



HAL
open science

**Ориентированные конъюгаты однодоменных антител и
флуоресцентных нанокристаллов: новое поколение
диагностических нанометок для
высокопроизводительной детекции онкомаркеров**

Bilan R.S., Brazhnik K.I., Chames P., Baty D., Nabiev I.R., Alyona Sukhanova

► **To cite this version:**

Bilan R.S., Brazhnik K.I., Chames P., Baty D., Nabiev I.R., et al.. Ориентированные конъюгаты однодоменных антител и флуоресцентных нанокристаллов: новое поколение диагностических нанометок для высокопроизводительной детекции онкомаркеров. Russian Journal of Biotherapy, 2014, 13 (4), pp.11-16. <hal-03159885>

HAL Id: hal-03159885

<https://hal.science/hal-03159885>

Submitted on 4 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

УДК 535.14:546-022.53+616-006.2-097.1

Р.С. Билан¹, К.И. Бражник¹, П. Шамс², Д. Бату², И.Р. Набиев^{1,3}, А.В. Суханова^{1,3}**ОРИЕНТИРОВАННЫЕ КОНЪЮГАТЫ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ:****НОВОЕ ПОКОЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАНОМЕТОК****ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ ОНКОМАРКЕРОВ**¹Лаборатория нано-биоинженерии, Национальный Исследовательский Ядерный Университет «МИФИ», Москва²Исследовательский центр в области канцерологии, INSERM UMR 1068, Марсель, Франция.³Лаборатория по исследованиям в области нанонаук – EA4682, Университет г. Реймс, Шампань-Арденны, Франция**Контактная информация**

Суханова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нано-биоинженерии

адрес: 115409 Москва, Каширское шоссе, д. 31; тел. +7(967)129-47-87

e-mail: nanomedicine.mephi@gmail.com

Статья поступила 08.09.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Идеальная диагностическая флуоресцентная нанометка должна состоять из нанокристалла с максимально возможной яркостью свечения и высокоспецифичной распознающей молекулы минимально возможного размера. При этом все распознающие молекулы, связанные с поверхностью нанокристалла, должны быть ориентированы одинаковым образом – так, чтобы их центры связывания были доступны для взаимодействия с антигенами и не были блокированы поверхностью нанокристалла.

Яркость полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов «квантовых точек» более чем на порядок превышает яркость лучших органических флуорофоров, они в тысячи раз более фотостабильны и флуоресценция квантовых точек разных цветов может быть возбуждена светом одной длины волны. В тоже время, мономерные однодоменные антитела, наименьшие функциональные единицы антител, производимых камелоидами и акулами, в 12 раз меньше полноразмерных моноклональных антител и, при сравнимой аффинности, отличаются выдающейся стабильностью и способностью к рефолдингу.

В настоящей работе нами получены ориентированные конъюгаты однодоменных антител с водорастворимыми квантовыми точками. Высокая ориентация антител на поверхности нанокристалла была достигнута за счет введения в структуру антител дополнительного С-концевого аминокислотного остатка, с последующим проведением реакции связывания антител с наночастицами именно через этот остаток.

Полученные диагностические метки использованы для высокочувствительной детекции РЭА *in vitro* методом проточной цитометрии. Показана возможность выявления малых количеств РЭА+ клеток линии MC38 (колоректальной аденокарциномы мыши) в смеси с РЭА– клетками. Предполагается, что чувствительность диагностики с использованием созданных нанометок нового поколения может быть существенно повышена за счет оптимизации условий возбуждения их флуоресценции, а возможность одновременного возбуждения флуоресценции нанокристаллов разных цветов позволяет разработать системы высокопроизводительной детекции большого количества онкомаркеров в минимальном объеме сыворотки крови.

Ключевые слова: квантовые точки, однодоменные антитела, раково-эмбриональный антиген, диагностические метки

R.S. Bilan¹, K.I. Brazhnik¹, P. Chames², D. Baty², I.R. Nabiev^{1,3}, A.V. Sukhanova^{1,3}**ORIENTED CONJUGATES OF SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES****AND FLUORESCENT NANOCRYSTALS:****A NEW GENERATION OF DIAGNOSTIC NANOPROBES****FOR HIGH-THROUGHPUT DETECTION OF CANCER MARKERS**¹Laboratory of Nano-Bioengineering of National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow²Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, INSERM UMR 1068, Marseille, France³Laboratoire de Recherche en Nanosciences, LRN-EA4682, Université de Reims Champagne-Ardenne, France**Abstract**

An ideal diagnostic fluorescent nanoprobe should comprise a nanocrystal with the highest possible fluorescence brightness and a highly specific capture molecule, which should be as small as possible. Furthermore, all capture molecules linked to the nanocrystal should be so oriented that their antigen-binding centers be accessible for antigens and not blocked by the nanocrystal surface.

The brightness of fluorescence nanocrystals, so-called QDs, is more than an order of magnitude higher than that of the best organic fluorophores; QDs are thousands of times more photostable; and fluorescence of QDs of different colors can be excited by light of the same wavelength. The monomeric single-domain antibodies (sdAbs), the smallest known antigen-recognizing molecules, which are derived from immunoglobulins of camelids and sharks, are 12 times smaller than full-size antibodies while preserving about the same affinity for antigens. They are also extremely stable and capable of refolding.

We have obtained oriented conjugates of sdAbs with water-soluble QDs. The desirable orientation of sdAbs relative to the nanocrystal surface was ensured by adding an amino acid residue to the C-end of the antibody peptide chain and subsequently linking the antibody to the nanocrystal through this residue.

The resultant diagnostic probes have been used for highly sensitive detection of CEA *in vitro* by means of flow cytometry. This technique has been demonstrated to detect minor amounts of CEA⁺ MC38 cells in a mixture with CEA⁻ cells. There are grounds to believe that the sensitivity of diagnosis using the novel nanoprobe can be substantially enhanced by optimizing the mode of excitation of their fluorescence. The possibility to simultaneously excite fluorescence of QDs of different colors allows systems for high-throughput detection of multiple cancer markers in a single, small serum sample to be developed.

Key words: quantum dots, single-domain antibodies, carcinoembryonic antigen, diagnostic probes.

Введение

КТ – новый класс флуорофоров, которые представляют собой неорганические нанокристаллы размером 2–10 нм, состоящие из полупроводникового ядра и оболочки, защищающей его от окисления [10]. В отличие от органических флуорофоров, традиционно используемых в клинической диагностике, КТ обладают рядом преимуществ: они имеют узкий, симметричный спектр эмиссии и широкий спектр возбуждения, что позволяет использовать один источник излучения для одновременного возбуждения флуоресценции КТ разных цветов. Очевидно, что подобные свойства позволяют одновременно выявить несколько биомаркеров в одном образце, используя для их визуализации КТ разных цветов [1]. КТ обладают также уникальными фотохимическими свойствами: интенсивность их флуоресценции более чем в сто раз, а фотостабильность в несколько тысяч раз выше, чем органических флуорофоров [11]. Для применения КТ в биологических и медицинских целях [2; 9] их поверхность модифицируют с тем, чтобы придать им стабильность в водных средах и биологических жидкостях и тканях. При этом для формирования дополнительной полярной оболочки на поверхности КТ используют соединения, содержащие различные функциональные группы (как правило, гидроксильные, карбоксильные или аминогруппы), что позволяет варьировать заряд поверхности полученных частиц, а также осуществлять их химическую сшивку с различными биологическими распознающими молекулами – белками, пептидами, олигонуклеотидами. Такой подход позволяет получать диагностические флуоресцентные нанометки, обладающие чрезвычайно высокими яркостью и фотостабильностью. Кроме того, разработанные методы конъюгации КТ с антителами позволяют получить целый набор меток для выявления множества антигенов.

За последние 15 лет непрерывно расширяется применение биоконъюгатов КТ в качестве диагностических меток в иммуногистохимических и цитохимических исследованиях [5; 6]. Как правило, для этих целей применяют конъюгаты КТ с моноклональными антителами или стрептавидином в комбинации с биотинилированными антителами. Большинство авторов отмечают, что использование КТ позволяет добиться большей чувствительности по сравнению со стандартными методами иммуноокрашивания [12;13].

Настоящая работа посвящена получению и применению в цитометрических исследованиях компактных диагностических меток на основе конъюгатов КТ с одАт – так называемыми «наноконъюгатами», специфичными к РЭА. Такие антитела представляют собой варибельные домены неканонических двухцепочечных антител (рис. 1), которые вырабатываются в организмах некоторых видов животных (представителей семейства верблюдовых). Неканонические антитела состоят только из двух тяжелых цепей, в отличие от полноразмер-

ных иммуноглобулинов, в состав которых входят две тяжелые и две легкие цепи [4]. Антиген-связывающий участок таких антител состоит из одного варибельного домена VhH и представляет собой наименьший из известных на сегодняшний день фрагментов, обладающих функциональной активностью антител. ОдАтОдАт получают генно-инженерным методом на основе последовательности варибельных доменов неканонических антител. В отличие от обычных моноклональных антител с молекулярной массой порядка 150 кДа, одАт имеют молекулярную массу всего около 13 кДа и состоят из приблизительно 110 аминокислотных остатков. При таком компактном размере одАт имеют высокие стабильность и растворимость, они полностью сохраняют функциональную активность полноразмерных антител и способны связываться с эпитопами, стерически недоступными для полноразмерных антител. В данной работе для получения компактных диагностических меток были использованы модифицированные одАт, содержащие С-концевой остаток цистеина, который позволил конъюгировать антитела с поверхностью КТ в строго заданной ориентации, не затрагивая участок связывания антигена. Метод ориентированной конъюгации одАт на поверхности КТ позволил получить компактные сверхяркие диагностические метки, которые были использованы для цитометрических исследований.

Материалы и методы

Получение и очистка

рекомбинантных однодоменных антител

РЭА-специфичные одАт С17 были получены путем иммунизации ламы. Клоны РЭА-специфичных одАт были отобраны из библиотек одАТ, полученных после иммунизации. Гены одАт были субклонированы в плазмидный вектор рЕТ, содержащий фрагмент ДНК, кодирующий шесть остатков гистидина, для экспрессии в клетках бактерий *Escherichia coli* штамма BL21-DE3 и дальнейшего выделения одАт с помощью хроматографии на колонке с никель-агарозой. Плазмидные конструкции рЕТ одАт-С17-his6Cys были получены введением дополнительного фрагмента ДНК, кодирующего аминокислоту цистеин с помощью стандартных генно-инженерных методов. Специфическая интеграция одиночного аминокислотного остатка цистеина на С-конце молекул рекомбинантных одАт-Сys позволяет получить ориентированное расположение молекул одАт на поверхности КТ после конъюгирования.

Бактериальные клетки, трансформированные плазмидными конструкциями, выращивали в течение ночи при 37 °С и постоянном перемешивании в 10 мл среды 2 YТ, содержащей 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 85 мМ хлорида натрия, 2 % глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина. Полученную ночную культуру бактериальных клеток разводили в 400 мл свежей среды 2 YТ и растили до момента, когда оптическая плотность (OD₆₀₀) становилась равной 0,5.

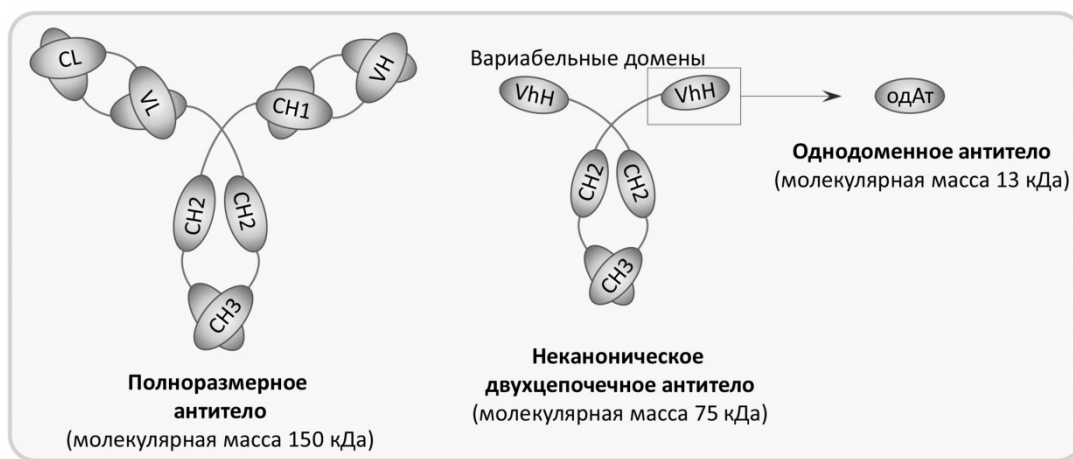


Рис. 1. Строение полноразмерных антител, состоящих из двух тяжелых и двух легких цепей, и неканонических двухцепочечных антител, которые состоят из двух тяжелых цепей. Антиген-связывающий участок полноразмерных антител состоит из двух переменных доменов тяжелых и легкой цепей; у неканонических антител этот участок состоит только из одного переменного домена (VhH). Однодоменные антитела, получаемые из неканонических антител, являются наименьшими структурными единицами, обладающими полноценной функциональной активностью антитела.

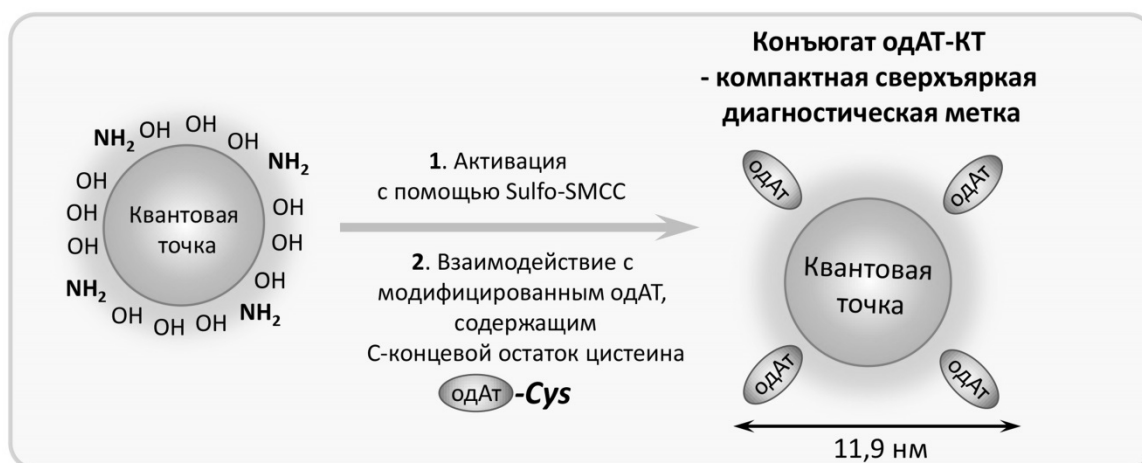


Рис. 2. Схема получения конъюгатов квантовых точек с рекомбинантными однодоменными антителами, модифицированными путем введения дополнительного остатка цистеина на С-конце аминокислотной последовательности.

Экспрессию одАТ-Cys индуцировали добавлением 0.1 мМ изопропил β -D-1-тиогактопиранозид, и инкубировали клетки при 30 °С и постоянном перемешивании в течение 20 ч.

Клетки собирали центрифугированием, клеточный осадок замораживали на 20 мин при –80 °С и затем лизировали добавлением реагента для экстракции белков BugBuster® (Novagen) на 20 мин при мягком перемешивании.

После этого одАТ выделяли с помощью хроматографии на колонке с никель-агарозой (Clontech) согласно протоколу производителя. После очистки одАТ-Cys концентрировали в натрий-фосфатном буфере, содержащем 137 мМ хлорида натрия (рН 7,2), с помощью центрифужных концентраторов Амикон Ультра 5000 MWCO. Степень очистки одАТ-Cys определяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия. Концентрацию белка определяли спектрометрически. Полученные высокоочищенные препараты одАТ-Cys с концентрацией белка 5 мг/мл хранили при –20 °С.

Оценка специфической активности полученных партий одАТ проводилась с помощью стандартных иммуотестов (иммуноблоттинг).

Конъюгация антител с квантовыми точками

Для получения конъюгатов были использованы КТ с максимумом эмиссии флуоресценции при 570 нм, сольбилизованные в водном растворе с помощью DL-цистеина и поверхность которых была модифицирована с использованием низкомолекулярных производных ПЭГ с концевыми сульфгидрильными (SH) и гидроксильными (OH) или аминогруппами (NH₂) в молярном соотношении (SH-ПЭГ-OH):(SH-ПЭГ-NH₂) = 9:1 [9].

Конъюгацию с одАТ проводили согласно методике, описанной в [9]. Квантовые точки разводили в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,2) до концентрации 4 мг/мл. Затем к раствору КТ добавляли 100-кратный молярный избыток бифункционального сшивающего агента Sulfo-SMCC и

инкубировали при комнатной температуре в течение часа при постоянном перемешивании. После окончания активации КТ очищали от избытка Sulfo-SMCC на хроматографической колонке с Сефадексом G-25, уравновешенной 0,1 М фосфатным буферным раствором (рН 7,2).

Затем очищенные активированные КТ смешивали с одАт в молярном соотношении 1:10 и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Полученные конъюгаты очищали методом гелефильтрационной хроматографии на колонке с Супердексом G200, уравновешенной 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,2).

Количественно соотношение одАт и КТ в полученных конъюгатах оценивали спектрофотометрически; содержание антител в пробе определяли при помощи стандартного набора реагентов (реакция Бредфорда), содержание КТ в пробе – по спектру поглощения, используя значение коэффициента молярного поглощения на первом экситонном максимуме поглощения. Полученное соотношение одАт и КТ в конъюгатах составило приблизительно 4 : 1.

Размеры КТ и конъюгатов КТ–одАт измеряли методом динамического рассеяния света с помощью анализатора размера наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern).

Клеточные культуры

Линию клеток колоректальной аденокарциномы мыши MC38 культивировали в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium glutamax media (Invitrogen) с добавлением 10% ТЭС, инактивированной нагреванием (BioWhittaker), и антибиотиков: пенициллина (1000 ед./мл), стрептомицина (1000 мкг/мл), фунгизина (2,5 мкг/мл). Клеточную линию MC38-РЭА, экспрессирующую РЭА, культивировали в тех же условиях в среде с добавлением G418 (Sigma-Aldrich).

Окрашивание клеток при помощи конъюгатов КТодАт и цитометрический анализ

Конъюгаты КТодАт разводили в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 5% БСА, до концентрации 30 мкг/мл. Клетки MC38 и MC38-РЭА суспендировали, и готовили смесь клеток с содержанием MC38-РЭА 1% и MC38 99%. Затем к общему количеству 100 000 клеток добавляли по 50 мкл растворов конъюгатов КТ–одАт и инкубировали в течение 90 мин при +4 °С в темноте. Затем производили отмывку фосфатным буферным раствором, содержащим 5 % БСА. Сразу же после последней стадии отмывания определяли соотношение окрашенных и неокрашенных клеток в смеси. Цитометрический анализ флуоресцентно окрашенных клеток проводили с помощью проточного цитометра FACStar Plus (Becton Dickinson). Для возбуждения флуоресценции КТ использовали аргоновый лазер с длиной волны излучения 488 нм, сигнал анализировали в диапазоне 564–586 нм. Интенсивность окрашивания клеток в каждом из анализируемых образцов оценивали по значению медианы флуоресцентного сигнала.

Результаты и обсуждение

Получение и характеристика конъюгатов КТ–одАт

Квантовые точки, представляющие собой нанокристаллы CdSe, покрытые оболочкой из ZnS,

были синтезированы в органической среде, сольбулизированы (для перевода в водный раствор) путем замены гидрофобных лигандов на поверхности КТ на DL-цистеин. Затем молекулы цистеина замещали смесью тиол-содержащих низкомолекулярных производных ПЭГ с концевыми гидроксильными (ОН) или аминогруппами (NH₂) в молярном соотношении (SH-ПЭГ-ОН):(SH-ПЭГ-NH₂) = 9 : 1 [9]. Таким образом, были получены стабильные в водных растворах компактные КТ с гидродинамическим диаметром около 9 нм и квантовым выходом около 90 %. На поверхности таких КТ экспонированы функциональные группы, определяющие стабильность КТ при различных рН. Варьируя состав производных ПЭГ при сольбулизации КТ, можно регулировать поверхностный заряд получаемых частиц и подбирать оптимальное соотношение функциональных групп для дальнейшей конъюгации (ковалентной иммобилизации) антител на поверхности КТ.

При получении диагностических меток на основе конъюгатов КТ с антителами решающими условиями являются:

- 1) сохранение биологической активности и стабильности антитела в результате конъюгации;
- 2) оптимальное количественное соотношение КТ и антитела в составе конъюгата;
- 3) надлежащая ориентация антител на поверхности КТ, с тем чтобы функционально активные сайты были экспонированы наружу и доступны для связывания с антигеном.

Для иммобилизации биологических молекул (в частности, антител) на поверхности наночастиц широко используют стандартные методы карбодимидной химии. Как правило, ковалентная иммобилизация осуществляется за счет взаимодействия первичной аминогруппы антитела с карбоксильными группами на поверхности частицы, предварительно активированными с помощью водорастворимого карбодимида. Этот метод имеет ряд ограничений. Во-первых, интермедиаты, образующиеся при активации гидроксильных групп с помощью карбодимида, нестабильны в водных средах и подвергаются быстрому гидролизу, поэтому необходимо использовать большие избытки карбодимида. Во-вторых, взаимодействие аминогрупп антитела с активированными карбоксильными группами КТ происходит случайным образом и может привести к большому числу нежелательных сшивок и потери аффинности антитела. В-третьих, из-за большого числа аминогрупп, экспонированных на поверхности антитела, его ориентация на поверхности происходит случайным образом, что приводит к стерической недоступности определенной доли центров связывания антигена.

Выпускаемые компанией Invitrogen метки на основе антител, связанных с КТ, получают конъюгацией КТ с фрагментами антител, образующихся в результате частичного восстановления дисульфидных связей полноразмерного антитела. При надлежащих условиях восстановления, в результате такой реакции получают два фрагмента антител, каждый из которых состоит из одной тяжелой и одной легкой цепей. Конъюгация происходит через тиольные группы восстановленных фрагментов антител. Однако функциональная активность восстановленных таким образом фрагментов антител может быть существенно снижена за счет нарушения целостности антиген-связывающих сайтов, образованных переменными доменами тяжелой и легкой цепей.

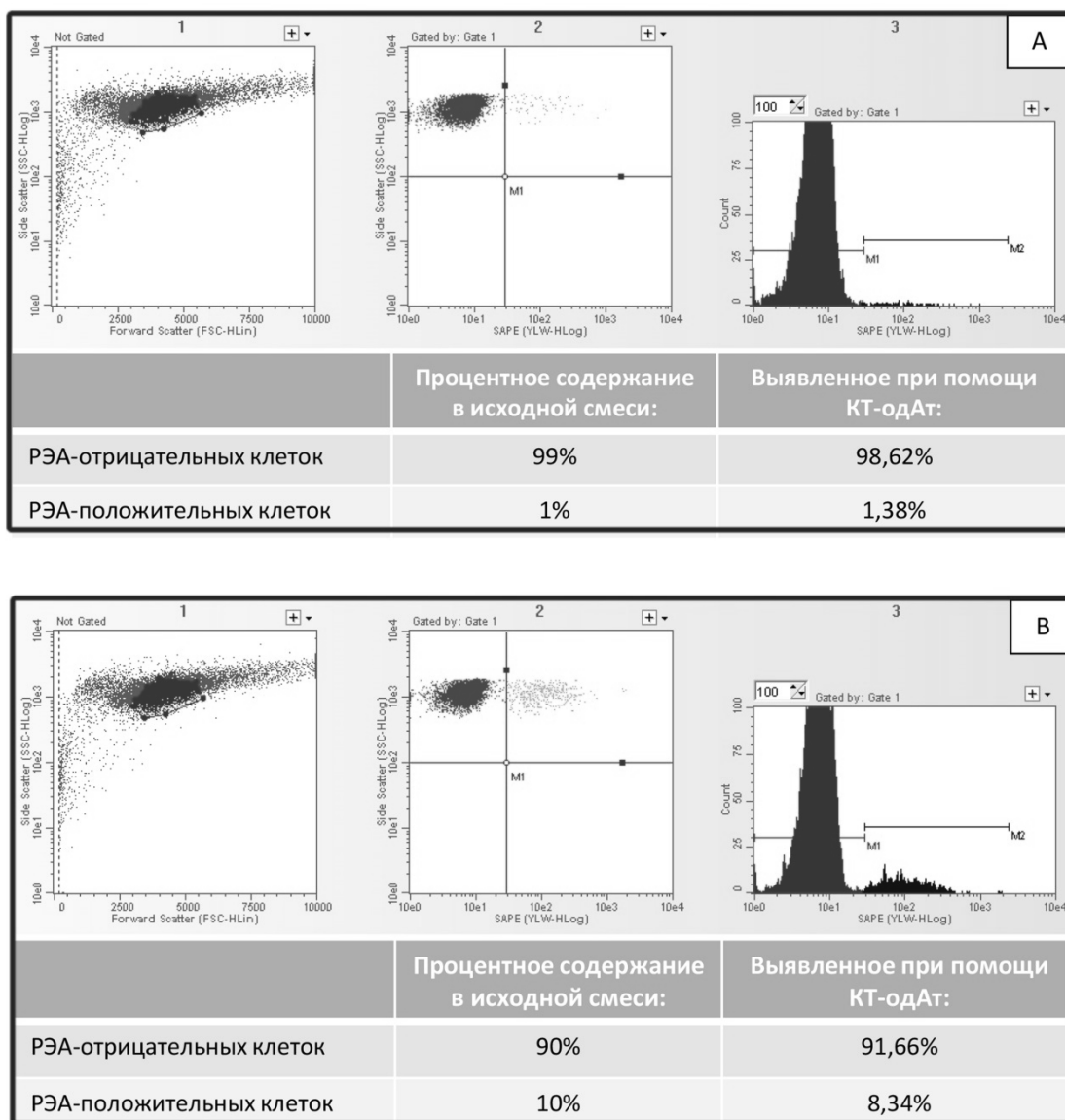


Рис. 3. Проточная цитометрия смесей клеток MC38-РЭА и MC38. 100 000 клеток инкубировали с КТ-одАт в течение 90 мин при +4°C в темноте. Сразу же после последней стадии отмывания определяли соотношение окрашенных и неокрашенных клеток в смеси с помощью проточной цитометрии.

- с процентным содержанием MC38-РЭА 1%
- MC38 99% и MC38-РЭА 10% и MC38 90%

Так, было обнаружено, что количество функционально активных антител в составе полученных таким образом серийно производимых конъюгатов составляет всего лишь $0,076 \pm 0,014$ антител/КТ, в то время как большая часть антител теряет свою активность вследствие чрезмерного восстановления [7].

В данной работе был разработан метод ориентированной конъюгации одАт на поверхности КТ, который позволяет сохранить биологическую активность антител и задать их строгую ориентацию на поверхности КТ (рис. 2). Модифицированные одАт к РЭА были получены генно-инженерными методами путем введения дополнительного остатка цистеина на С-конце аминокислотной последовательности. Для конъюгации с КТ был использован бифункциональный сшивающий агент сульфо-сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил] циклогексан-1-карбоксилат (Sulfo-SMCC), имеющий две реакционно-способные группы; одна из них (N-оксисукцинимидный эфир) активна в отношении пер-

вичных аминогрупп на поверхности КТ, а вторая (малеимидная группа) связывается с тиольной группой цистеина в составе модифицированного одАт. Сначала проводили реакцию взаимодействия Sulfo-SMCC с аминогруппами в составе оболочки КТ, после чего активированные КТ очищали от избытка реагента методом гель-проникающей хроматографии. Затем к КТ добавляли одАт, в результате чего тиольные группы в составе одАт связывались с поверхностью КТ, активированных с помощью Sulfo-SMCC. За счет того, что в состав модифицированных одАт была введена всего одна тиольная группа, присоединение одАт происходило только через С-концевой аминокислотный остаток антител. В результате все молекулы одАт, ковалентно связанные с поверхностью КТ, строго ориентированы относительно поверхности КТ, что сохраняет активность распознающего центра, экспонированного в окружающую среду. Молярное соотношение одАт:КТ в конъюгате подсчитывали,

определяя содержание белка методом Бредфорда и подсчитывая концентрацию КТ, зная коэффициенты экстинкции КТ для первого экситона. Это соотношение оказалось примерно 4 одАт на КТ (одАт:КТ = 4 : 1).

Измерения с использованием метода ДРС показали, что конъюгация КТ с одАт-Cys позволяет получить исключительно компактные диагностические метки. Гидродинамические диаметры конъюгатов КТ–одАт (11,9 нм) лишь немного больше, чем диаметры неконъюгированных КТ (8,84 нм) и гораздо меньше, чем размеры серийно выпускаемых конъюгатов КТ–IgG (30,3 нм).

Использование конъюгатов КТ–одАт в проточной цитометрии

Эксперименты по иммунодетекции с помощью метода проточной цитометрии продемонстрировали, что конъюгаты КТ–одАт специфически связывают РЭА – рецептор клеточной поверхности, который экспрессирует значительная часть опухолевых клеток человека (рис. 3). Проточная цитометрия смесей клеток МС38-РЭА и МС38 в различных соотношениях (процентное содержание РЭА-положительных клеток в смеси варьировалось от 100% до 1%), окрашенных конъюгатами КТ–одАт, показала тесную корреляцию между числом клеток, идентифицированных как РЭА+, и действительным количеством РЭА+ клеток: даже 1% РЭА+ клеток легко выявлялся на фоне 99%

Благодарности

Данная работа финансировалась Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках программы привлечения ведущих ученых в российские образовательные учреждения высшего профессионального образования (проф. Игорь Руфаилович Набиев, грант № 11.G34.31.0050, www.lnbe.mephi.ru).

Литература

1. Бражник К.И., Барышникова М.А., Соколова З.И. и др. Новые направления в исследовании и ранней диагностике рака с применением детекционных систем на основе флуоресцентных нанокристаллов // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 3. – С. 11–24.
2. Akinfiyeva O., Nabiev I., Sukhanova A. New directions in quantum dots-based flow cytometry detection of cancer serum markers and tumor cells // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2013. – 86(1). – P. 1–14.
3. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains // Nature. – 1993. – 363. – P. 446–8.
4. Li Z.H., Peng J., Chen H.L. Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for biomedical imaging // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2011. – 11(9). – P. 7521–36.
5. Liu X.L., Peng C.W., Chen C., et al. Quantum dots-based double-color imaging of HER2 positive breast cancer invasion // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – 409(3). – P. 577–82.
6. Pathak S., Davidson M.C., Silva G.A. Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots // Nano Letters. – 2007. – 7. – P. 1839–45.
7. Rousserie G., Sukhanova A., Even K. et al. Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection and cancer diagnosis on solid-state microarrays // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2010. – 74. – P. 1–15.
8. Samokhvalov P., Artemyev M., Nabiev I. Basic principles and current trends in colloidal synthesis of highly luminescent semiconductor nanocrystals // Chemistry - A European Journal. – 2013. – 19(5). – P. 1534–46.
9. Sukhanova A., Devy J., Venteo L. et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // Analytical Biochemistry. – 2004. – 324(1). – P. 60–7.
10. Xing Y., Smith A.M., Agrawal A. et al. Molecular profiling of single cancer cells and clinical tissue specimens with semiconductor quantum dots // International Journal of Nanomedicine. – 2006. – 1(4). – P. 473–81.
11. Zrazhevskiy P., Gao X. Quantum dot imaging platform for single-cell molecular profiling // Nat. Commun. – 2013. – 4. 1619.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КТ	квантовая точка
одАт	однодоменное антитело
РЭА	раково-эмбриональный антиген
Sulfo-SMCC	сульфо-сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат
QDs	quantum dots

РЭА– клеток (рис. 3). Это подтверждает высокую специфичность и чувствительность выявления РЭА-эксперес-сирующих клеток с помощью конъюгатов КТ–одАт методом проточной цитометрии.

Заключение

Метод ориентированной конъюгации, разработанный в данном исследовании, позволяет химически иммобилизовать одАт на поверхности КТ без потери функциональной активности антител таким образом, что практически все центры связывания антигена экспонированы в окружающей среде. Полученные диагностические метки на основе конъюгатов КТ–одАт имеют крайне малый размер: их гидродинамический диаметр составляет 11,9 нм, что значительно меньше используемых в настоящее время конъюгатов полно-размерных антител с КТ. В среднем, с каждой КТ конъюгированы одАт4 молекулы одАт.

Полученные диагностические метки применяли для иммунодетекции РЭА-положительных клеток методом проточной цитометрии. Показана высокая чувствительность меток: они позволяют выявить РЭА-положительные клетки, даже если их содержание в клеточной популяции составляет всего 1%. Данный подход можно применять для высокоточной детекции других онкомаркеров, например, рецепторов эпидермального фактора роста, методом проточной цитометрии.