

УДК 577.182.46:547-386:57.083.3

О. С. КУПРИЕНКО, П. С. ШАБУНЯ, С. А. ФАТЫХОВА, О. В. СВИРИДОВ

СИНТЕЗ И ПАРАМЕТРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АНТИТЕЛАМИ НОВОГО БИОКОНЬЮГАТА ХЛОРАМФЕНИКОЛ-ДИЭТИЛЕНТРИАМИНТЕТРААЦЕТАТ ЕВРОПИЯ

(Представлено академиком Ф. А. Лахвичем)

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
olga_garbuz@iboch.bas-net.by; polinashabunya@nm.by; fsa1981@tut.by; sviridov@iboch.bas-net.by

В реакции *N*-сукцинимидного эфира 3-гемисукцината хлорамфеникола с Eu^{3+} -комплексонатом *N*¹-(2-аминоэтил-амида) диэтилентриаминпентауксусной кислоты и получен конъюгат антибиотика с лантанидохелатом. Определены кинетическая зависимость и равновесные параметры связывания конъюгата с поликлональными антителами к хлорамфениколу, биоспецифически иммобилизованными в лунках микропланшета. Сделан вывод о возможности использования конъюгата для лантанидного иммунофлуориметрического анализа хлорамфеникола.

Ключевые слова: хлорамфеникол, европий, поликлональные антитела, лантанидный иммунофлуориметрический анализ.

O. S. KUPRIENKO, P. S. SHABUNYA, S. A. FATYKHAVA, O. V. SVIRIDOV

SYNTHESIS AND PARAMETERS OF INTERACTION WITH ANTIBODIES OF A NEW BIOCONJUGATE OF CHLORAMPHENICOL WITH EUROPIUM DIETHYLENTRIAMINETETRAACETATE

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
olga_garbuz@iboch.bas-net.by; polinashabunya@nm.by; fsa1981@tut.by; sviridov@iboch.bas-net.by

A conjugate has been obtained in the reaction of chloramphenicol 3-hemisuccinate with diethylenetriaminepentaacetic acid *N*¹-(2-aminoethylamide) Eu^{3+} -complexonate. Kinetic and equilibrium parameters of conjugate binding to polyclonal anti-chloramphenicol antibodies biospecifically immobilized onto microtiter plate wells were determined. It was concluded that the new bioconjugate can be used in a lanthanide immunofluorometric assay of chloramphenicol.

Keywords: chloramphenicol, europium, polyclonal antibodies, time-resolved fluoroimmunoassay.

Введение. В биохимических исследованиях, биотехнологии и медицине широко используются низкомолекулярные биологически активные вещества, меченные комплексными соединениями лантанидов. В частности, применение низкомолекулярных антигенов, конъюгированных с хелатами европия, самария, тербия, диспрозия, в иммунохимических системах дало импульс дальнейшему развитию иммуноанализа. В настоящее время в медицинской практике многих стран, в том числе и в Беларуси широко используется лантанидный иммунофлуориметрический анализ (ЛИФМА), который обеспечивает высокую чувствительность и точность определений диагностических маркеров. Данный метод основан на специфичной реакции прочного нековалентного связывания антиген–антитело, долгоживущей флуоресценции лантанидохелата в структуре одного из этих реагентов, которая характеризуется высоким квантовым выходом и большим стоковым сдвигом в усиливающем растворе, и отложенной во времени регистрации излучения [1–3].

Известны конъюгаты органических комплексов лантанидов с малыми биомолекулами, например, со стероидными гормонами [4–6], тиреоидными гомонами [6], брассиностероидами [7]. Они являются реагентами ЛИФМА в клинической лабораторной практике и в научных исследованиях. Гораздо меньше сведений в литературе имеется об использовании в ЛИФМА меченых лантанидохелатами антибиотиков [8; 9] и применении метода для контроля безопасности

пищевых продуктов и кормов. К токсичным соединениям, количественное определение которых в продуктах и сырье животного происхождения является обязательным, относится и антибиотик широкого спектра действия L-хлорамфеникол (Хф) или левомецетин, представляющий собой d(-)-трео-1-(4-нитрофенил)-2-дихлорацетиламино-1,3-пропандиол. Для скрининговых исследований образцов продовольствия на содержание остаточных количеств Хф используется система прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) в микропланшетном формате, типичная конструкция которой описана в одной из многих статей на эту тему [10]. Однако применение ИФА для указанных целей имеет ряд ограничений. Главным из них является матрикс-эффект, обусловленный посторонними веществами животного происхождения, которые взаимодействуют с антителами или ферментом, частично ингибируя их активность. ЛИФМА, в котором в качестве метки вместо фермента используется комплексонат редкоземельного металла, а флуоресцентный сигнал лантанида регистрируется в условиях затухшей фоновой флуоресценции реакционной среды, может выступать в качестве альтернативного метода при количественном определении малых биомолекул в сложных смесях. Однако в литературе нет сведений о прямом ЛИФМА Хф и не описаны бимолекулярные конъюгаты этого антибиотика с комплексонатами лантанидов, детектирующие свойства которых, в принципе, могут уменьшить матрикс-эффект. Кроме того, синтез Хф, меченного органическим комплексом редкоземельного металла, и исследование его взаимодействий с полипептидами (антитела, транспортные белки, рецепторы) позволил бы не только расширить арсенал методов количественного определения, но и получить новый реагент для изучения механизма действия и метаболизма Хф с участием связывающих (транспортных) белков.

Цель работы – синтез нового биоконъюгата на основе Хф и комплексоната Eu^{3+} в качестве потенциального иммунореагента и меченого лиганда связывающих белков.

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали 0,05 М буфер HEPES (рН 6,8), содержащий 0,15 М NaCl, 0,02 % Tween-20, 0,02 % NaN_3 и 1 г/л БСА (буферный раствор 1). Моющий буфер состоял из 0,01 М Tris-HCl (рН 7,4), 0,15 М NaCl, 0,01 % Tween-20 и 0,01 % NaN_3 (буферный раствор 2). Диссоциативно-усиливающий раствор содержал 50 мкМ три-н-октилфосфиноксид, 15 мкМ β -нафтоилтрифторацетон и 0,1 % тритон X-100 [1]. Применяли разборные 96-луночные микропланшеты, полученные от фирмы «ХЕМА» (РФ). Поликлональные антитела к Хф получены путем иммунизации животных конъюгатом 3-гемисукцината Хф и тиреоглобулина человека [11]. Эти анти-Хф антитела в титре 1 : 20000 биоспецифически иммобилизовали в лунках планшета, покрытых пассивно адсорбированными из раствора 5 мг/л антителами овцы к иммуноглобулинам кролика [11].

N-сукцинимидный эфир гемисукцината хлорамфеникола **1** синтезировали по ранее описанной методике [12]. В качестве исходного сырья использовали медицинский препарат «Левомецетин-КМП» (ОДО «Киевмедпрепарат»), который по результатам проведенного нами анализа содержал 90,4 % 3-гемисукцината Хф. Комплексонат Eu^{3+} с N^1 -(2-аминоэтиламидом) диэтилен-триаминпентауксусной кислоты **2** получали, как описано ранее [13].

В синтезе и экспериментах по определению параметров связывания биоконъюгата с антителами применяли воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 Мом · см, очищенную в модульной установке Water Pro Plus (Labconco, США)

Конъюгат 3-гемисукцината хлорамфеникола с комплексонатом Eu^{3+} **3**. К 9,6 мг (22 мкмоль) комплексоната Eu^{3+} **2** в 0,9 мл DMSO, содержащего 0,03 мл триэтиламина, добавляли 10,3 мг (20 мкмоль) N-сукцинимидного эфира 3-гемисукцината хлорамфеникола **1** в 0,1 мл диоксана. Перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч до полного растворения осадка. За ходом реакции следили по ТСХ в системе ацетонитрил : вода 3 : 1. Окончанием реакции считали исчезновение из реакционной среды N-сукцинимидного эфира **1**. Диоксан упаривали на ротаторном испарителе, DMSO удаляли наслаиванием на реакционную смесь диэтилового эфира. Остаток растворяли в 1 мл воды и трижды проводили экстракцию этилацетатом. Воду упаривали, продукт сушили в вакуум-эксикаторе с P_2O_5 . Дополнительную очистку продукта Хф-ДТТА/ Eu^{3+} проводили методом полупрепаративной ВЭЖХ на колонке Zorbax SB C18, 4,6 × 250 мм, 3,5 мкм.

В качестве элюентов использовали: раствор А – 8 мМ ацетат аммония в воде и раствор Б – ацетонитрил, элюцию проводили в линейном градиенте изменения концентрации раствора Б от 10 до 50 % за 10 мин при скорости потока 1 мл/мин. Анализ образцов методом ВЭЖХ-МС проводили с использованием тех же элюентов на колонке Zorbax XDB C18, $4,6 \times 50$ мм, 1,8 мкм в линейном градиенте изменения концентрации раствора Б от 10 до 60 % за 15 мин при скорости потока 0,5 мл/мин. ВЭЖХ-МС: R_f 7,4 мин. Масс-спектр (ESI): m/z 990,0 $[M + H]^+$, 495,4 $[M + 2H]^{2+}$. $C_{31}H_{40}Cl_2EuN_7O_{16}$. Вычислено 989,1.

Определение кинетических характеристик взаимодействия конъюгата Хф-ДТТА/Eu³⁺ с антителами к Хф. В лунки планшета с антителами к Хф вносили по 0,1 мл растворов Хф-ДТТК/Eu³⁺ в концентрациях 10^{-8} и $5 \cdot 10^{-10}$ М в буферном растворе 1. Инкубировали в течение 0,5–24 ч при +25 °С с непрерывным встряхиванием. Жидкость из лунок удаляли и промывали 6 раз по 0,35 мл буферным раствором 2. Вносили по 0,2 мл диссоциативно-усиливающего раствора и инкубировали в течение 3 ч при +25 °С со встряхиванием. Измеряли флуоресцентный сигнал в лунках планшета. По результатам трех экспериментов в координатах время–сигнал строили кинетическую зависимость связывания конъюгата **3** с иммобилизованными антителами к Хф.

Определение константы связывания конъюгата Хф-ДТТА/Eu³⁺ с антителами к Хф. В лунки планшета с антителами к Хф вносили по 0,1 м растворов конъюгата **3** в концентрациях от $5 \cdot 10^{-11}$ до $5 \cdot 10^{-9}$ М в буферном растворе 1. Инкубировали в течение 24 ч при + 25 °С со встряхиванием. Жидкость из лунок удаляли и промывали 6 раз по 0,35 мл буферным раствором 2. Вносили по 0,2 мл диссоциативно-усиливающего раствора и инкубировали в течение 3 ч при +25 °С со встряхиванием. Измеряли флуоресцентный сигнал в лунках планшета. Количество связавшегося Хф-ДТТА/Eu³⁺ (B) определяли по калибровочному графику зависимости флуоресцентного сигнала от концентрации Eu³⁺. Количество свободного конъюгата (U) **3** находили как разность между общим количеством внесенного Хф-ДТТА/Eu³⁺ и связанного конъюгата. Строили график в координатах Скэтчарда $B / U = f(B)$ [14]. Константу связывания определяли как тангенс угла наклона прямой, количество сайтов связывания на поверхности лунки, занятой объемом 0,1 мл, рассчитывали по величине отрезка, отсекаемого прямой на оси абсцисс.

Результаты и их обсуждение. Ранее фармацевтическая субстанция «Левомецетин-КМП», которая почти полностью состоит из 3-гемисукцината Хф, была успешно использована для синтеза конъюгатов антибиотика с биотином и пероксидазой хрена и эти продукты нашли применение в ИФА [10–12]. К тому же наш опыт показывает, что в ходе отделения 3-гемисукцината Хф от небольшой примеси 1-гемисукцината этого соединения, например на колонке с силикагелем, происходит «перераспределение» ацильной группы между первичным и вторичным гидроксилами боковой цепи Хф и повторное образование производного по атому С1. Поэтому в данной работе для получения биоконъюгата Хф-ДТТА/Eu³⁺ мы взяли препарат «Левомецетин-КМП» без дополнительных исследований по разделению 1- и 3-гемисукцинатов. После растворения натриевой соли в воде и последующего осаждения подкислением раствора соляной кислотой карбоксильную группу гемисукцината активировали *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии карбодиимида. Активированный эфир **1** вводили в реакцию с аминопроизводным комплексоната Eu⁺³ **2** (рис. 1). За ходом реакции наблюдали с помощью ТСХ. В результате образовывались конъюгат Хф с комплексономатом Eu³⁺ **3**, а также побочный продукт – Хф (вероятно, вследствие гидролиза гемисукцината Хф в присутствии основания), который удаляли из реакционной смеси экстракцией этилацетатом. Окончательную очистку конъюгата **3** осуществляли методом ВЭЖХ. При исследовании фракции, содержащей целевое соединение, методом ВЭЖХ-МС оказалось, что в продукте также содержится примерно 7 % конъюгата комплексоната Eu⁺³ с 1-гемисукцинатом Хф. Возможные причины этого факта обсуждались выше. Масс-спектр конъюгата Хф-ДТТА/Eu³⁺ имеет сложную структуру. Величина m/z , полученная для основного однозарядного молекулярного иона $[M + H]^+$, равняется 990. Также в масс-спектре наблюдали пики с m/z 988, 991, 992, что обусловлено приблизительно равной распространенностью в природе изотопов ¹⁵¹Eu и ¹⁵³Eu, а также наличием в молекуле Хф двух атомов хлора, изотопы которого ³⁵Cl и ³⁷Cl встречаются в природе с вероятностью 75,77 и 24,23 %. Основной двухзарядный молекулярный ион $[M + 2H]^{2+}$ характеризовался m/z 495,4.

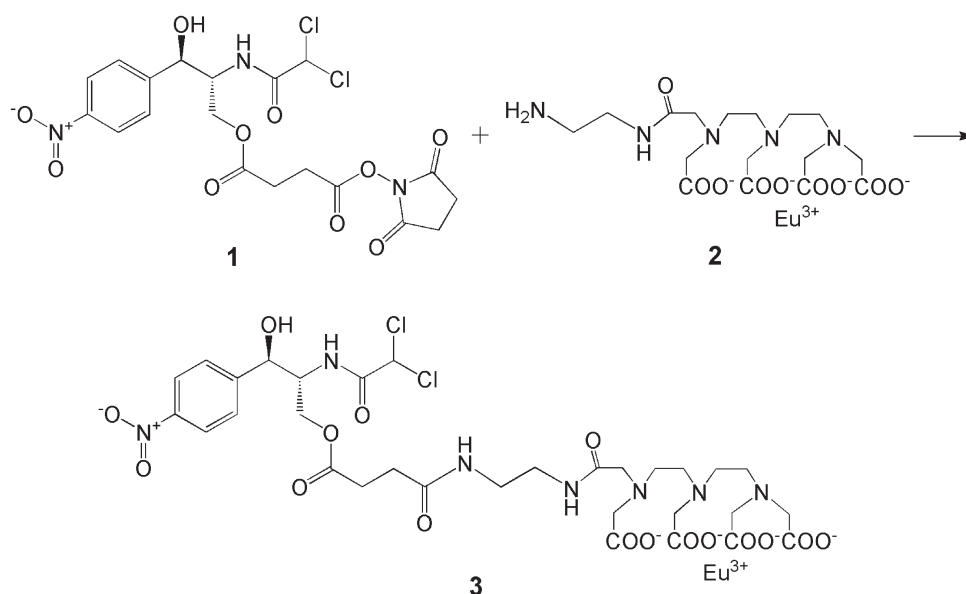


Рис. 1. Схема синтеза конъюгата хлорамфеникола с комплексонатом европия

УФ спектр конъюгата **3** в воде имеет максимум поглощения при 275 нм. Коэффициент экстинкции при 278 нм $\epsilon = 9625 \text{ см}^{-1} \cdot (\text{моль/л})^{-1}$ немодифицированного Хф использовали для определения концентрации конъюгата **3** в растворе.

В системе ИФА, включающей планшет с биоспецифически иммобилизованными антителами кролика к Хф и конъюгат 3-гемисукцината Хф с пероксидазой хрена в качестве детектирующего соединения [10], было проведено сравнение иммунореактивностей Хф и синтезированного Хф-ДТГА/ Eu^{3+} . Из рис. 2 видно, что конъюгат **3** конкурентно ингибирует связывание конъюгата Хф-пероксидаза с антителами примерно в 2 раза сильнее, чем Хф. Это может быть связано с тем, что при получении антител использовался иммуноген, в котором антибиотик присутствовал в виде 3-гемисукцината, присоединенного к инертному белку-носителю [11].

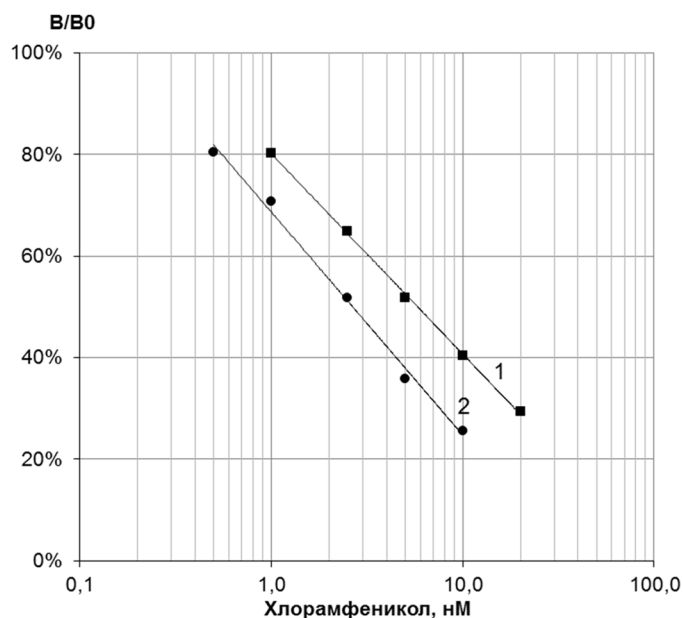


Рис. 2. Конкурентное ингибирование хлорамфениколом (1) и конъюгатом хлорамфеникол-комплексонат Eu^{3+} (2) связывания конъюгата хлорамфеникол–пероксидаза с антителами к хлорамфениколу в системе прямого гетерогенного иммуноферментного анализа

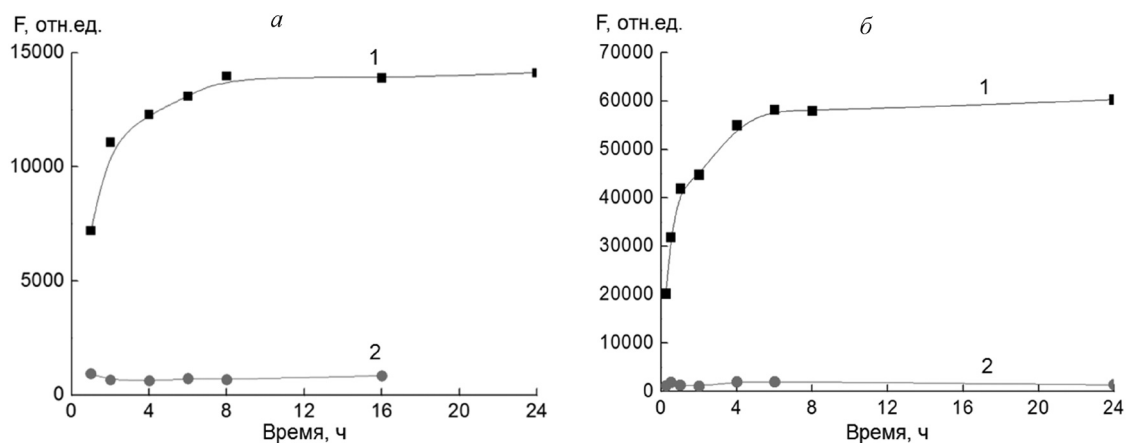


Рис. 3. Зависимости специфического связывания конъюгата хлорамфеникол-комплексонат Eu^{3+} с антителами к хлорамфениколу (1) и фонового сигнала (2) от времени инкубации при $+25\text{ }^\circ\text{C}$ и концентрациях хлорамфеникола в системе 0,1 нМ (а) и 10 нМ (б)

Изучение кинетики образования комплекса белок–лиганд в гетерогенной системе с биоспецифически иммобилизованными в лунках планшета антителами к Хф и конъюгатом **3** в растворе проводили при концентрациях Хф-ДТТА/ Eu^{3+} 0,1 и 10 нМ. Несвязавшийся конъюгат удаляли многократным промыванием лунок. Количество связанного с антителами лиганда определяли по флуоресцентному сигналу, регистрируемому после добавления диссоциативно-усиливающего раствора. Снижение общей концентрации конъюгата **3** в системе привело к увеличению времени наступления равновесия с 6 до 8 ч (рис. 3), при этом инкубация в течение 24 ч не приводила к изменению вышедшего на плато специфического сигнала. На протяжении этого же периода не наблюдали увеличения фонового сигнала. Поэтому последующие эксперименты по определению равновесных параметров связывания Хф-ДТТА/ Eu^{3+} в концентрациях меньших 0,1 нМ проводили путем его инкубации с иммобилизованными антителами в течение 24 ч.

Константу связывания определяли по графику, построенному в координатах Скэтчарда (рис. 4). Ее величина составила $6,2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Такое значение константы ассоциации говорит о высоком сродстве конъюгата к используемым в иммуноанализе антителам. Как правило, поликлональные

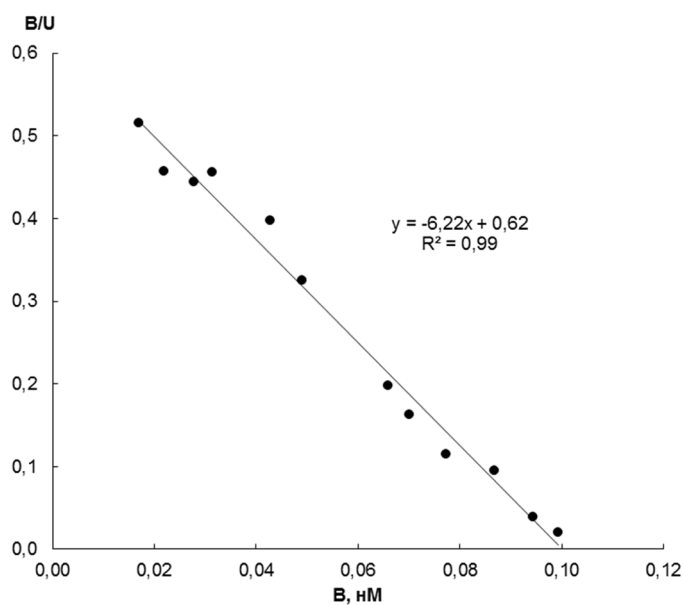


Рис. 4. График Скэтчарда для связывания конъюгата хлорамфеникол-комплексонат Eu^{3+} с иммобилизованными антителами к хлорамфениколу

антитела характеризуются гетерогенностью сродства к антигену, что отражается ломанной прямой на графике Скэтчарда. Исходя из представленной на рис. 4 зависимости следует, что в изученном диапазоне концентраций Хф-ДТТА/Eu³⁺ доминирующий вклад в связывание лиганда вносит высокоаффинный клон. Возможно и то, что выбранные поликлональные антитела в основном содержат высокоаффинные анти-Хф иммуноглобулины. Используя точку пересечения прямой с осью абсцисс, мы рассчитали содержание сайтов связывания на внутренней поверхности лунки, которое оказалось равным 10⁻¹⁴ моль/см².

При обсуждении измеренных параметров связывания конъюгата **3** с иммобилизованными поликлональными антителами к Хф необходимо сделать несколько замечаний. Использованный нами подход позволяет количественно оценить иммунореактивность Хф-ДТТА/Eu³⁺ как силу связывания, которая выражается соответствующей константой. Эта величина может отличаться от истинной константы ассоциации, характеризующей соотношение концентраций свободной и связанной с индивидуальным белком форм лиганда не в гетерогенной системе, а в растворе. С другой стороны, измеренная константа связывания соответствует не истинной аффинности отдельного антитела, а отражает характеристику, более полезную для практики иммуноанализа – avidность антител. Действительно, сродство антител к антигену мы определяли в условиях максимально приближенных к условиям твердофазного иммунохимического анализа. Использование функционализированных твердофазных носителей, которые существенно упрощают процедуру отделения несвязавшихся компонентов реакции, является распространенным приемом при проведении иммунохимических реакций. Поскольку в такой системе один из иммунореагентов неподвижен, то на взаимодействие антитело-антиген оказывает влияние большое число факторов: скорость диффузии растворенного компонента (в нашем случае Хф-ДТТА/Eu³⁺) к твердофазному реагенту (поликлональные антитела к Хф), стерические препятствия, плотность посадки иммобилизованного белка. Проводя измерения и выполняя последующие расчеты, мы к тому же основывались на следующих обоснованных допущениях.

1. В течение 24 ч инкубации в гетерогенной системе, состоящей из иммобилизованных на твердой фазе антител и меченого антигена в растворе, наступает и поддерживается состояние равновесия.

2. На стадии отмывки обеспечивается полное разделение свободного и связанного антителами Хф-ДТТА/Eu³⁺.

3. После внесения в лунки диссоциативно-усиливающего раствора в течение 3 ч инкубации происходит полная диссоциация ионов Eu³⁺ из комплексогена в раствор.

4. Неспецифические взаимодействия в изучаемой системе лиганд-белкового связывания пренебрежимо малы.

Очень хорошая линейная корреляция ($R^2 = 0,99$) экспериментальных точек на графике Скэтчарда (рис. 4) говорит о том, что большинство (если не все) условий 1–4 выполнены в эксперименте.

Заключение. Нами впервые синтезирован и исследован в гетерофазных системах ИФА и ЛИФМА конъюгат Хф с полиаминополикарбоксилатным комплексоном европия. Конъюгированный Хф имел большую иммунореактивность по отношению к поликлональным антителам, чем исходный Хф. Кинетические характеристики и равновесные параметры связывания конъюгата Хф-ДТТА/Eu³⁺ с биоспецифически иммобилизованными антителами в системе ЛИФМА позволяют использовать полученный конъюгат для количественного определения Хф данным методом.

Список использованной литературы

1. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays / I. Hemmilä [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1984. – Vol. 137. – P. 335–343.
2. *Christopoulos, T. K.* Fluorescence immunoassays / T. K. Christopoulos, E. P. Diamandis // *Immunoassay* / eds. E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos. – San Diego, USA: Academic Press, 1996. – Ch. 14. – P. 309–335.
3. *Гарбуз, О. С.* Лантанидный иммунофлуориметрический анализ: научные основы и технические принципы / О. С. Гарбуз, О. В. Свиридов // *ARSmedica.* – 2011. – № 13. – С. 51–61.
4. *Mikola, H.* Labeling of estradiol and testosterone alkyloxime derivatives with a europium chelate for time-resolved fluoroimmunoassays / H. Mikola, A.-Ch. Sundell, E. Hanninen // *Steroids.* – 1993. – Vol. 58. – P. 330–334.

5. *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: прилож. к журн. «Весці НАН Беларусі»: в 5 ч. – 2014. – Ч. 1. – С. 13–19.
6. *Mikola, H.* Syntheses and properties of luminescent lanthanide chelate labels and labeled haptenic antigens for homogeneous immunoassays / H. Mikola, H. Takalo, I. Hemmila // Bioconjugate Chem. – 1995. – Vol. 6. – P. 235–241.
7. Новый подход к иммунохимическому определению брассиностероидов / А. Л. Савчук [и др.] // Докл. НАН Беларусі. – 2015. – Т. 59, № 1. – С. 63–67.
8. Generic lanthanide fluoroimmunoassay for the simultaneous screening of 18 sulfonamides using an engineered antibody / T. Korpitaki [et al.] // Anal. Chem. – 2004. – Vol. 76. – P. 3091–3098.
9. Rapid screening method for halofuginone residues in poultry eggs and liver using time-resolved fluorometry combined with the all-in-one dry chemistry assay concept / V. Hagren [et al.] // Anal. Chim. Acta. – 2005. – Vol. 529. – P. 21–25.
10. *Вашкевич, И. И.* Конструкция и технические характеристики тест-системы для иммуноферментного анализа хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения / И. И. Вашкевич, Т. А. Позняк, О. В. Свиридов // Весці НАН Беларусі. Сер. аграрн. навук. – 2013. – № 1 – С. 93–98.
11. Получение и свойства реагентов для иммуноферментного анализа хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения / И. И. Вашкевич [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 4. – С. 57–65.
12. *Новаковский, М. Е.* Синтез и бифункциональная активность конъюгата хлорамфеникол-биотин / М. Е. Новаковский, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // Докл. НАН Беларусі. – 2010. – Т. 54, № 2. – С. 87–92.
13. Функционализированные металлохелаты на основе диэтилентриаминтетрауксусной кислоты для химической модификации белков и малых биомолекул / О. С. Куприенко [и др.] // Биоорган. химия. – 2015. – Т. 41, № 6. – С. 675–685.
14. *Scatchard, G.* The attractions of proteins for small molecules and ions / G. Scatchard // Ann. NY Acad. Sci. – 1949. – Vol. 51. – P. 660–672.

Поступило в редакцию 23.12.2015