

# СОЗДАНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ МЕТОДОМ МОДИФИКАЦИИ ОЛИГОСАХАРИДОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ФЛЮОРЕСЦЕИН-5-ТИОСЕМИКАРБАЗИДОМ

А.С. Гриневич, И.В. Чинарева, О.С. Бурова, П.К. Иванов

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

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

**Введение.** Моноклональные антитела (МКАТ) — надежный инструмент диагностики различных заболеваний человека. В этом качестве их используют в виде конъюгатов с флуоресцентными и иными метками. Классический подход создания таких конъюгатов сводится к химическим реакциям, использующим белковую основу МКАТ. Вместе с тем для целого ряда МКАТ синтез конъюгата сопровождается встраиванием метки в антигенсвязывающий участок, что приводит к уменьшению или полной потере специфической активности конъюгата. Для выхода из данной ситуации предлагается синтез флуоресцентных конъюгатов методами углеводной химии через пространственно удаленные от активного центра олигосахариды антител.

**Цель исследования** — получение активных и стабильных при хранении конъюгатов антител серии ICO на основе реакции ковалентного включения флуоресцентной метки в олигосахаридную последовательность МКАТ.

**Материалы и методы.** В исследовании были использованы МКАТ серии ICO высокой степени очистки. Олигосахариды МКАТ окисляли до альдегидных групп, подвергали взаимодействию с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом с последующим восстановлением гидразонового производного боргидридами. Полученный ковалентный конъюгат исследовали в прямой реакции иммунофлуоресценции.

**Результаты.** Отработаны тонкие детали синтеза флуоресцентного конъюгата МКАТ с использованием олигосахаридов последнего. Модифицированные МКАТ сохраняли специфическое связывание с клетками-мишенями, присущее нативным антителам. Полученные конъюгаты сохраняли свою активность на протяжении длительного времени в процессе хранения.

**Заключение.** Разработан альтернативный метод для конъюгирования флуоресцентных меток с МКАТ, позволяющий получать конъюгаты высокой активности.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, флуоресцентные конъюгаты, олигосахарид IgG, проточная цитометрия

**Для цитирования:** Гриневич А.С., Чинарева И.В., Бурова О.С., Иванов П.К. Создание флуоресцентных зондов методом модификации олигосахаридов моноклональных антител флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):39–46.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-39-46



## FLUORESCENT MODIFICATION OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES OLIGOSACCHARIDES BY FLUORESCIEIN-5-THIOSEMICARBAZIDE

A.S. Grinevich, I.V. Chinareva, O.S. Burova, P.K. Ivanov

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

**Introduction.** Monoclonal antibodies (Mabs) are a good tool for diagnosing human pathologies. They are used as conjugates with fluorescent and other dyes. The classical approach of creating such conjugates is reduced to chemical reactions using the protein base of the Mab. At the same time, for a number of Mabs, conjugate production is accompanied by embedding the label into the antigen binding site, which leads to a decrease or complete loss of the specific activity of the conjugate. To get out of this situation, the synthesis of fluorescent conjugates by methods of carbohydrate chemistry through spatially distant from the active center oligosaccharides of antibodies is proposed.

**Objective.** To obtain high activity ICO series Mab conjugates based on the reaction of covalent inclusion of the fluorescent label in the oligosaccharide sequence of the Mab.

**Materials and methods.** We used Mab series ICO of high purity. Oligosaccharides Mabs oxidized to aldehyde groups, were subjected to interaction with fluorescein-5-thiosemicarbazide, followed by the reduction of hydrazone derivative borhydrides. The resulting covalent conjugate was investigated in a flow cytometry.

**Results.** The synthesis of a fluorescent conjugate using monoclonal antibodies oligosaccharides was worked out. Modified monoclonal antibodies retain specific binding to target cells inherent in the native antibody. The resulting conjugates remained active for a long time during storage.

**Conclusion.** An alternative method for conjugation of immunofluorescent, allowing to obtain conjugates of high activity, has been developed.

**Key words:** monoclonal antibodies, fluorescent conjugates, IgG oligosaccharide, flow cytometry

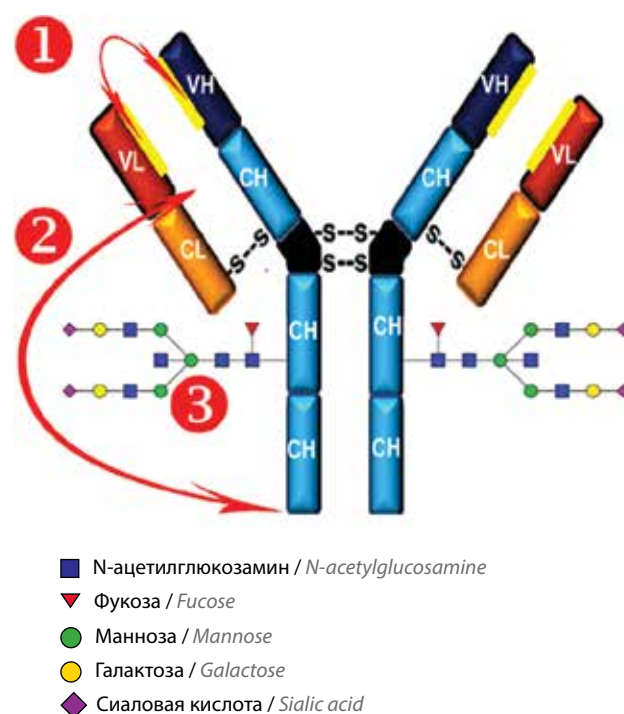
**For citation:** Grinevich A.S., Chinareva I.V., Burova O.S., Ivanov P.K. Fluorescent modification of the monoclonal antibodies oligosaccharides by fluorescein-5-thiosemicarbazide. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2020; 19(2):39–46. (In Russ.).

## Введение

Проточная цитометрия с использованием флуоресцентных конъюгатов моноклональных антител (МКАТ) широко применяется для диагностики патологических состояний у пациентов с иммунологическими, гематологическими и онкологическими заболеваниями. Указанные конъюгаты часто именуют флуоресцентными зондами (ФЗ). Набор используемых МКАТ и качество ФЗ на их основе определяют успех медицинских мероприятий. Общепринятый на сегодня подход к модификации МКАТ для их применения в иммунометрическом анализе сводится к химическим реакциям, затрагивающим белковую часть молекулы. Из данных литературы и личного опыта известно, что в ряде случаев такая модификация антител приводит к потере их антигенсвязывающих свойств, что, по-видимому, обусловлено включением флуоресцентной метки в область антигенсвязывающего центра [1, 2]. Иммуноглобулины по химической природе являются гликопротеинами, гликозилирование которых связано преимущественно с CH2-доменом (аспарагин 297), пространственно удаленным от антигенсвязывающего центра (рис. 1) и ассоциированного с биологическими свойствами антител и иммунных комплексов [3–5].

Использование олигосахаридных цепей МКАТ представляется перспективным при создании высокоэффективных ФЗ с ненарушенной антигенсвязывающей активностью. Характерно, что олигосахариды химически достаточно инертны, но легко переводятся в реакционные формы альдегидов ферментативным или химическим окислением. Дальнейшая модификация полученных альдегидов в ФЗ во многом определяется доступными флуорохромами, способными напрямую взаимодействовать с альдегидной группой. Ранее мы сообщали о принципиальной схеме мечения МКАТ через олигосахаридные цепи. При этом на I-м этапе альдегиды олигосахаридов МКАТ биотинилировали с помощью гидразинактивированного производного биотина (Biotin-LC-Hydrazide). На следующем этапе был сформирован комплекс биотинилированных таким образом МКАТ со стрептавидин-флуоресцеином [6]. Полученный флуоресцентный комплекс проявлял все основные характеристики, необходимые для ФЗ, но обладал очевидным недостатком, поскольку основывался на нековалентной связи между МКАТ и флуоресцеином, что приво-

дило к нестабильности полученных конъюгатов при хранении. В последнее время на рынке биохимических реактивов стали доступны производные флуорохромов, способные к прямому взаимодействию с альдегидными группами, что позволило предложить новую схему синтеза: на I этапе гексозы в составе



**Рис. 1.** Схема строения IgG. Гипервариабельная зона в области VH- и VL-доменов формирует специфический центр связывания антигена. Константные домены тяжелых цепей (CH) ответственны за биологические эффекты антител и иммунных комплексов с их участием: связывание с комплементом, Fc-рецепторами, проникновение через плаценту, скорость деградации, взаимодействие с белками A и G стрептококка и др. Олигосахаридные последовательности на основе гексоз находятся в CH2-домене, пространственно не перекрывающемся с антигенсвязывающим центром. 1 – антигенсвязывающий центр; 2 – область IgG, ответственная за реализацию биологических свойств; 3 – олигосахаридные остатки

**Fig. 1.** The IgG structure. Hypervariable area in the region VL and VH domain forms a specific binding site of the antigen. The constant domains of the heavy chain (CH) responsible for the biological effects of antibodies and immune complexes with their participation: the binding of complement, Fc-receptors, penetration through the placenta, the rate of degradation, interaction with proteins A and G Streptococcus, etc. Oligosaccharide on the basis of the hexoses is in CH2 domain, spatially not overlapping with the antigen-binding site. 1 – the antigen-binding site; 2 – region of IgG responsible for implementation of the biological properties; 3 – oligosaccharide residues

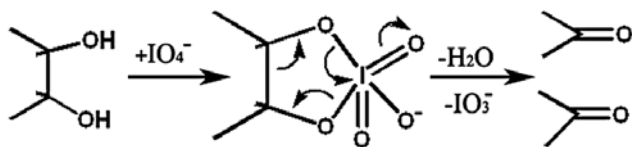


Рис. 2. Схема модификации спиртовых групп гексозного кольца до альдегидов с помощью солей иодной кислоты (периодатное окисление)

Fig. 2. Modification of the alcohol groups hexose's rings to aldehydes with the iodic acid salt (periodate oxidation)

олигосахаридов МКАТ окисляются до альдегидных групп с помощью периодатного окисления (рис. 2).

Далее образовавшиеся альдегидные группы вступают во взаимодействие с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом (5-ФТ) с образованием гидразоновых связей (рис. 3).

Двойную связь между углеродом и азотом в гидразоне ( $R-C=N-NH-$ ) восстанавливают с помощью борогидридов.

**Цель исследования** — получение активных и стабильных при хранении конъюгатов антител серии ICO на основе реакции ковалентного включения флуоресцентной метки в олигосахаридную последовательность МКАТ.

### Материалы и методы

**Получение и фракционирование МКАТ.** В работе использован клон ICO-180 (анти-CD20). Источником МКАТ служили асцитные жидкости мышей линии BALB/c. Фракционирование МКАТ проводили с использованием аффинной хроматографии на белке А [7]. Чистоту полученных МКАТ анализировали при помощи электрофореза (SDS-ПААГ) по Лэммли [8].

**Периодатное окисление углеводов МКАТ.** МКАТ переводили в 0,1 М фосфатно-солевой буфер, pH 7,2–7,4

(PBS) и концентрировали до 5–10 мг/мл. Здесь и в последующем для смены буфера и удаления низкомолекулярных реагентов и промежуточных продуктов синтеза использовали обессоливающие колонки PD-10 (Biosciences, Inc., Amersham, Англия), для концентрирования образцов — центрифужный фильтр Centricon 30 (Millipore, США). Готовили свежий 100 мМ раствор натрия периодата ( $NaIO_4$  — Sigma) на деионизированной воде. К образцам МКАТ добавляли  $NaIO_4$  до конечной концентрации 2–20 мМ и выдерживали в темноте при температуре 25 °С и постоянном перемешивании в течение 30 мин. К реакционной смеси добавляли 100 мкл этиленгликоля и продолжали инкубировать еще 15 мин. По завершении реакции МКАТ отделяли от непрореагировавших продуктов, концентрацию МКАТ доводили до 1,5–4,0 мг/мл.

**Взаимодействие окисленных олигосахаридов МКАТ с 5-ФТ** (Thermo Fisher Scientific, F121). За основу взят синтез, используемый для мечения гликопротеинов [9]. Маточный раствор 5-ФТ готовили на безводном диметилсульфоксиде в концентрации 4 мг/мл. Раствор хранили не более 30 дней при –20 °С. Сразу после окисления МКАТ к ним добавляли 5-ФТ в конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали в темноте при 25 °С и постоянном перемешивании в течение 0,5–24 ч. Образовавшиеся на этом этапе гидразоновые связи между окисленными гексозами олигосахаридов МКАТ и 5-ФТ восстанавливали инкубацией с борогидридом натрия ( $NaBH_4$ ) или с цианоборогидридом ( $NaBH_3CN$ ), концентрация последних в реакционной смеси составляла 5 мг/мл, инкубацию проводили при 4 °С в течение 1,5 ч. После завершения инкубации МКАТ отделяли от продуктов синтеза. Хранили полученные конъюгаты в их концентрации по белку >1 мг/мл при наличии 0,1 % азида натрия в защищенном от света контейнере при 4 °С.

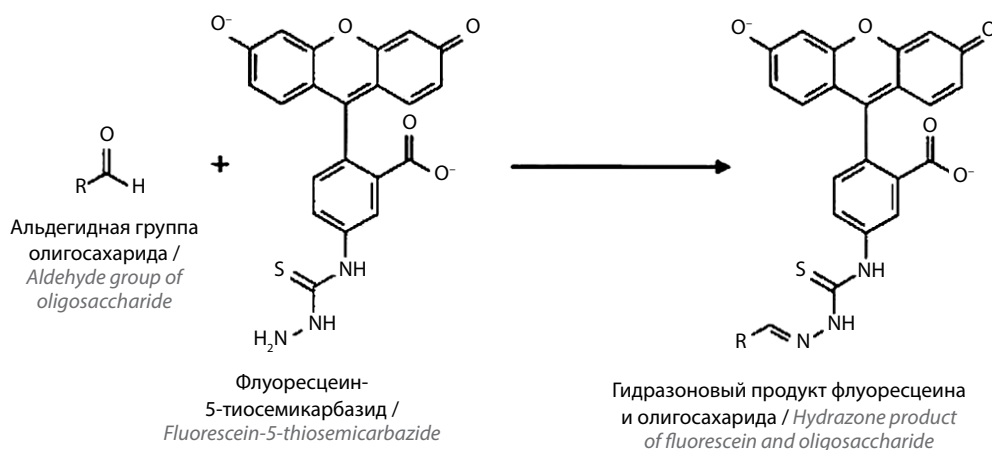


Рис. 3. Схема взаимодействия флуоресцеин-5-тиосемикарбазида с окисленным олигосахаридом моноклональных антител с образованием гидразоновой связи

Fig. 3. Fluorescein-5-thiosemicarbazide reacts with aldehydes groups of the monoclonal antibodies oligosaccharides to produce hydrazone linkage

Степень включения флуоресцеина в МКАТ определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение конъюгатов при 2 длинах волн — 280 и 495 нм. Расчеты проводили по формулам:

$$\frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,4} = \text{IgG (1)},$$

$$\frac{2,87 \times A_{495}}{A_{280} - (0,35 \times A_{495})} = \text{ФЛ/IgG (2)},$$

где  $A_{280}$  — оптическая плотность раствора при 280 нм;  $A_{495}$  — оптическая плотность раствора при 495 нм; IgG — концентрация МКАТ, мг/мл; ФЛ/IgG — молярное отношение флуоресцеина в МКАТ.

**Определение устойчивости флуоресцентных конъюгатов к хранению.** Для определения того, насколько устойчивым является комплекс МКАТ с флуоресцеином при длительном хранении, использовали следующий подход. Полученные конъюгаты через определенные интервалы времени концентрировали на центрифужных фильтрах Centricon 30 и повторно пропускали через обессоливающие колонки PD-10. Прошедший через колонку материал повторно анализировали спектрофотометрически (см. предыдущий пункт). При этом предполагалось, что, если в процессе хранения связь флуоресцеина с IgG разрушится, свободный флуоресцеин задержится на колонке PD-10. Об устойчивости комплекса свидетельствовала величина отношения ФЛ/IgG (формула 2).

Прямая реакция иммунофлуоресценции и точная цитометрия описаны ранее [10].

## Результаты

Для создания работоспособной методологии измерения МКАТ с помощью 5-ФТ необходимо было исследовать ряд параметров данного синтеза. Основная идея экспериментов сводилась к получению ФЗ с максимально большим соотношением флуоресцеина к белковой части IgG без потери специфической активности, а также к сохранению работоспособности полученных зондов в результате хранения.

### 1. Влияние концентрации $\text{NaIO}_4$ на степень включения 5-ФТ в МКАТ

Для решения этой задачи равные аликвоты ICO-180 смешивали с различными объемами маточного раствора  $\text{NaIO}_4$ . Конечная концентрация окислителя варьировала в диапазоне от 2 до 20 мМ. Далее все образцы МКАТ инкубировали с окислителем, как описано ранее, отделяли от непрореагировавших продуктов и проводили взаимодействие с 5-ФТ в течение 2,5 ч. После восстановления гидразоновых связей МКАТ отделяли от продуктов синтеза и определяли степень

включения флуоресцеина в МКАТ. Результаты 2 независимых опытов представлены на рис. 4.

Как видно, степень включения 5-ФТ в ФЗ закономерно возрастала с увеличением концентрации окислителя. Дальнейшего повышения концентрации  $\text{NaIO}_4$  в реакционной смеси мы не проводили, поскольку из данных литературы известно, что при концентрациях  $\text{NaIO}_4 > 50$  мМ наблюдается уменьшение степени окисления IgG, обусловленное в том числе и деструкцией белковой части антител [11]. Таким образом, даже при минимально исследованной концентрации окислителя степень включения метки в ФЗ превышает 1 моль на моль МКАТ.

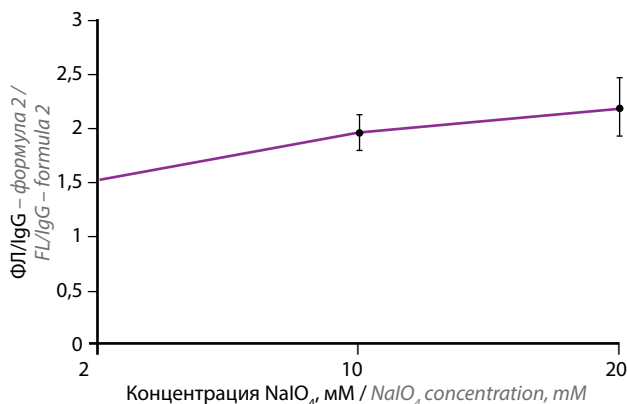
### 2. Влияние времени инкубации с 5-ФТ на степень включения метки в МКАТ

Для нахождения оптимального режима взаимодействия МКАТ с 5-ФТ равные аликвоты ICO-180, окисленные  $\text{NaIO}_4$  в концентрации 20 мМ, инкубировали с 5-ФТ в течение 0,5–20 ч. Данные 2 опытов приведены на рис. 5.

Как видно из приведенного графика, плотность включения флуоресцеина в МКАТ прямо пропорциональна времени инкубации. При этом максимальное нарастание включения метки проходило в пределах первых 2–3 ч. Далее этот показатель выходил на плато, достигая значения 2,3–2,7 моля флуоресцеина на моль IgG.

### 3. Сохранность флуоресцентных конъюгатов МКАТ при хранении

Через определенные интервалы времени в течение 7 мес от момента синтеза конъюгатов ICO-180 с 5-ФТ определяли молярное соотношение включенного в МКАТ флуоресцеина. В качестве материала для исследования использовали конъюгаты, полученные при исследовании времени инкубации с 5-ФТ и, как показано ранее, имеющие различную степень включения флуоресцеина. Данные приведены на рис. 6.



**Рис. 4.** Плотность включения флуоресцеин-5-тиосемикарбазида в ICO-180 в зависимости от концентрации  $\text{NaIO}_4$  на стадии окисления  
Fig. 4. The inclusion of fluorescein-5-thiosemicarbazide in ICO-180, depending on the  $\text{NaIO}_4$  concentration



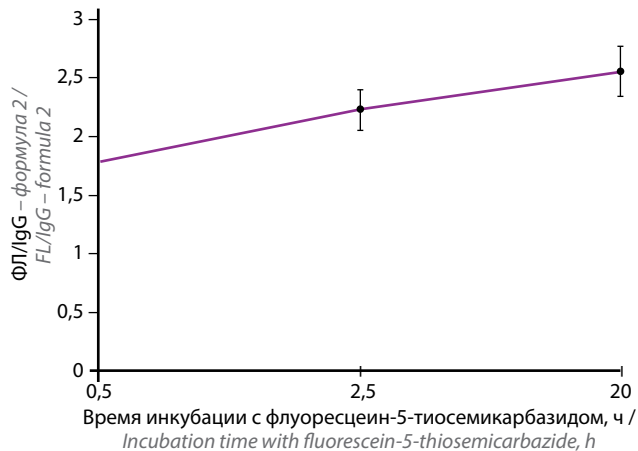


Рис. 5. Плотность включения флуоресцеина в моноклональные антитела ICO-180 в зависимости от времени инкубации с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом

Fig. 5. The fluorescein inclusion in monoclonal antibodies ICO-180 depending on incubation time with fluorescein-5-thiosemicarbazide

Как видно из графика, при хранении конъюгатов наблюдалось падение молярного отношения флуоресцеина к белковой части IgG. Однако при периоде наблюдения больше полугода расщепление конъюгатов было незначительным. Так, если в течение 1-го месяца отношение ФЛ/IgG (формула 2) уменьшилось для всех конъюгатов в среднем на 10 %, последующее изменение этого показателя за 6 мес не превысило 6 %. Среднее падение включения флуоресцеина в конъюгаты за 7 мес наблюдения составило не более 15 %, что было меньше, чем разница в плотности мечения МКАТ за счет разного времени инкубации с 5-ФТ («нулевые точки» на рис. 6). Иными словами, формальное падение плотности флуоресцеина в зондах при их хранении оказалось меньше, чем разница в плотности мечения МКАТ в исследованных диапазонах варьирования параметров реакции.

#### 4. Влияние восстановителя на свойства конъюгатов МКАТ с 5-ФТ

На стадии восстановления гидразинового производного ICO-180 и 5-ФТ мы применяли 2 реактива: боргидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) и цианоборгидрид ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ). Для этого окисленные 20 мМ  $\text{NaIO}_4$  ICO-180 инкубировали 2,5 ч с 5-ФТ и далее обрабатывали  $\text{NaBH}_4$  или  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , как описано в части «Материалы и методы». Полученные таким образом конъюгаты имели похожие свойства с плотностью включения флуоресцеина 1,5–1,65 (формула 2). Последующее хранение конъюгатов с повторным определением отношения ФЛ/IgG через 3 нед показало для обоих конъюгатов похожее и, как следует из раздела «Результаты», ожидаемое падение данного показателя на 8–10 %. Таким образом, данный эксперимент позволяет заключить, что боргидрид и цианоборгидрид Na одинаково пригодны для восстановления

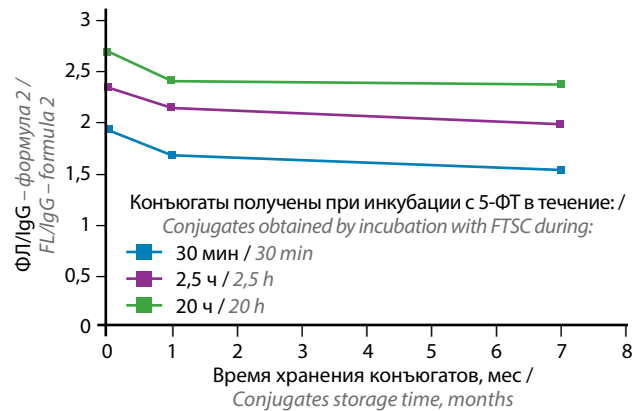


Рис. 6. Изменение включения флуоресцеина в конъюгаты с моноклональными антителами ICO-180 в зависимости от времени их хранения. 5-ФТ – флуоресцеин-5-тиосемикарбазид

Fig. 6. The inclusion changing of fluorescein in monoclonal antibodies ICO-180 conjugates depending on their storage time. FTSC – fluorescein-5-thiosemicarbazide

гидразинового производного ФЗ. Однако реакция с боргидридом Na проходила более интенсивно, с образованием газообразного водорода, что затрудняло колоночные методы хроматографии для отделения непрореагировавших продуктов синтеза. Поэтому в качестве основного реагента на этом этапе синтеза нами выбран  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ .

#### Флуоресцентные свойства конъюгатов ICO-180 с 5-ФТ и зависимость выявления клеток-мишеней от плотности флуоресцеина в IgG

Конъюгаты ICO-180, полученные при различных способах окисления (см. выше раздел 1), при разном времени конъюгирования с 5-ФР (см. выше раздел 2), также в результате длительного хранения (см. выше раздел 3) проверялись в прямой реакции иммунофлуоресценции на выявление CD20-положительных ( $\text{CD}20^+$ ) клеток-мишеней. Результаты представлены в таблице и на рис. 7.

Как видно из представленных данных, все исследованные конъюгаты ICO-180, полученные в рамках данного исследования, выявляли клетки  $\text{CD}20^+$  в крови здоровых доноров практически так же, как ICO-80, меченные флуоресцеина изотиоцианатом по белковой части IgG. Из данных литературы известно, что содержание  $\text{CD}20^+$ -В-клеток в крови здоровых доноров находится в пределах 6–23 % [12]. Такого порядка величины содержания клеток  $\text{CD}20^+$  наблюдались и в наших экспериментах. Отличия в выявлении клеток-мишеней исследуемыми конъюгатами и методом контроля составляли не более 7–12 % относительной величины измерения (см. таблицу), что укладывается в границы погрешности, принятые для биологического эксперимента. Работоспособностью обладали все конъюгаты независимо от способов их получения и хранения. При этом следует особо отметить, что

Специфическое связывание конъюгатов ICO-180, меченных флуоресцеином в различных условиях, с лимфоцитами человека в прямой реакции иммунофлуоресценции

*Specific binding of ICO-180 conjugates labeled with fluorescein under various conditions to human lymphocytes by immunofluorescence reaction*

Тип конъюгата Conjugate type	% CD20 <sup>+</sup> -лимфоцитов в прямой РИФ с конъюгатами ICO-180, меченными флуоресцеином % CD20 <sup>+</sup> -lymphocytes in direct IR with fluorescein-labeled ICO-180 conjugates						
	Характеристики конъюгатов, меченных 5-ФТ Characteristics of FTSC conjugates						
	Без хранения No storing				45 дней хранения Stored for 45 days		
	Концентрация NaIO <sub>4</sub> при окислении, мМ NaIO <sub>4</sub> concentration at oxidation, mM						
	2	20	2	20	2	10	20
	Длительность реакции с 5-ФТ, ч Time of reaction with FTSC, h						
	2,5		20		2,5		
	Молярное отношение ФЛ/IgG (формула 2) FL/IgG molar ratio (formula 2)						
	1,93	2,35	2,1	2,7	1,63	2,05	2,39
	Контрольный конъюгат ICO-180, меченный ФИТЦ FITC ICO-180 control conjugate	14,0		16,0		9,7	
Конъюгаты ICO-180, меченные 5-ФТ FTSC ICO-180 conjugates	15,5	13,8	15,2	16,5	8,5	11,1	9,0

**Примечание.** РИФ — реакция иммунофлуоресценции; 5-ФТ — флуоресцеин-5-тиосемикарбазид; ФЛ/IgG — молярное отношение флуоресцеина в моноклональных антителах; ФИТЦ — флуоресцеина изотиоцианат.

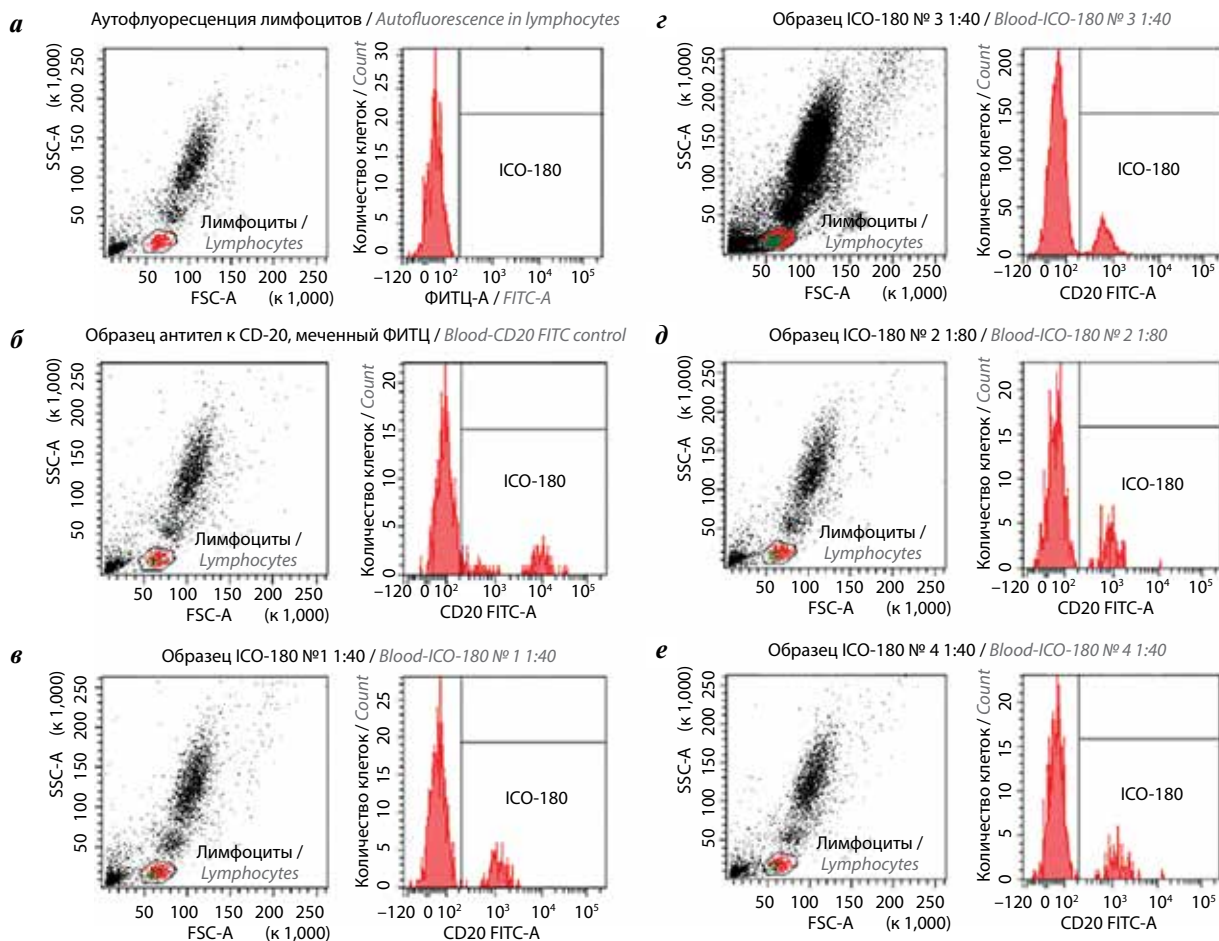
*Note.* IR — immunofluorescence reaction; FTSC — fluorescein-5-thiosemicarbazide; FL/IgG — fluorescein molar ratio in monoclonal antibodies; FITC — fluorescein isothiocyanate.

молярное отношение ФЛ/IgG для всех исследованных конъюгатов было выше 1,6. В данном исследовании мы не ставили задачу найти минимальное значение ФЛ/IgG, при котором конъюгаты теряют свойства ФЗ, но значение 1,5–1,7, по-видимому, достаточно для использования полученных конъюгатов в качестве работоспособных зондов.

### Заключение

В результате проведенной работы нами были получены работоспособные ФЗ анти-CD20 МКАТ кло-на ICO-180. Характеристики полученных конъюгатов проводили биохимическими (спектрофотометрия с определением плотности включения флуоресцеина в МКАТ) и иммунофлуоресцентными (реакция иммунофлуоресценции для определения связывания с клетками-мишенями) методами. Безусловно, когда речь идет о ФЗ, реакция иммунофлуоресценции является окончательным методом контроля качества полученных конъюгатов. Однако спектрофотометрия позволяет достаточно быстро провести скрининговые оценки получаемых конъюгатов. Известно, что чем выше молярное включение флуорохрома в молекулу зонда, тем выше суммарный квантовый выход полученной конструкции, однако параллельно этому уве-

личивается вероятность деструкции получаемых зондов за счет блокады антигенсвязывающего центра антител [13]. Так, для ФЗ на основе флуоресцеина изотиоцианата (синтез происходит по вторичным аминок группам лизина и аргинина) оптимальными зондами считаются те, которые имеют плотность включения флуоресцеина 2–6 на моль IgG. В нашем случае использования олигосахаридов для модификации белковая часть IgG не затрагивалась. При этом получить плотность мечения МКАТ более 3 молей флуоресцеина на моль IgG нам не удалось. В значительной степени это может быть связано со стерическими ограничениями выбранной модели, в частности с тем, что 5-ФТ имеет очень короткий спейсер (не более 4 атомов), что ограничивает его пространственную проницаемость вглубь цепочки олигосахарида, и реакции взаимодействия, вероятно, ограничиваются дистальными гексозами. Тем не менее даже в пределах этого узкого диапазона включения флуоресцеина в МКАТ были выявлены основные закономерности протекания синтеза. Во-первых, увеличение концентрации NaIO<sub>4</sub> на стадии окисления увеличивало степень включения флуоресцеина в зонд, при этом для оптимальных концентраций NaIO<sub>4</sub> нами выявлен и принят диапазон 10–20 mM. Во-вторых, увеличение



**Рис. 7.** Гистограммы CD20<sup>+</sup>-клеток. Под каждой литерой изображены две гистограммы: левая — прямое и боковое рассеивание, многогранником выделены гейты исследуемых клеток, правая — флуоресценция лимфоцитов внутри гейта: а — аутофлуоресценция лимфоцитов; б — флуоресценция с конъюгатом ICO-180, меченным флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ); в–е — конъюгатами ICO-180, меченными флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом (5-ФТ). Условия синтеза флуоресцентных зондов, меченных 5-ФТ: в и г — 2 мМ NaIO<sub>4</sub>, д и е — 20 мМ NaIO<sub>4</sub>; в и д — 2,5 ч инкубации с 5-ФТ; г и е — 20 ч инкубации с 5-ФТ

**Fig. 7.** Histograms of CD20<sup>+</sup>-cells (the left histogram is fast and side scattering, the gates of the studied cells are selected, the right histogram is fluorescence of lymphocytes within the gate). а — autofluorescence in lymphocytes; б — fluorescence with a fluorescein isothiocyanate labeled (FITC) ICO-180 conjugate; в–е — ICO-180 conjugates labeled with fluorescein-5-thiosemicarbazide. The conditions of synthesis ICO-180 with 5-FIT: в and г — 2 mm NaIO<sub>4</sub>, д and е — 20 mm NaIO<sub>4</sub>; в and д — 2.5 hour of incubation with 5-FIT, г and е — 20 hours of incubation with 5-FIT

времени инкубации окисленных гексоз с 5-ФТ от 0,5 до 20 ч приводило к увеличению включения флуоресцеина в зонд, однако основная реакция протекала в пределах первых 2–3 ч. В-третьих, полученные конъюгаты после восстановления гидразоновой связи цианоборгидридом были достаточно стабильными, что выражалось в падении включения флуоресцеина не более чем на 15 % при их хранении в течение 7 мес и не от-

ражалось на свойствах конъюгатов как ФЗ. И наконец, показано, что для адекватной работы в качестве детекторов клеток-мишеней ФЗ должны иметь степень включения флуоресцеина >1,5 молекулы на моль IgG.

Распространение данного подхода к МКАТ других клонов позволило бы как уточнить особенности данного синтеза, так и, возможно, повысить эффективность ФЗ иных специфичностей.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Grossberg L., Pressman D. Modification of arginine in the active sites of antibodies. *Biochemistry* 1968;7(1):272–9. DOI: 10.1021/bi00841a033.
- Tawfik D.S., Chap R., Eshhar Z., Green B.S. pH on–off switching of antibody-hapten binding by site-specific chemical modification of tyrosine. *Protein Eng* 1994;7(3):431–4. DOI: 10.1093/protein/7.3.431.
- Dwek R.A., Lellouch A.C., Wormald M.R. Glycobiology: “the function of sugar in the IgG molecule”. *J Anat* 1995;187(Pt 2):279–92.
- Matsumiya S., Yamaguchi Y., Saito J. et al. Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. *J Mol*

- Biol 2007;4;368(3):767–79.  
DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.034.
5. Lund J., Takahashi N., Popplewell A. et al. Expression and characterization of truncated forms of humanized L243 IgG1. Architectural features can influence synthesis of its oligosaccharide chains and affect superoxide production triggered through human Fcγ3 receptor I. *Eur J Biochem* 2000;267(24):7246–57.  
DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01839.x.
  6. Гриневич А.С., Краева М.Н., Бурова О.С. и др. Использование олигосахаридов иммуноглобулинов для модификации моноклональных антител. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):44–8.  
DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-44-48. [Grinevich A.S., Kraeva M.N., Burova O.S. et al. The use of oligosaccharides of immunoglobulin for modification of monoclonal antibodies. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(4):44–8. (In Russ.)].
  7. Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 1978;15(7):429–36.  
DOI: 10.1016/0161-5890(78)90070-6.
  8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;15;227(5259):680–5.  
DOI: 10.1038/227680a0.
  9. Hermanson G.T. Fluorescent Probes. In: *Bioconjugate Techniques*. 3<sup>rd</sup> Ed. Academic Press, 2013:395–463.  
DOI: 10.1016/B978-0-12-382239-0.00010-8.
  10. Голубцова Н.В., Бурова О.С., Барышников К.А. и др. Моноклональные антитела ICO-406 против антигена CD117. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):99–104. [Golubtsova N.V., Burova O.S., Baryshnikov K.A. et al. Monoclonal antibodies ICO-406 against the antigen CD117. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):99–104. (In Russ.)].
  11. Wolfe C.A., Hage D.S. Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate. *Anal Biochem* 1995;231(1):123–30.  
DOI: 10.1006/abio.1995.1511.
  12. Al-Mawali A., Pinto A.D., Busaidi R.A., Al-Zakwani I. Lymphocyte subsets: reference ranges in an age- and gender-balanced population of Omani healthy adults. *Cytometry* 2013;83(8):739–44.  
DOI: 10.1002/cyto.a.22322.
  13. Vira S., Mekhedov E., Humphrey G. et al. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. *Anal Biochem* 2010;402(2):146–50.  
DOI: 10.1016/j.ab.2010.03.036.

#### Вклад авторов

А.С. Гриневич: получение иммунофлуоресцентных зондов, обзор публикаций по теме статьи, анализ данных, написание рукописи статьи;  
И.В. Чинарева: получение и фракционирование асцитов, получение высокоочищенных моноклональных антител;  
О.С. Бурова: оценка специфической активности иммунофлуоресцентных зондов методом проточной цитометрии, обзор публикаций по теме статьи;  
П.К. Иванов: разработка дизайна исследования.

#### Authors' contributions

A.S. Grinevich: obtaining immunofluorescence probes, reviewing publications on the topic, data analysis, writing the manuscript;  
I.V. Chinareva: obtaining and fractionation of ascites, obtaining highly purified monoclonal antibodies;  
O.S. Burova: assessing specific activity of immunofluorescence probes using flow cytometry, reviewing publications on the topic;  
P.K. Ivanov: developing study design.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

А.С. Гриневич / A.S. Grinevich: <https://orcid.org/0000-0002-4570-2124>  
И.В. Чинарева / I.V. Chinareva: <https://orcid.org/0000-0002-5749-5652>  
О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>  
П.К. Иванов / P.K. Ivanov: <https://orcid.org/0000-0003-1403-8520>

#### 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.** Протокол исследования №55-4 от 16.04.2020 одобрен этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. 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 the rules of bioethics.** The study protocol №55-4 or 16.04.2020 was approved by the biomedical ethics committee of Research Institute for Experimental Diagnosis and Treatment of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 06.09.2019. Принята к публикации: 03.03.2020.

Article submitted: 06.09.2019. Accepted for publication: 03.03.2020.