

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

УДК 611.441[577.175.44+577.112]:577.112.4+579.222

**НОВАКОВСКИЙ**  
Максим Евгеньевич

**БИОТИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И МОДИФИЦИРОВАННЫЕ  
БИОТИНОМ ТИРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ И АУТОАНТИГЕНЫ И ИХ  
ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

по специальности 03.00.04 – Биохимия

Минск, 2008

Работа выполнена в Институте биоорганической химии НАН Беларуси

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

Официальные оппоненты: **Еремин Александр Николаевич**,  
доктор химических наук, вед. науч. сотр.,  
Институт химии новых материалов НАН  
Беларуси, лаборатория химии поверхности  
тонких пленок

**Владыко Александр Станиславович**,  
доктор медицинских наук,  
зав. лабораторией биотехнологии и  
иммунодиагностики особо опасных  
инфекций Научно-исследовательского  
института эпидемиологии и микробиологии  
МЗ РБ

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Международный  
государственный экологический  
университет  
имени А.Д. Сахарова»

Защита диссертации состоится 24 февраля 2009 г. в 10 часов на заседании  
Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 при Институте биоорганической  
химии НАН Беларуси по адресу: 220141 Минск, ул. академика В.Ф.Купревича,  
5/2, зал Ученого Совета.

Телефон Ученого секретаря Совета 2678553.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке  
им. Я.Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «\_\_\_» января 2009 г.

Ученый секретарь Совета  
по защите диссертаций Д 01.21.01,  
кандидат химических наук

С.В.Бабицкая

## **ВВЕДЕНИЕ**

Белки семейства калицинов, стрептавидин и авидин, имеющие необычайно высокое сродство к биотину (витамин Н), в настоящее время широко применяются в структурных и биоинженерных исследованиях, а также в диагностических и лечебных биотехнологиях, основанных на лиганд-белковых взаимодействиях. Так, химическая модификация антигенов или антител остатком биотина (Бт) и связывание их с очищенным стрептавидином или авидином является распространенным приемом конструирования иммуноаналитических систем и эффективным процессом при их промышленном выпуске в форме диагностических наборов. В частности, (стрепт)авидин-биотиновая технология внедрена и успешно развивается на ведущем биотехнологическом предприятии РБ Хозрасчетном опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Тиропероксидаза (ТПО) и тироглобулин (ТГ) являются ключевыми белковыми компонентами системы биосинтеза тироидных гормонов в щитовидной железе (ЩЖ) человека. Главные и минорные продукты биосинтетических реакций 3,3',5,5'-тетрайод-L-тиронин (тироксин, Т<sub>4</sub>) и 3,3',5-трийод-L-тиронин (Т<sub>3</sub>) регулируют обменные и энергетические процессы, составляющие основу нормального развития и функционирования организма как интегральной биологической системы. Однако при заболеваниях ЩЖ тироидные белки могут выступать в роли антигенов, индуцирующих образование патологических аутоантител, в том числе антител, перекрестно реагирующих с тирогормонами. Кроме того, эти тироантигены и тирогормоны, выделенные из ткани или полученные путем органического синтеза, входят в состав иммунохимических систем для медицинской диагностики и/или играют роль диагностических маркеров. Прикладные исследования в данной области имеют высокую медико-социальную мотивацию, поскольку устойчивый рост тироидной патологии в Беларуси и других странах становится проблемой века. С производственной точки зрения, разработка и усовершенствование технологии изготовления полного профиля высококачественных наборов для тироидной диагностики являются особенно актуальными для нашей страны в связи с большими потребностями отечественного здравоохранения в них и поставленной задачей импортозамещения.

Научная актуальность темы диссертации обусловлена необходимостью получения новых знаний о синтезе биотинилированных биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, особенностях их взаимодействия с очищенными биотинсвязывающими белками (БтСБ) на твердой фазе, структуре и свойствах их растворимых комплексов со стрептавидином и авидином.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Связь работы с крупными научными программами, темами.** Диссертационная работа включает фундаментальные и прикладные исследования и инновационные разработки в приоритетных направлениях научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2005-2010 гг, относящихся к технологиям получения новых материалов и их использованию в создании диагностических систем для практической медицины, а именно «Разработка новых методов диагностики неинфекционных и инфекционных заболеваний, диагностических приборов, оборудования и наборов, сывороток, способов инструментального и неинструментального контроля, радиоиммунного и иммуноферментного анализа» (Указ Президента Республики Беларусь № 315 от 6 июля 2005 г.). Работа является

частью плановых исследований лаборатории химии белковых гормонов ИБОХ НАН Беларуси, выполненных в соответствии с заданиями ГППИ «Биоанализ и диагностика» по теме «Разработать способы микробиологического синтеза и очистки стрептавидина для биологических систем», задание 36, № госрегистрации 20052112 (2004-2005 гг.); Инновационного проекта «Разработать технологии производства импортозамещающей ориентированной на экспорт продукции: наборы реактивов для радиоиммунологического анализа тироксина, свободного тироксина, трийодтиронина, тиротропина, тироглобулина, аутоантител к тироглобулину и аутоантител к тиропероксидазе в сыворотке крови человека», по договору с Инновационным фондом НАН Беларуси № 08/2005 от 11.11.2005 (2005 – 2006 гг), № госрегистрации 20053824; ГНТП «Промышленные биотехнологии» по теме «Разработать технологии получения компонентов для промышленного производства белково-гормональных диагностических наборов для здравоохранения и животноводства», задание 1.3, № госрегистрации 2007562 (2006 г. – по настоящее время); проекта БРФФИ на тему «Иммобилизованные аутоантигены щитовидной железы: иммунохимические и ферментативные реакции на твердой фазе», задание X05-M035, № госрегистрации 20052008 (2005 – 2007 гг.).

#### **Цель и задачи исследования.**

Цель работы: получить и охарактеризовать очищенные стрептавидин, авидин, биотинилированные ТПО, ТГ, Т<sub>4</sub> и Т<sub>3</sub>, твердофазные и растворимые комплексы БтСБ и биотинилированных тироантигенов и тирогормонов, сконструировать иммунохимические тест-системы на основе этих реагентов.

#### Задачи исследования:

1. Разработать технологию получения препаратов стрептавидина и авидина, включающую выделение БтСБ и методы контроля их качества.
2. Охарактеризовать комплексообразование стрептавидина с биотинилированными макромолекулами в агаровом геле.
3. Получить и охарактеризовать покрытые стрептавидином макропористое стекло (МПС), углеродный наноматериал (УНМ), магнитные частицы (МЧ) и флуоресцентные латексные частицы (ФЛЧ).
4. Разработать способ синтеза и определить биоспецифические свойства биотинилированных Т<sub>3</sub> и Т<sub>4</sub> как бифункциональных лигандов связывающих белков.
5. Получить препараты биотинилированных тироантигенов, пригодные для использования в твердофазных тест-системах с участием БтСБ.
6. Разработать иммуноаналитические системы для количественного определения свободных Т<sub>4</sub> и Т<sub>3</sub>, аутоантител к ТПО и ТГ, содержащие биотинилированные тироантигены или тирогормоны и БтСБ.

#### **Положения диссертации, выносимые на защиту.**

1. Технология получения препаратов стрептавидина из культуральной жидкости штамма ВКМ Ас 1047 *Streptomyces avidinii* и авидина из куриных яиц, основанная на применении аффинной хроматографии, позволяющая многократно использовать биоспецифический сорбент и включающая новые способы характеристики препаратов стрептавидина и авидина – «аффинный» электрофорез и сатурационный анализ с ферментной детекцией, позволяющие быстро и надежно оценить молекулярные параметры, степень чистоты и биотинсвязывающую активность БтСБ.
2. Новое свойство стрептавидина – способность образовывать видимые устойчивые комплексы с полибиотинилированными белками в условиях диффузии в

агаровом геле (эффект биоспецифической преципитации). Этот феномен можно использовать в исследованиях лиганд-белковых взаимодействий с участием стрептавидина, а также для обнаружения и оценки степени модификации биотинилированных белков.

3. Модификация стрептавидином микрочастиц и характеристика их связывающей активности в отношении биотина и биотинилированных тироантигенов и тирогормонов.

4. Способ получения биотинилированных производных тирогормонов, заключающийся в N-ацилировании N-(3-аминопропил)биотинамида N-оксисукцинимидным эфиром соответствующего N-ацетилтиродиронина; характеристика синтезированных Бт-Т<sub>3</sub> и Бт-Т<sub>4</sub>; структура и свойства их комплексов со связывающими белками.

5. Препараты биотинилированных ТПО и ТГ, полученные по оптимизированным способам, отличающиеся стабильностью и проявляющие сродство одновременно к БтСБ и к специфическим антителам, что позволяет использовать их в качестве бифункциональных компонентов в иммунохимических конструкциях, основанных на (стрепт)авидин-биотиновом взаимодействии.

6. Новые конструкции твердофазных тест-систем, основанных на (стрепт)авидин-биотиновом взаимодействии, для количественного определения в сыворотке крови человека аутоантител к ТПО, аутоантител к ТГ, свободного Т<sub>4</sub> и свободного Т<sub>3</sub> методами иммунорадиометрического, иммуноферментного и лантанидного иммунофлуориметрического анализа. Технология изготовления набора реагентов ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ для определения антител к ТПО в сыворотке крови человека методом иммунорадиометрического анализа.

**Личный вклад соискателя.** Исследования по выделению, реакциям на твердой фазе и методам контроля качества стрептавидина и авидина, получению биотинилированных белковых тироантигенов, определению свойств биотинилированных тироидных гормонов и аутоантигенов и моделированию их взаимодействий со связывающими белками, разработке иммуноаналитических систем выполнены автором самостоятельно под научным руководством д.х.н. О.В. Свиридова. На стадиях планирования отдельных этапов работы (синтез биотинилированных гормонов, сбор и функционализирование микрочастиц, разработка технологии изготовления набора ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ) и критического обсуждения полученных результатов соискатель пользовался методической и консультативной помощью к.х.н. В.Д.Матвеевцева, к.х.н. И.И.Вашкевич и н.с. Института физиологии НАН Беларуси О.Н.Дарашкевича.

**Апробация результатов диссертации.** Материалы диссертационной работы были представлены в докладах на I, II и III Международной конференциях «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2004, 2006 и 2008), Международных научных конференциях молодых ученых «Молодежь в науке – 2004 (2005 и 2006)»; Международной научно-практической конференции «Перспективы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества» (Минск-Нарочь, 2005); XVIII Международной научно-практической конференции «Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии» (Минск, 2005); Международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск-Раков, 2006); IV Международной конференции «Углерод: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, технология» (Москва, Ленинские горы, 2005); VI Международной конференции

«Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers» (Krems, Austria, 2006); Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Modern problems of microbiology and biotechnology» (Odesa, Ukraine, 2007); II Международном Форуме «Аналитика и аналитики» (Воронеж, РФ, 2008).

**Опубликованность результатов диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 4 рецензированные статьи в журналах (3,65 авторских листа), 5 статей в сборниках конференций и тезисы 9 докладов. Общий объем опубликованных материалов по теме диссертации составляет 55 страниц.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из оглавления, перечня условных обозначений, введения, общей характеристики работы, 5 глав, заключения, списка цитируемой литературы и 9 приложений. В главе 1 приводится обзор литературных данных по БтСБ и химически модифицированным, в том числе биотинилированным, аутоантигенам (ТПО, ТГ) и гормонам ( $T_3$ ,  $T_4$ ) ЩЖ. В главе 2 представлены экспериментальные методы, глава 3 посвящена разработке метода выделения БтСБ и их твердофазным реакциям, глава 4 – получению биотинилированных тироидных гормонов и аутоантигенов и изучению их специфических свойств, глава 5 – разработке иммунодиагностических тест-систем тироидного профиля. Работа изложена на 141 странице, содержит 33 рисунка и 12 таблиц. Список цитируемой литературы включает 207 ссылок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы (**первая глава**) посвящен БтСБ и химически модифицированным, в том числе биотинилированным, аутоантигенам (ТПО, ТГ) и гормонам ( $T_4$  и  $T_3$ ) щитовидной железы. Рассматриваются методы получения и применение модифицированных тироантигенов и тирогормонов, выделение, физико-химические свойства и активность стрептавидина, а также свойства других многосайтовых БтСБ. Более подробно изложены сведения, объясняющие структурные особенности молекулы стрептавидина, которые обуславливают ее высокое сродство к биотину и биотинилированным объектам.

Во **второй главе** (материалы и методы) дана характеристика исходных реагентов, описаны методы получения и характеристики БтСБ, биотинилированных тироидных аутоантигенов и гормонов, покрытых стрептавидином твердых фаз, варианты использованного иммунохимического анализа. В работе использовались физикохимические методы для идентификации синтезированных веществ (ЯМР-, ИК-, УФ-спектроскопия, масс-спектрометрия, аналитическая тонкослойная хроматография), общебиохимические методы (аффинная хроматография, белковый щелочной электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия в полиакриламидном геле, диффузия в геле по Манчини и Ухтерлони), иммунохимические методы анализа с ферментным, изотопным и флуоресцентным с разрешением во времени способами детекции, флуоресценные измерения, компьютерное моделирование.

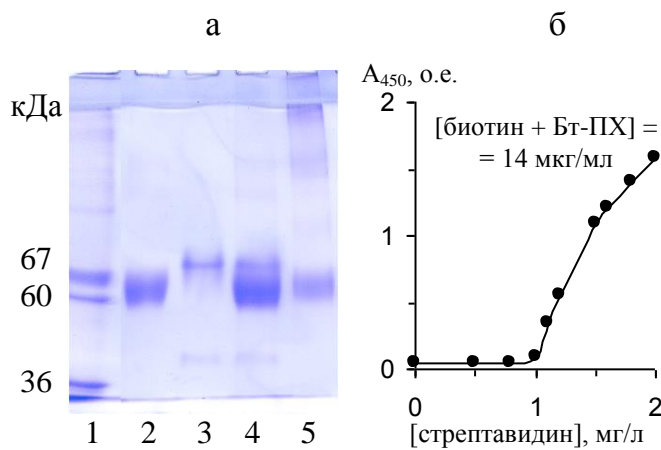
В **третьей главе** описаны разработанная технология получения БтСБ, включающая новые способы контроля, эффект преципитации комплексов стрептавидина с биотинилированными белками, а также получение и характеристики микрочастиц, покрытых стрептавидином.

Очистка и методы контроля качества препаратов БтСБ. Источники стрептавидина – культуральные жидкости *S. avidinii* ВКМ Ас 1047 – содержат посторонние окрашенные вещества, поэтому пропускание неподготовленного стартового материала через аффинный сорбент (иминобиотин-сефарозу) сильно

снижает срок службы дорогостоящего сорбента и не обеспечивает требуемого количества и надлежащего качества элюированного стрептавида. Поэтому была предложена предварительная обработка стартового материала, направленная на унификацию его химического состава, которая включала сульфат-аммонийное фракционирование (70 % насыщ.), диализ, подщелачивание белкового раствора (до pH 11,2), осаждение нерастворимых компонентов низкоскоростным центрифугированием (1500 g) и пропускание супернатанта через амино-Сефарозу (ключевая стадия предварительной подготовки). Далее проводили биоспецифическую хроматографию на иминобиотин-сефарозе, удаляя неспецифически связавшиеся ингредиенты буферным раствором (pH 7,4) с высокой концентрацией соли (0,5 M NaCl) и элюируя стрептавидин раствором с pH 4,0. Элюат нейтрализовали, обессоливали ультрафильтрацией и лиофилизовали. Выход целевого продукта превышает 90 %.

Вышеописанная схема хроматографической очистки была также использована для выделения авидина из подвергнутой диализу сульфат-аммонийной фракции гомогената белка куриных яиц. Поскольку химический состав белка яиц гораздо более постоянный, чем культуральные жидкости *S. avidinii*, перечисленных стадий очистки оказалось достаточно для получения очищенного авидина с выходом не менее 90 %. По данным электрофореза в 12,5 % ПААГ в присутствии ДДС-На степень чистоты полученных БтСБ составляет не менее 95 %.

С целью быстрой и надежной проверки качества препаратов предложены новые методики – аффинный электрофорез и сатурационный анализ с ферментной детекцией, позволяющие оценить молекулярные параметры, степень чистоты и биологическую активность каждой партии выделенных БтСБ.



а – «аффинный» электрофорез (7,5 % ПААГ с ДДС-На):  
1 – стандарты молек. масс; 2 – Бт-ТК; 3 – стрептавидин;  
4 – стрептавидин + ТК; 5 – стрептавидин + Бт-ТК.  
б – сатурационный анализ на примере стрептавида

**Рисунок 1 — Методы контроля качества препаратов БтСБ**

Аффинный электрофорез основан на сравнении электрофореграмм препаратов БтСБ до контакта с биотинилированным белком транскортином (ТК) и после. Получаемая картина (рисунок 1а) одновременно характеризует биотинсвязывающую способность и чистоту препаратов БтСБ. При инкубировании очищенного стрептавида с немодифицированным белком, высокомолекулярные комплексы не образуются (рисунок 1а, дорожка 4), в то время как Бт-ТК образует такие комплексы (рисунок 1а, дорожка 5). Отсутствие одинаковых полос в дорожках 3 и 5 указывает на то, что

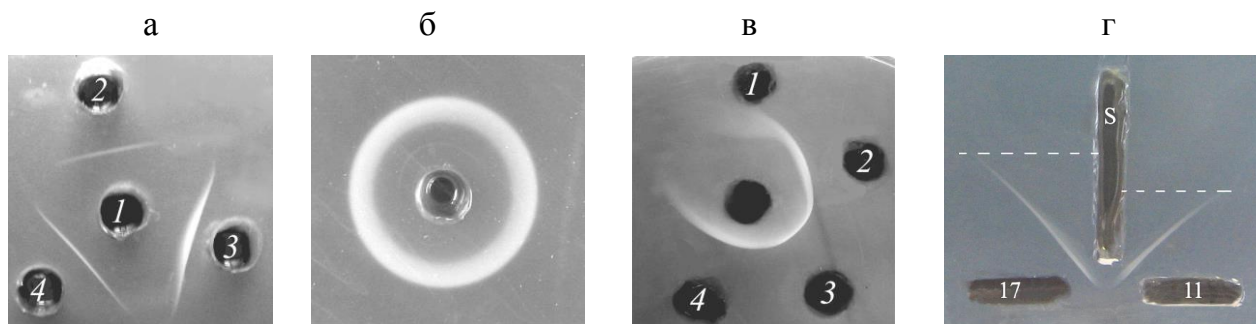
все белковые компоненты препарата обладают биотинсвязывающей способностью.

Принцип предлагаемого сатурационного анализа с ферментной детекцией состоит в насыщении исследуемого БтСБ, взятого в возрастающих количествах, фиксированным количеством биотина (свободного и меченного ПХ) и последующей колориметрической детекции БтСБ, способного связаться с Бт-ПХ в растворе, а затем

с Бт-БСА на твердой фазе. На соответствующем графике точка перегиба кривой титрования соответствует минимальной концентрации БтСБ, способной связать весь биотин (14 и 12 мкг/мл для стрептавидина и авидина, соответственно). Для коммерческих и полученного препаратов стрептавидина концентрация равна 1 мг/л (рисунок 1б), что соответствует активности 14 U (1 U = 1 мкг биотина на 1 мг БтСБ).

На основе разработанных способов выделения и контроля качества препаратов БтСБ составлены Лабтехрегламенты № 8/2005-ЛТР на получение аффинно очищенного стрептавидина и № 14/2006-ЛТР на получение авидина.

Преципитация комплексов стрептавидина с биотинилированными белками в агаровом геле. Обнаружение данного эффекта явилось результатом проведенного нами изучения взаимодействия между стрептавидином и биотинилированными белками в слое агарового геля по аналогии с радиальной иммунодиффузией – простой (по Манчини) и двойной (по Ухтерлони). Удалось получить полосы преципитации (рисунок 2а и 2б) между стрептавидином и различными по природе и молекулярной массе биотинилированными белками: ТСГ (гликопротеин, 55 кДа), БСА (негликозилированный белок, 67 кДа), иммуноглобулин класса G (многодоменный белок, 150 кДа), а также с Бт-ТПО (100 кДа), Бт-ТГ (660 кДа) и конъюгатом ПХ с Бт-БСА. Стрептавидин, предварительно денатурированный кипячением, не давал линий преципитации, что подтверждает специфическую природу взаимодействий.



а – двойная радиальная диффузия: 1 – стрептавидин (8 мкМ), 2 – Бт-ТСГ (8 мкМ), 3 – Бт-Ig G (8 мкМ), 4 – Бт-БСА (4 мкМ). б – простая радиальная диффузия: в массе геля – стрептавидин (8 мкМ), в лунке – Бт-БСА (200 мкМ). в – двойная радиальная диффузия: зависимость от исходной концентрации Бт-БСА: 1 – 0,3, 2 – 0,9, 3 – 1,8, 4 – 4,5 мкМ, лунка в центре – стрептавидин (0,8 мкМ). г – двойная радиальная диффузия: зависимость от степени биотинилирования БСА, моль/моль (17/1 и 11/1), S – стрептавидин.

**Рисунок 2 – Преципитация стрептавидина с конъюгатами биотин-белок (1,5 % агар)**

На примере Бт-БСА было показано, что положение и форма полосы преципитации зависят от соотношения исходных концентраций биотинилированного белка и стрептавидина (рисунок 2в). При оптимальных соотношениях линия располагается посередине между лунками, при мольном избытке конъюгата биотин-БСА полоса преципитации сдвигается к лунке со стрептавидином, при избытке стрептавидина наблюдается смещение полосы к лунке с биотинилированным белком. Кроме того, положение линии преципитации зависит от степени биотинилирования белка (рисунок 2г).

Свободный биотин, 1 % ДДС-На и 6 М мочевины, присутствовавшие в геле, а также тепловая денатурация стрептавидина ингибировали процесс образования преципитата, в то время как высокие концентрации (1 М) маннозы, глюкозы, фукозы, галактозы, сахарозы и NaCl не оказывали на него влияния.

Предложена модель взаимодействия стрептавидина и биотинилированных макромолекул, объясняющая наблюдаемый эффект, за основу которой принята теория, описывающая взаимодействия между антителами и антигенами. В результате



анализа модели были сделаны следующие заключения. Ввиду наличия градиента концентраций белковых компонентов, образование биоспецифического преципитата возможно только в строго ограниченной области агарового геля, где имеется благоприятный для образования преципитата диапазон соотношений концентраций компонентов. Этот диапазон, в свою очередь, зависит от степени биотинилирования молекул.

Микрочастицы, функционализированные стрептавидином. Диспергированные наноструктурированные твердофазные носители с иммобилизованными биомолекулами являются базовыми компонентами биохимических технологий, систем и процессов, основанных на связывании по сродству, таких как иммуноанализ, аффинная хроматография и лиганд-белковые взаимодействия. Тип и свойства твердофазного носителя во многом определяют назначение и область применения полученного на его основе сорбента. Нами описаны подходы и определены характеристики покрытых стрептавидином микрочастиц для связывания биотинилированных молекул (таблица 1).

Таблица 1 — Физико-химические и функциональные характеристики микрочастиц, покрытых стрептавидином

Свойства частиц	МПС	УНМ		МЧ			ФЛЧ	
		Sn-Pd-Ni-Au	Au	Sn-Au	МФА+ ПВП-А	МФА+ инулин	декстран	МФА+ ПВП-А
Структура поверхности	Sn-Pd-Ni-Au	Au	Sn-Au	МФА+ ПВП-А	МФА+ инулин	декстран	МФА+ ПВП-А	МФА
Биотинсвязывающая емкость, пмоль/мкл	<0,1	800	500	1-2	10-20	500	100-200	<0,1
Форма и размер	сферы Ø50 мкм, поры Ø0,05 мкм	нанотрубки нановолокна L=1-10мкм Ø0,02-0,1 мкм		сферы Ø3-5 мкм			сферы Ø0,3-0,5 мкм	
Однородность, %	>80	неоднородны		>80			>80	
Устойчивость 10 %-ной суспензии	неустойчивы	более 10 мин		менее 5 мин			более 10 мин	
Намагниченность	–	+ (слабая)		++			–	
Седиментация	при стоянии	5000g		при стоянии			3000g	
Флуоресценция	–	–		–			+	

Примечание – МПС – макропористое стекло, УНМ – углеродный наноматериал, МЧ – магнитные частицы, ФЛЧ – флуоресцентные латексные частицы, МФА – меламинформальдегид, ПВП-А – поливинилпирроледон-акролеин.

Для последующей иммобилизации стрептавидина химически инертные поверхности УНМ и МПС предварительно покрывались коллоидным золотом, а монодисперсные МЧ и ФЛЧ – оболочкой из сополимеров МФА и ПВП-А или инулина. С целью получения активных альдегидных групп микроносители с ПВП-А обрабатывали соляной кислотой для снятия ацетальной защиты, а с инулином, декстраном и МФА – окисляли перйодатом натрия. Стрептавидин (в расчете 3 мг белка на 0,1 мл уплотненного сорбента) адсорбировали на активированных наносорбентах из слабощелочных растворов (рН 8,3).

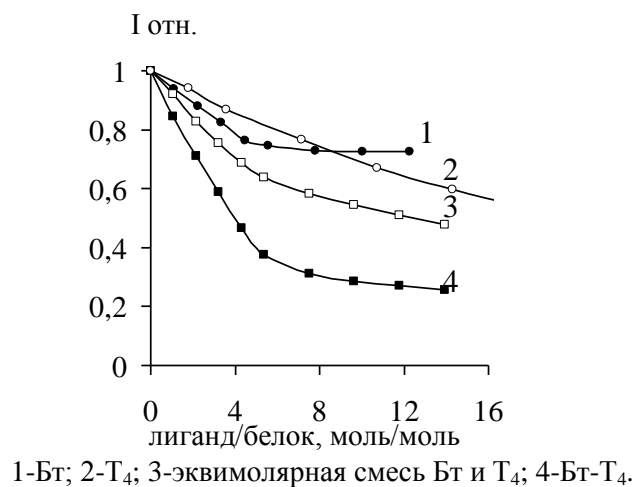
Показано, что УНМ, обладая уникальными физико-химическими свойствами, эффективно модифицируется стрептавидином, что делает весьма перспективным его применение в современных технологиях иммуноанализа. ФЛЧ, МПС и МЧ, присоединяют стрептавидин с меньшей эффективностью. Вместе с тем приемлемые седиментационные характеристики или намагниченность позволяют использовать эти частицы после модификации биомолекулами в качестве аффинных сорбентов для выделения и очистки разнообразных объектов из сложных по составу биологических смесей. Так, покрытые стрептавидином ФЛЧ были использованы в лаборатории иммунохимии Института иммунологии МЗ РФ для получения аффинного сорбента с биотинилированными моноклональными антителами для выделения поверхностных антигенов лимфоцитов человека. На примере иммобилизованных тироантигенов показана возможность использования покрытых стрептавидином УНМ, ФЛЧ и МЧ для разработки иммуноаналитических систем.

**Четвертая глава** посвящена получению биотинилированных тироидных гормонов и аутоантигенов и изучению их специфических свойств.

Синтез, физико-химические и связывающие свойства биотинилированных тироксина и трийодтиронина. Путем N-ацилирования N-(3-аминопропил)-биотинамида N-гидроксисукцинимидным эфиром N-ацетилтироксина или N-ацетилтрийодтиронина получены конъюгаты, содержащие остатки Бт и T<sub>4</sub> или T<sub>3</sub>.

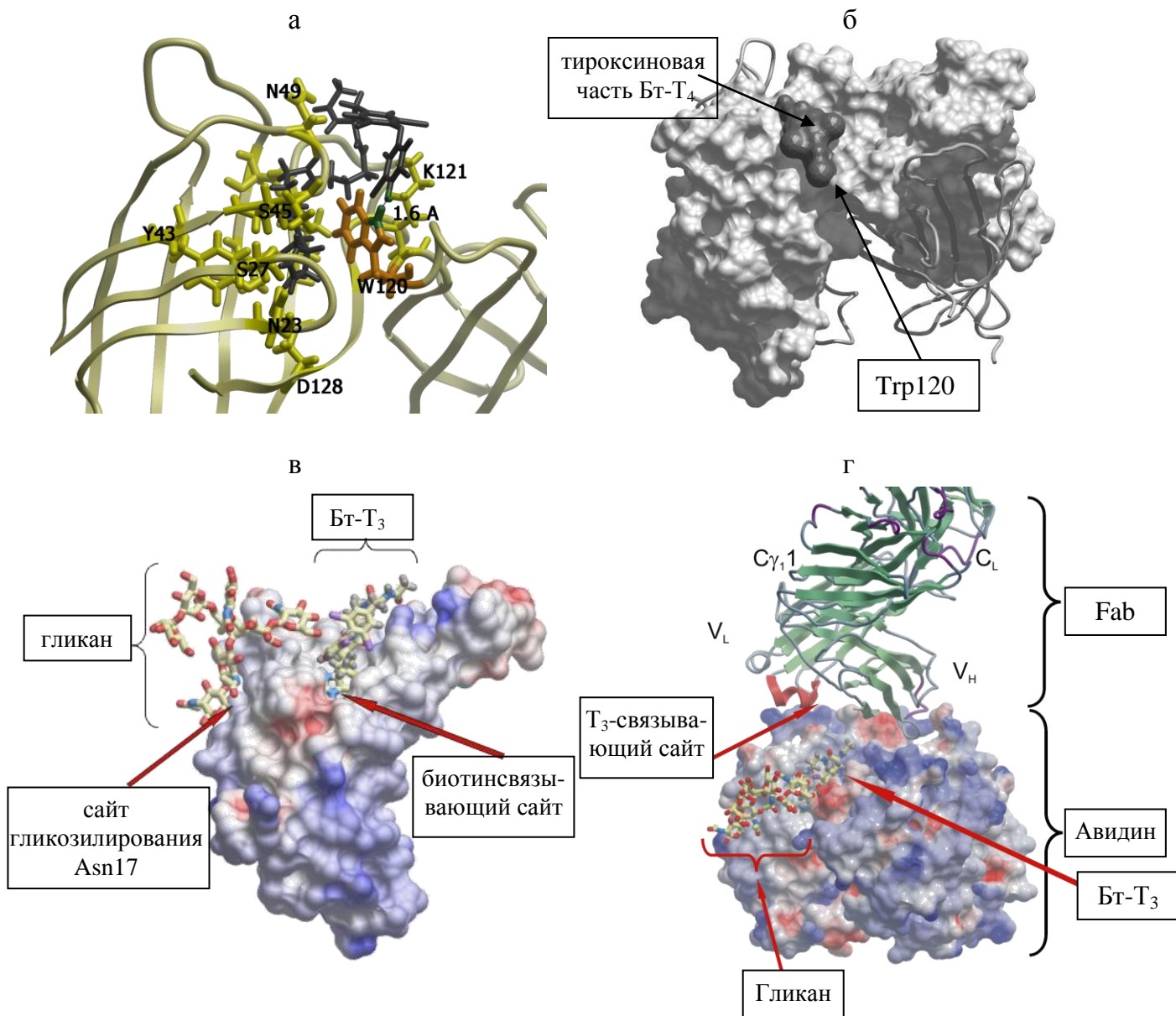
Предварительное ацетилирование T<sub>4</sub> ацетоксисукцинимидом требуется для получения растворимой в этих условиях формы гормона за счет предотвращения образования цвиттериона и побочных реакций на последующих стадиях. Синтезированные Бт-T<sub>3</sub> и Бт-T<sub>4</sub> представляют собой порошкообразные кристаллические вещества кремового цвета, плохо растворимые в воде, гексане, бензоле, ацетоне и ацетонитриле, слаборастворимые в хлороформе и метаноле и хорошо растворимые в этилацетате и диметилсульфоксиде. Разлагаются, не достигая температуры плавления. Данные ЯМР-, ИК-, масс- и УФ-спектров подтвердили структуры синтезированных конъюгатов.

Методами электронной спектроскопии, иммуноанализа и компьютерного моделирования изучены взаимодействия конъюгатов Бт-T<sub>4</sub> и Бт-T<sub>3</sub> с одним или одновременно с двумя связывающими белками, проявляющими сродство к Бт или T<sub>4</sub>. Бт-T<sub>4</sub> специфически взаимодействовал с Бт-связывающим сайтом молекулы стрептавидина за счет большого числа водородных связей и гидрофобных взаимодействий. В результате комплексообразования сдвигается в длинноволновую область максимум и снижается интенсивность собственной флуоресценции стрептавидина, причем степень тушения эмиссии белка была существенно выше, чем в случае комплекса стрептавидин-Бт (рисунок 3). Дополнительное тушение флуоресценции вызывалось чувствительными к рН, ионной силе и детергентам взаимодействиями, стабилизирующими положение тироксиновой части конъюгата вблизи Trp120 стрептавидина в его комплексе с Бт-T<sub>4</sub> (рисунок 4а и 4б).



**Рисунок 3 — Флуориметрическое титрование стрептавидина лигандами**

Конъюгат Бт-Т<sub>4</sub> образовывал также специфический эквимольный комплекс с ТСГ по тому же механизму, что и Т<sub>4</sub>, причем остаток Бт не участвовал во взаимодействиях, изменяющих характеристики флуорофоров ТСГ. Таким образом, на примере Бт-Т<sub>4</sub> показано, что биотиновый и йодтирониновый фрагменты конъюгатов являются функционально независимыми.



**а и б.** Возможный вариант расположения связанного со стрептавидином конъюгата Бт-Т<sub>4</sub>, при котором биотиновый фрагмент погружен внутрь мономера, а тироксиновая часть располагается на поверхности белковой молекулы, находясь в непосредственной близости от Trp120. **в.** Возможный вариант расположения гликана авидина, при котором он находится в непосредственной близости от тиронинового остатка Бт-Т<sub>3</sub>. Показан только один мономер авидина. **г.** Относительная доступность тиронинового остатка Бт-Т<sub>3</sub> для Fab-фрагмента IgG, ориентированного по направлению к нему своим паратопом.

**Рисунок 4 – Компьютерное моделирование взаимодействий конъюгатов Бт-Т<sub>4</sub> со стрептавидином (а, б) и Бт-Т<sub>3</sub> с авидином (в, г)**

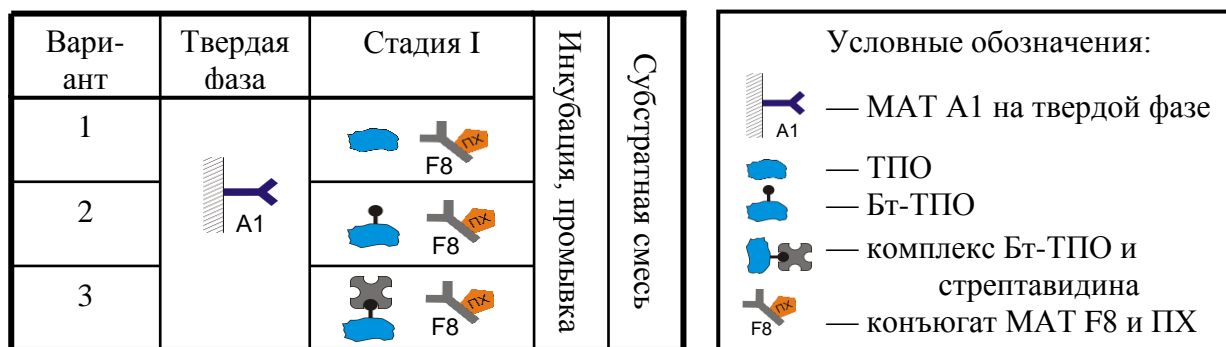
На примере Бт-Т<sub>3</sub> изучено взаимодействие конъюгатов с авидином. Показана возможность взаимодействий тирониновой части связанного Бт-Т<sub>3</sub> с углеводным компонентом и полипептидной поверхностью авидина (рисунок 4в и 4г), существенно

снижающие пространственную доступность тиронинового остатка антителам. В то же время первоначально образовавшийся комплекс между Бт-Т<sub>3</sub> и анти-Т<sub>3</sub> может затем взаимодействовать с биотинсвязывающим сайтом без существенных стерических затруднений.

Модификация биотином ТПО и ТГ и исследование комплексообразования Бт-ТПО. Оптимизирован основанный на иммуноаффинной хроматографии способ получения препарата Бт-ТПО, отличающийся использованием обязательного комплекса стадий – ограниченного трипсинализа микросомально-митохондриальной фракции, диализа аффинноочищенной ТПО против буфера с КI, хроматографического удаления примесей, проявляющих сродство к белку А, и последующего биотинилирования белка 10-кратным мольным избытком N-оксисукцинимидного эфира биотинамидокапроновой кислоты. Разработанный технологический процесс вошел в Лабтехрегламент № 6/2007-ЛТР. Биотинилирование ТГ осуществляли за полипептидную или углеводную части без предварительной подготовки препарата, очищенного ионообменной хроматографией.

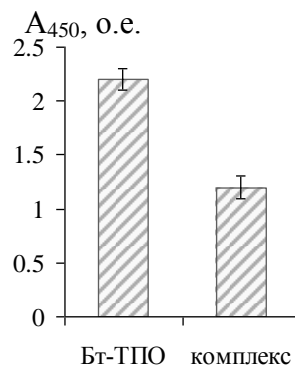
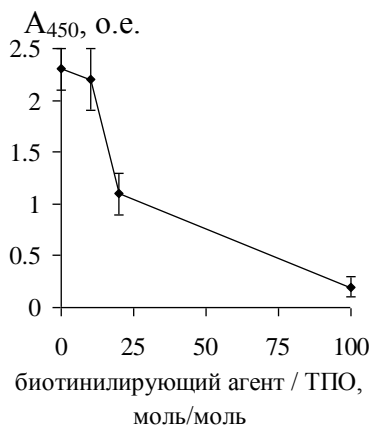
Избыточное биотинилирование, являясь модификацией структуры белковой молекулы, может негативно влиять на способность Бт-ТПО связываться с антителами, выработанными к интактной ТПО. Поэтому мы изучили влияние степени биотинилирования на способность Бт-ТПО и комплекса Бт-ТПО/стрептавидин связывать МАТ к ТПО в системе (рисунок 5а) с участием синергетической пары МАТ А1 и F8, специфичных к пространственно изолированным конформационным эпитопам антигена, один из которых локализован в иммунодоминантной области. Из рисунка 5б видно, что первый перегиб кривой происходит в точке, соответствующей

а



б

в



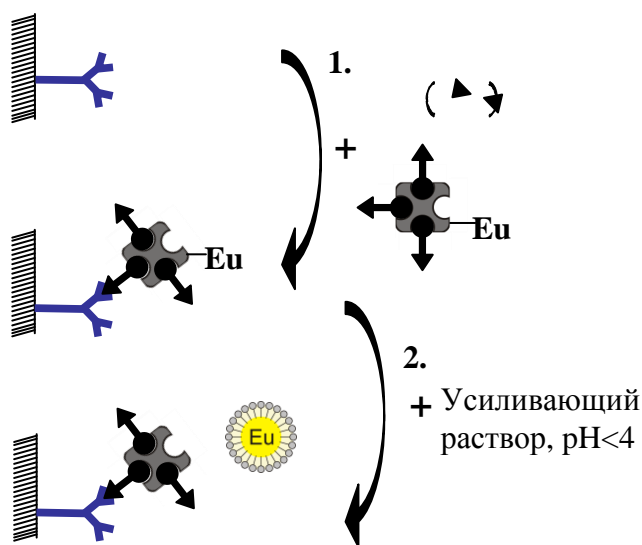
**Рисунок 5 – Связывание парой МАТ препаратов Бт-ТПО с различной степенью биотинилирования (б), а также Бт-ТПО (биотинилирующий реагент/белок=10/1) и ее эквимольного комплекса со стрептавидином (в); а – схема эксперимента.**

примерно 10-кратному мольному избытку биотинилирующего агента. Вероятно, добавление дополнительного мольного избытка биотинилирующего реагента критически увеличивает вероятность модификации остатков лизинов, входящих в иммунодоминантный регион, например, K713, тем самым существенно снижая сродство к МАТ. Комплекс Бт-ТПО/стрептавидин в силу стерических препятствий менее активно взаимодействует с парой антител по сравнению со свободной Бт-ТПО (рисунок 5в).

Полученные Бт-ТПО и Бт-ТГ пригодны для использования в современных иммунохимических тест-системах, принцип действия которых основан на связывании остатка биотина с иммобилизованным стрептавидином, а белковой части с соответствующим аутоантителом.

**Пятая глава** посвящена разработке четырех иммунодиагностических тест-систем тироидного профиля.

Лантанидный иммунофлуориметрический анализ (ЛИФМА) свободного тироксина. В разработанной конструкции твердая фаза содержит моноклональное



**Рисунок 6 — Схема лантанидного иммунофлуориметрического анализа свободного Т<sub>4</sub>**

антитело к Т<sub>4</sub>, а жидкая – включает комплекс Бт-Т<sub>4</sub> со стрептавидином, меченым хелатом европия, и Т<sub>4</sub> (свободный и связанный) в равновесии с эндогенными связывающими белками анализируемой пробы сыворотки крови человека (рисунок б). В ходе анализа меченый стрептавидин / Бт-Т<sub>4</sub> за счет своей тироксиновой функции конкурирует со свободным Т<sub>4</sub> за связывание с твердофазным антителом. В результате количество связанного комплекса, а значит и флуоресцентный сигнал лантанида, находятся в обратной зависимости от концентрации свободного Т<sub>4</sub> в пробе.

На характеристики калибровочной кривой заметно влияет

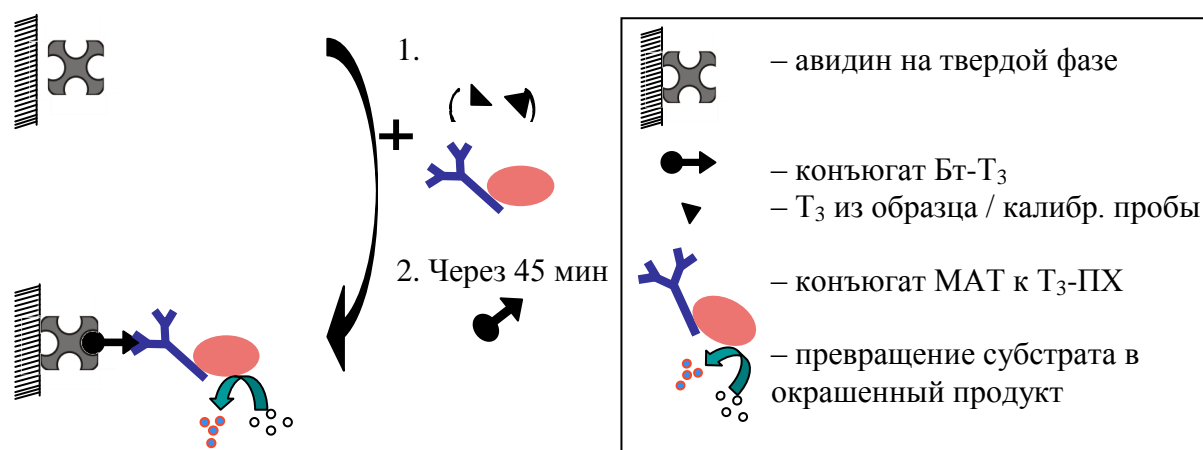
соотношение Бт-Т<sub>4</sub> и стрептавидина в предварительно подготовленном меченом комплексе. Типичный калибровочный график ЛИФМА в начале имеет вогнутую форму, обеспечивая повышенную чувствительность при низких концентрациях свободного Т<sub>4</sub>, и приобретает прямолинейность в диапазоне концентраций 15–70 пмоль/л свободного гормона. При этом сыворотки крови с известным содержанием свободного Т<sub>4</sub> открываются в предписанных диапазонах концентраций.

Описанные технические характеристики тест-системы ЛИФМА позволяют взять ее за основу при конструировании наборов реагентов для определения свободного, а также общего Т<sub>4</sub> в сыворотке крови человека методом ЛИФМА для медицинской диагностики. В частности ЛИФМА с использованием дорогостоящих импортных наборов, традиционно используется в нашей стране для скрининговой программы по раннему выявлению гипотироза у новорожденных.

Иммуноферментная тест-система для определения свободного трийодтиронина в сыворотке крови человека. По результатам компьютерного моделирования иммунохимическая реакция предварительно образованного твердофазного комплекса

$T_3$ -Бт/авидин с анти- $T_3$  стерически затруднена, в то время, как специфическое взаимодействие предварительно сформированного растворимого комплекса Бт- $T_3$ /анти- $T_3$  с твердофазным авидином должно происходить без особых препятствий.

Поэтому для иммуноферментной тест-системы по определению свободного  $T_3$  в сыворотке крови человека была изучена конкурентная конструкция, включающая твердую фазу, покрытую БтСБ, и вносимые в ходе анализа Бт- $T_3$ , исследуемую пробу  $T_3$  и меченные ПХ моноклональные антитела к  $T_3$  (МАТ к  $T_3$  – ПХ). После смешивания всех компонентов, инкубации и промывки лунок планшета измеряется ферментативная активность ПХ, иммобилизованной в составе тройного твердофазного комплекса авидин/Бт- $T_3$ /МАТ к  $T_3$  – ПХ. Характеризуя реакции, параллельно протекающие в описанной системе, следует отметить, что константа ассоциации авидина с Бт- $T_3$  на несколько порядков выше соответствующих констант связывания МАТ к  $T_3$  – ПХ с  $T_3$  и МАТ к  $T_3$  – ПХ с Бт- $T_3$ . Поэтому истинной (равновесной) конкуренции между Бт- $T_3$  и  $T_3$  за связывание с МАТ к  $T_3$  в лунках, покрытых авидином, не происходит. Конъюгат Бт- $T_3$ , несмотря на присутствие  $T_3$  в жидкой фазе, быстро выводит МАТ к  $T_3$  – ПХ из раствора за счет комплексообразования с меченым антителом и его биоспецифической иммобилизации через остаток Бт на твердофазном БтСБ. То есть в такой системе конкурентный потенциал определяемого  $T_3$  недостаточно высок.



**Рисунок 7 – Схема неконкурентного иммуноферментного анализа свободного  $T_3$  в сыворотке крови человека**

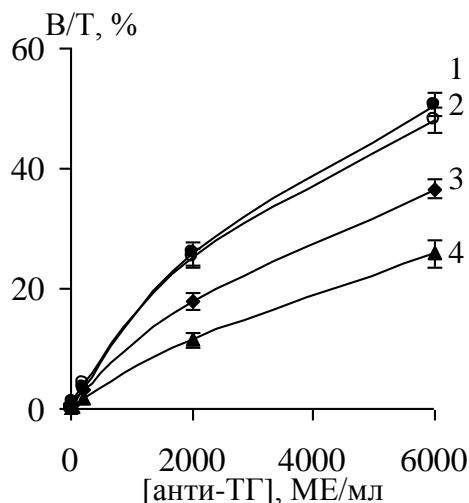
В связи с этим, была предложена модификация рассматриваемой конструкции, в которой на первой стадии происходит взаимодействие анализируемого  $T_3$  с МАТ к  $T_3$  – ПХ, а уже потом в реакционную среду вводится Бт- $T_3$ , который взаимодействует с оставшимися незанятыми паратопами МАТ к  $T_3$  – ПХ (рисунок 7). По сути, такая модифицированная система является неконкурентной, и ее преимущества выявлены в эксперименте. Калибровочная кривая в такой системе имеет приемлемый наклон и высокое максимальное значение исходного сигнала, который падает на 80% в последней точке калибровочного диапазона. Значения концентраций свободного  $T_3$ , определенные в контрольных сыворотках (Bio-Rad Lab.) с различным содержанием свободной формы этого гормона, попадают в предписанные интервалы.

Кроме того, иммуноанализ с отложенным во времени внесением Бт- $T_3$  был успешно опробован в радиометрическом варианте, в котором использовали



[<sup>125</sup>I]МАТ к Т<sub>3</sub>. Этот результат можно рассматривать как существенный научный задел разработки набора реагентов для ИРМА свободного Т<sub>3</sub>.

Иммуннорádiометрический анализ аутоантител к тироглобулину. В случае ТГ также выявлены существенные преимущества использования биоспецифической иммобилизации белкового тироантигена над пассивной адсорбцией для тест-системы по определению анти-ТГ.



1 – ТГ, модифицированный биотином по гликану, биоспецифически иммобилизован через Бт-БСА и стрептавидин; 2 – ТГ, модифицированный по полипептидной части, биоспецифически иммобилизован через Бт-БСА и стрептавидин; 3 — ТГ, модифицированный по полипептидной части, биоспецифически иммобилизован через авидин; 4 – прямая (физическая) адсорбция ТГ.

**Рисунок 8 – Связывание анти-ТГ с твердой фазой в зависимости от способа иммобилизации на ней ТГ**

Иммобилизация ТГ на пластике, покрытом стрептавидином, через полипептидный или углеводный компоненты не влияет на связывание анти-ТГ и последующее их выявление [<sup>125</sup>I]белком А (рисунок 8). Это, вероятно, объясняется тем, что ни остатки лизинов, которые подвергаются биотинилированию, ни олигосахариды, окисляемые NaIO<sub>4</sub>, не участвуют в сколь-либо существенной степени в формировании на ТГ эпитопов анти-ТГ. Все полученные калибровочные кривые имеют характер близкий к линейному в диапазоне концентраций анти-ТГ от 0 до 6000 МЕ/мл. Однако, удовлетворительным значением максимального связывания (45-50 %) характеризуется только система, основанная на биоспецифической иммобилизации Бт-ТГ через стрептавидин. При этом контрольные сыворотки крови открываются в предписанных диапазонах концентраций.

Тест-система и набор реагентов для определения антител к тиропероксидазе в сыворотке крови человека методом иммунорádiометрического анализа (набор реагентов ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ). В наших экспериментах показано, что иммобилизация трипсинизированной или полноразмерной ТПО посредством биоспецифического связывания на полистирольных пробирках, предварительно покрытых стрептавидином (способ 1), имеет существенные преимущества перед пассивной адсорбцией ТПО (способ 2). При уменьшенных количественных затратах (в 2-4 раза) антигена улучшаются технико-аналитические характеристики получаемых носителей, определяющие максимальное связывание с выявляющим реагентом – радиоактивно меченым белком А (способ 1 – 70-85 %, способ 2 – 20-50 %). При этом существенно увеличивается верхний предел диапазона измеряемых концентраций анти-ТПО (способ 1 – 1800-2200 МЕ/мл, способ 2 – 700-1100 МЕ/мл).

Поэтому были исследованы несколько вариантов конструкций тест-системы с использованием биоспецифической иммобилизации Бт-ТПО. Найдено, что по ряду аналитических, экономических и технологических показателей, конструкция, в которой связывание Бт-ТПО с иммобилизованным БтСБ происходит в ходе анализа, является наиболее удачной. Зависимость связывания выявляющего компонента ([<sup>125</sup>I]белок А), вносимого на второй стадии анализа, от концентрации определяемых

иммуноглобулинов в пробах близка к линейной, при этом последняя точка калибровочной кривой имеет достаточно высокое значение. Данная конструкция позволила разработать технологию изготовления набора реагентов ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ, успешно прошедшего стадии опытного образца, медицинских испытаний, государственной регистрации, и в настоящее время серийно выпускаемого УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Выбор и применение для конструирования тест-систем некоторых универсальных стандартизированных компонентов для комплектации других радиоиммунных наборов, изготавливаемых на этом предприятии, существенно облегчили и ускорили производственное освоение созданного диагностического набора.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Создана технология получения препаратов стрептавидина из культуральной жидкости штамма ВКМ Ас 1047 *Streptomyces avidinii* и авидина из белка куриных яиц. Технология основана на аффинной хроматографии, характеризуется малыми трудозатратами и быстротой выполнения, позволяет многократно использовать биоспецифический сорбент. Технология включает два новых способа контроля качества препаратов БтСБ: аффинный электрофорез, позволяющий одновременно оценить молекулярные характеристики, чистоту препаратов и способность связывать макромолекулы, содержащие остатки биотина, и сатурационный анализ с ферментной детекцией, который определяет связывающую активность целевого белка в отношении биотина [2, 3, 5, 7].

2. Обнаружен эффект преципитации комплексов стрептавидина с биотинилированными белками в условиях простой и двойной радиальной диффузии в слое агарового геля. Показано, что положение и вид полосы преципитации зависят, главным образом, от начальных концентраций реагирующих компонентов и степени биотинилирования белков. Предложена модель взаимодействий стрептавидина и биотинилированных макромолекул, объясняющая наблюдаемый эффект, и указаны потенциальные сферы его практического применения [9, 17].

3. Получены и охарактеризованы экспериментальные образцы покрытых стрептавидином микрочастиц (МПС, УНМ, МЧ, ФЛЧ), которые способны с высокой эффективностью связывать биотин и биотинилированные молекулы. На примере биоспецифически иммобилизованных тироантигенов показана возможность использования сорбентов для разработки иммуноаналитических систем медико-диагностического назначения [1, 8, 13, 14, 15].

4. Разработан способ получения биотинилированных производных тирогормонов, включающий N-ацилирование N-(3-аминопропил) биотинамида N-оксисукцинимидным эфиром N-ацетилйодтиронинов. Методами спектроскопии, иммуноанализа и компьютерного моделирования охарактеризовано взаимодействие конъюгатов Бт-Т<sub>4</sub> и Бт-Т<sub>3</sub> со стрептавидином, авидином, ТСГ, моно- и поликлональными антителами. Биотиновый и йодтирониновый фрагменты конъюгатов являются функционально независимыми, что позволяет применить синтезированные конъюгаты при разработке иммуноферментных, иммунорадиометрических и иммунофлуориметрических тест-систем для анализа свободных Т<sub>3</sub> и Т<sub>4</sub> в сыворотке крови человека [4, 10, 11, 18, 19].



5. Получены стабильные препараты Бт-ТПО и Бт-ТГ, проявляющие сродство одновременно к БтСБ и к специфическим антителам, что позволяет использовать их в качестве бифункциональных компонентов в иммунохимических конструкциях, основанных на (стрепт)авидин-биотиновом взаимодействии. Оптимизирован способ получения препарата Бт-ТПО, отличающийся использованием обязательного комплекса стадий – ограниченного трипсинолиза микросомально-митохондриальной фракции, диализа аффинноочищенной ТПО, отрицательной аффинной хроматографии на белок А – сефарозе и последующего биотинилирования ТПО N-оксисукцинимидным эфиром биотинамидокапроновой кислоты в мольном соотношении реагент : белок = 10 : 1. Биотинилирование углеводной или полипептидной части ТГ не влияет на способность полученных продуктов, иммобилизованных на твердофазном стрептавидине, связываться с аутоантителами. Показано, что иммобилизация Бт-ТПО и Бт-ТГ через стрептавидин на полистирольные пробирки имеет существенные преимущества перед их физической адсорбцией на поверхности формованного пластмассового носителя [6, 7, 12].

6. Разработаны четыре новые тест-системы, предназначенные для количественного определения в сыворотке крови человека свободного  $T_4$  методом лантанидного иммунофлуорометрического анализа, свободного  $T_3$  методом иммуноферментного анализа, аутоантител к ТПО и аутоантител к ТГ методом иммунорадиометрического анализа. На основе разработанной конструкции системы для иммунорадиометрического анализа аутоантител к ТПО, включающей пробирки, покрытые БтСБ, и Бт-ТПО в растворе, создана технология изготовления диагностического набора ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ, который успешно прошел медицинские испытания, получил государственную регистрацию и в настоящее время выпускается УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» [20].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Полученные результаты могут использоваться в лабораторной и производственной практике.

- Разработанные базовые конструкции четырех иммунодиагностических тест-систем тироидного профиля, использующие традиционные формованные изделия (полистирольные микропланшеты и пробирки) могут быть применены на предприятиях, специализирующихся на выпуске иммунодиагностической продукции. Технология производства набора реагентов ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ для определения анти-ТПО в сыворотке крови человека методом радиометрического анализа (Лабораторный технологический регламент № 6/2007-ЛТР) с апреля 2008 г. внедрена на УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

- Новые технологии получения (выделения и контроля качества) стрептавидина и авидина (Лабтехрегламенты № 8/2005-ЛТР и № 14/2006-ЛТР) могут быть использованы предприятиями, выпускающими высокоочищенные белковые препараты.

- Новые сведения об особенностях биотинилирования низкомолекулярных соединений, их химических и лигандных свойствах, а также функционализированные стрептавидином монолитные или диспергированные носители могут оказаться полезными в лабораториях, использующих в исследованиях комплексы (стрепт)авидина с биотинилированными объектами.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в научных журналах:*

1. Новаковский, М.Е. Использование микрочастиц, содержащих стрептавидин, для иммобилизации биотинилированных белков и гормонов / М.Е.Новаковский // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2005. – № 5. – С. 85-88.
2. Новый нехроматографический метод выделения стрептавидаина из культуральной жидкости *Streptomyces avidinii*: сравнение с аффинной хроматографией на иминобиотин-сефарозе / М.Е.Новаковский, А.П.Дрожденюк, Т.В.Эпштейн, Л.В.Дубовская, С.В.Халимончик, Н.А.Фильченков, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Биотехнология.– 2006. – № 1. – С. 68-75.
3. Усовершенствования в методах выделения аффинной хроматографией и контроля качества стрептавидаина / М.Е.Новаковский, Т.В.Эпштейн, Л.В.Дубовская, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2006. – № 4. – С. 94-98.
4. Новаковский, М.Е. Синтез и биоспецифические свойства конъюгата биотин-тироксин / М.Е. Новаковский, В.Д. Матвеевцев, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов // Доклады НАН Беларусі. – 2008. – Т. 52, № 3. – С. 66-71.

### *Статьи в сборниках материалов научных конференций:*

5. Новаковский, М.Е. Аффинная хроматография культуральной жидкости *Streptomyces avidinii* на иминобиотин-сефарозе и биохимические характеристики выделенного стрептавидаина / М.Е. Новаковский // Сборник трудов молодых ученых НАН Беларусі: сб. науч. ст.: в 2 ч. – Минск: ИП Логвинов, 2004.— Т.2.— С. 50—54.
6. Биотехнологические аспекты иммобилизации тироантигенов для иммуноанализа / М.Е.Новаковский, С.В.Халимончик, И.В.Матвеевцева, Е.С.Луневич, В.И.Василевский, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск-Нарочь, 25-28 мая 2005 г. / Бел. госуд. ун-т; под ред. А.Н.Евтушенкова. – Минск, 2005. — С. 157-158.
7. Определение биотинсвязывающей емкости твердофазных носителей, функционализированных стрептавидином / Л.В.Дубовская, М.Е.Новаковский, Т.В.Эпштейн, Е.С.Пышко, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран Содружества: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск-Нарочь, 25-28 мая 2005 г. / Бел. госуд. ун-т; под ред. А.Н.Евтушенкова. – Минск, 2005. — С. 62-63.
8. Микрочастицы с иммобилизованным стрептавидином для технологий иммуноанализа / М.Е.Новаковский, И.И.Вашкевич, О.Н.Дарашкевич, А.П.Солнцев, О.В.Свиридов // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф., Минск-Раков, 1-2 июня 2006. / Инс-т микробиологии НАН Беларусі; под ред. З.М.Алещенкова [и др.]. – Минск, 2006. – С. 290-292.
9. Новаковский, М.Е. Преципитация комплексов стрептавидаина с биотинилированными белками в агаровом геле / М.Е.Новаковский, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф., Минск-Раков, 1-2 июня 2006. / Инс-т микробиологии НАН Беларусі; под ред. З.М.Алещенкова [и др.]. – Минск, 2006. – С. 292-294.

*Тезисы докладов:*

10. Пластмассовые носители, покрытые белками: получение, стабилизация и применение в биоаналитических системах / М.Е.Новаковский, Л.В.Дубовская, Т.В.Эпштейн, Е.С.Пышко, И.В.Матвеевцева, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тезисы докл. междунар. конф., Минск, 29-30 июня, 2004 г. / Инс-т биоорганич. химии НАН Беларуси. – Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. — 2004. — № 2.— С. 84.

11. Новаковский, М.Е. Твердофазный сорбент для тироксинсвязывающих белков на основе покрытого золотом макропористого стекла / М.Е.Новаковский, О.Н.Дарашкевич, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: тезисы докл. XVIII междунар. науч.-практ. конф., Минск, 18-21 октября, 2005 г. / Инс-т химии новых материалов НАН Беларуси; редкол.: В.Е.Агабеков [и др.]. – Минск, 2005.— С. 53.

12. Биоспецифические сорбенты на основе магнитоуправляемых углеродных наноматериалов / М.Е.Новаковский, О.Н.Дарашкевич, А.С.Егоров, А.П.Солнцев, И.А.Жукова, А.В.Крауклис, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Углерод: фундаментальные проблемы науки, материаловедение, технология: тезисы докл. IV междунар. конф., Москва, Ленинские горы, 26-28 октября 2005 / МГУ им. М.В.Ломоносова, редкол.: В.В. Авдеев [и др.]. – Москва, 2005. – С. 163.

13. Carbon magnetic nanotubes in bioassay of thyroid hormones / O.Darashkevich, M.Navakouski, A.Solntsev, A.Jegorov, I.Vashkevich, O.Sviridov // Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers: abstr. of 6<sup>th</sup> Int. Conf., Krems, Austria, 17-20 May, 2006 – Krems, 2006.

14. Модель многопараметрического иммуноанализа, основанного на панели аутоантигенов, для мониторинга неинфекционных заболеваний / О.Н.Дарашкевич, Е.И.Гоуфман, М.Е.Новаковский, Е.П.Киселева, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тезисы докл. II междунар. конф., Минск, 3-5 октября, 2006 г. / Инс-т биоорганич. химии НАН Беларуси; редкол.: Н.Б.Хрипач [и др.]. – Минск, 2006. – С. PR-43.

15. Navakouski, M.J. An effect of precipitation of the complexes of streptavidin with biotinylated proteins in agar slab gel / M.J.Navakouski, I.I.Vashkevich, O.V.Sviridov // Modern problems of microbiology and biotechnology: Int. Sci. Conf. of Young Scientists and Students, Odesa, Ukraine, 28–31 May, 2007. / Biol. depart. of Mechnikov Odesa Nat. University; edit.: B.N.Galkin [et al.]. – Odesa, 2007. – P. 104.

16. Новаковский, М.Е. Конъюгат биотин-тироксин как новый бифункциональный реагент для иммуноанализа в медицинской диагностике / М.Е.Новаковский, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Аналитика и аналитики: II Междун. Форум, Воронеж, РФ, 22 – 26 сентября 2008 г. – Воронеж, 2008. – С. 502.

17. Применение конъюгата трийодтиронин-биотин в иммуноферментном анализе свободного трийодтиронина / М.Е. Новаковский, О.В.Жоров, Н.В.Кузуб, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тезисы докл. III междунар. конф., Минск, 1-3 октября, 2008 г. / Инс-т биоорганич. химии НАН Беларуси; редкол.: А.А.Ахрем [и др.]. – Минск, 2008. – С. 181-182.

18. Новаковский, М.Е. Структура и свойства комплексов стрептавидина с биотинилированным тироксином / М.Е.Новаковский, В.Д.Матвеевцев, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов // Химия, структура и функция биомолекул: тезисы докл. III междунар. конф., Минск, 1-3 октября, 2008 г. / Инс-т биоорганич. химии НАН Беларуси; редкол.: А.А.Ахрем [и др.]. – Минск, 2008. – С. 183-184.

*Заявки на патенты:*

19. Заявка № а20081414 на получение патента РБ. Конъюгаты йодированных производных тиронина с биотином и 2-иминобиотином в качестве бифункциональных связывающих компонентов в иммунодиагностических системах / М.Е.Новаковский, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов. – Заявл. 11.11.2008. Заявитель – Институт биоорганической химии НАН Беларуси.

20. Заявка № а20081415 на получение патента РБ. Способ иммунохимического количественного определения тирогормонов / М.Е.Новаковский, О.В.Жоров, Н.В.Кузуб, И.И.Вашкевич, О.В.Свиридов. Заявл. 11.11.2008. Заявитель – Институт биоорганической химии НАН Беларуси.

## РЭЗІЮМЭ

Навакоўскі Максім Яўгеньевіч

«Біятынзвязваючыя бялкі і мадыфікаваныя біятынам тыроідныя гармоны і аўтаантыгены: атрыманне, асаблівасці комплексаўтварэння і прымяненне ў імунахімічных сістэмах»

**Ключавыя словы:** біятыніліраванняя, тырапераксідаза, тыраглабулін, тыраксін, трыодтыранін, імунааналіз, стрэптавідзін, авідзін.

**Аб'ектамі даследавання** з'яўляліся біятыніліраванняя тырапераксідаза (Бт-ТПА), тыраглабулін (Бт-ТГ), тыраксін (Бт-Т<sub>4</sub>), трыодтыранін (Бт-Т<sub>3</sub>), біятынзвязваючыя бялкі (БтЗБ) стрэптавідзін і авідзін, комплексы біятыніліраваных тыроідных бялкоў і гармонаў з БтЗБ, імунааналітычныя сістэмы на аснове гэтых рэагентаў.

**Прадмет даследавання:** уключаў спосабы і тэхналогіі атрымання аб'ектаў даследавання, іх узаемадзеяння, шляхі выкарыстання ў імунахімічных тэст-сістэмах і дыягнастычных наборах.

**Мэта работы:** атрымаць і ахарактэрызаваць ачышчаныя БтЗБ, Бт-ТПА, Бт-ТГ, Бт-Т<sub>4</sub> і Бт-Т<sub>3</sub>, знайсці аптымальныя ўмовы ўзаемадзеяння біятыніліраваных тыраантыгенаў і БтЗБ, вызначыць уласцівасці і будову іх цвердафазных і растваральных комплексаў, сканструяваць імунахімічныя тэст-сістэмы на аснове гэтых рэагентаў.

**Метады даследавання:** электрафарэз, афінная храматаграфія, абсарбцыйная, флюарэсцэнтная, ЯМР- і ІЧ-спектраскапія, мас-спектраметрыя, імунааналіз, кампутарнае мадэліраванне.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** удасканалены спосаб і створаны тэхналогіі вылучэння ачышчаных БтЗБ. Аптымізаваны працэс атрымання Бт-ТПА, распрацаваны спосаб сінтэзу Бт-Т<sub>4</sub> і Бт-Т<sub>3</sub>, вызначана будова і ўласцівасці іх комплексаў са стрэптавідзінам і авідзінам. Выяўлены і апісаны эфект прэцыпітацыі комплексаў стрэптавідзіна з біятыніліраванымі бялкамі. Атрыманы і ахарактэрызаваны першыя эксперыментальныя прыклады нанаструктураваных матэрыялаў, функцыяналізаваных стрэптавідзінам. Вывучаны біятэхналагічныя аспекты імабілізацыі бялковых тыраантыгенаў для імунааналізу. Распрацаваны новыя тэст-сістэмы для імунааналізу тыроідных гармонаў і аўтаантыцелаў супраць тырагармонаў.

**Ступень выкарыстання:** тэхналогія вырабу набору рэагентаў ІРМА-АНТЫ-ТПА-СТ перададзена па ліцэнзійнаму дагавору на УП "ГВП ІБАХ НАН Беларусі". У цяперашні час тэхналогія укаранена ў вытворчасць і ажыццяўляецца серыйны выпуск дыягнастычнага набору. Новыя тэхналогіі атрымання і метады кантролю якасці ачышчаных БтЗБ, а таксама біятыніліраваных тыраантыгенаў выкарыстоўваюцца ў сумесных распрацоўках лабараторыі хіміі бялковых гармонаў ІБАХ НАН Беларусі і тэхналагічнай групы УП "ГВП ІБАХ НАН Беларусі", а таксама ў работах па выкананню заданняў дзяржаўных праграм.

**Галіна выкарыстання:** біяхімія, медыцынская дыягностыка, імунадыягнастычная індустрыя.

## РЕЗЮМЕ

Новаковский Максим Евгеньевич

«Биотинсвязывающие белки и модифицированные биотином тироидные гормоны и аутоантигены: получение, особенности комплексообразования и применение в иммунохимических системах»

**Ключевые слова:** биотинилированные, тиропероксидаза, тироглобулин, тироксин, трийодтиронин, иммуноанализ, стрептавидин, авидин.

**Объектами исследования** являлись биотинилированные тиропероксидаза (Бт-ТПО), тироглобулин (Бт-ТГ), тироксин (Бт-Т<sub>4</sub>), трийодтиронин (Бт-Т<sub>3</sub>), биотинсвязывающие белки (БтСБ) стрептавидин и авидин, комплексы биотинилированных тироидных белков и гормонов с БтСБ, иммуноаналитические системы на основе этих реагентов.

**Предмет исследования** включал способы и технологии получения объектов исследования, их взаимодействия, пути использования в иммунохимических тест-системах и диагностических наборах.

**Цель работы:** получить и охарактеризовать очищенные БтСБ, Бт-ТПО, Бт-ТГ, Бт-Т<sub>4</sub> и Бт-Т<sub>3</sub>, найти оптимальные условия взаимодействия биотинилированных тироантигенов и БтСБ, определить свойства и строение их твердофазных и растворимых комплексов, сконструировать иммунохимические тест-системы на основе этих реагентов.

**Методы исследования:** электрофорез, аффинная хроматография, абсорбционная, флуоресцентная, ЯМР- и ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, иммуноанализ, компьютерное моделирование.

**Полученные результаты и их новизна.** Усовершенствован способ и созданы технологии выделения очищенных БтСБ. Оптимизирован процесс получения Бт-ТПО, разработан способ синтеза Бт-Т<sub>4</sub> и Бт-Т<sub>3</sub>, определена структура и свойства их комплексов со стрептавидином и авидином. Обнаружен и описан эффект преципитации комплексов стрептавидина с биотинилированными белками. Получены и охарактеризованы первые экспериментальные образцы наноструктурированных материалов, функционализированных стрептавидином. Изучены биотехнологические аспекты иммобилизации белковых тироантигенов для иммуноанализа. Разработаны новые тест-системы для иммуноанализа тироидных гормонов и аутоантител к тироантигенам.

**Степень использования.** Технология изготовления набора реагентов ИРМА-АНТИ-ТПО-СТ передана по лицензионному договору на УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». В настоящее время технология внедрена в производство и осуществляется серийный выпуск диагностического набора. Новые технологии выделения и методы контроля качества очищенных БтСБ, а также биотинилированные тироантигены используются в совместных разработках лаборатории химии белковых гормонов ИБОХ НАН Беларуси и технологической группы УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», а также в работах по выполнению заданий государственных программ.

**Область применения:** биохимия, медицинская диагностика, иммунодиагностическая индустрия.

## SUMMARY

Navakouski Maksim Jaugen'evicz

«Biotin-binding proteins and biotinylated thyroid hormones and autoantigenes: obtaining, complexation characteristics and application in immunochemical systems»

**Key words:** biotinylated, thyroid peroxidase, thyroglobulin, thyroxine, triiodothyronine, immunoassay, streptavidin, avidin.

**The objects of research** were biotinylated thyroid peroxidase (bt-TPO), biotinylated thyroglobulin (bt-TG), biotinylated thyroxine (bt-T<sub>4</sub>), biotinylated triiodothyronine (bt-T<sub>3</sub>), biotin-binding proteins (BBP) streptavidin, avidin, immunochemical systems based on these reagents.

**The subjects of research** were means and procedures of obtaining of the objects of research, their interactions, ways of using in immunochemical test-systems and diagnostic sets.

**The aim of work** was to obtain and to characterize purified BBP, bt-TPO, bt-TG, bt-T<sub>4</sub> and bt-T<sub>3</sub>, to find optimal conditions of biotinylated proteins and BBP interaction, to test properties and structure of their soluble and solid phase complexes, to construct immunochemical test-systems based on these reagents.

**Research methods:** electrophoresis, affine chromatography, absorption, fluorescent, NMR- and IR-spectroscopy, mass-spectrometry, immunoassay, computer modeling.

**Results obtained and their novelty.** The method of purified BBP obtaining has been improved and the technology thereof has been created. The process of bt-TPO has been optimized, the method of bt-T<sub>4</sub> has been developed, the structure and properties of their complexes with streptavidin and avidin have been determined. The effect of precipitation of complexes of streptavidin with biotinylated proteins is found out and described. The first experimental samples of streptavidin-covered nanostructured materials have been obtained and characterized. Biotechnological aspects of protein thyroid antigen immobilization for immunoassay have been examined. New test-systems for thyroid hormone and thyroid autoantigen immunoassay have been studied.

**The extent of use.** The technology of manufacturing "IRMA-ANTI-TPO-CT" kit has been assigned to the Experimental Production Facility (EPF) of IBOC of NAS of Belarus according to license contract. At present, the technology is introduced in manufacturing and serial output of diagnostic kit is being put into effect. New technologies of isolation of purified BBP, quality control methods thereof, as well as biotinylated antigens are being used in joint developments of the Laboratory of protein hormone chemistry of IBOC of NAS of Belarus and a technology group of EPF of IBOC of NAS of Belarus, as well as in frame of work of according state scientific programs.

**Areas of application:** biochemistry, medical diagnostics, immunodiagnostic industry.

Подписано в печать 08.01.2009. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.  
Печать на ризографе. Усл. печ. л. 2,1. Уч.-изд. л. 1,2.  
Тираж 60 экз. Заказ 8.

Республиканское унитарное предприятие  
«Информационно-вычислительный центр  
Министерства финансов Республики Беларусь».  
ЛП № 02330/0056683 от 29.03.2004.  
220004, г.Минск, ул. Кальварийская, 17.