **О.С. Куприенко**, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, О.В. Свиридов // Доклады НАН Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 3. – С. 93-99.

Статьи в сборниках

10. Сравнение параметров иммуноферментного и лантанидного иммунофлуориметрического анализов свободной β-субъединицы хорионического гонадотропина в сыворотке крови человека / Л.В. Дубовская, И.И. Вашкевич, **О.С. Гарбуз**, Н.В. Кузуб, Н.Б. Гусина, И.В. Наумчик, О.В. Свиридов // Белорусские лекарства : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 22-23 ноября 2012 / НАН Беларуси, Институт биоорганической химии НАН Беларуси». – Минск, 2012. – С. 84-89.

11. **Гарбуз, О.С.** Eu³⁺-комплексонат и биотинилированное производное 17-альфа-гидроксипрогестерона для лантанидного иммунофлуориметрического анализа / О.С. Гарбуз, Д.А. Семенов // Молодежь в науке – 2013 : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 19-22 ноября 2013 г. / НАН Беларуси, Совет молодых ученых НАН Беларуси. – Минск, 2013. – С. 710-714.

12. Антитела, меченные комплексонатом европия, и флуориметрия с разрешением во времени в иммуноанализе альбумина человека / Т.С. Серченя, Н.Ф. Золотарь, **О.С. Куприенко**, О.В. Свиридов // Молекулярные, мембранные

и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Двенадцатый съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28–30 июня 2016 г. : сб. ст. : в 2 ч. / редкол. И.Д. Волоотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2016. – Ч. 1. – С. 179-181.

13. **Куприенко, О.С.** Конъюгаты малых биомолекул с хелатом европия в иммунохимических системах лиганд-белкового связывания / О.С. Куприенко // Современные проблемы биохимии : сб. науч. ст. : в 2 ч. / НАН Беларуси, Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, редкол.: Л.И. Надольник (гл. ред.) [и др.]. – Гродно : ЮрСаПринт, 2016. – Ч. 2. – С. 195-201.

Тезисы докладов

14. **Гарбуз, О.С.** Иммуносорбент в формате микропланшета как компонент наборов для определения свободной β -субъединицы хорионического гонадотропина / О.С. Гарбуз, Л.В. Дубовская, О.В. Свиридов // НИРС-2011 : сборник тезисов докладов XI Республ. научн. конф. студ. и асп. высш. уч. завед. Республики Беларусь, Минск, 18 октября 2011 г. / БГУ, БНТУ, БГАТУ, БГТУ, БГУИР, БГУКИ, ВГТУ; редкол.: С.В. Абламейко [и др.]. – Минск, 2011. – С. 102-103.

15. **Гарбуз, О.С.** Синтез, свойства и применение в иммуноанализе конъюгатов белков с поликарбоксилатными комплексонатами лантанидов / О.С. Гарбуз, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул : материалы IV Междунар. научн. конф., Минск, 17-19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2012. – С.42-42.

16. Получение компонентов и характеристики наборов реагентов для иммуноанализа биохимических маркеров пренатальной диагностики / Л.В. Дубовская, И.И. Вашкевич, **О.С. Гарбуз**, Т.В. Терентьева, Н.В. Кузуб, И.В. Наумчик, Н.Б. Гусина, О.В. Свиридов // Актуальные проблемы развития биоорганической химии : сборник тезисов Междунар. науч. конф., Ташкент, 15-16 ноября 2013 г. / Академия наук Республики Узбекистан, Институт биоорганической химии им. ак. А.С. Садыкова; редкол.: А.С. Тураев [и др.]. – Ташкент, 2013. – С. 5.

17. **Гарбуз, О.С.** Химическая модификация белков моно-N-оксисукцинимидными эфирами поликарбоксилатных металлохелатов / О.С. Гарбуз, О.В. Свиридов // Белки и пептиды : материалы VI Российского симпозиума, Уфа, 11-15 июня 2013 г. / ИСЭИ УНЦ РАН; редкол.: В.Т. Иванов [и др.]. – Уфа, 2013. – С. 185.

18. Семенов, Д.А. Комбинированные конъюгаты 17α -гидроксипрогестерона с белком-носителем, модифицированным ферментом

или лантанидохелатом / Д.А. Семенов, **О.С. Гарбуз**, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул : материалы V Междунар. науч. конф., Минск, 4-6 июня 2014 г. / НАН Беларуси, ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 161-162.

19. **Гарбуз, О.С.** Моноклональные антитела, меченные комплексоном Eu^{3+} , в наборах реагентов для лантанидного иммунофлуориметрического анализа / О.С. Гарбуз, Л.В. Дубовская, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул : материалы V Междунар. науч. конф., Минск, 4-6 июня 2014 г. / НАН Беларуси, ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 54-55.

20. Комбинированный флуоресцентно-ферментный конъюгат кортизола и рекомбинантный Fab фрагмент моноклонального антитела к кортизолу: получение и взаимодействия в иммунохимической системе / **О.С. Куприенко**, Д.О. Дормешкин, О.В. Свиридов, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы VIII Московского Междунар. конгресса, г. Москва, 17-20 марта 2015 г. / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – Москва, 2015. – Т. 2. – С. 230-231.

21. **Куприенко, О.С.** Мечение фрагмента F(ab)_2 моноклонального антитела к тиреотропину новым производным диэтилентриаминтетраацетата европия для лантанидного иммунофлуориметрического анализа / О.С. Куприенко // Молодежь в науке – 2015 : материалы X Междунар. науч. конф. молодых ученых, Минск, 1-4 декабря 2015 г. / НАН Беларуси, Совет молодых ученых НАН Беларуси. – Минск, 2015. – С. 326.

Решение от 09.06.2016 о выдаче патента РБ по заявке

22. Реагент для мечения белков ионами лантанидов : заявка а20131159 Респ. Беларусь : МПК C07C51/00 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), G01N33/533 (2006.01) / **О.С. Гарбуз**, Л.В. Дубовская, В.П. Мартинович, О.В. Свиридов ; дата публ.: 30.06.2015.



РЕЗЮМЕ

Куприенко Ольга Сергеевна

Синтез и свойства конъюгатов белков и низкомолекулярных биологически активных соединений с комплексоном европия

Ключевые слова: комплексоном европия, лантанидный иммунофлуориметрический анализ, конъюгаты, антитела, альбумин, стрептавидин, стероиды, хлорамфеникол.

Цель работы: разработка новых способов получения реагентов для лантанидного иммунофлуориметрического анализа.

Методы исследования: спектроскопия ЯМР, масс-спектрометрия, ВЭЖХ, электрофорез, флуоресцентная спектроскопия с разрешением во времени, спектрофотометрия, иммунохимический анализ, гель-фильтрация.

Результаты работы и их новизна. Разработан способ синтеза, получены и охарактеризованы новые реагенты для химической модификации белков и низкомолекулярных биорегуляторов производными комплексоном европия в исследовательских целях и для практики лантанидного иммунофлуориметрического анализа. Созданы новые методики получения и изготовлены экспериментальные образцы конъюгатов комплексоном европия с биоактивными соединениями различных групп: полипептидами, гликопротеином, стероидами и антибиотиком. Получены новые знания об особенностях и количественных параметрах взаимодействия меченных комплексоном европия антигенов с моно- и поликлональными антителами.

Рекомендации по использованию. Результаты работы могут быть использованы для получения конъюгатов биологически активных соединений с комплексоном европия с целью дальнейшего их применения при разработке иммуноаналитических систем и для количественной характеристики лиганд-белковых взаимодействий. Результаты исследования рекомендуется использовать в производственных технологиях серийного выпуска отдельных компонентов и готовых наборов реагентов для лантанидного иммунофлуориметрического анализа.

Область применения: биоорганическая химия, биохимия, медицинская диагностика, производство иммунодиагностических средств.

РЭЗІЮМЭ

Купрыенка Вольга Сяргееўна

Сінтэз і ўласцівасці кан'югатаў бялкоў і нізкамалекулярных біялагічна актыўных злучэнняў з камплексанатам еўропію

Ключавыя словы: камплексанат еўропію, лантанідны імунафлуарыметрычны аналіз, кан'югаты, антыцелы, стрэптавідзін, стэроіды, хларамфенікол.

Мэта даследавання: распрацоўка новых спосабаў атрымання рэагентаў для лантаніднага імунафлуарыметрычнага аналізу.

Метады даследавання: спектраскапія ЯМР, мас-спектраметрыя, ВЭВХ, электрафарэз, флуарэсцэнтная спектраскапія з затрымкай ў часе, спектрафотаметрыя, імунахімічны аналіз, гель-фільтраванне.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Распрацаваны спосаб сінтэзу, атрыманы і ахарактарызаваны новыя рэагенты для хімічнай мадыфікацыі бялкоў і нізкамалекулярных біярэгулятараў вытворнымі камплексаната еўропію ў даследчых мэтах і для практыкі лантаніднага імунафлуарыметрычнага аналізу. Створаны новыя метадыкі атрымання і выраблены эксперыментальныя ўзоры кан'югатаў камплексанату еўропію з біяактыўнымі злучэннямі розных груп: поліпептыдамі, глікапратэінам, стэроідамі і антыбіётыкам. Атрыманы новыя веды пра асаблівасці і колькасныя параметры ўзаемадзеяння мечаных камплексанатам еўропію антыгенаў з мона- і полікланальнымі антыцеламаі.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Вынікі працы могуць быць выкарыстаны для атрымання кан'югатаў біялагічна актыўных злучэнняў з камплексанатам еўропію з мэтай далейшага іх выкарыстання пры распрацоўцы імунааналітычных сістэм і для колькаснай характарыстыкі ліганд-бялковых узаемадзеянняў. Вынікі даследавання рэкамендуецца выкарыстоўваць у вытворчых тэхналогіях серыйнага выпуску асобных кампанентаў і гатовых набораў рэагентаў для лантаніднага імунафлуарыметрычнага аналізу.

Галіна выкарыстання: біяарганічная хімія, біяхімія, медыцынская дыягностыка, вытворчасць імунадыягнастычных сродкаў.

SUMMARY

Kuprienko Olga Sergeyevna

Synthesis and properties of the conjugates of proteins and biologically active low molecular weight substances with a europium complexonate

Key words: europium complexes, time-resolved fluoroimmunoassay, conjugates, antibodies, albumin, streptavidin, steroids, chloramphenicol.

The aim of the research: development of the new methods for the preparation of reagents for time-resolved fluoroimmunoassay systems.

Research methods: NMR spectroscopy, mass-spectrometry, HPLC, electrophoresis, time-resolved fluorescence spectrometry, spectrophotometric analysis, immunoassay, gel chromatography.

Obtained results and their novelty. The method of the synthesis of new reagents for the chemical modification of proteins and small biomolecules with a europium complexonate for research purposes and practical time-resolved fluoroimmunoassays has been developed. New preparation procedures and experimental samples of the conjugates of the lanthanide chelate with polypeptides, a glycoprotein, steroids and an antibiotic were elaborated. New knowledge about the characteristics and quantitative parameters of the interaction of europium complexonate labeled antigens with mono- and polyclonal antibodies was obtained.

The extent of use. The results can be used for the preparation of the conjugates of biologically active compounds with europium complexes for further use in the development of immunoassay systems and for quantitative characterization of ligand-protein interactions. The obtained data are recommended for using in the manufacture of individual components and complete kits for a time-resolved fluoroimmunoassay.

Application fields: bioorganic chemistry, biochemistry, medical diagnostics, manufacture of immunodiagnostic reagents.