

# СОЗДАНИЕ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ НА БАЗЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ СЕРИИ ICO С ФИКОЭРИТРИНОМ – ФЛУОРОФОРОМ ГРУППЫ ФИКОБИЛИПРОТЕИНОВ

А.С. Гриневич, М.Н. Краева, Е.Н. Захарова, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

**Контакты:** Анатолий Станиславович Гриневич [agrinevich@mail.ru](mailto:agrinevich@mail.ru)

**Введение.** Флуоресцентные зонды на основе моноклональных антител (МКА) широко используются в научных и клинических исследованиях в области онкологии, гематологии, иммунологии, эпидемиологии. Уникальные спектральные свойства природного белка фикоэритрина (РЕ) сделали его доминирующим флуорофором, широко используемым для создания флуоресцентных зондов на основе МКА.

**Цель работы** – создание иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ) на основе МКА и флуоресцентного красителя фикоэритрина двумя альтернативными методами белковой химии.

**Материалы и методы.** В работе были использованы антитела к антигенам Т-лимфоцитов (клон ICO-86, клон ICO-31), флуоресцентный краситель фикоэритрин и бифункциональные агенты SPDP и SMCC. Для выделения и очистки МКА использовали методы жидкостной хроматографии: на I этапе – аффинное выделение иммуноглобулинов на иммобилизованном белке G или в качестве альтернативы – анионообменную колоночную хроматографию. Для очистки конъюгатов (ИФЗ) от исходных компонентов реакции использовали гель-фильтрацию на колонке PD-10. Концентрацию и плотность мечения ИФЗ определяли спектрофотометрически.

**Результаты.** Конъюгирование МКА с РЕ проводили при молярном отношении компонентов 1 : 2. Мы использовали 2 метода белковой химии для получения конъюгатов на основе МКА с РЕ. Для этого оба компонента реакции конъюгации – РЕ и МКА – предварительно были раздельно модифицированы. Показано, что для создания ИФЗ на базе МКА серии ICO применимы оба приведенных метода конъюгирования МКА с РЕ, однако метод II, при котором химической модификации бифункциональным агентом SMCC подвергается только молекула РЕ по ее свободным аминогруппам, а молекула иммуноглобулина сохраняется в максимально нативном состоянии, исключая дозированное восстановление части дисульфидных групп, является предпочтительным.

**Заключение.** Способы, описанные в статье, позволяют получать ИФЗ на основе МКА серии ICO и РЕ, сравнимые по своим аналитическим характеристикам с зарубежными коммерческими аналогами.

**Ключевые слова:** моноклональное антитело, иммунофлуоресцентный зонд, фикоэритрин, конъюгат МКА

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-39-47

## THE CREATION OF IMMUNOFLUORESCENCE PROBES BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES SERIES ICO AND PHYCOERYTHRIN – FLUOROPHORE OF PHYCOBILIPROTEIN GROUP FOR ANALYSIS OF CELL POPULATIONS BY FLOW CYTOMETRY

A.S. Grinevich, M.N. Kraeva, E.N. Zakharova, D. Yu. Blokhin, P.K. Ivanov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia;  
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

**Introduction.** Fluorescent probes based on monoclonal antibodies (MAb) are widely used in scientific and clinical research in the field of oncology, hematology, immunology, epidemiology. The unique spectral properties of the natural protein, phycoerythrin (PE), made it the dominant dye widely used for the preparation of fluorescent probes based on MAb.

**Objective.** To create of fluorescent probes based on the MAb and the fluorescent dye PE by two alternative methods of protein synthesis.

**Materials and methods.** MAb to T lymphocyte antigen (clone ICO-86, clone ICO-31), fluorescent dye PE and bifunctional agents SPDP and SMCC were used in the work. Liquid chromatography methods were used for isolation and purification of MAb: in the first step, affinity isolation of immunoglobulins on the immobilized protein G or anion exchange column chromatography. Gel filtration on a PD-10 column was used to purify the conjugates (immunofluorescent probes, IFP) in the second step, the concentration and labeling density of the IFP were determined spectrophotometrically.

**Results.** Conjugation of MAb with PE was carried out at a molar ratio of components of 1 : 2. For this both components of the conjugation reaction (PE and MAb) were separately modified. For the creation of IFP on the basis of the MAb of the ICO series, both methods of conjugation of MAb with PE are applicable, but method II, in which the chemical modification by the bifunctional SMCC agent is exposed only to the PE molecule by its free amino groups, and the immunoglobulin molecule is conserved in the maximally native state is preferred. **Conclusion.** The methods described in the article allow to obtain immunofluorescent probes based on antibodies of the ICO series that are comparable in their analytical characteristics to foreign commercial analogs.

**Key words:** monoclonal antibody, immunofluorescence probe, phycoerythrin, conjugate of MAb

## Введение

Аналитические характеристики метода проточной цитометрии, широко используемого для мультипараметрического анализа клеточных суспензий, неразрывно связаны с выбором адекватных средств и методов флуоресцентной маркировки клеточных биомакромолекул. При этом важны как собственно оптические свойства используемых флуорофоров (спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции, квантовый выход и др.), так и адресность этой маркировки, обеспечивающая избирательное мечение целевых биомолекул, и количественная пропорциональность такой маркировки исходному содержанию целевого субстрата — стехиометрическое соотношение. Таким требованиям отвечают флуоресцентные зонды, которыми в зависимости от задачи исследования могут быть как собственно флуорофоры с определенными свойствами (пропидия йодид избирательно и количественно связывается с двуспиральной молекулой ДНК), так и специально созданные надмолекулярные конструкции, в которых молекулы специфического лиганда, играющего роль вектора для адресной маркировки определенных биомолекул (белок аннексин специфически связывается с фосфатидилсерином), предварительно маркируются активным флуорофором. Применение в качестве вектора молекул высокоспецифичных моноклональных антител (МКА), адресно связывающихся с искомыми антигенными детерминантами на поверхности или в цитоплазме анализируемых клеток, практически безгранично расширяет возможности метода цитометрического анализа клеточных популяций. На базе конъюгированных с соответствующими флуорофорами МКА создают иммунофлуоресцентные зонды (ИФЗ) для использования во флуоресцентной, в том числе конфокальной, микроскопии и проточной цитометрии. Однако, несмотря на огромное количество способных к флуоресценции веществ, список флуорофоров, пригодных к использованию в качестве метки в ИФЗ для проточной цитометрии, резко ограничен жесткими требованиями к их физико-химическим и биохимическим свойствам. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции таких веществ должны совпадать с оптическими диапазонами, предусмотренными для этого в конструкции

цитометра; их конъюгирование с МКА не должно существенно изменять их собственных оптических характеристик, а также биологической активности и антигенной специфичности МКА. Желательным, хотя и необязательным, свойством таких веществ должна быть их способность к необратимому (чаще всего ковалентному) связыванию с молекулой МКА. Этим свойством обладают промышленно выпускающиеся активные формы флуорофоров в виде изотиоцианатных производных (FITC), сукцинимидных или малеимидных эфиров (Cy<sup>3</sup>, Imd-306, Imd-506, Alexa flour), опыт применения которых для создания ИФЗ описан нами ранее [1].

Уникальные спектральные свойства природных белков — фикобилипротеинов фикоэритрина (РЕ) и аллофикоцианина (АРС) сделали их доминирующими маркерами, широко применяющимися для получения ИФЗ на основе МКА [2]. Фикобилипротеины — группа красных и синих пигментов, содержащихся в красных водорослях и цианобактериях и участвующих в процессах фотосинтеза у этих организмов [3]. Хромофорная группа пигмента, называемая фикобилином, ковалентно связана с водорастворимым белком типа глобулина и представляет собой структуру, состоящую из 4 пиррольных колец, но не замкнутых, как в молекуле хлорофилла, а имеющих вид развернутой цепи, не содержащей металла. Молекулы фикобилипротеинов состоят из 2 нековалентно связанных и неидентичных субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$ , к каждой из которых ковалентно присоединены хромофорные группы: фикоэритробилин или фикоцианобилин. Они отличаются рекордными коэффициентами экстинкции и независимостью оптических характеристик от присутствия в растворе тушителей флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции у этих веществ очень высок — у В-РЕ он близок к 1,0. Способность фикобилипротеинов к флуоресценции устойчива к «выгоранию», а прямая пропорциональность интенсивности флуоресценции количеству молекул флуорофора создает надежную базу для выполнения количественных измерений. По своей оптической эффективности фикобилипротеины превосходят флуоресцеин в 30 раз, а родамин — в 100 раз (в одинаковых спектральных диапазонах), их флуоресценция мало зависит от pH. Практическое

увеличение чувствительности по сравнению с FITC-мечеными антителами составляет 5–10 раз [4]. PE поглощает сине-зеленый и зеленый свет, а APC — оранжевый и красный свет [5]. Пик абсорбции R-PE — 565 нм, дополнительный пик абсорбции — 498 нм, максимум эмиссии — 573 нм, что позволяет возбуждать флуоресценцию световым лучом стандартного для проточных цитометров аргонного лазера (488 нм) и регистрировать сигнал в канале FL2 (575–595 нм). APC имеет пик абсорбции 652 нм и добавочный пик 625 нм, максимум эмиссии — 657,5 нм. Флуоресценция возбуждается светом гелий-неонового и диодного лазеров (633–635 нм), сигнал регистрируется в канале FL4 (650–670 нм).

В отличие от низкомолекулярных флуорофоров (FITC, Cy<sup>3</sup>, Alexa fluor) эти природные белки обладают значительной молекулярной массой (ММ), не только сравнимой, но даже превосходящей массу иммуноглобулиновых (Ig) молекул МКА, а также невозможностью их коммерческого выпуска в активной форме, способной к самостоятельному конъюгированию с МКА, в связи с чем для создания конъюгатов «МКА — фикобилипротеин» используются методы белковой химии. Основным подходом для получения таких конъюгатов является использование так называемых бифункциональных агентов. В научной литературе и коммерческих наборах для получения флуоресцентных конъюгатов (фирмы AnaSpec, Biotmax, Abnova и др.) описывается применение 2 основных бифункциональных агентов: сукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) и N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионата (SPDP) [6, 7]. На белковых молекулах при этом в реакцию вовлекаются аминокислоты лизина и аргинина, а также восстановленные до сульфгидрильных групп «дисульфидные мостики» IgG в области «моста» — месте сшивки между собой 2 тяжелых цепей IgG.

**Метод I:** МКА и молекулу фикобилипротеина модифицируют низкомолекулярными реагентами таким образом, что при совместной инкубации полученных производных образуется комплекс, в котором модифицирующие на I этапе реагенты выступают в роли мостика — спейсера. На I этапе молекулу PE модифицируют по белковым аминокислотам SPDP. На следующем этапе полученный продукт обрабатывают дитиотреитолом (DTT), что приводит к образованию на поверхности молекулы PE сульфгидрильных групп. Параллельно с этим антитела модифицируются SMCC, что приводит к формированию на их поверхностях малеимидных групп. На заключительном этапе полученные производные совместно инкубируются, малеимидные и сульфгидрильные группы взаимодействуют, образуя ковалентную связь (рис. 1).

**Метод II:** в этой методике химической модификации бифункциональным агентом SMCC подвергается молекула фикобилипротеина по ее свободным аминокислотам. Образовавшееся производное имеет свободные малеимидные группировки, способные ко взаимодействию с сульфгидрильными группами. Для получения таких групп молекулы IgG МКА обрабатывают DTT. Совместная инкубация обоих модифицированных белков приводит к образованию ковалентного конъюгата фикобилипротеина с IgG (рис. 2).

Среди продуктов последней стадии реакции, кроме конъюгата, присутствуют не вступившие в реакцию молекулы фикобилипротеина и МКА, присутствие которых абсолютно недопустимо для последующего использования конъюгата в качестве ИФЗ, поскольку свободный IgG будет конкурентно ингибировать связывание ИФЗ с адресным антигеном, снижая интенсивность флуоресцентного сигнала. Поскольку исходные компоненты реакции конъюгирования имеют собственные ММ 180 кДа (МКА) и 250 кДа (фикобилипротеины), а образовавшийся конъюгат ММ >400 кДа, разделение белковых молекул традиционно проводят методом гель-фильтрации.

**Цель** настоящей работы — создание ИФЗ на базе конъюгатов МКА серии ICO с фикобилипротеином R-PE двумя альтернативными методами белковой химии.

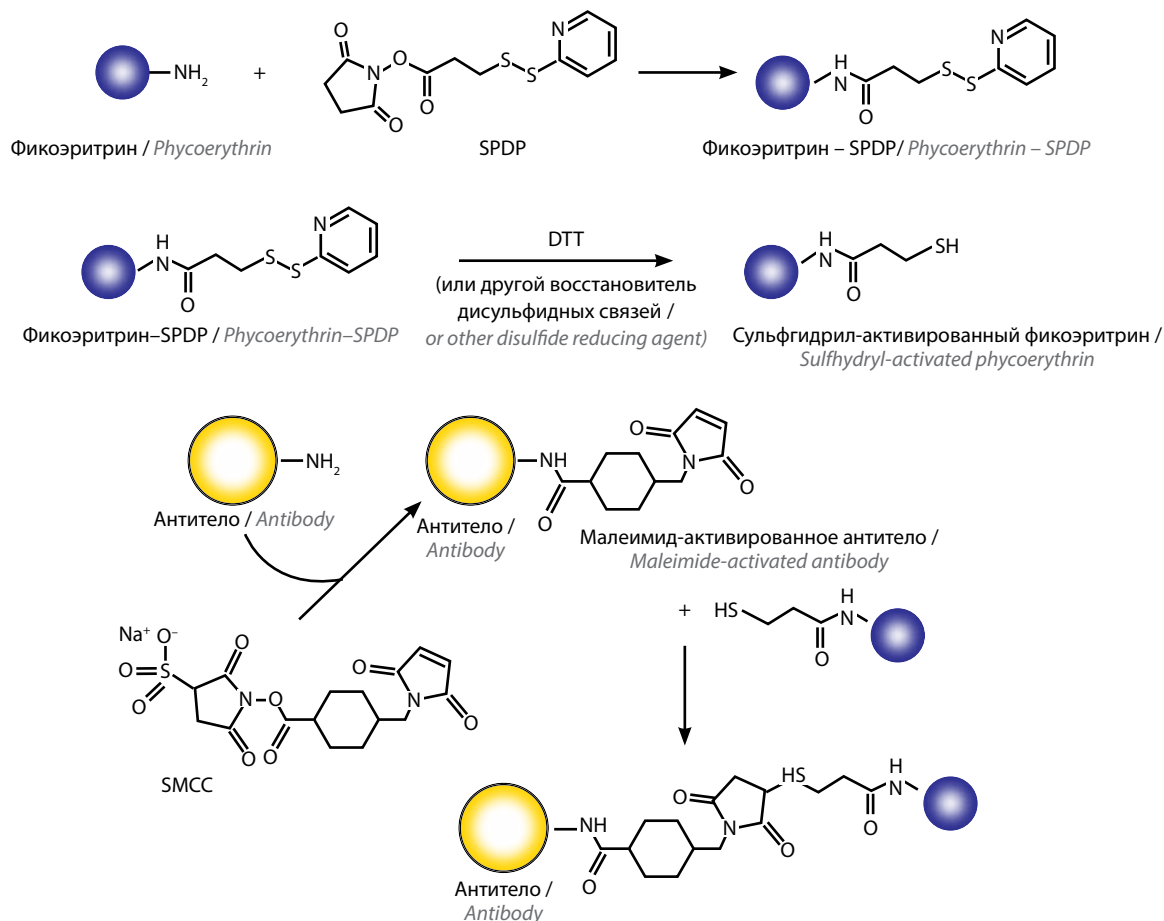
## Материалы и методы

### Материалы и оборудование

Флуоресцирующий белок R-PE, бифункциональные агенты SPDP и SMCC, DTT, диметилсульфоксид (DMSO), N-этилмалеимид (Sigma-Aldrich, США); жидкостный хроматограф ÄKTA Purifier-10 и хроматографические колонки для аффинной (HiTrap rProtein G), анионообменной (Mono Q 10/100) и гель-эксклюзионной (Superdex 200 10/300) хроматографии (GE Healthcare Life Sciences, США), мембранные микрофильтры с порами 0,45 и 0,22 мкм, центрифужные мембранные концентраторы Centricon-30, гель-фильтрационные микроколонки PD-10 (Millipore, США); спектрофотометр Ultraspec 3100 pro (Amersham Biosciences, Великобритания); проточный цитометр FACSCalibur (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest, контрольный препарат МКА a-CD4/PE (BD Biosciences, США).

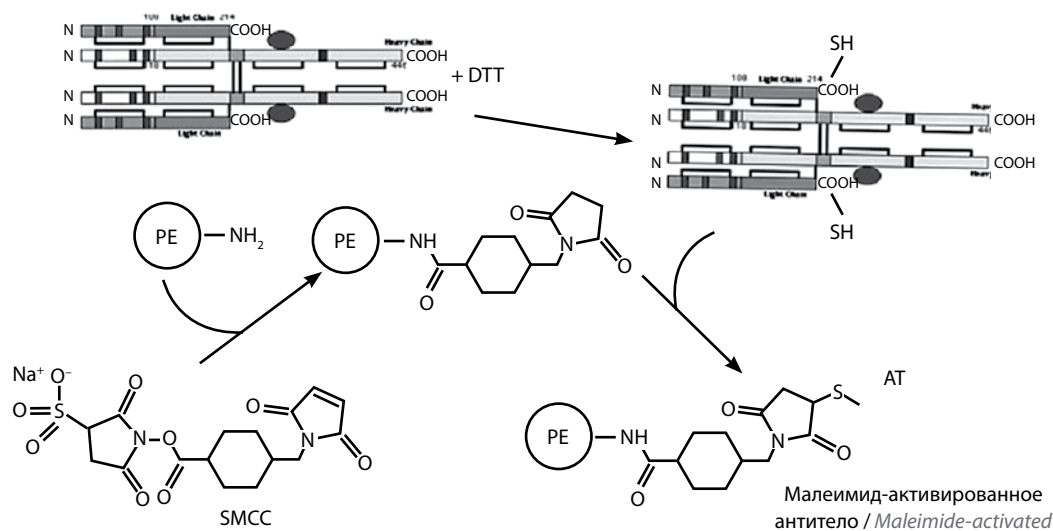
### Методы

Моноклональные антитела серии ICO-86 к антигену CD4 и ICO-31 к антигену CD8 Т-лимфоцитов человека выделяли из асцитной жидкости мышей, которым внутрибрюшинно инокулированы продуцирующие эти антитела гибридные клетки, ранее полученные методами гибридомной технологии



**Рис. 1.** Получение конъюгата МКА (IgG) с PE по методу I. SPDP – *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат, DTT – дитиотреитол, SMCC – сукцинимидил-4-[*N*-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилат.

Fig. 1. Preparation of Mab conjugates (IgG) with PE by the method I. SPDP stands for *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, DTT – dithiothreitol, SMCC – succinimidyl-4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate.



**Рис. 2.** Получение конъюгата МКА (IgG) с PE по методу II

Fig. 2. Preparation of Mab conjugates (IgG) with PE by the method II



и клонирования. Поскольку для конъюгирования с РЕ требуются высокоочищенные препараты Ig, в настоящей работе для выделения и очистки МКА использовали методы жидкостной хроматографии: на I этапе — аффинное выделение Ig на иммобилизованном белке G или в качестве альтернативы — анионообменную колоночную хроматографию, а на II — освобождение от неполно-сборных фрагментов и молекулярных агрегатов гель-эксклюзионной хроматографией (гель-фильтрацией).

#### Очистка МКА на иммобилизованном белке G

Центрифугированием 60 мин при угловом ускорении 350 g осветляли 5–10 мл асцитной жидкости, супернатант разводили равным объемом 0,1 М фосфатно-солевого буфера с 0,15 М NaCl, pH 7,4 (PBS) и оставляли на ночь при +4 °C. Надосадочную жидкость после повторного центрифугирования при тех же режимах пропускали через фильтр 0,45 мкм и наносили на колонку HiTrap rProtein G, уравновешенную PBS. Нанесенный на колонку материал тщательно отмывали PBS до значений оптической плотности элюата на выходе из колонки >0,002 ОЕ. После окончания отмывки элюацию Ig проводили буфером 0,1 М глицин-HCl, pH 3,0, собирали выходящие из колонки белковые фракции, немедленно защелачивая их до pH 7,5–8,0 добавлением 1 М Трис-HCl буфера, pH 9,0. Собранные фракции объединяли, переводили в PBS с 1 mM ЭДТА, концентрировали до содержания белка 8–12 мг/мл и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм.

#### Очистка МКА на анионообменном сорбенте Mono Q

Центрифугированием 60 мин при ускорении 350 g осветляли 5–10 мл асцитной жидкости, к супернатанту при постоянном перемешивании по каплям добавляли равный объем насыщенного при +4 °C водного раствора аммония сульфата и выдерживали 15–20 мин для формирования преципитата. Осадок отделяли центрифугированием 30 мин при ускорении 350 g, растворяли в буфере 0,1 М Трис-HCl с 0,15 М NaCl, pH 8,0 (TBS) и повторяли процедуру высаливания так, как это описано выше. Осадок растворяли в 10 mM Трис-HCl буфере pH 7,8 и наносили на колонку Mono Q 10/100, уравновешенную тем же буфером. Хроматографию проводили на хроматографе ÄKTA Purifier-10 со скоростью потока 1 мл/мин, выход белковых продуктов оценивали денситометрией элюата при 280 нм. После отмывки колонки от несвязавшейся белковой фракции на колонку подавали градиент 0–40 % 1 М раствора NaCl в буфере 10 mM Трис-HCl, pH 7,8. Собирали фракции объемом по 1 мл для их последующего анализа методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли на на-

личие IgG и оценки степени чистоты препарата. Фракции, имеющие молекулярную гомогенность >95 %, объединяли, переводили в PBS с 1 mM ЭДТА, концентрировали до содержания белка 8–12 мг/мл и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм.

#### Очистка препаратов МКА от фрагментов и молекулярных агрегатов гель-эксклюзионной хроматографией

Препараты МКА, полученные описанными выше методами, очищали на гель-эксклюзионной колонке среднего давления Superdex 200 10/300, предварительно откалиброванной с помощью маркеров ММ. На колонку наносили 0,6–1,0 мл раствора МКА в PBS с 1 mM ЭДТА и проводили разделение при скорости потока PBS с 1 mM ЭДТА 0,5 мл/мин. Выход белковых продуктов оценивали денситометрией элюата при 280 нм. Фракции, соответствующие гомогенному препарату IgG, объединяли, концентрировали до содержания белка 8–12 мг/мл и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм.

Выделенные и очищенные до гомогенного состояния МКА тестировали в непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкг/мл для оценки степени сохранения ими иммунологической реактивности и специфичности, после чего использовали иммунореактивные МКА для их конъюгирования с РЕ одним из 2 альтернативных методов. Полученные в результате конъюгирования продукты после их очистки (см. *Результаты*) тестировали в прямой РИФ для оценки качества полученных ИФЗ.

#### Прямая реакция иммунофлуоресценции

Для выполнения прямой РИФ к образцам (100 мкл) венозной крови здоровых доноров добавляли 20 мкл раствора полученного ИФЗ, инкубировали в течение 20 мин при 18–25 °C, лизировали эритроциты раствором FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США), осаждали клетки центрифугированием (5 мин, 300 g), ресуспендировали и дважды промывали PBS, фиксировали полученные препараты PBS с добавлением 0,4 % формальдегида.

#### Проточная цитометрия

В работе использован проточный двулучевой цитометр FACS Calibur (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest. Возбуждение флуоресценции происходило при прохождении клеткой фокального пятна аргонового лазера (мощность 15 mW, длина волны 488 нм). Флуоресценцию учитывали в спектральном диапазоне 575–595 нм (FL2), соответствующем спектру эмиссии РЕ. Для анализа клеточных популяций учитывали также показатели прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания,

на основании которых выполняли процедуру гейтирования — программного «выделения» субпопуляции лимфоцитов и дискриминацию из анализа иных клеточных субпопуляций. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов. Обработку файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8, находящегося в свободном доступе в сети Интернет. Настройка рабочего протокола анализа выполнена по рекомендациям С.В. Хайдукова [8].

### Результаты

Конъюгирование МКА с РЕ выполняли при молярном соотношении компонентов 1 : 2. Для этого отдельно модифицировали оба компонента реакции конъюгирования — РЕ и МКА.

#### Получение конъюгатов МКА и РЕ с применением I метода синтеза

В 500 мкл раствора PBS с 1 mM ЭДТА растворяли 0,75 мг РЕ, к полученному раствору добавляли 16 мкл раствора SPDP в DMSO с концентрацией 1,33 мг/мл, реакционную смесь инкубировали 2,5 ч при комнатной температуре в обернутой фольгой пробирке на роторном смесителе при постоянном помешивании, после чего в пробирку с реакционной смесью добавляли 30 мкл 0,5 M раствора DTT в PBS с 1 mM ЭДТА и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 30 мин.

К 120 мкл раствора МКА в PBS с 1 mM ЭДТА (2,5 мг/мл) добавляли 5 мкл раствора SMCC в DMSO (1,75 мг/мл), реакционную смесь инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре с периодическим встряхиванием.

После завершения инкубации обоих компонентов модифицированные РЕ и МКА освобождали от непрореагировавших реагентов и низкомолекулярных продуктов гель-фильтрацией на колонках PD-10 (Sephadex-25), элюируя их PBS с 1 mM ЭДТА. Полученные растворы дериватов РЕ и МКА объединяли в 1 пробирку и инкубировали при +4 °C в темноте в течение 16 ч, постоянно помешивая на роторном смесителе. Реакцию конъюгирования останавливали добавлением 40 мкл 0,1 mM раствора N-этилmaleимида в DMSO с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 45 мин. Полученный продукт концентрировали на центрифужном мембранном концентраторе Centricon-30 до объема ≈0,5 мл.

#### Получение конъюгатов МКА с РЕ с применением II метода синтеза

0,75 мг РЕ растворяли в 500 мкл р-ра PBS с 1 mM ЭДТА, к полученному раствору добавляли 12 мкл раствора SMCC в DMSO с концентрацией 10 мг/мл, реакционную смесь инкубировали 1 ч при комнатной

температуре в обернутой фольгой пробирке на роторном смесителе.

К 60 мкл раствора МКА в PBS с 1 mM ЭДТА (5 мг/мл) добавляли 4 мкл 0,5 M раствора DTT в том же буфере и инкубировали 30 мин при комнатной температуре с периодическим встряхиванием.

После завершения периода инкубации реакцию модифицирования РЕ и МКА останавливали, разделяя ее компоненты гель-фильтрацией на колонках PD-10, оба деривата объединяли в одной пробирке и инкубировали в темноте в течение 16 ч при +4 °C, как это подробно описано выше. Реакцию конъюгирования останавливали добавлением N-этилmaleимида, продукт концентрировали на мембранном концентраторе до объема ≈0,5 мл.

#### Разделение продуктов конъюгации

Материал, полученный на предыдущих этапах по I и II методикам конъюгирования, наносили на гель-эксклюзионную колонку Superdex 200 10/300, уравновешенную PBS, и проводили хроматографическое разделение продуктов реакции при скорости потока 0,5 мл/мин, детектируя выход продуктов денситометрией при длинах волн 280 и 565 нм. Фракцию, содержащую конъюгат МКА с РЕ (на рис. 3 выделена голубым фоном), собирали и рассчитывали «плотность метки» МКА по формуле:

$$D/P = C_{PE}/C_{IgG},$$

где  $C_{PE} = OD_{565}/1960000$ ,  
 $C_{IgG} = (OD_{280} - 0,18 * OD_{565})/203000$ .

Оптимальная «плотность метки» должна составлять 0,8–1,6.

После разделения очищенные конъюгаты стабилизируют добавлением раствора бычьего сывороточного альбумина до конечной концентрации 10 мг/мл, консервируют добавлением азида натрия (до 0,1 %) и стерилизуют фильтрацией через фильтр 0,22 мкм.

На рис. 3 показаны хроматографические профили продуктов реакции конъюгирования МКА а-CD4 (IC0-86), выполненной двумя альтернативными методами, полученные при двухволновом режиме детектирования. Видно, что при использовании метода I образуются более высокомолекулярные продукты, что вызывает асимметрию соответствующего хроматографического пика. Соответственно, и средняя «плотность метки» конъюгата, полученного по методу I, составляет 1,4, в то время как для конъюгата, полученного по методу II, она составила 1,1, что приближается к эквимольному соотношению — на 1 молекулу Ig привязана 1 молекула флуорофора.

Для оценки специфической иммунореактивности полученных конъюгатов были произведены серийные

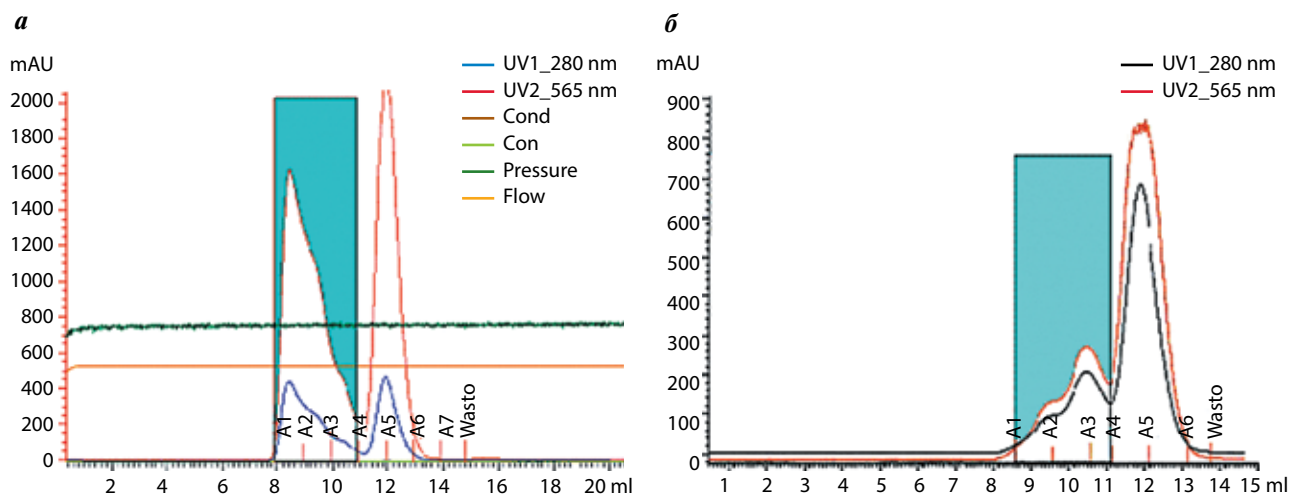


Рис. 3. Хроматограммы разделения продуктов конъюгирования МКА  $\alpha$ -CD4 (ICO-86) с PE по методам I (а) и II (б). Голубая область соответствует фракциям, взятым для дальнейшего цитометрического исследования

Fig. 3. Separation chromatograms of ICO-86 conjugation products with PE by the method I (a) and the method II (b). The blue area corresponds to the fractions taken for cytometric analyses (ICO-86-1 and ICO-86-2 respectively)

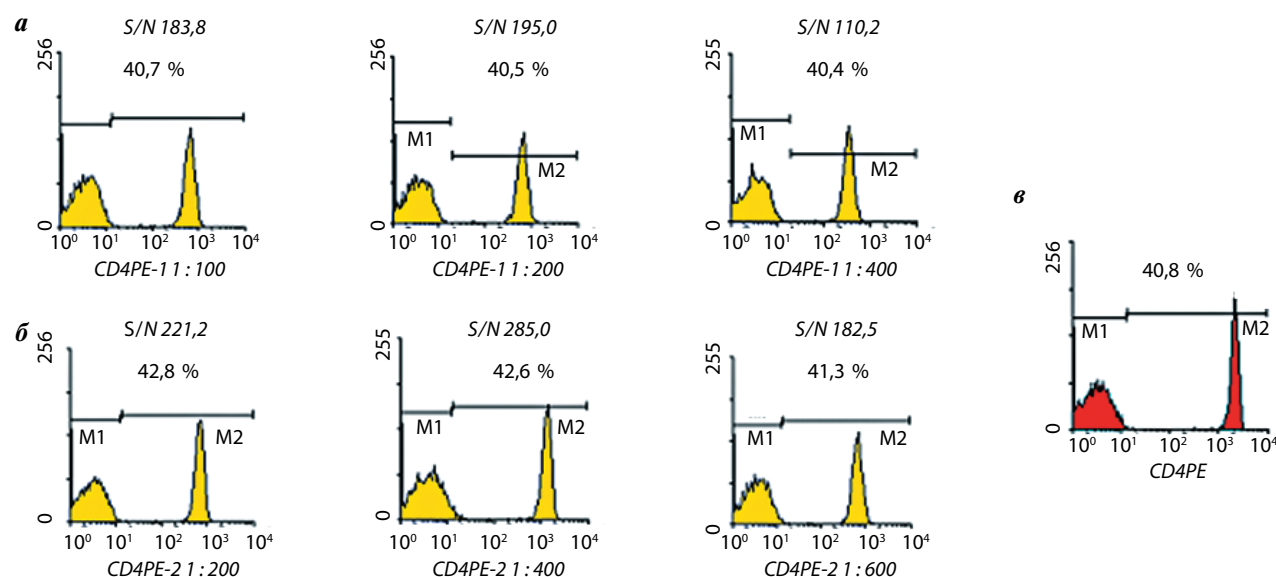


Рис. 4. Гистограммы CD4 положительных клеток, полученные с помощью конъюгатов: а – ICO-86-1 в разведениях 1 : 100, 1 : 200 и 1 : 400; б – ICO-86-2 в разведениях 1 : 200, 1 : 400 и 1 : 600; в – анти-CD4-PE конъюгатом фирмы BD Biosciences в рабочем разведении

Fig. 4. Histograms of CD4 positive cells obtained by conjugates: а – ICO-86-1 in 1 : 100, 1 : 200 and 1 : 400 dilutions; б – ICO-86-2 in 1 : 200, 1 : 400 and 1 : 600 dilutions; в – with anti-CD4-PE conjugat BD Biosciences in the working dilution

разведения обоих препаратов, и полученные растворы использованы для выполнения прямой РИФ с образцами крови здорового донора. На рис. 4 представлены результаты РИФ, учтенные методом проточной цитометрии, для разных разведений исходных конъюгатов, полученных по методам I (обозначено на рисунке как CD4PE-1) и II (CD4PE-2). Видно, что смещение пика специфической флуоресценции (правый пик на каждой гистограмме) влево и, соответственно, снижение соотношения сигнал/шум (обозначено S/N XXX в верхней части каждой гистограммы)

наблюдаются для конъюгатов CD4PE-1 при разведениях  $>1 : 200$ , а для конъюгатов CD4PE-2 – для разведений  $>1 : 400$ , следовательно, именно такие значения предельных разведений, после которых результаты цитометрического анализа начинают искажаться (снижается регистрируемая интенсивность специфической флуоресценции), следует принимать за рабочий титр соответствующих реагентов. В нижней части рис. 4 представлена гистограмма цитометрического анализа того же образца крови с использованием в качестве ИФЗ контрольного

препарата МКА а-CD4/РЕ (BD Biosciences, США) — количественные результаты измерения доли CD4-позитивных клеток, выявленные с применением созданных в рамках настоящей работы ИФЗ и контрольного коммерческого реагента, полностью совпадают.

Таким образом, оба метода конъюгирования МКА с РЕ позволяют получать ИФЗ, пригодные для исследований клеточных популяций методом проточной цитометрии, однако по полученным результатам (более низкий уровень включения метки, близкий к эквимолярному, более высокий иммунометрический титр конечного продукта, более высокое соотношение сигнал/шум) позволяет отдать предпочтение методу II.

Поскольку описанная методика получения ИФЗ с использованием РЕ в качестве флуорофора представляется значительно более громоздкой в сравнении с применением для тех же целей низкомолекулярных активных флуоресцентных красителей, возникает вопрос о целесообразности столь тщательной предварительной очистки МКА перед выполнением реакции конъюгирования.

Для оценки важности тщательной очистки исходных МКА перед их конъюгированием с РЕ использовали МКА а-CD8 (ICO-31), выделенные из асцитной жидкости мышей методом сульфатного осаждения с последующей анионообменной хроматографией на колонке Моно Q. В результате реализации предпочтительного метода II конъюгирования на выходе процесса получили продукт с невысокой

«плотностью метки» ( $<0,8$ ) и показывающий низкий рабочий титр ИФЗ ( $<1 : 50$ ). Те же самые препараты МКА, дополнительно очищенные гель-эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex 200 10/300, так же как МКА того же клона, выделенные из асцитной жидкости на аффинном сорбенте HiTrap rProtein G, после выполнения конъюгирования с РЕ по методике II показали сопоставимые результаты: «плотность метки» конъюгатов составила 1,1 и 1,2 соответственно, а рабочий титр обоих реагентов был равен  $1 : 200$ .

Вместе с тем отдельные из используемых нами клонов МКА не выдерживали процедуры аффинной очистки на белке G, утрачивая специфическую иммунореактивность в процессе кислотной элюции, что следует учитывать при выборе метода для работы с каждым конкретным клоном МКА.

### Заключение

Для создания ИФЗ на базе МКА серии ICO применимы оба приведенных метода конъюгирования МКА с РЕ, однако метод II, при котором химической модификации бифункциональным агентом SMCC подвергается только молекула РЕ по ее свободным аминогруппам, а молекула Ig сохраняется в максимально нативном состоянии, исключая дозированное восстановление части дисульфидных групп, является предпочтительным. Предварительная тщательная многостадийная очистка МКА позволяет в лабораторных условиях получить продукт, не уступающий по своим аналитическим характеристикам зарубежным коммерческим аналогам.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Копырулина М.Е., Захарова Е.Н., Заботина Т.Н. и др. Технология создания и свойства иммунофлуоресцентных зондов с меткой Alexa-488 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):70–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-70-75. [Kopyulina M.E., Zakharova E.N., Zabolina T.N. et al. The technology of creation and quality testing of immunofluorescent probes with dye Alexa-488 for analysis of cellular populations by flow cytometry. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):70–5/ (In Russ.)].
2. Parks D.R., Herzenberg L.A. Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and application in lymphoid cell biology. Methods Enzymol 1984;108:197–241. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)08086-1.
3. Oi V.T., Glazer A.N., Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. J Cell Biol 1982;93(3):981–6. DOI: 10.1083/jcb.93.3.981.
4. Kronick M.N., Grossman P.D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. Clin Chem 1983;29(9):1582–6.
5. Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th edn. Eugene, OR. Molecular Probes 2002; 1.3.
6. Hardy R.R., Weir D.M., Herzenberg L.A. et al. Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry. In: Handbook of Experimental Immunology, 4th edn. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1986.
7. Mahmoudian J., Jeddi-Tehrani M., Hodjattallah Rabbani H. Conjugation of r-phycoerythrin to a polyclonal antibody and f(ab')<sub>2</sub> fragment of a polyclonal antibody by two different methods. Avicenna J Med Biotechnol 2010;2(2):87–91.
8. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа. Медицинская иммунология 2007;9(6):569–74. [Khaidukov S.V. Approaches to standardization of the flow cytometry method for cells immunophenotyping. Cytometers adjustment and preparation of protocols for analysis. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2007;9(6):569–74. (In Russ.)].



**Вклад авторов**

А.С. Гриневич: получение иммунофлуоресцентных зондов, обзор публикаций по теме статьи;

М.Н. Краева: получение препаратов очищенных моноклональных антител;

Е.Н. Захарова: оценка специфической активности иммунофлуоресцентных зондов методом проточной цитометрии, обзор публикаций по теме статьи, написание рукописи статьи;

Д.Ю. Блохин: анализ данных, написание рукописи статьи;

П.К. Иванов: разработка дизайна исследования.

**Author's contributions**

A.S. Grinevich: preparation of immunofluorescent probes, literature review;

M.N. Kraeva: preparation of purified monoclonal antibodies;

E.N. Zakharova: evaluation of specific activity of immunofluorescent probes using flow cytometry, literature review, manuscript preparation;

D.Yu. Blokhin: data analysis, manuscript preparation;

P.K. Ivanov: study design.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Е.Н. Захарова/E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

Д.Ю. Блохин/D.Yu. Blokhin: <https://orcid.org/0000-0002-4322-8430>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соблюдение правил биоэтики.** Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

**Compliance with principles of bioethics.** The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 22.02.2019. Принята к печати: 05.08.2019.

Article received: 22.02.2019. Accepted for publication: 05.08.2019.