

УДК 577.112.4:57.083.3:543.426

*О. С. ГАРБУЗ, Л. В. ДУБОВСКАЯ, О. В. СВИРИДОВ*

## НОВЫЙ РЕАГЕНТ ДЛЯ МЕЧЕНИЯ БЕЛКОВ ИОНАМИ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ

*(Представлено академиком Ф. А. Лахвичем)*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск*

*Поступило 30.12.2013*

**Введение.** Ионы некоторых редкоземельных элементов (главным образом, лантаниды  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  и  $\text{Dy}^{3+}$ ) в комплексах с поглощающими УФ-свет органическими соединениями способны к долгоживущей флуоресценции. Такое испускание света может быть зарегистрировано со значительной временной задержкой после импульса возбуждения, благодаря чему широко используется в биохимических и молекулярно-биологических исследованиях. Одним из практически важных направлений применения этого явления в медицине и смежных областях является лантанидный иммунофлуориметрический анализ (ЛИФМА), в котором один из компонентов системы антиген–антитело несет лантанидную метку чаще всего в виде иона  $\text{Eu}^{3+}$  в составе полиаминополикарбоксилатного комплексогена. В ходе ЛИФМА на стадии детекции этот комплексонат под действием диссоциативно-усиливающего раствора обеспечивает получение интенсивного флуоресцентного сигнала в форме узкого пика с большим стоксовым сдвигом и нулевым вкладом короткоживущей фоновой флуоресценции. ЛИФМА характеризуется повышенной чувствительностью и более широким диапазоном измеряемых концентраций в сравнении с иммуноферментным анализом, а также иммунофлуоресцентными тестами, в которых регистрируется обычное излучение меток на основе органических красителей [1–4].

Опираясь на описанную в научной и патентной литературе методологию синтеза белков, модифицированных комплексогенами металлов, и долговременный опыт их применения в диагностических тест-системах [5–9], мы поставили цель синтезировать активированный лантанидохелат на основе диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПК), способный образовывать прочные амидные связи при взаимодействии с первичными аминогруппами полипептидной цепи. Задачи достижения необходимых для ЛИФМА характеристик нового реагента и экономичности процессов его получения решены путем синтеза целевого продукта в реакции комплексной лантанидной соли аминоксидоамида ДТПК с одной из двух активированных карбоксильных групп *n*-фталевой кислоты. Конъюгаты белков с комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$ , синтезированные нами с использованием полученного N-сукцинимидного эфира лантанидохелата, полностью удовлетворяют требованиям ЛИФМА.

**Материалы и методы исследования.** Все реактивы и растворители имели классификацию не ниже «ч. д. а.». Использовали диметилсульфоксид (ДМСО) фирмы Applichem (Германия), диангидрид ДТПК, N-Вос-1,2-этилендиамин, N-гидроксисукцинимид фирмы Sigma (США), триэтиламин фирмы Acros (Бельгия), усиливающий раствор фирмы PerkinElmer (США). Для химической модификации использованы коммерческие мышинные моноклональные антитела (МАТ) к тиреотропному гормону (ТТГ), свободной бета-субъединице хорионического гонадотропина (св. бета-ХГЧ) и ассоциированному с беременностью белку А плазмы человека (ПАББ-А). Для ЛИФМА применяли микропланшеты фирмы Biomat (Италия). Точную концентрацию  $\text{Eu}^{3+}$  в рабочем растворе  $\text{EuCl}_3$  определяли комплексонометрическим титрованием с использованием ди-натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты и ксиленолового оранжевого в качестве индикатора. На всех стадиях синтеза и в ЛИФМА применяли воду с удельным электрическим

сопротивлением 17–18 МОм · см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США). Для проведения анионообменной хроматографии продуктов синтеза использовали сорбент Dowex 1X4 фирмы Serva (Германия).

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  записывали на приборе фирмы Bruker BioSpin AVANCE 500 с рабочими частотами 500 и 125 МГц в  $d_6$ -ДМСО и  $\text{D}_2\text{O}$ . Химические сдвиги определяли относительно сигналов ДМСО ( $\delta\text{H}$  2,50 м. д. и  $\delta\text{C}$  39,52 м. д.) или внутреннего стандарта ацетона ( $\delta\text{H}$  2,22 м. д. и  $\delta\text{C}$  30,89 м. д.). Масс-спектры получали на приборе LCQ Fleet фирмы Thermo Electron. Высушивание из замороженного состояния под вакуумом выполняли на установке для лиофильной сушки VirTis 6211 (США).

Для проведения ЛИФМА применяли синтезированные в данной работе конъюгаты МАт с комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$  и готовые реагенты наборов ЛИФМА–нео-ТТГ (ТУ ВУ 100185093.060–2010), ЛИФМА–св. бета-ХГЧ (ТУ ВУ 100185093.062–2012) и ЛИФМА–ПАББ-А (ТУ ВУ 100185093.063–2012), изготовленные производственным участком лаборатории химии белковых гормонов с использованием технологического оборудования УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Флуоресценцию при длине волны возбуждения и регистрации 320 и 615 нм соответственно, с временной задержкой 400 мкс измеряли в микропланшетном флуориметре DELFIA 1234 фирмы Wallac Oy (Финляндия).

Электрофорез белков до и после химической модификации проводили в 10 %-ном полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях, используя кипячение проб в присутствии 5 % 2-меркаптоэтанола. Для выявления белковых полос применяли окрашивание Кумасси R-250.

*Синтез  $N^1$ -(2-аминоэтиламида) ДТПК (1).* Навеску 311 мг (0,87 ммоль) диангидрида ДТПК при нагревании до 60 °С растворяли в 2 мл ДМСО, при интенсивном перемешивании в течение 20 мин вносили раствор 99 мг (0,62 ммоль)  $N$ -Вос-1,2-этилендиамина в 1,5 мл ДМСО и добавляли 0,5 мл (3,48 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 8 ч. Содержимое колбы вливали в диэтиловый эфир. Образовавшееся масло растворяли в 2 мл воды, перемешивали при нагревании на кипящей водяной бане в течение 1,5 ч, затем лиофилизовали. Сухой остаток растворяли в 0,3 мл воды и обрабатывали 0,3 мл концентрированной соляной кислоты в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Раствор нейтрализовали 5 М раствором  $\text{NaOH}$  до pH 6. Смесь наносили на колонку с Dowex 1X4 (в форме ацетата), промытую и уравновешенную водой. Элюирование проводили сначала водой, затем 1 М раствором уксусной кислоты. Фракции, содержащие, по данным ТСХ, целевое соединение, объединяли и лиофилизовали. Получили 123 мг (45 %) соединения **1**: 2,2'-(13-амино-1-карбокси-2-(карбоксиметил)-10-оксо-2,5,8,11-тетраазатридекан-5,8-диил)диуксусная кислота. Масс-спектр,  $m/z$ : 434 [M]<sup>+</sup>. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , м. д.): 3,20 (т, 2H), 3,27–3,36 (м, 4H), 3,46 (т, 2H), 3,58 (т, 2H), 3,64 (т, 2H), 3,67 (с, 2H), 3,76 (с, 2H), 3,83 (с, 2H), 3,92 (с, 4H). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$ , м. д.): 37,5, 39,6, 51,2, 52,0, 52,5, 52,9, 55,1, 56,6, 58,1, 58,3, 170,5, 170,9, 172,5, 173,4.

*Получение комплексной европиевой соли  $N^1$ -(2-аминоэтиламида) ДТПК (2).* Навеску 20 мг (46 мкмоль) 2-аминоэтиламида ДТПК **1** растворяли в 0,2 мл воды. Добавляли 0,5 мл (50 мкмоль) 0,1 М раствора  $\text{EuCl}_3$ . Затем 1 М раствором триэтиламина в воде доводили pH до 6 и перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Прибавлением 1 М триэтиламина доводили pH до 11, перемешивали 30 мин при комнатной температуре, отделяли центрифугированием выпавший осадок гидроксида  $\text{Eu}^{3+}$ , супернатант лиофилизовали. Получили 45 мг 2-аминоэтиламида карбоксипроизводного диэтилентриаминтетраацетата  $\text{Eu}^{3+}$ /триэтиламина **2**: европий (III) триэтиламмоний 13-амино-2,5,8-трис(карбоксилатометил)-10-оксо-2,5,8,11-тетраазатридекан-1-карбоксилат.

*Синтез ди- $N$ -сукцинимидного эфира  $n$ -фталевой кислоты (3).* 1 г (4,9 ммоль) дихлорангидрида  $n$ -фталевой кислоты растворяли в 30 мл хлористого метилена, перемешивали 10 мин при комнатной температуре, затем 10 мин при охлаждении на ледяной бане. Добавляли 2 г (17,4 ммоль)  $N$ -гидроксисукцинимида и 2,4 мл (17,4 ммоль) триэтиламина. Перемешивали 30 мин при охлаждении и 48 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, промывали 5 мл хлористого метилена, суспендировали в 20 мл этого растворителя, опять отфильтровывали и сушили при комнатной температуре. Получили 1,37 г (78 %) ди(2,5-диоксопирролидин-1-ил)  $n$ -фталаата **3**.

Масс-спектр,  $m/z$ : 359 [M]<sup>-</sup>. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ, м. д.): 2,92 (с, 8H, CH<sub>2</sub>), 8,34 (с, 4H, CH). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, δ, м. д.): 25,6, 130,1, 131,0, 161,0, 170,2.

*Получение N<sup>1</sup>-[2-(*n*-сукцинимидилкарбокси)бензоиламино)этиламида] ДТПК/Eu<sup>3+</sup> (4).* Навеску 16 мг (44 мкмоль) эфира **3** растворяли в 0,6 мл ДМСО. Добавляли 35 мг (36 мкмоль) европиевой соли **2** в 0,6 мл ДМСО и 0,03 мл (216 мкмоль) триэтиламина. Перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. За ходом реакции следили по ТСХ в системе 10 % ацетат аммония : метанол 1 : 3. Rf продукта реакции 0,55.

Продукт выделяли осторожным наслаиванием диэтилового эфира на раствор в ДМСО. При этом выпадал белый кристаллический осадок. Для отделения от непрореагировавшего ди-N-сукцинимидного эфира **3** продукт снова растворяли в ДМСО и промывали тетрагидрофураном. При этом выпадал осадок, представляющий собой моно-N-сукцинимидный эфир комплексоната Eu<sup>3+</sup> **4**: европий (III) триэтиламмоний 2,5,8-трис(карбоксилатометил)-15-(4-((2,5-диоксипирролидин-1-илокси)карбонил)фенил)-10,15-диоксо-2,5,8,11,14-пентаазапентадекан-1-карбоксилат. Соединение **4** хранили при -20 °С в сосуде, заполненном аргоном.

*Получение белков, меченных Eu<sup>3+</sup>.* Методика описана на примере иммуноглобулина класса G – МАт к ПАББ-А.

14 мкл свежеприготовленного раствора (8 г/л) реагента **4** в воде добавляли к 100 мкл раствора (4,5 г/л) МАт к ПАББ-А в 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>. Тщательно перемешивали и инкубировали при температуре 8–10 °С в течение ночи. Для очистки конъюгата проводили гель-фильтрацию на колонке (1,0 × 30 см) с сорбентом Superose 12 в системе проточной эффективной жидкостной хроматографии среднего давления FPLC при скорости элюирования 12 мл/ч. Элюирующий буфер – 0,05 М Tris-HCl (pH 7,8), 0,15 М NaCl, 0,05 % NaN<sub>3</sub>. Фракции, содержащие белок, объединяли. По поглощению при 280 нм определяли концентрацию МАт, используя коэффициент экстинкции E<sub>280 нм, 1 см, г/л</sub> = 1,35(г/л)<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Флуоресцентную активность конъюгата измеряли в диссоциативно-усиливающем растворе, содержащем 50 мкМ триоктилфосфиноксид, 15 мкМ β-нафтоилтрифторацетон и 0,1 % тритон X-100, и определяли концентрацию Eu<sup>3+</sup>, используя для калибровки растворы с точным содержанием Eu<sup>3+</sup> по данным комплексонометрического титрования. Степень мечения определяли как мольное соотношение Eu<sup>3+</sup>/белок.

Выполнение ЛИФМА с применением МАт, меченных Eu<sup>3+</sup>, проводили в соответствии с инструкциями для наборов ЛИФМА–ПАББ-А, ЛИФМА–св. бета-ХГЧ, ЛИФМА–нео-ТТГ.

**Результаты и их обсуждение.** Для синтеза конъюгатов белков с полиаминополикарбоксилатными металлохелатами существуют два подхода. Один из них состоит в химической модификации белка органическим комплексоном, очистке полученного конъюгата, с последующим хелатированием иона редкоземельного металла образованным конъюгатом и отделением несвязавшихся ионов. Второй подход включает получение химически активного производного комплексоната металла, проведение его реакции с белком и очистку от избытка низкомолекулярного комплексоната. При реализации первого пути применяют производные ДТПК такие как диангидрид [5; 10], N-сукцинимидные эфиры [6–8] и другие дериваты [11]. Двухстадийная модификация белков ионами металлов более трудоемка по сравнению с реакцией в одну стадию по второму пути. Известно, что применение диангидрида ДТПК является причиной образования олигомеров модифицируемого белка, что приводит к снижению его иммунореактивности и значительному увеличению неспецифической адсорбции. Из-за высокой вероятности сшивки полипептидных цепей при использовании этого реагента невозможно получить конъюгаты с высокой степенью включения комплексона в молекулу белка [5; 9]. Помимо этого, на двух стадиях очистки конъюгатов, получаемых по первому пути, теряется довольно много белка, который часто является дорогостоящим реагентом. Второй путь мечения белков, хотя и является экономически более выгодным, требует разработки методов синтеза и очистки металлохелатов, реакционно-способных в отношении полипептида. Выполненный ранее в этом направлении синтез активированного N<sup>1</sup>-(*n*-изотиоцианобензил)-диэтилентриамин-N<sup>1</sup>, N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>, N<sup>3</sup>-тетраацетата европия сложен, многостадийен и требует использования такого токсичного соединения, как тиофосген [9]. Кроме того, реакция активной изотиоцианатной группы соединения с первичными аминогруппами белка приводит к формированию тиокарбаматной связи, которая, как известно, характери-

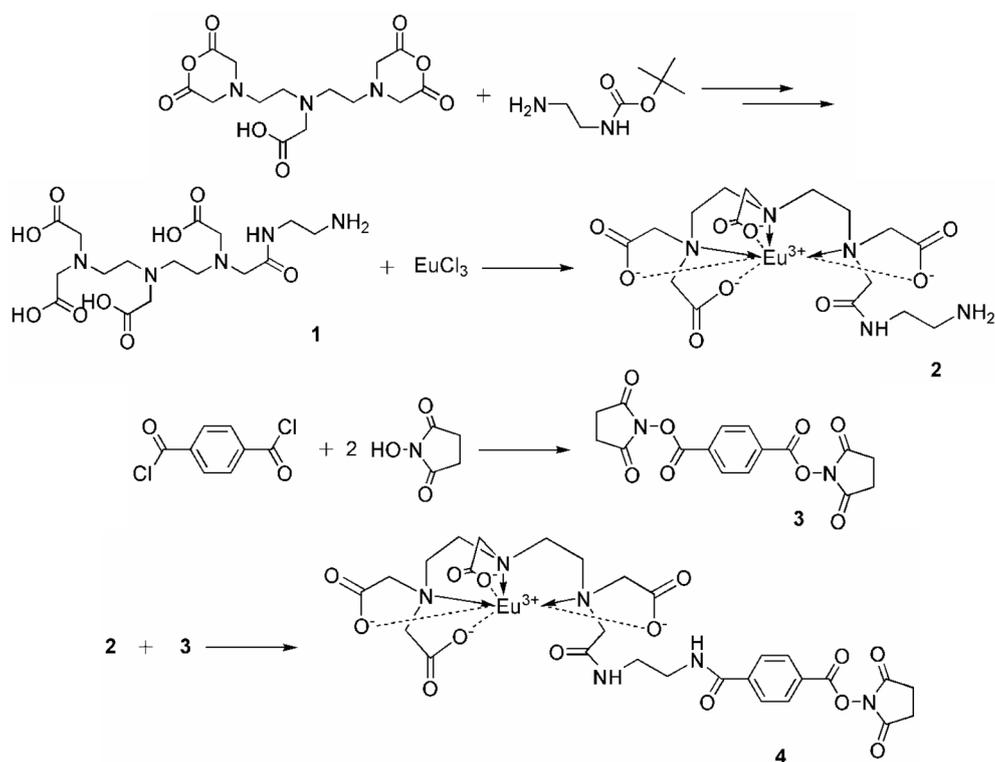


Рис. 1. Схема синтеза активированного эфира карбоксипроизводного тетраацетата европия

зуется определенной лабильностью, что может значительно ухудшить характеристики набора реагентов и ограничить срок его эксплуатации.

Разработанный нами синтез реагента **4** для мечения белков ионами лантанидов в целях ЛИФМА включает две параллельные схемы, в одной из которых моно-*N*-ос-замещенный 1,2-диаминоэтан ацилируется диангидридом ДТПК с последующим удалением защитной группы и протеканием реакции комплексообразования, а другая состоит в получении активированного диэфира *n*-фталевой кислоты. Конечный продукт образуется в результате взаимодействия комплексной европиевой соли  $\text{N}^1$ -(2-аминоэтиламида) ДТПК с одной из активированных карбоксильных групп ароматической кислоты (рис. 1).

При взаимодействии диангидрида ДТПК и *N*-*Os*-1,2-этилендиамина образуется смесь моноамида и диамида ДТПК. Для выделения аминопроизводного **1** использовали анионообменную хроматографию. При пропускании через колонку с анионитом неочищенного  $\text{N}^1$ -(2-аминоэтиламида) ДТПК и элюировании раствором уксусной кислоты наибольшую подвижность имел ди- $\text{N}^1$ ,  $\text{N}^3$ -(2-аминоэтиламин) ДТПК, наименьшую – немодифицированная ДТПК, а моноамид **1** занимал промежуточное положение. ТСХ показала, что очищенный на колонке с Dowex 1X4 амин **1** не содержит примесей побочных продуктов реакции. Суммарная интегральная интенсивность сигналов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  полученного соединения соответствует количеству метиленовых групп соединения **1**.

При получении комплексной европиевой соли **2** использовали небольшой избыток ионов  $\text{Eu}^{3+}$  по отношению к количеству аминопроизводного ДТПК **1**. Реакцию комплексообразования проводили при pH 6. Такие условия позволяли избежать образования гидроокиси лантанида и являлись подходящими для хелатирования  $\text{Eu}^{3+}$ . Несвязанный лантанид удаляли из реакционной смеси при подщелачивании до pH 10–11, в результате чего выпадал осадок гидроксида  $\text{Eu}^{3+}$ . В реакции комплексообразования pH варьировали добавлением триэтиламина, поскольку образующуюся смешанную соль **2** удалось растворить в органическом растворителе ДМСО.

Хлорангидриды карбоновых кислот являются высокоактивными соединениями. Атом хлора может быть легко замещен даже таким слабым нуклеофилом, как *N*-гидроксисукинимид. При получении сукцинимидил-*n*-фталата из хлорангидрида протеканию реакции в направлении об-

разования продукта **3** способствовало его выведение из реакционной среды в виде осадка. Результаты ЯМР и масс-спектр подтверждают структуру эфира **3** и его чистоту.

Реакцию ацилирования аминоксидного **2** эфиром **3** проводили в ДМСО в присутствии большого количества основания, способствующего депротонированию (активации) аминоксидной группы. Используемый растворитель является высококипящим, поэтому для его удаления из реакционной смеси использовали диэтиловый эфир, который аккуратно наслаивали на диметилсульфоксидный раствор. По мере удаления ДМСО выпадал продукт реакции **4** в виде кристаллического вещества.

Модификацию белков проводили в бикарбонатном буферном растворе (рН 8,3). При таких значениях рН среднее время полураспада сукцинимидных эфиров около 30 мин [12]. Для того чтобы реакция ацилирования аминоксидных групп белка протекала полностью, проводили инкубацию в течение ночи при непрерывном перемешивании. Очистка конъюгатов белок–металлохелат с помощью традиционной гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-25 не обеспечивает отделения от белка всего количества химически не связанного комплексогена  $\text{Eu}^{3+}$  [13]. При гель-фильтрации на колонке с Superose 12 на установке для FPLC конъюгат и избыток реагента выходили узкими пиками (значения полуширин соответственно 1–2 и 2–3 мл), разделенными базовой линией протяженностью около 4 мл. При этом происходило отделение белковых агрегатов, элюция которых предшествовала выходу синтезированного конъюгата.

Возможное образование олигомеров за счет сшивки полипептидных цепей в результате химической модификации детектировалось SDS-электрофорезом в ПААГ. Ранее нами было показано, что при мольном соотношении диангида ДТПК и белка в пропорции 20 : 1 наблюдается частичная сшивка полипептидных цепей иммуноглобулинов, а при соотношении 100 : 1 практически весь белок находится в виде олигомеров [13]. В данной работе на электрофореграммах белковых конъюгатов, синтезированных с помощью (50–150)-кратных мольных избытков реагента **4**, вообще не было выявлено белковых полос, которые соответствовали бы сшитым полипептидам. Следовательно, степень модификации белка и его удельную флуоресцентную активность можно повысить за счет увеличения количества вносимого соединения **4** (рис. 2).

С целью апробации предложенного реагента для химической модификации белков комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$  мы выбрали мышинные МАт, которые наиболее часто используются в ЛИФМА (МАт к ТТГ, св. бета-ХГЧ и ПАББ-А). Синтезированные конъюгаты были протестированы в соответствующих наборах ЛИФМА. Полученные технические характеристики, представленные в таблице, соответствуют техническим условиям на данные диагностикумы, и не уступают показателям референс-наборов фирмы PerkinElmer (США), зарегистрированным и используемым в Беларуси.

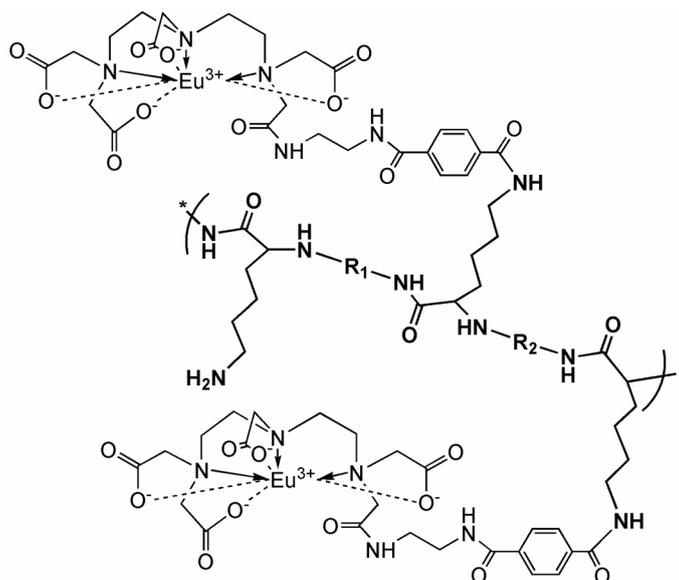


Рис. 2. Общая структура полипептида, меченного комплексоном  $\text{Eu}^{3+}$  с помощью реагента **4**

**Технико-аналитические характеристики диагностических наборов ЛИФМА, включающих белковые конъюгаты, которые синтезированы с применением моно-N-сукцинимидного эфира комплексоната  $\text{Eu}^{3+}$**

МАт	Степень мечения, моль $\text{Eu}^{3+}$ /моль белка	Отношение интенсивностей флуоресценции для калибровочных проб А и $\text{E}^1$ , $\text{V}_E/\text{V}_A$	Чувствительность <sup>2</sup>	Коэффициент вариации <sup>3</sup> , %	Коэффициент корреляции <sup>4</sup> , r
Анти-ТТГ	18,0	47 ( $\geq 30$ )	1,2 (2,0) мкМЕ/мл	7,6–8,5 ( $\leq 12$ )	0,88
Анти-св. бета-ХГЧ	12,5	3229 ( $\geq 500$ )	0,03 (0,3) нг/мл	1,6–3,0 ( $\leq 8$ )	0,98
Анти-ПАББ-А	10,0	2975 ( $\geq 500$ )	3,0 (10,0) мМЕ/л	2,0–3,1 ( $\leq 8$ )	0,93

Примечания: 1 – калибровочные пробы, не содержащие определяемого вещества (А) и с максимальной концентрацией данного вещества (Е); 2 – минимальная достоверно определяемая диагностическим набором концентрация вещества, рассчитанная на основании удвоенного значения среднего квадратичного отклонения от среднего арифметического значения интенсивности флуоресценции, измеренной в пробе А; 3 – повторяемость результатов измерений; 4 – сравнение результатов определений веществ в одних и тех же пробах ЛИФМА-набором с исследуемым белковым конъюгатом и референс-набором. В скобках даны значения технико-аналитических параметров по утвержденным техническим условиям.

Представленные в таблице характеристики всех белковых конъюгатов несущественно изменились после хранения концентрата растворов в течение года в холодильнике при 2–8 °С. Низкая неспецифическая адсорбция и высокая удельная флуоресцентная активность меченных  $\text{Eu}^{3+}$  МАт обеспечивают высокую чувствительность ЛИФМА и хорошую воспроизводимость результатов во всем динамическом диапазоне. Это важно для клинико-диагностической практики особенно в области медицинской помощи матерям и детям при проведении массовых обследований в рамках национальных программ: неонатальный скрининг на врожденный гипотиреоз, пренатальный скрининг в первом триместре беременности для выявления врожденных пороков развития плода. Так, свойства меченного  $\text{Eu}^{3+}$  МАт к тиреотропину позволяют использовать данный конъюгат в диагностическом наборе для определения ТТГ в сухих пятнах крови, содержащих всего лишь около 0,003 мл образца.

**Заключение.** Синтезированный нами реагент для мечения белков ионами редкоземельных металлов обладает тремя преимуществами по сравнению с предложенными ранее соединениями аналогичного назначения: простота синтеза, присутствие в структуре иона лантанида, исключение возможности сшивания полипептидных цепей. Новый реагент получен путем превращения диангида ДТПК в N<sup>1</sup>-(2-аминоэтиламин) диэтилентриаминтетраацетат лантанида и последующего его ацилирования ди-N-сукцинимидным эфиром *n*-фталевой кислоты. Реагент позволяет получать конъюгаты белка с комплексонатом  $\text{Eu}^{3+}$  с необходимой удельной флуоресцентной активностью. Избыток реагента легко отделяется от белкового конъюгата гелефильтрацией на установке для FPLC. Конъюгаты, полученные с использованием предложенного нами соединения, имеют характеристики, позволяющие применять их в наборах ЛИФМА. Есть все основания полагать, что разработанный метод синтеза позволит получать различные металлохелаты белков и для других научных и практических целей. Следует отметить, что в синтезе целевого реагента можно использовать и другие алифатические амины (например, монозамещенный 1,6-диаминогексан) и дикарбоновые кислоты (например, адипиновую).

Авторы выражают благодарность кандидатам хим. наук В. К. Ольховику и Д. А. Василевскому за оказанную помощь в планировании экспериментов и любезное предоставление некоторых реактивов, а также канд. хим. наук А. В. Барановскому за консультации по расшифровке масс-и ЯМР-спектров.

### Литература

1. *Beitz J.* // Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths. 1994. Vol. 18. P. 159–195.
2. *Holzwarth A. R.* // Methods in Enzymology. 1995. Vol. 246. P. 334–362.
3. *Hagan A. K., Zuchner T.* // Anal. Bioanal. Chem. 2011. Vol. 400. P. 2847–2864.
4. *Гарбуз О. С., Свиридов О. В.* // ARSmedica. 2011. № 13. С. 51–61.
5. *Paik C. H. et al.* // J. Nucl. Med. 1983. Vol. 24, N 12. P. 1158–1163.
6. *Najafi A., Childs R. L., Hnatowich D. J.* // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1984. Vol. 35, N 6. P. 554–557.
7. *Paxton R. J. et al.* // Cancer Res. 1985. Vol. 45, N 11. P. 5694–5699.

8. *Kondo S., Kurami M., Azuma M.* US Patent 5094950. Diethylenetriamine pentaacetic acid derivatives: заявл. 05.01.1989; опубл. 10.03.1992.
9. *Mukkala V. M., Mikola H., Hemmila I.* // *Anal. Biochem.* 1989. Vol. 176, N 2. P. 319–325.
10. *Hnatowich D. J., Childs R. L., Lanteigne D., Najafi A.* // *J. Immunol. Methods.* 1983. Vol. 65. P. 147–157.
11. *Kozak R. W.* et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1986. Vol. 83. P. 474–478.
12. *Hermanson G. T.* *Bioconjugate technique.* USA. 1996.
13. *Гарбуз О. С., Вашкевич И. И., Свиридов О. В.* // *Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук.* 2014. № 1. С. 85–90.

*O. S. GARBUZ, L. V. DUBOVSKAYA, O. V. SVIRIDOV*

*olga\_garbuz@iboch.bas-net.by; dubovskaya@iboch.bas-net.by; sviridov@iboch.bas-net.by*

#### **NEW REAGENT FOR LABELING PROTEINS WITH RARE EARTH METAL IONS**

### **Summary**

Activated ester of a carboxylic derivative of europium diethylenetriaminetetraacetate has been synthesized by the interaction of europium salt of diethylenetriaminepentaacetic acid aminoethylamide with di-N-succinimidyl-p-phthalate. This reagent was applied to introduce rare earth metal ions in animal immunoglobulins (monoclonal antibodies). The proteins labelled with  $\text{Eu}^{3+}$  provide the required characteristics of fluorescence intensity, background, sensitivity and selectivity in diagnostic systems of lanthanide immunofluorometric assay.