

Нанозонды на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител для высокочувствительной детекции рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках

Г.О. Нифонтова¹, Д.В. Калениченко¹, М.А. Барышникова², З.А. Соколова², П.С. Самохвалов³,
А.В. Караулов⁴, А.В. Суханова¹, И.Р. Набиев^{1,4}

¹Университет Реймса Шампань-Арденн; Франция, 51100 Реймс, ул. Когнак Жэ, 51;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

⁴ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119992 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Игорь Руфаилович Набиев igor.nabiev@gmail.com

Введение. Разработка инновационных средств флуоресцентной визуализации, представляющих собой нанозонды – конъюгаты квантовых точек (КТ) и однодоменных антител (одАТ), специфически распознающих биомаркеры опухолей, в частности рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), является актуальным направлением усовершенствования подходов к иммуногистохимическому типированию опухолей.

Цель исследования – разработка флуоресцентных нанозондов на основе КТ и одАТ, специфически распознающих EGFR, а также оценка их функциональных характеристик (размера и оптических свойств) и функциональной активности.

Материалы и методы. КТ получены методом металлоорганического высокотемпературного синтеза и переведены в водную фазу посредством поэтапной замены лигандов на поверхности КТ. Ориентированную конъюгацию КТ и одАТ осуществляли с использованием бифункционального агента для кросс-сшивки. Полученные конъюгаты комплексно охарактеризованы методами динамического светорассеяния и иммуноанализа. Функциональную активность оценивали на модельной линии опухолевых клеток эпидермоидной карциномы A431.

Результаты. Разработанные конъюгаты стандартизованы по контрольным параметрам, обуславливающим их функциональную активность, в частности по гидродинамическому диаметру и эффективности связывания с опухолевыми клетками-мишенями, и характеризуются высокой дисперсностью, гомогенностью, специфической функциональной активностью по отношению к исследованной молекулярной мишени.

Заключение. Полученные результаты демонстрируют потенциальную возможность использования разработанных конъюгатов КТ и одАТ для детекции EGFR при иммуногистохимическом типировании опухолей.

Ключевые слова: квантовые точки, однодоменные антитела, конъюгация, нанозонды для флуоресцентной детекции, рецептор эпидермального фактора роста

Для цитирования: Нифонтова Г.О., Калениченко Д.В., Барышникова М.А. и др. Нанозонды на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов и однодоменных антител для высокочувствительной детекции рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(1):68–75. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-68-75

Nanoprobes based on fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies for highly sensitive detection of epidermal growth factor receptor in tumor cells

Galina O. Nifontova¹, Daria V. Kalenichenko¹, Maria A. Baryshnikova², Zinaida A. Sokolova², Pavel S. Samokhvalov³, Alexander V. Karaulov⁴, Alyona V. Sukhanova¹, Igor R. Nabiev^{1, 4}

¹University of Reims Champagne-Ardenne; 51 Cognacq Jay, 51100 Reims, France;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

³National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), 31 Kashirskoe Shosse, 115409 Moscow, Russia;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya, 119992 Moscow, Russia

Contacts: Igor Rufailovich Nabiev igor.nabiev@gmail.com

Background. The development of highly oriented conjugates of quantum dots (QDs) and single-domain antibodies (sdAbs) as innovative fluorescence imaging nanoprobes that specifically recognize tumor biomarkers, in particular, epidermal growth factor receptor (EGFR), is a promising approach to improving immunohistochemical tumor typing.

Aim. The study was aimed at developing fluorescent nanoprobes based on QDs and sdAbs that specifically recognize EGFR, as well as evaluating their functional characteristics (size and optical properties) and functional activity.

Materials and methods. QDs were obtained using high-temperature organometallic synthesis and transferred into the aqueous phase by means of stepwise replacement of ligands on the QD surface. The QDs and sdAbs were conjugated in an oriented manner using a bifunctional cross-linking agent. Detailed characteristics of the resulting conjugates were analyzed by the dynamic light scattering and immunoassay methods. Functional activity was assessed on the model human epidermoid carcinoma cells line A431.

Results. The QD–sdAb conjugates have been standardized in terms of control parameters determining their functional activity, in particular, hydrodynamic diameter and efficiency of binding with target tumor cells. They are characterized by high dispersity, homogeneity, and specific functional activity towards their molecular target.

Conclusion. The results demonstrate the potential use of the designed QD–sdAb conjugates for EGFR detection in immunohistochemical typing of tumor.

Keywords: quantum dots, single-domain antibodies, conjugation, nanoprobes for fluorescent detection, epidermal growth factor receptor

For citation: Nifontova G.O., Kalenichenko D.V., Baryshnikova M.A. et al. Nanoprobes based on fluorescent semiconductor nanocrystals and single-domain antibodies for highly sensitive detection of epidermal growth factor receptor in tumor cells. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(1): 68–75. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-1-68-75

Введение

Ранняя диагностика опухолей является одним из факторов, обеспечивающих положительный прогноз и улучшение показателя выживаемости пациентов. Секвенирование единичных опухолевых клеток, многопараметрический анализ образцов аутопсии и жидкостной биопсии представляют собой современные диагностические инструменты персонализированной терапии опухолей [1]. Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) является одним из клинически релевантных маркеров, поскольку экспрессируется различными опухолевыми клетками, в частности опухолями молочной железы [2], легкого [3, 4] и яичников [5]. Мониторинг экспрессии EGFR в образцах биоматериала и определение наличия его мутантных форм позволяют предсказать чувствительность опухолей к ингибиторам EGFR-тирозинкиназы, что также представляется актуальным при подборе эффективной стратегии противоопухолевой терапии [6].

Флуоресцентная детекция применяется для многопараметрического иммуногистохимического анализа [7], трехмерной визуализации (реконструкции) биологических тканей [8] и *in vivo* визуализации [9], биохимических исследований взаимодействий между макромолекулами [10]. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки, КТ) представляют собой перспективные нанометки, характеризующиеся высокой яркостью, фотостабильностью, широким спектром возбуждения и узким пиком флуоресценции, а также намного более высоким временем жизни флуоресценции и устойчивостью к фотовыгоранию, выгодно отличающими их от органических флуоресцентных красителей [11, 12]. Для обеспечения возможности высокоспецифичной и высокочувствительной флуоресцентной детекции отдельных молекулярных маркеров органические флуорофоры или КТ конъюгируют с распознающими молекулами — полноразмерными антителами иммуноглобулинами класса G (IgG) или их фрагментами,

а также однодоменными антителами (одАТ). Малый физический размер одАТ (около 2 нм), их конформационная стабильность, устойчивость к высоким температурам и присутствию детергентов, гидрофильность и стабильность в буферных растворах, являются ключевыми критериями, обуславливающими их привлекательность как инструмента специфичной и высокочувствительной иммунодетекции [13–15].

Конъюгация распознающих молекул, в частности одАТ, с поверхностью КТ позволяет получать флуоресцентные нанозонды малого размера, что улучшает их проникновение в ткани, а также обеспечивает возможность связывания с эпитопами биомаркеров, которые недоступны для классических полноразмерных антител [16]. Кроме того, высокая стабильность одАТ позволяет проводить окрашивание и детекцию сигнала в более широком диапазоне физико-химических параметров образца, что дает возможность оптимизировать протоколы пермеабилзации, фиксации и окрашивания срезов опухолевых тканей. Таким образом, разработка новых средств флуоресцентной визуализации, представляющих собой конъюгаты КТ и одАТ, специфически распознающих биомаркеры опухолей, в частности EGFR, является актуальным направлением усовершенствования подходов к иммуногистохимическому типированию опухолей.

Цель исследования — разработка флуоресцентных нанозондов на основе КТ и одАТ, специфически распознающих EGFR, а также оценка их функциональных характеристик (размера и оптических свойств) и функциональной активности.

Материалы и методы

Материалы. Оксид кадмия (99,5 %), 2-этилгексановая кислота (99 %), олеиновая кислота (90 %), 1-октадецен (ОДЕ, 90 %), селен (порошок, 100 mesh, 99,5 %), оксид цинка (99–100 %), тиомочевина (>99 %), триглицерин (99 %), три-*n*-октилфосфин оксид (ТОФО, 99 %) приобретены у Sigma-Aldrich (США) и использованы без дополнительной очистки. Растворители — метанол, метилацетат, *n*-гексан марки «для спектроскопии» приобретены у АО «ЭККОС-1» (Россия). Реактивы для перевода КТ в водную фазу хлороформ и метанол марки «для спектроскопии», D,L-цистеин, гидроксид натрия получены от Sigma-Aldrich (США). Для солиubilизации водорастворимых КТ использовали производное полиэтиленгликоля (ПЭГ), содержащее концевые тиольную и гидроксильную группы, а также алифатический фрагмент длиной $(CH_2)_{11}(HS-(CH_2)_{11}-EG_6-OH)$, полученный от Prochimia Surfaces (Польша). Трис(2-карбоксиэтил) фосфин гидрохлорид (ТФ), *N*-[*p*-малеимидофенил] изоцианат (МФИ) приобретены у Thermo Fischer Scientific (США). Все остальные используемые реагенты

были аналитического класса (приобретены у Sigma-Aldrich, США). Буферные растворы были приготовлены с использованием воды Milli-Q (18,2 мΩ·см), полученной с помощью системы очистки воды Direct-Q (Millipore, Франция), и дополнительно профильтрованы через стерильные фильтры с размером пор 0,22 мкм.

Рекомбинантные одАТ, специфически распознающие EGFR, и контрольный неспецифический анализ, содержащие на C-конце аминокислотной последовательности белковых молекул дополнительно введенный остаток цистеина, любезно предоставлены профессором Софи Эрно (Sophie Hernot, Vrije Universiteit Brussel, Бельгия). Клеточная линия эпидермоидной карциномы A431 была получена из Биоресурсной коллекции клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Синтез 0,4 М прекурсора селена. В двугорлую колбу объемом 25 мл помещали 4 ммоль селена в форме порошка и 16 мл ОДЕ. В колбу устанавливали термopару и отвод, через который осуществляли вакуумирование и подачу аргона. Взвесы селена в ОДЕ начинали перемешивать на скорости 1000 об/мин и нагревать до 120 °С при вакуумировании (остаточное давление — 20 мбар). Дегазацию проводили в течение 25 мин, после чего проводили аккуратный нагрев реакционной смеси до 200 °С в токе аргона. Далее проводили перемешивание реакционной смеси до полного растворения селена с образованием раствора с интенсивной коричневой окраской (около 1,5 ч), после чего резко нагревали до 250 °С и выдерживали раствор при этой температуре в течение 30 мин. Далее раствор охлаждали в токе аргона до комнатной температуры и переносили его в стеклянную банку, где хранили до использования в синтезе. При необходимости перед проведением синтеза раствор прогревали до 110 °С при пропускании через него аргона.

Синтез квантовых точек CdSe/ZnS. В трехгорлую колбу объемом 50 мл помещали 1 ммоль оксида кадмия, 16 мл ОДЕ и 3,5 ммоль ОК. В колбу устанавливали термopару, отвод для вакуумирования и подвода аргона, а также отвод с прокалываемой силиконовой септой. Пропуская через реакционную смесь поток аргона, нагревали ее до 250 °С до полного растворения оксида кадмия с образованием раствора со слабой желтой окраской. Далее раствор охлаждали до 120 °С и проводили дегазацию в течение 25 мин. Затем в токе аргона раствор прекурсора кадмия резко нагревали до 270 °С, и при скорости перемешивания 950 об/мин осуществляли резкий впрыск 4 мл прекурсора селена. После впрыска температуру реакционной смеси снижали до 250 °С, и в течение 5 мин проводили реакцию синтеза ядер CdSe. Далее реакционную смесь охлаждали

до 50 °С потоком холодного воздуха, добавляли в колбу 20 мл метанола и перемешивали образовавшуюся эмульсию в течение 20 мин. Далее эмульсии давали отстояться, после чего собирали верхний слой, содержащий остатки прекурсора кадмия. Процедуру обработки ядер CdSe метанолом проводили еще 2 раза, затем удаляли остатки метанола вакуумированием при слабом нагреве, после чего смесь повторно дегазировали при 100 °С в течение 20 мин. Затем смесь быстро нагревали до 180 °С, после чего в течение 1 ч в раствор вводили 5 мл 0,62 М раствора 2-этилгексаноата цинка в ОДЕ и 3 мл 0,8 М раствора тиомочевина в триглице. По окончании ввода прекурсоров оболочки реакционную смесь выдерживали при 180 °С в течение 20 мин, после чего реактор охлаждали до 50 °С и проводили выделение КТ CdSe/ZnS посредством их осаждения избытком метилацетата и центрифугирования. Очищенные КТ растворяли в н-гексане, добавляли в раствор 250 мг ТОФО и высушивали в кристаллизаторе.

Получение водорастворимых квантовых точек CdSe/ZnS. Предварительно осуществляли очистку синтезированных КТ от ТОФО методом растворения-преципитации в смеси хлороформа и метанола, как описано ранее [17, 18]. Отмывку и переосаждение повторяли 2 раза, затем растворяли осадок в 800 мкл хлороформа. Полученные образцы КТ в хлороформе титровали раствором DL-цистеина (10 мг/мл) в метаноле до получения хлопьеобразного осадка. Цистенинированные КТ осаждали центрифугированием при 14 000 об/мин, полученный осадок трижды промывали метанолом, чтобы удалить непрореагировавший избыток цистеина, и высушивали под вакуумом. Полученный осадок КТ высушивали в вакуум-концентраторе при комнатной температуре в течение 2 мин. К высушенному остатку КТ добавляли 600 мкл воды ультрачистой и 60 мкл 1 М раствора гидроксида натрия. Образец перемешивали на вортексе и озвучивали с помощью ультразвуковой бани в течение 10 мин. Подготовленный таким образом образец КТ центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 8000 об/мин при комнатной температуре. Полученный супернатант, содержащий КТ в водной фазе аккуратно отбирали и фильтровали через фильтры Millipore с диаметром отверстий 0,22 мкм. Затем в водному раствору КТ добавляли производное ПЭГ с химической структурой HS-(CH₂)₁₁-EG₆-ОН, при этом рабочее массовое соотношение производное ПЭГ:КТ составляло 30 мг: 8,7 мг. Полученный образец интенсивно перемешивали и инкубировали при +4 °С в течение 48 ч в темноте. После инкубации солюбилизированные КТ очищали от избытка лигандов и переводили в 0,05 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,2) с помощью ультрацентрифугирования с использованием центрифужных фильтров Amicon 15 Ultra 10K и центрифужных гель-фильтрационных колонок, заполненных

носителем Сефадекс-G25. Полученный препарат фильтровали с использованием стерильных фильтров с диаметром пор 0,1 мкм.

Получение мономерной формы однодоменных антител. Мономеры молекул одАТ анти-EGFR получали путем восстановления дисульфидных связей с использованием ТФ. Для проведения редукции образцы одАТ инкубировали с 10-кратным молярным избытком ТФ при комнатной температуре при мягком перемешивании в течение 30 мин. После проведения реакции восстановления полученные образцы мономеров одАТ переводили в буфер для проведения реакции конъюгирования с КТ (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0) с помощью центрифужных гель-фильтрационных колонок, заполненных носителем Сефадекс-G25 и уравновешенных 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,0).

Получение конъюгатов квантовых точек и однодоменных антител. КТ переводили в буфер для проведения реакции активации поверхности (0,05 М боратный буфер, рН 8,5) с помощью центрифужных гель-фильтрационных колонок, заполненных носителем Сефадекс-G25. Образец КТ с концентрацией 0,5 мг/мл смешивали с аликватами стокового раствора МФИ до получения молярного соотношения МФИ:КТ – 50:1. После инкубации в темноте в течение 45 мин при комнатной температуре и постоянном мягком встряхивании малеимид-активированные КТ переводили в буфер для проведения реакции ковалентного связывания с одАТ (0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,0) с помощью гель-фильтрационных колонок, заполненных носителем Сефадекс-G25. Подготовленные малеимид-активированные КТ смешивали с восстановленными образцами одАТ анти-EGFR или контрольных одАТ (молярное соотношение одАТ:КТ-МФИ – 10:1), инкубировали реакционную смесь в темноте в течение 2 ч при комнатной температуре и постоянном мягком встряхивании и проводили очистку с помощью колоночной хроматографии на гель-фильтрационной колонке, заполненной носителем Сефадекс-G100.

Характеризация квантовых точек и их конъюгатов с однодоменными антителами. Оценку оптических свойств водорастворимых КТ осуществляли с помощью спектрофотометра Cary 60 и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США). Размер КТ и их конъюгатов с одАТ анти-EGFR оценивали методом динамического светорассеяния с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобритания).

Оценка функциональной активности конъюгатов квантовых точек и однодоменных антител. Для характеристики функциональной активности полученных конъюгатов применяли анализ с помощью метода иммунодетекции in-cell-иммуоферментный анализ

с использованием модельных опухолевых клеток, экспрессирующих молекулярную мишень — EGFR. Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 высаживали в 96-луночный планшет из черного пластика с оптически прозрачным дном и полилизинированной поверхностью лунок и доращивали в стандартных условиях до достижения плотности клеточного монослоя 80–90 %. Перед проведением анализа культуральную среду, в которой культивировались клетки, аккуратно отбирали без повреждения клеточного монослоя. В лунки планшета добавляли 100 мкл 4 % раствора параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и инкубировали при мягком перемешивании в течение 15 мин при комнатной температуре. После инкубации содержимое лунок аккуратно отбирали. Фиксированные клетки в лунках 3-кратно отмывали фосфатно-солевым буфером (pH 7,4). После отмывки проводили блокировку поверхности лунок 3 % раствором казеина в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). В лунки вносили 300 мкл блокирующего раствора, планшет инкубировали в течение 2 ч при мягком перемешивании при комнатной температуре. Затем блокирующий раствор удаляли из лунок и вносили исследуемые разведения конъюгатов КТ с одАТ анти-EGFR или контрольными одАТ, или контрольный буферный раствор (фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) в объеме 100 мкл/лунку в триплетах. После инкубации содержимое лунок планшета аккуратно отбирали и 3-кратно отмывали, добавляя в лунки 300 мкл 0,05 % раствора Tween-20 в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4). После финальной отмывки в лунки добавляли 300 мкл фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) и измеряли интенсивность флуоресценции в лунках при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 592 нм с помощью планшетного ридера Infinite 200 PRO (Tecan, Швейцария). Дополнительно эффективность связывания полученных флуоресцентных нанозондов с модельными клетками оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Axio Observer 3 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Иммуногистохимическое типирование опухолевых срезов проводится в водной среде или буферных растворах, характеризующихся определенными значениями pH и ионной силы [16]. После синтеза КТ нерастворимы в воде и содержат на своей поверхности большое количество ТОФО, защищающего КТ от окисления. Однако наличие органической оболочки на поверхности КТ является препятствием для взаимодействия гидрофильных лигандов с поверхностью КТ. Для получения стабильных водорастворимых КТ, характеризующихся отсутствием агрегатов, нами был использован подход поэтапной замены лигандов на

поверхности КТ. Для перевода КТ в водную фазу на 1-м этапе с поверхности КТ был полностью удален органический лиганд (ТОФО), и поверхность КТ хелатирована лигандом, содержащим гидрофильные группы, совместимые с водными растворами (D,L-цистеин). Затем для дальнейшего получения конъюгатов поверхность КТ, переведенных в водную фазу, была стабилизирована посредством добавления производного ПЭГ, содержащего концевые тиольную и гидроксильные функциональные группы, необходимые для обеспечения коллоидной стабильности и последующей конъюгации КТ с одАТ соответственно. Полученные водорастворимые КТ, стабилизированные с помощью HS-(CH₂)₁₁-EG₆-OH, характеризуются широким спектром поглощения и узким спектром флуоресценции с положением максимума флуоресценции, соответствующим 592 нм (рис. 1, а, б). Показано, что солюбилизованные КТ обладают узким распределением гидродинамического диаметра и отсутствием крупноразмерных агрегатов (рис. 1, в). Средний размер (гидродинамический диаметр) полученных водорастворимых КТ составляет $7,5 \pm 0,6$ нм. Заряд поверхности полученных КТ составляет $-9,4 \pm 3,9$ мВ, что свидетельствует об эффективной модификации их поверхности с помощью выбранного лиганда. Слабоотрицательный заряд поверхности КТ в водной среде подтверждает наличие на поверхности КТ экспонированных гидроксильных групп, необходимых для проведения конъюгации с одАТ.

Ориентированные конъюгаты одАТ и КТ получены путем химического ковалентного связывания сульфгидрильной группы остатка цистеина молекул одАТ и экспонированных в раствор гидроксильных групп КТ. Для этого предварительно проводили восстановление одАТ с целью обеспечения отсутствия в образцах одАТ их димерных форм вследствие образования дисульфидной связи между двумя сульфгидрил-содержащими молекулами одАТ в процессе хранения.

Для проведения реакции химического ковалентного связывания одАТ с поверхностью КТ использовали бифункциональный агент для кросс-сшивки сульфгидрильных и гидроксильных групп МФИ, совместимый с составом реакционной смеси. Для проведения реакции конъюгации осуществляли малеимидную активацию поверхности КТ. МФИ содержит в своей структуре малеимидную группу, способную реагировать с экспонированной сульфгидрильной группой одАТ, а также изоцианатную группу, реактогенную по отношению к гидроксильным группам на поверхности КТ, модифицированных производным ПЭГ [17].

Размер конъюгатов является одним из критических параметров контроля эффективности проведенной конъюгации. Размер нанозондов определяет

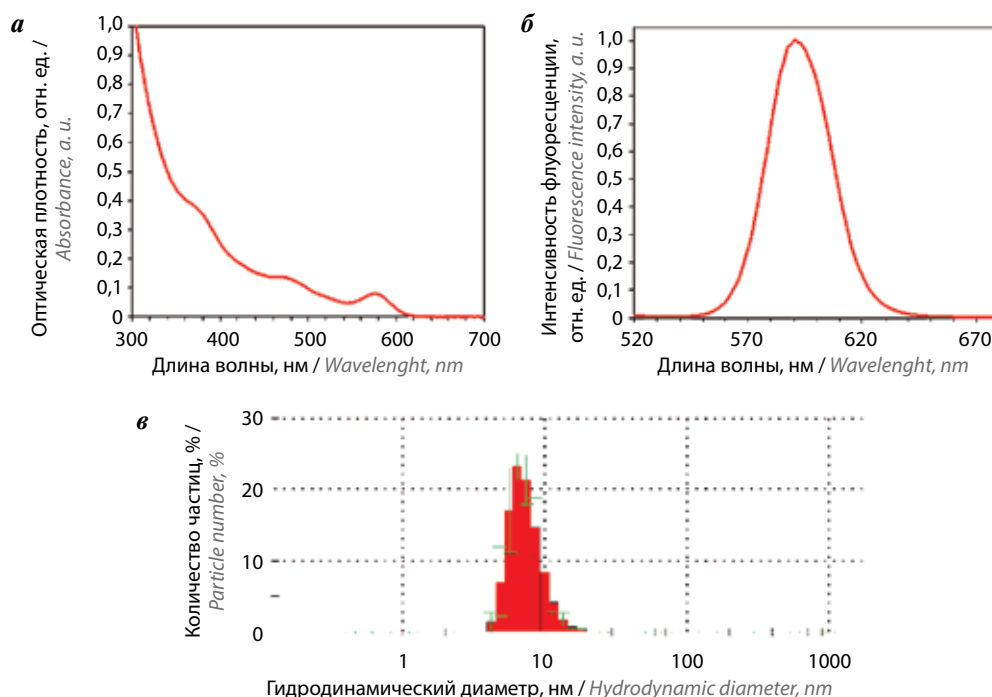


Рис. 1. Результаты характеристики водорастворимых квантовых точек CdSe/ZnS, солюбилизованных с помощью производного полиэтиленгликоля: спектр поглощения (а), спектр флуоресценции (б), распределение гидродинамического диаметра (в) полученных образцов

Fig. 1. Characteristics of the prepared samples of water-soluble CdSe/ZnS quantum dots solubilized with a polyethylene glycol derivative: the absorption spectrum (a), the fluorescence spectrum (b), and the distribution of the hydrodynamic diameter (c) of the obtained samples

проникающую способность и, соответственно, эффективность и чувствительность детекции целевых биомаркеров [19]. Полученные конъюгаты характеризовались узким распределением по размерам и отсутствием крупноразмерных агрегатов (рис. 2). При этом средний гидродинамический диаметр конъюгатов КТ – анти-EGFR одАТ составляет $9,8 \pm 0,8$ нм. Средний размер контрольного образца конъюгата КТ – контрольное одАТ составляет $9,9 \pm 0,3$ нм.

Прирост среднего гидродинамического диаметра полученных конъюгатов по сравнению с таковым у исходных КТ, использованных для конъюгации, составляет 2,3–2,4 нм, что сопоставимо с размером молекул одАТ и свидетельствует о химическом связывании оптимального количества молекул одАТ в ориентированной конфигурации для сохранения эффективной функциональной активности полученных образцов конъюгатов. Полученные данные указывают на то, что используемые молярные соотношения МФИ:КТ – 50:1 и одАТ:КТ – 10:1 являются оптимальными для получения гомогенных конъюгатов КТ с высокой дисперсностью.

Функциональную активность полученных конъюгатов оценивали с помощью in-cell-иммуноферментного анализа с использованием модельной клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431, экспрессирующей EGFR. Полученные результаты представлены на рис. 3, 4. Для изучаемых конъюгатов

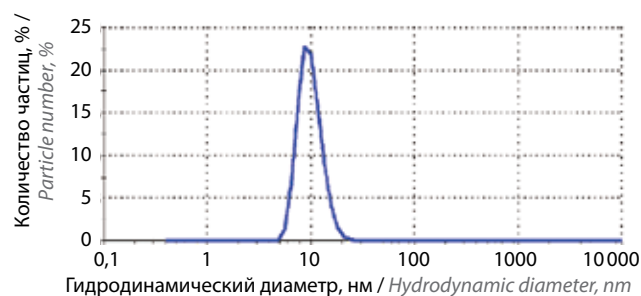


Рис. 2. Распределение гидродинамического диаметра конъюгатов квантовых точек и однодоменных антител анти-EGFR

Fig. 2. Distribution of the hydrodynamic diameter of the conjugates of anti-EGFR single-domain antibodies with quantum dots

КТ – анти-EGFR одАТ характерно наличие специфического связывания с модельными клетками линии A431, начиная с разведения 1:500. Наиболее выраженный детектируемый сигнал наблюдается в случае разведений 1:100, 1:50 и 1:25. При этом связывание контрольных образцов – КТ, не конъюгированных с одАТ, и конъюгата КТ – контрольное одАТ – имеет слабовыраженный характер, близкий к фоновому сигналу, что указывает на специфическое взаимодействие конъюгатов КТ – анти-EGFR одАТ с модельными опухолевыми клетками. Таким образом, разработанные конъюгаты были стандартизованы по контрольным параметрам, обуславливающим их функциональную активность, в частности по

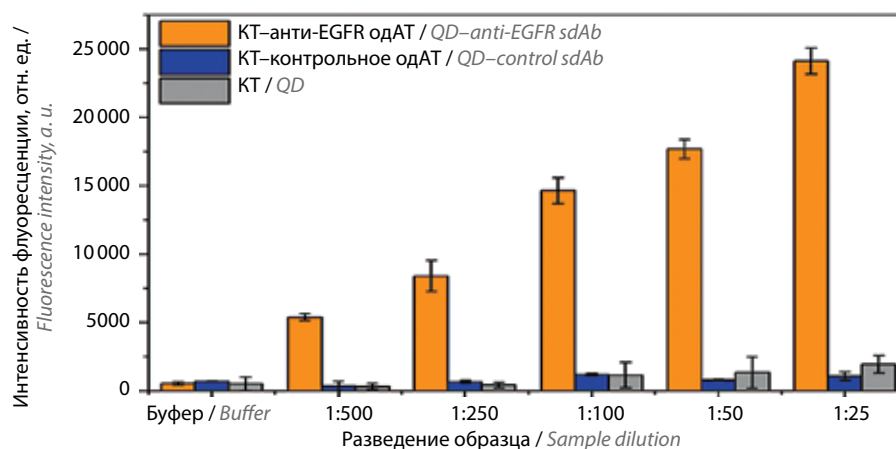


Рис. 3. Профили связывания полученных образцов конъюгатов квантовых точек с однодоменными антителами анти-EGFR (КТ–анти-EGFR одАТ), квантовых точек с контрольными однодоменными антителами (КТ–контрольное одАТ) и квантовых точек, не конъюгированных с однодоменными антителами (КТ), с модельными клетками эпидермоидной карциномы человека A431

Fig. 3. The profiles of binding of the model A431 human epidermoid carcinoma cells with the conjugates of quantum dots and anti-EGFR single-domain antibodies (QD–anti-EGFR sdAb), conjugates of quantum dots and control single-domain antibodies (QD–control sdAb), and quantum dots not conjugated with antibodies (QD)

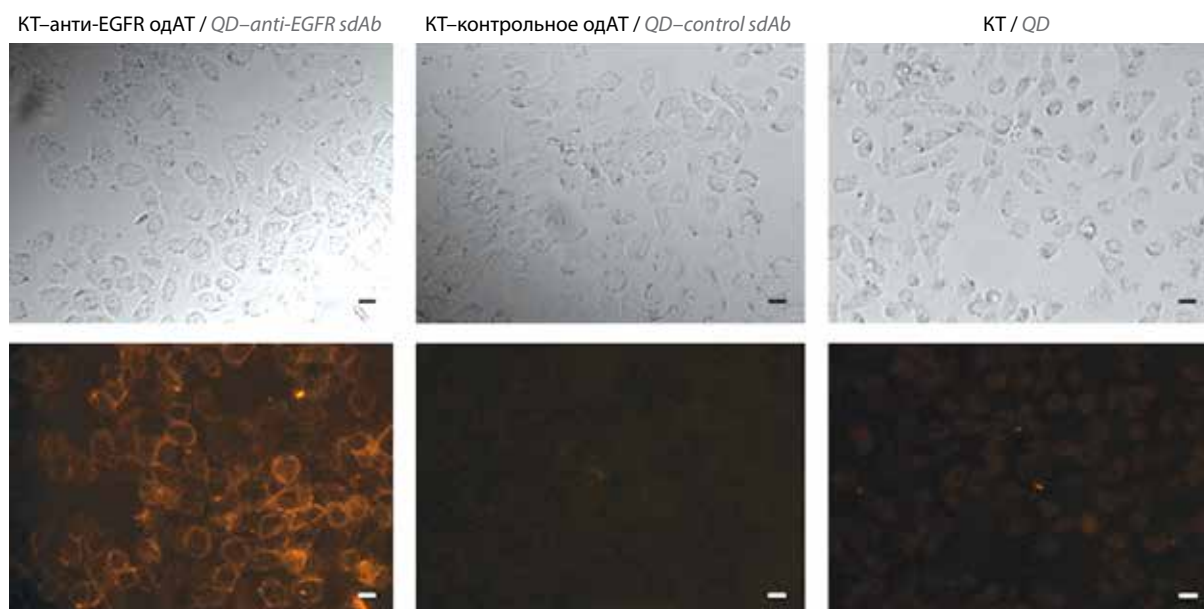


Рис. 4. Изображения клеток эпидермоидной карциномы человека A431, обработанных конъюгатами квантовых точек с однодоменными антителами анти-EGFR (КТ–анти-EGFR одАТ), квантовых точек с контрольными однодоменными антителами (КТ–контрольное одАТ) и неконъюгированных квантовых точек (КТ). Верхняя панель представляет собой снимки, полученные в светлом поле, нижняя панель – флуоресцентные изображения той же зоны (фильтр E506LP). Шкала, представленная на всех изображениях, соответствует 20 мкм

Fig. 4. Images of A431 human epidermoid carcinoma cells treated with the conjugates of quantum dots and anti-EGFR single-domain antibodies (QD–anti-EGFR sdAb), conjugates of quantum dots and control single-domain antibodies (QD–control sdAb), and quantum dots not conjugated with antibodies (QD). The top panel shows images obtained in the brightfield; the bottom panel shows fluorescence images of the same area (an E506LP filter). Scale bars, 20 μm

гидродинамическому диаметру и эффективности связывания с опухолевыми клетками-мишенями.

Закключение

Разработанные конъюгаты КТ и анти-EGFR одАТ характеризуются высокой дисперсностью, гомогенностью и функциональной активностью в отношении

заданной молекулярной мишени, подтвержденной методами иммуноанализа с использованием модельных опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR. Полученные результаты демонстрируют возможность дальнейшего использования разработанных конъюгатов в качестве средства иммуногистохимического типирования биоптатов опухолей.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Dagogo-Jack I., Shaw A. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(2):81–94. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.166
2. Gupta G.K., Collier A.L., Lee D. et al. Perspectives on triple-negative breast cancer: current treatment strategies, unmet needs, and potential targets for future therapies. *Cancers* 2020;12(9):2392. DOI: 10.3390/cancers12092392
3. Sheikine Y., Rangachari D., McDonald D.C. et al. EGFR testing in advanced non-small-cell lung cancer, a mini-review. *Clin Lung Cancer* 2016;17(6):483–92. DOI: 10.1016/j.clcc.2016.05.016
4. Inamura K. Update on immunohistochemistry for the diagnosis of lung cancer. *Cancers* 2018;10(3):72. DOI: 10.3390/cancers10030072
5. Mehner C., Oberg A.L., Goergen K.M. et al. EGFR as a prognostic biomarker and therapeutic target in ovarian cancer: evaluation of patient cohort and literature review. *Genes Cancer* 2017;8(5–6):589–99. DOI: 10.18632/genesandcancer.142
6. Fenizia F., De Luca A., Pasquale R. et al. EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy. *Future Oncol* 2015;11(11):1611–23. DOI: 10.2217/fon.15.23
7. Zhang W., Hubbard A., Jones T. et al. Fully automated 5-plex fluorescent immunohistochemistry with tyramide signal amplification and same species antibodies. *Lab Invest* 2017;97(7):873–85. DOI: 10.1038/labinvest.2017.37
8. Wan H., Yue J., Zhu S. et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues. *Nat Commun* 2018;9(1):1171. DOI: 10.1038/s41467-018-03505-4
9. Montecinos-Franjola F., Lin J.Y., Rodriguez E.A. Fluorescent proteins for *in vivo* imaging, where's the biliverdin? *Biochem Soc Trans* 2020;48(6):2657–67. DOI: 10.1042/BST20200444
10. Deshayes S., Divita G. Fluorescence technologies for monitoring interactions between biological molecules *in vitro*. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;113:109–43. DOI: 10.1016/B978-0-12-386932-6.00004-1
11. Bilan R., Nabiev I., Sukhanova A. Quantum dot-based nanotools for bioimaging, diagnostics, and drug delivery. *ChemBiochem* 2016;17(22):2103–114. DOI: 10.1002/cbic.201600357
12. Nifontova G., Krivenkov V., Zvaigzne M. et al. Controlling charge transfer from quantum dots to polyelectrolyte layers extends prospective applications of magnetooptical microcapsules. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12(32):35882–94. DOI: 10.1021/acsami.0c08715
13. Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A. et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 2002;11(3):500–15. DOI: 10.1110/ps.34602
14. Staus D.P., Wingler L.M., Strachan R.T. et al. Regulation of β_2 -adrenergic receptor function by conformationally selective single-domain intrabodies. *Mol Pharmacol* 2014;85(3):472–81. DOI: 10.1124/mol.113.089516
15. Liu J.L., Goldman E.R., Zabetakis D. et al. Enhanced production of a single domain antibody with an engineered stabilizing extra disulfide bond. *Microbial Cell Factories* 2015;14(1):158. DOI: 10.1186/s12934-015-0340-3
16. Ramos-Gomes F., Bode J., Sukhanova A. et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Sci Rep* 2018;8(1):4595. DOI: 10.1038/s41598-018-22973-8
17. Brazhnik K., Nabiev I., Sukhanova A. Oriented conjugation of single-domain antibodies and quantum dots. In: *Quantum Dots: Applications in Biology. Methods in Molecular Biology*. N.-Y.: 2014. P. 129–140.
18. Sukhanova A., Ramos-Gomes F., Chames P. et al. Multiphoton deep-tissue imaging of micrometastases and disseminated cancer cells using conjugates of quantum dots and single-domain antibodies. In: *Multiplexed Imaging. Methods in Molecular Biology*. N.-Y.: 2021. P. 105–123.
19. Dang X., Bardhan N.M., Qi J. et al. Deep-tissue optical imaging of near cellular-sized features. *SciRep* 2019;9(1):3873. DOI: 10.1038/s41598-019-39502-w

Вклад авторов

Г.О. Нифонтова, Д.В. Калениченко, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, П.С. Самохвалов: получение экспериментальных данных, обработка данных, подготовка рукописи;

А.В. Караулов, А.В. Суханова: анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи;

И.Р. Набиев: концепция и дизайн, анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи.

Author's contributions

G.O. Nifontova, D.V. Kalenichenko, M.A. Baryshnikova, Z.A. Sokolova, P.S. Samokhvalov: obtaining experimental data for analysis, data processing, article preparation;

A.V. Karaulov, A.V. Sukhanova: data analysis and interpretation, editing of the article;

I.R. Nabiev: concept and design, data analysis and interpretation, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Г.О. Нифонтова / G.O. Nifontova: <https://orcid.org/0000-0002-6956-5654>

Д.В. Калениченко / D.V. Kalenichenko: <https://orcid.org/0000-0002-1394-7768>

М.А. Барышникова / M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

З.А. Соколова / Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

П.С. Самохвалов / P.S. Samokhvalov: <https://orcid.org/0000-0002-2878-8376>

А.В. Караулов / A.V. Karaulov: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

А.В. Суханова / A.V. Sukhanova: <https://orcid.org/0000-0003-2796-7898>

И.Р. Набиев / I.R. Nabiev: <https://orcid.org/0000-0002-8391-040X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Данная работа была поддержана грантом № 075-15-2021-937 (проект NanoToBio) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation through the grant No 075-15-2021-937 (NanoToBio project).

Статья поступила: 24.10.2022. **Принята к публикации:** 28.12.2022.

Article received: 24.10.2022. **Accepted for publication:** 28.12.2022.