

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОЛИГОСАХАРИДОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

А.С. Гриневич, М.Н. Краева, О.С. Бурова, П.К. Иванов

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анатолий Станиславович Гриневич agrinevich@mail.ru

Введение. Моноклональные антитела (МКАТ) служат надежным и удобным инструментом диагностики патологий человека. Чаще всего они используются в качестве конъюгатов с флуоресцентными и иными метками. Классический подход создания таких конъюгатов сводится к химическим реакциям с использованием белковой основы моноклональных антител. Вместе с тем для целого ряда МКАТ изготовление конъюгата сопровождается встраиванием метки в антигенсвязывающий участок, что приводит к уменьшению или полной потере специфической активности конъюгата. Выходом из данной ситуации может стать синтез флуоресцентных конъюгатов методами углеводной химии через пространственно удаленные от активного центра олигосахариды антител.

Цель исследования – показать принципиальную возможность химической модификации олигосахаридов МКАТ серии ICO и получить на их базе флуоресцентные конъюгаты.

Материалы и методы. В работе использовалась панель МКАТ серии ICO высокой степени очистки. Олигосахариды МКАТ, окисляясь до альдегидных групп, подвергались взаимодействию с гидразиновым производным биотина и конъюгировались со стрептавидин-флуоресцеином. Полученный комплекс был использован для прямой реакции иммунофлуоресценции.

Результаты. Все модифицированные МКАТ сохраняли специфичность связывания с клетками-мишенями, присущую нативным антителам.

Заключение. Данный метод может быть альтернативой для конъюгирования флуоресцентных меток с МКАТ, для которых методы белкового синтеза приводят к потере активности конъюгата.

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

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-44-48

THE USE OF OLIGOSACCHARIDES OF IMMUNOGLOBULIN FOR MODIFICATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

A.S. Grinevich, M.N. Kraeva, O.S. Burova, P.K. Ivanov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Monoclonal antibodies are reliable and convenient tool for the diagnosis of human pathologies. Most often they are used as conjugates with fluorescent or other labels. The classical approach of creating such conjugates reduces chemical reactions using monoclonal antibodies protein base. However, for a number of manufacturing monoclonal antibodies conjugate followed by embedding tags in the antigen binding site, which leads to reduction or complete loss of specific activity of the conjugate. The way out of this situation could be the synthesis of fluorescent conjugates, methods of carbohydrate chemistry through spatially distant from the active site of the antibody oligosaccharides.

The purpose of the study – to show the fundamental possibility of chemical modification of the oligosaccharides monoclonal antibodies ICO series and get to their base fluorescent conjugates.

Materials and methods. We used monoclonal antibodies panel ICO series of high purity. Oligosaccharides monoclonal antibodies oxidized to aldehyde groups, is reacted with a hydrazine derivative of biotin and streptavidin-conjugated fluorochrome. The resulting complex was used for the direct reaction immunofluorescence.

Results. All modified monoclonal antibodies retain binding specificity to target cells inherent to native antibodies.

Conclusions. This may be an alternative method for conjugating a fluorescent label with monoclonal antibodies to protein synthesis methods which lead to loss of activity of the conjugate.

Key words: monoclonal antibody, fluorescent conjugates, oligosaccharide IgG, flow cytometry

Введение

Иммуноглобулины по химической природе являются гликопротеидами. Классический подход к модификации моноклональных антител (МКАТ) для их использования в иммунометрическом анализе сводится к химическим реакциям, затрагивающим белковую часть молекулы IgG. Наличие достаточно большого количества стерически доступных аминогрупп на «поверхности» IgG позволяет вводить в структуру этой молекулы флуоресцентные и иные маркеры, связывать IgG с хроматографическими сорбентами и т. д. Однако наш опыт показывает, что для некоторых МКАТ возможно получение конъюгата с потерей специфической активности, что вероятно связано с блокированием активного центра. Вместе с тем олигосахаридные детерминанты МКАТ расположены в области CH_2 домена и связаны с аспарагином 297, находясь вне антигенсвязывающего центра антител. Показана принципиальная возможность использования олигосахаридов для модификаций поликлональных антител [1–3].

В течение нескольких лет в РОНЦ им. Н.Н. Блохина под руководством профессора А.Ю. Барышникова была создана коллекция гибридом-продуцентов МКАТ серии ICO, сейчас они активно используются для диагностики онкологических и других заболеваний.

Цель настоящего исследования – показать принципиальную возможность химической модификации олигосахаридов МКАТ серии ICO и получить на их базе флуоресцентные конъюгаты.

Материалы и методы

Получение и фракционирование МКАТ. В работе использованы клоны ICO 31 (анти-CD8), ICO 86 (анти-CD4), ICO 90 (анти-CD3), ICO 150 (анти-CD24), ICO 160 (анти-CD95) и ICO 180 (анти-CD20). Источником МКАТ служили асцитные жидкости мышей линии BALB/c. Фракционирование МКАТ проводили с использованием аффинной хроматографии на белке А [4], сульфата аммония, анионообменника MonoQ и гель-фильтрации на Superdex 200 [5], а также каприловой кислоты (КК) [6]. Чистоту полученных МКАТ анализировали SDS-ПААГ электрофорезом по Лэммли [7].

Периодатное окисление углеводов МКАТ. МКАТ переводили в 0,9 % раствор хлорида натрия, pH 6,5 (ФР). Здесь и далее для смены буфера использовали обессоливающие колонки PD-10, для концентрирования образцов – центрифужный фильтр Centricon. Готовили свежий 100 мМ раствор натрия периодата (NaIO_4) на деионизированной воде. К образцам МКАТ добавляли NaIO_4 до конечной концентрации 1–10 мМ и выдерживали в темноте при температуре 25 °С при постоянном перемешивании в течение

30 мин. К реакционной смеси добавляли 50 мкл этиленгликоля и продолжали инкубировать еще 15 мин. По завершении реакции МКАТ отделяли от непрореагировавших продуктов.

Взаимодействие окисленных МКАТ с модифицирующими агентами. Сразу после окисления МКАТ инкубировали гидразинактивированное производное биотина (Biotin-LC-Hydrazide) в темноте при 25 или 37 °С при постоянном перемешивании в течение 2–24 ч. Далее МКАТ отделяли от непрореагировавших продуктов. Часть МКАТ после реакции с Biotin-LC-Hydrazide инкубировали со стрептавидин-флуорисценином (STREPT-FITC) в темноте при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 18–24 ч для получения комплекса МКАТ-[спейсер]-флуорисцеин. Степень включения флуорисцеина в IgG определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение конечного продукта при 2 длинах волн – 280 и 495 нм. Расчеты проводили по формулам:

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

где A_{280} – оптическая плотность раствора при 280 нм; A_{495} – оптическая плотность раствора при 495 нм.

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

где [IgG] – концентрация МКАТ мг/мл; ФЛ/IgG – молярное отношение FITC в МКАТ.

Реакцию прямой и непрямой иммунофлуоресценции (РИФ) ставили с использованием клеток крови здоровых доноров по стандартной методике [8].

Результаты и обсуждение

После окисления углеводов МКАТ NaIO_4 и последующей конъюгации с Biotin-LC-Hydrazide все исследованные МКАТ имели включенную биотиновую метку. Степень «биотинилирования» МКАТ и, следовательно, «окисленность» олигосахаридов мы оценивали косвенно по их реакции с STREPT-FITC, исследуя продукт МКАТ- [спейсер] -флуорисцеин (табл. 1).

Как видно из табл. 1, все исследованные МКАТ имели плотность включения флуорисцеина от 2 до 4,5 молей на моль МКАТ. Такая степень включения метки вполне согласуется с ранними результатами по изготовлению работоспособных МКАТ при прямом включении флуорисцеин-изотиоцианата [9]. Плотность включения флуорисцеина в МКАТ незначительно менялась при изменении концентрации

Таблица 1. Характеристика конечного продукта синтеза МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин*

Характеристика продукта	Модифицированные МКАТ					
	ICO 31	ICO 86	ICO 90	ICO 150	ICO 160	ICO 180
Метод выделения МКАТ	КК	КК	Prt A**	3 ст***	КК	PrtA**
Концентрация МКАТ	0,7	0,4	0,6	0,4	0,5	0,6
Отношение флуоресцеин/белок	1,8	3,94	2,6	4,5	2,5	2,6

Примечание. МКАТ – моноклональные антитела; КК – каприловая кислота; * периодатное окисление проводили 10 мМ NaIO₄; ** PrtA – хроматография на белке А; *** – трехступенчатый метод фракционирования МКАТ (сульфатное осаждение, ионообменная хроматография и гель-фильтрация).

окислителя на 1-м этапе в диапазоне от 1 до 10 мМ NaIO₄ (табл. 2).

Таблица 2. Характеристика конечного продукта синтеза МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин для ICO90, окисленного различными концентрациями NaIO₄

Характеристика продукта	Концентрации NaIO ₄		
	1 мМ	5 мМ	10 мМ
Концентрация МКАТ	0,52	0,49	0,6
Отношение флуоресцеин/белок	2,9	3,0	2,6

На характеристики полученных конъюгатов МКАТ- [спейсер] -флуоресцеин не оказывал заметного эффекта способ их очистки (см. табл. 1). Так, флуоресцентные конъюгаты МКАТ 3 клонов (ICO31, ICO86 и ICO160) были получены самым грубым методом очистки – с помощью КК, 2 – ICO90 и ICO180 – на белке А, ICO150 – подвергнут самой тщательной 3-ступенчатой очистке. Вместе с тем максимальное соотношение флуоресцеин/белок отмечалось именно для ICO 150.

Таким образом, проведенные исследования показали, что для 6 исследованных образцов МКАТ серии ICO, фракционированных тремя различными методами, окисление NaIO₄ в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ в течение 30 мин при 25 °С, дальнейшее взаимодействие с Biotin-LC-Hydrazide и STREPT-FITC

приводит к образованию комплекса МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин с количеством флуоресцеиновых групп не менее 2 на молекулу МКАТ.

На следующем этапе было проведено исследование способности полученных комплексов МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин взаимодействовать с лимфоцитами человека в прямой РИФ. Контрольными значениями служили данные о непрямой РИФ с нативными, немодифицированными МКАТ тех же клонов (табл. 3).

Как видно из табл. 3, все модифицированные МКАТ сохраняли специфичность связывания с клетками-мишенями, присущую нативным антителам. Примеры гистограмм распределения меченых клеток для двух МКАТ (ICO31 и ICO180) приведены на рис. 1 и 2.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали принципиальную возможность использования олигосахаридной части молекулы иммуноглобулинов МКАТ серии ICO для приготовления флуоресцентных конъюгатов. Установлено, что степень включения флуоресцентной метки принципиально не зависит от метода фракционирования МКАТ. Определены оптимальные условия для проведения такого рода конъюгации. Данный метод может быть альтернативой для конъюгирования флуоресцентных меток с МКАТ, для которых методы белкового синтеза приводят к потере активности конъюгата.

Таблица 3. Специфическое связывание комплекса МКАТ-[спейсер]-флуоресцеин с лимфоцитами человека в реакции иммунофлуоресценции

Характеристика	МКАТ					
	ICO 31	ICO 86	ICO 90	ICO 150	ICO 160	ICO 180
	CD8	CD4	CD3	CD24	CD95	CD20
% выявляемых данных МКАТ клеток от контроля той же специфичности	97	49	95	100	95	102

Примечание. МКАТ – моноклональные антитела.

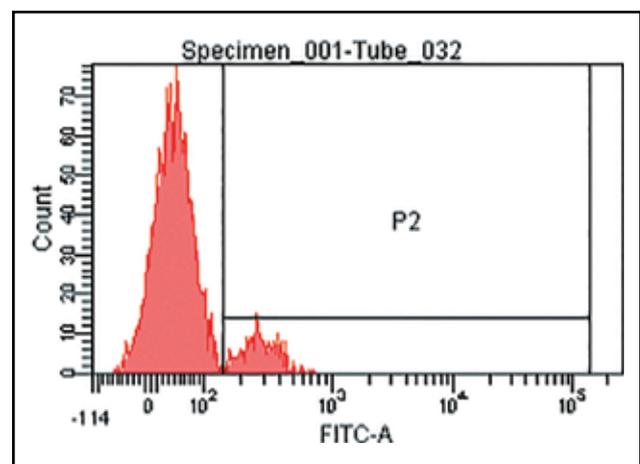
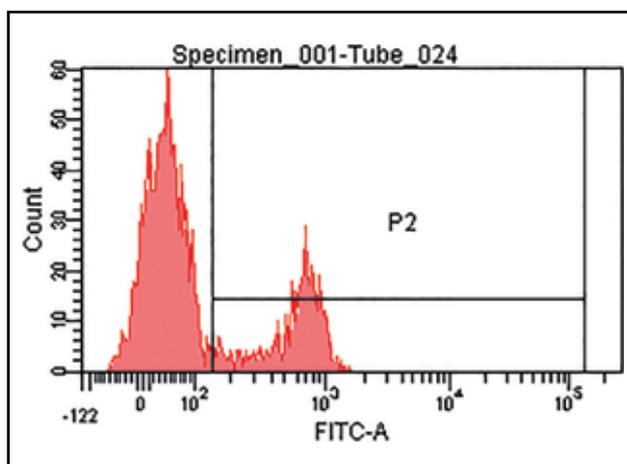
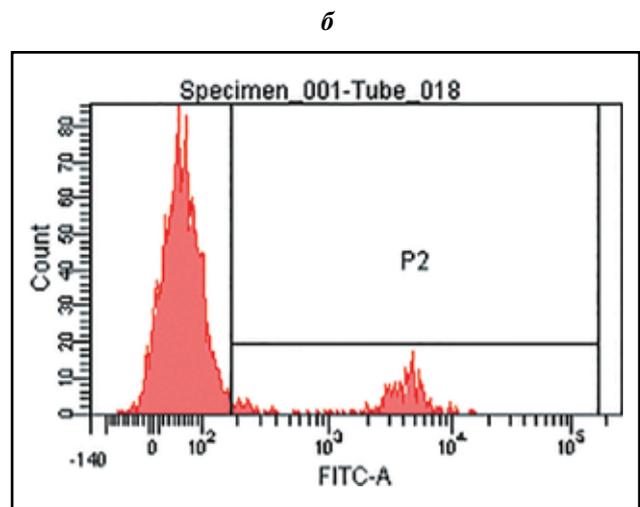
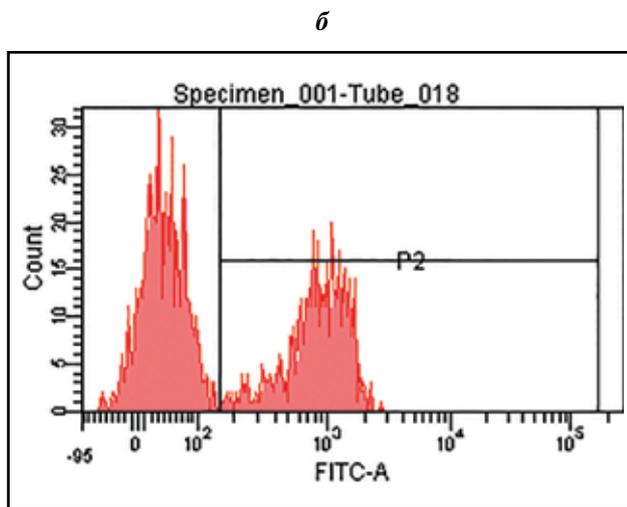
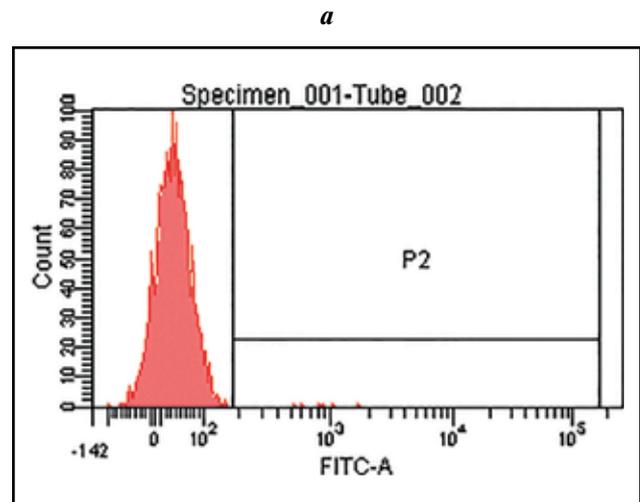
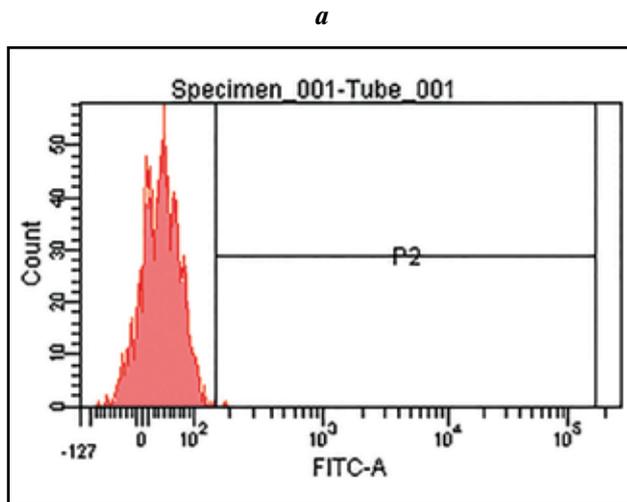


Рис. 1. Гистограммы распределения клеток при взаимодействии с МКАТ ICO31: а – неокрашенный контроль; б – непрямая РИФ с ICO31 в концентрации 5 мкг/мл, проявленная Fab²-антимышными антителами, мечеными FITC; в – прямая РИФ с комплексом ICO31-[спейсер]-флуоресцеин в концентрации 10 мкг/мл

Рис. 2. Гистограммы распределения клеток при взаимодействии с МКАТ ICO180: а – неокрашенный контроль; б – непрямая РИФ с ICO180 в концентрации 5 мкг/мл, проявленная Fab²-антимышными антителами, мечеными FITC; в – прямая РИФ с комплексом ICO180-[спейсер]-флуоресцеин в концентрации 5 мкг/мл

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

1. Buchowicz I., Zakrzewski K. Carbohydrate oxidation and antibody function in equine anti-diphtheria immunoglobulin T. *Immunochemistry* 1975;12:795–800. PMID: 173648.
2. Hage D.S., Wolfe C.A., Oates M.R. Development of a Kinetic Model To Describe the Effective Rate of Antibody Oxidation by Periodate. *Bioconjugate Chem* 1997;8(6):914–20. DOI: 10.1021/bc970112o. PMID: 9404666.
3. Hermanson G.T. *Bioconjugate techniques*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2013.
4. 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. PMID: 30693.
5. Голубцова Н.В., Бурова О.С., Барышников К.А. и др. Моноклональные антитела ICO-406 против антигена CD117. *Российский онкологический журнал* 2015;2:99–104.
6. Temponi M., Kageshita T., Perosa F. et al. Purification of murine IgG monoclonal antibodies by precipitation with caprylic acid: comparison with other methods of purification. *Hybridoma* 1989;8:85–95. DOI: 10.1089/hyb.1989.8.85. PMID: 2784406.
7. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5. PMID: 5432063.
8. Толчева Е.В., Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. и др. Анти-от5-иммунолипосомы как транспортная система для направленной доставки лекарственных препаратов к от5⁺-клеткам. *Российский биотерапевтический журнал* 2005;4:38–43.
9. Murata M., Kawamura A.Jr. Effect of molar ratio of fluorescent dye to IgG on the detection of lymphocyte surface immunoglobulins by immunofluorescence. *Microbiol Immunol.* 1980;24(1):65–78. PMID: 6767174.