



УДК 547.873:57.083.3+541.182.43+616-097+577.112.85+677.287.5

## СИНТЕЗ КОНЪЮГАТОВ ФТАЛОЦИАНИНОВ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ В СРЕДЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ АОТ/ОКТАН И В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СМЕСИ

© 1998 г. Е. Г. Матвеева<sup>#</sup>, И. Г. Меерович, А. П. Савицкий

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 117071, Москва, ГСП-7, Ленинский просп., 33

Поступила в редакцию 22.01.97 г. Принята к печати 10.08.97 г.

Синтезированы конъюгаты фталоцианинов кобальта и алюминия с моноклональными антителами с использованием в качестве среды для синтеза системы обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в *n*-октане или водно-органической смеси с низким содержанием органического растворителя. Изучено влияние степени гидратации мицелл и концентрации фталоцианинов на состав конъюгатов. Проведена оценка иммунологической активности полученных конъюгатов антител с фталоцианином кобальта в сравнении с немодифицированными антителами. Исследована каталитическая активность свободных фталоцианинов кобальта и их конъюгатов с антителами в реакции окисления аскорбиновой кислоты.

*Ключевые слова:* конъюгаты, моноклональные антитела, фталоцианины кобальта, фталоцианины алюминия, обращенные мицеллы.

Конъюгаты фталоцианинов с моноклональными антителами перспективны для применения в иммунохимической диагностике [1, 2] и терапии [3–7]. Использование таких конъюгатов в иммунохимической диагностике обусловлено флуоресцентными [1, 2], каталитическими [2] и электрохимическими [2] свойствами комплексов фталоцианинов с различными металлами. Применение конъюгатов в терапии основано на способности фталоцианинов накапливаться в злокачественных новообразованиях и под воздействием лазерного излучения или химического агента катализировать генерацию цитотоксических агентов (синглетного кислорода, пероксидного или гидроксильного радикала и т.д.). Одним из путей повышения селективности накопления токсических соединений в злокачественных опухолях является использование конъюгатов этих соединений с моноклональными антителами к опухолюассоциированному антигену [8].

В процессе получения конъюгатов фталоцианинов с белками возникает проблема их различ-

ной растворимости. Многие производные фталоцианинов в активированном для проведения ковалентного связывания с антителами состоянии плохо растворимы в воде (или в водно-органических смесях с малым содержанием органических растворителей). Поэтому в качестве среды для синтеза конъюгатов антител с фталоцианинами кобальта была выбрана система обращенных мицелл, которая может служить универсальной матрицей для модификации водорастворимых макромолекул водонерастворимыми реагентами [9, 10]. При синтезе конъюгата молекула белка заключена внутри обращенной мицеллы и находится в водной фазе, а молекулы амфифильных и неполярных реагентов локализованы в более гидрофобной мицеллярной оболочке или вне обращенной мицеллы – в неполярном органическом растворителе. Реакция между солюбилизированным в мицелле белком и нерастворимым в воде реагентом проходит на поверхности мицеллы – границе раздела гидрофильной и гидрофобной фаз.

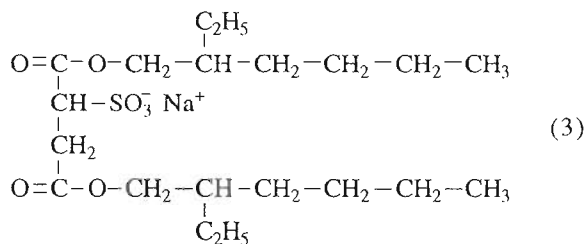
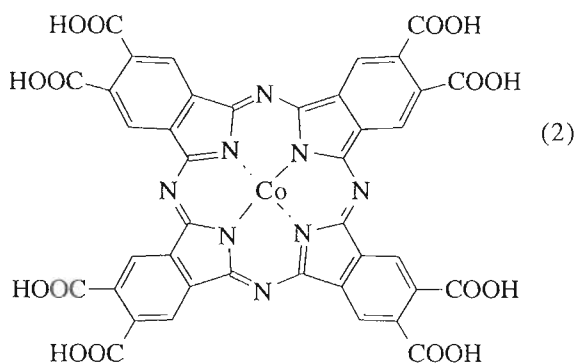
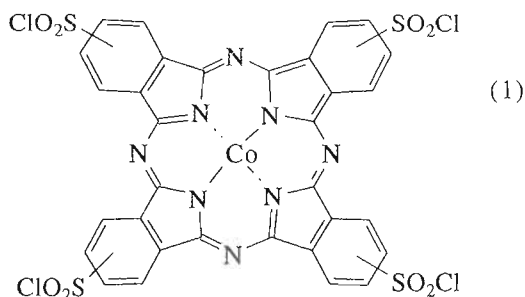
Мы провели сравнительное изучение состава конъюгатов моноклональных антител с сульфохлоридами фталоцианинов кобальта и алюминия, а также октакарбокситфалоцианином кобальта, синтезированных в системах обращенных мицелл и водно-органических смесях с низким (2–15%) содержанием смешивающегося с водой органического растворителя (DMSO или пиридин). Изучены функциональные свойства полученных конъюгатов (а именно способность их специфического связывания с антигеном и каталитическая

Сокращения: АОТ – аэрозоль ОТ, натриевая соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты; БСА – бычий сывороточный альбумин; ПАВ – поверхностно-активное вещество; АВТС – 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазол-6-сульфокислота); АlPc – фталоцианин алюминия; СоPc – фталоцианин кобальта; СоPcSCl – сульфохлорид фталоцианина кобальта; СоPc(COOH)<sub>8</sub> – октакарбокситфалоцианин кобальта; МА – моноклональные антитела; NSI – N-гидрокси-сукцинимид; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBS-AT – PBS, pH 7.4, 0.05% Tween-20, альбумин – 5 мг/мл; Pc – фталоцианин.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: inbio@glas.apc.org).

активность в реакции окисления аскорбиновой кислоты) с целью сравнения их со свойствами исходных антител и фталоцианинов. Для отработки методик получения и очистки конъюгатов, а также измерения их каталитической активности в качестве модельных антител использовали моноклональные антитела против копропорфирина палладия, что связано со сравнительной доступностью этих антител и с возможностью проведения контрольных иммунологических тестов на микропланшетах.

Для конъюгирования с антителами использовали сульфохлориды фталоцианинов кобальта (алюминия) (1) и октакарбокситфалоцианин кобальта (2). В качестве мицеллярной среды синтеза была выбрана хорошо изученная физико-химическими методами система обращенных мицелл, образованных Аэрозолем ОТ (АОТ) (3) в *n*-октане [11–16].



Молекулы антител имеют на своей поверхности доступные для химических реакций свободные аминогруппы. Активные группы фталоцианинов, в частности сульфохлоридные группы и карбоксильные группы, активированные дициклогексилкарбодиимидом, могут образовывать с аминогруппами антител ковалентные связи. Конъюгаты моноклональных антител с фталоцианином

кобальта/алюминия (в водно-органической смеси и в среде обращенных мицелл) были получены в результате прямого взаимодействия сульфохлорида фталоцианина кобальта и моноклональных антител. Для синтеза конъюгатов моноклональных антител с октакарбокситфалоцианином кобальта была применена двухстадийная методика: а) активация октакарбокситфалоцианина кобальта смесью *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида и *N*-гидроксисукцинимидом с образованием активированного эфира; б) реакция активированного эфира с антителами с образованием конъюгата.

Количественные и качественные результаты синтеза выявляли после проведения хроматографической очистки продуктов (см. “Экспериментальную часть”) и определения их физико-химических и иммунологических характеристик.

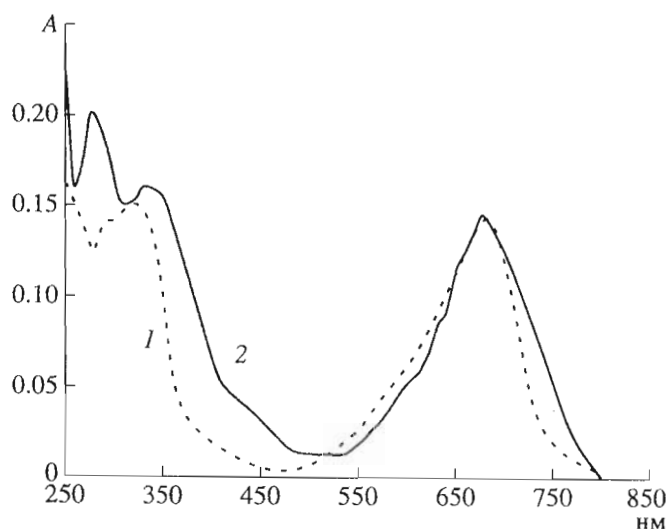
Степень модификации белка в синтезированных конъюгатах,  $\alpha$  ( $\alpha$  – количество молекул фталоцианина кобальта на одну молекулу белка), определяли методом УФ-видимой спектроскопии. Оптическое поглощение растворов конъюгатов антител с фталоцианинами кобальта/алюминия в видимой области определяется лишь количеством фталоцианина кобальта/алюминия, а оптическое поглощение в УФ-области – суммарным вкладом антител (МА) и фталоцианина (Рс) (рис. 1). Степень модификации белка может быть вычислена по формуле

$$\alpha = \frac{A_{670}}{(A_{280} - A_{280}^{Pc})} \frac{\epsilon_{280}^{MA}}{\epsilon_{670}^{Pc}}$$

где  $A_{670}$  и  $A_{280}$  – оптическое поглощение растворов конъюгатов сульфохлорида фталоцианина кобальта/алюминия с антителами при длине волны 670 (максимум в видимой области спектра) и 280 нм. Для растворов конъюгатов октакарбокситфалоцианина кобальта с антителами оптическое поглощение измеряли при длине волны 680 нм;  $A_{280}^{Pc}$  – вклад фталоцианина кобальта/алюминия в оптическую плотность при длине волны 280 нм;  $\epsilon_{280}^{MA}$  и  $\epsilon_{670}^{Pc}$  – молярные коэффициенты поглощения антител (при  $\lambda$  280 нм) и фталоцианина (при  $\lambda$  670 нм).

Величина  $\epsilon_{280}^{MA}$  в водном буферном растворе, согласно данным [17], составляет  $2.07 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Молярные коэффициенты поглощения фталоцианинов кобальта/алюминия при длине волны 280 и 670 (680) нм определяли исходя из спектров поглощения их растворов, измеренных в диапазоне 250–800 нм (см. “Экспериментальную часть”).

Выход реакции (по белку) определяли как отношение количества белка в конъюгате к количеству белка, введенного в реакцию, выраженное в процентах.



**Рис. 1.** Спектры оптического поглощения растворов: 1 – октакарбокситфталоцианина кобальта, 2 – конъюгата октакарбокситфталоцианина кобальта с моноклональными антителами против копропорфирина палладия в буфере PBS, pH 8.15. Синтез конъюгата проводили в водно-органической смеси,  $[\text{CoPc}(\text{COOH})_8]/[\text{MA}] = 50$ ,  $\alpha = 22.7$ .

Установлено, что на состав и свойства полученных конъюгатов оказывают влияние различные факторы, в частности исходное соотношение реагентов, степень гидратации обращенных мицелл  $w_0$  ( $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ ), способ выделения конъюгатов из системы обращенных мицелл (осаждение избытком этанола или ацетона, экстракция фосфатно-солевым буфером с большим содержанием соли с последующим диализом), температура, время реакции. С увеличением времени синтеза конъюгатов с фталоцианином алюминия растет степень модификации белка, однако падает выход (табл. 1).

**Таблица 1.** Степень модификации белка ( $\alpha$ ) и выход реакции синтеза конъюгатов моноклональных антител с сульфохлоридом фталоцианина алюминия, синтезированных в среде обращенных мицелл АОТ/октан\* при разном времени реакции

Время реакции	$\alpha$	Выход, %**
10 мин	1.5	99
3.5 ч	3.3	82
24 ч	5.4	59

\*  $w_0 = 12$ , выделение конъюгатов осаждением избытком ацетона,  $[\text{AlPcSCl}]/[\text{MA}] = 40 : 1$ .

\*\* Здесь и в табл. 2–5 выход приведен в % от количества белка, введенного в реакцию.

При варьировании степени гидратации обращенных мицелл наиболее высокая степень модификации была получена для степени гидратации  $w_0$  20 (табл. 2). В дальнейшем синтез конъюгатов в обращенных мицеллах проводили при этой степени гидратации.

С ростом исходного мольного соотношения  $[\text{Pc}]/[\text{MA}]$  степень модификации белка растет при проведении синтеза как в системе обращенных мицелл (табл. 3), так и в водно-органической смеси (табл. 4). Оказалось, что в случае синтеза в системе обращенных мицелл степень модификации белка зависит от способа выделения модифицированного белка из мицеллярного раствора. Более высоких степеней модификации можно достичь при выделении методом экстракции (табл. 3), однако выход в этом случае значительно ниже, чем при выделении осаждением избытком ацетона. Если же сравнить состав конъюгатов, полученных при синтезе в среде обращенных мицелл и в водно-органической смеси (табл. 5), то видно, что использование мицеллярной среды позволяет достичь более высоких степеней модификации белка даже при меньших исходных соотношениях  $[\text{Pc}]/[\text{MA}]$ . По-видимому, этот эффект можно объяснить концентрированием реагентов в ходе синтеза в водной полости или вблизи оболочки обращенной мицеллы. Такое увеличение степени модификации может оказаться полезным в случае использования дорогостоящих модифицирующих агентов.

Была определена иммунологическая активность конъюгатов, полученных в различных условиях, в сравнении с немодифицированными антителами. Обнаружено, что иммунологическая активность конъюгатов уменьшается с ростом степени модификации белка. Конъюгаты, полученные в водно-органических смесях, сохраняют иммунологическую активность практически полностью, по крайней мере до степени модифика-

**Таблица 2.** Степень модификации белка ( $\alpha$ ) и выход реакции синтеза конъюгатов моноклональных антител с сульфохлоридами фталоцианина кобальта и алюминия, синтезированных в среде обращенных мицелл АОТ/октан при различных степенях гидратации,  $w_0^*$

$w_0$	Металл Pc	$\alpha$	Выход, %
10	Co	2.6	68
20		4.5	93
30		3.8	95
9	Al	1.7	н/о
25		3–5	н/о
45		0.7	н/о

\* Выделение конъюгатов осаждением избытком ацетона,  $[\text{CoPcSCl}]/[\text{MA}] = 50 : 1$  и  $[\text{AlPcSCl}]/[\text{MA}] = 20 : 1$ .



ции белка, равной 6. При дальнейшем увеличении степени модификации белка иммунологическая активность конъюгатов резко уменьшается (рис. 2). Кроме того, активность конъюгатов зависит от содержания органического растворителя в водно-органической смеси при их получении: при низком содержании (до 8%) активность конъюгатов сохраняется практически полностью, при увеличении до 15% резко уменьшается. Конъюгаты, полученные в среде обращенных мицелл, сохраняют иммунологическую активность лишь частично (рис. 3). При выделении таких конъюгатов осаждением ацетоном их иммунологическая активность сохраняется лишь частично, а при выделении методом экстракции из октановой мицеллярной фазы водно-солевым раствором активность значительно ниже активности нативного немодифицированного препарата антител.

Известно, что фталоцианиновые комплексы кобальта катализируют автоокисление аскорбиновой кислоты [18]. Мы исследовали влияние свободных замещенных фталоцианинов кобальта (гидролизованного сульфохлорида фталоцианина кобальта и октакарбокситфалоцианина кобальта), а также их конъюгатов с антителами на реакцию окисления аскорбиновой кислоты. В качестве величины, характеризующей каталитическую активность ( $k$ ), было выбрано отношение разности скоростей реакции окисления аскорбиновой кислоты в присутствии и в отсутствие фталоцианина кобальта к его концентрации. Замещенные фталоцианины кобальта, как и их конъюгаты с антителами, катализируют окисление аскорбиновой кислоты. Однако каталитическая активность конъюгатов приблизительно в 2 раза меньше, чем у свободных фталоцианинов (табл. 6). Отметим, что каталитическая активность фталоцианиновых конъюгатов, синтезированных в среде обращенных мицелл, такая же (для октакарбокситфалоцианина) или в 2 раза ниже (для сульфохлорида фталоцианина) по сравнению с конъюгатами, синтезированными в водно-органической среде.

Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность синтеза конъюгатов фталоцианинов с белками в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях на примере получения конъюгатов фталоцианинов кобальта и алюминия с иммуноглобулинами (моноклональными антителами) в обращенных мицеллах Аэрозоль ОТ в *n*-октане. Проведена оптимизация условий синтеза в обращенных мицеллах (степень гидратации мицелл, способ выделения конъюгатов из мицеллярной среды) с точки зрения выхода конъюгата и его иммунологической активности. Оптимальными оказались степень гидратации мицелл ( $w_0$  20) и экстракция конъюгата из октанового раствора обращенных мицелл водно-солевым раствором. Показано, что при синте-

**Таблица 3.** Степень модификации белка ( $\alpha$ ) и выход реакции синтеза конъюгатов моноклональных антител с сульфохлоридом фталоцианина кобальта, синтезированных в среде обращенных мицелл АОТ/октан при разных исходных соотношениях  $[\text{CoPcSCl}]/[\text{МА}]^*$

Исходное кол-во CoPcSCl, моль/моль МА	Метод выделения	$\alpha$	Выход, %
5 : 1	Осаждение	2.4	64
50 : 1	»	4.5	93
150 : 1	»	11	93
10 : 1	Экстракция	8.9	26
25 : 1	»	9.8	10

\*  $w_0 = 20$ , выделение конъюгата осаждением избытком ацетона (осаждение) или экстракцией водно-солевым раствором, содержащим 0.1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 0.3 М  $\text{NaCl}$ , pH 7.4 (экстракция).

**Таблица 4.** Степень модификации белка ( $\alpha$ ) и выход реакции синтеза конъюгатов моноклональных антител с октакарбокситфалоцианином кобальта, синтезированных в водно-органической среде при разных исходных соотношениях  $[\text{CoPc}(\text{COOH})_8]/[\text{МА}]^*$

Исходное кол-во $\text{CoPc}(\text{COOH})_8$ , моль/моль МА	Содержание органического растворителя, %	$\alpha$	Выход, %
10	1.8	3.8	49
20	3.2	5.6	68
50	8.3	22.7	86
100	15.3	29.2	88

зе в среде обращенных мицелл может быть достигнута более высокая степень модификации при меньших относительных количествах введенного в реакцию фталоцианина кобальта, чем при синтезе в водно-органической среде. Обнаружено, что специфическая иммунологическая активность моноклональных антител сохраняется практически полностью при их конъюгировании с фталоцианинами кобальта в водно-органическом растворе и сохраняется частично при конъюгировании в среде обращенных мицелл и последующем выделении. Продемонстрировано, что свободный октакарбокситфалоцианин кобальта и гидролизованный сульфохлорид фталоцианина кобальта и их конъюгаты с антителами проявляют каталитическую активность в реакции окисления аскорбиновой кислоты, причем каталитическая активность конъюгатов приблизительно в 2 раза ниже, чем свободных фталоцианинов кобальта.

**Таблица 5.** Степень модификации белка и выход реакции синтеза конъюгатов моноклональных антител с сульфохлоридом фталоцианина кобальта и октакарбокситфалоцианином кобальта в разных средах синтеза

Производное CoPc	Среда	Исходное соотношение [CoPc]/[MA], моль/моль	$\alpha$	Выход, %
CoPcSCl	АОТ/октан*	10 : 1	8.9	26
CoPcSCl	2.5% DMSO	50 : 1	4.7	80
CoPcSCl	8.3% DMSO	50 : 1	5.0	Не опред.
CoPc(COOH) <sub>8</sub>	АОТ/октан*	10 : 1	7.8	11
CoPc(COOH) <sub>8</sub>	1.8% пиридина	10 : 1	3.8	49

\*  $w_0 = 20$ , выделение конъюгатов экстракцией водно-солевым раствором, содержащим 0.1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 0.3 М  $\text{NaCl}$ , pH 7.4.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

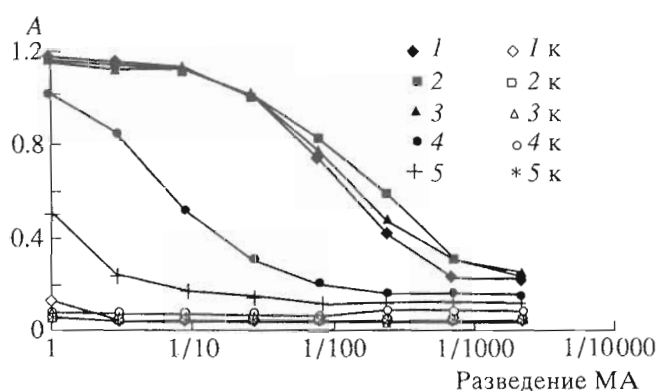
В работе использовали дициклогексилкарбодимид, монофосфат натрия, пиридин, DMF (Aldrich, США), N-гидроксисукцинимид, ABTS, хлорид натрия, дифосфат натрия, DMSO (Sigma, США), Аэрозоль ОТ, трис (Serva, Германия); Tween-20 (Ferak, Германия), БСА, ацетон, октан, этанол; кислоты, щелочи, компоненты буферных растворов – марок ос. ч. и ч. д. а. отечественного производства (“Реахим”). DMF, DMSO и пиридин хранились над молекулярными ситами (4 Å). В качестве носителей для колоночной хроматографии использовали сефадекс G-50 и сефарозу CL-6B (Pharmacia, Швеция).

Фталоцианины кобальта (сульфохлорид фталоцианина со средним количеством сульфохлоридных групп 3–4 и октакарбокситфалоцианин) и алюминия (сульфохлорид фталоцианина со средним количеством сульфохлоридных групп 2–3)

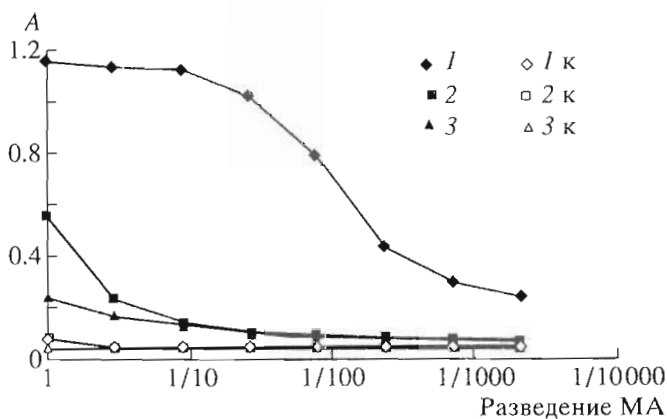
были предоставлены сотрудниками ГНЦ РФ НИИОПик (Москва) О.Л. Каляя и Е.А. Лукьянцом.

Моноклональные антитела против копропорфирина палладия были получены в лаборатории молекулярной иммунологии Института биохимии РАН М.В. Демчевой [19]. Суспензию переосажденных антител, хранившуюся под 40% сульфатом аммония при 4°C, центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин, осадок растворяли в дистиллированной воде и переводили в 50 мМ карбонатный буфер, pH 9.1, методом равновесного диализа в течение 4 ч при 5-кратной смене буфера при 4°C.

Спектры поглощения свободных фталоцианинов и их конъюгатов с моноклональными антителами снимали на спектрофотометре Hitachi-557 (Япония). Кинетику окисления аскорбиновой кислоты в присутствии свободных фталоцианинов



**Рис. 2.** Связывание конъюгатов модельных МА с октакарбокситфалоцианином кобальта с конъюгатом копропорфирина палладия – овалбумин А. 1 – исходные немодифицированные антитела; 2–5 – синтезированные в водно-органической смеси конъюгаты со степенью модификации белка ( $\alpha$ ) 3.8 (2), 5.6 (3), 22.7 (4), 29.2 (5). 1к – 5к – соответствующие контроли без антигена. Условия см. табл. 4.



**Рис. 3.** Связывание конъюгатов модельных МА с сульфохлоридом фталоцианина кобальта с конъюгатом копропорфирина палладия – овалбумин А. 1 – исходные немодифицированные антитела; 2 и 3 – конъюгаты, синтезированные в среде обращенных мицелл АОТ в октане ( $w_0 = 20$ , выделение из мицелл осаждением охлажденным ацетоном): 2 –  $[\text{CoPcSCl}]/[\text{MA}] = 5$ ,  $\alpha = 2.4$ ; 3 –  $[\text{CoPcSCl}]/[\text{MA}] = 150$ ,  $\alpha = 10.9$ . 1к – 3к – соответствующие контроли без антигена.



**Таблица 6.** Каталитическая активность ( $k$ ) производных CoPc (своб.) и их конъюгатов с антителами в реакции окисления аскорбиновой кислоты

Комплекс	Условия получения	$k$ , мин <sup>-1</sup>
CoPcSCl	Гидролизован в карбонатном буфере	0.206
CoPcSCl-MA ( $\alpha = 5.0$ )	Водно-органическая смесь (2.5% DMSO)	0.062
CoPcSCl-MA ( $\alpha = 10.9$ )	Обращенные мицеллы*, А	0.099
CoPcSCl-MA ( $\alpha = 11.2$ )	Обращенные мицеллы*, Э	0.041
CoPc(COOH) <sub>8</sub>		0.358
CoPc(COOH) <sub>8</sub> -MA ( $\alpha = 5.6$ )	Водно-органическая смесь (3.2% пиридина)	0.171
CoPc(COOH) <sub>8</sub> -MA ( $\alpha = 7.8$ )	Обращенные мицеллы*, Э	0.171

\*  $w_0 = 20$ ; выделение конъюгата: А – осаждением избытком охлажденного ацетона, Э – экстракцией водно-солевым раствором, содержащим 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 0.3 M NaCl, pH 7.4.

кобальта и их конъюгатов с моноклональными антителами исследовали на спектрофотометре Hitachi U-3400 (Япония).

Иммунологическую активность моноклональных антител и конъюгатов определяли методом ИФА с использованием прибора Multiscan MCC/340 (Labsystem, Финляндия).

**Синтез конъюгатов сульфохлоридов фталоцианинов кобальта/алюминия с моноклональными антителами в среде обращенных мицелл.** К 1 мл 0.3 M раствора Аэрозоля ОТ в октанде добавляли 108 мкл раствора антител в 50 mM карбонатном буфере, pH 9.1 (14.5–19.5 мг белка/мл, или  $9.7 \times 10^{-5}$ – $1.3 \times 10^{-4}$  M) при интенсивном перемешивании (1–2 мин) до восстановления прозрачности. К полученному мицеллярному раствору добавляли раствор сульфохлорида фталоцианина кобальта в DMSO (2.5–3 мг/мл, или  $2.6 \times 10^{-3}$ – $3.1 \times 10^{-3}$  M) при интенсивном перемешивании (1 ч при комнатной температуре) и выдерживали смесь при той же температуре в течение ночи. Конъюгат с сульфохлоридом алюминия синтезировали аналогично.

**Синтез конъюгатов сульфохлорида фталоцианина кобальта с моноклональными антителами в водно-органической смеси.** К водному раствору антител в 50 mM карбонатном буфере, pH 9.1 (1.6 мг белка/мл, или  $10.7 \times 10^{-6}$  M) добавляли 50 мкл раствора сульфохлорида фталоцианина кобальта в DMSO (2 мг/мл, или  $2.1 \times 10^{-3}$  M) при интенсивном перемешивании (1 ч при комнатной температуре) и выдерживали смесь при той же температуре в течение ночи. Полученную смесь наносили на колонку для хроматографической очистки (см. ниже).

**Синтез конъюгатов октакарбокситфалоцианина кобальта с моноклональными антителами в среде обращенных мицелл.** 2 мг октакарбокситфалоцианина кобальта растворяли в 0.5 мл смеси пиридина и DMF (2 : 3), при интенсивном перемешивании добавляли 2.5 мг NSI и 4.5 мг DCC, ос-

тавляли на ночь. Затем реакционную смесь центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин. Концентрацию фталоцианина кобальта в супернатанте определяли спектрофотометрически по оптическому поглощению раствора при длине волны 680 нм. К 1 мл 0.3 M раствора Аэрозоля ОТ в октанде добавляли 108 мкл раствора антител в 50 mM карбонатном буфере, pH 9.1 (14.5 мг белка/мл, или  $9.7 \times 10^{-5}$  M) при интенсивном перемешивании до восстановления прозрачности. К полученному мицеллярному раствору добавляли 25 мкл раствора активированного октакарбокситфалоцианина кобальта в смеси пиридина и DMF при интенсивном перемешивании (1 ч при комнатной температуре) и выдерживали смесь при той же температуре в течение ночи. Выпавший осадок удаляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант наносили на колонку для хроматографической очистки (см. ниже).

**Синтез конъюгатов октакарбокситфалоцианина кобальта с моноклональными антителами в водно-органической смеси.** 2 мг октакарбокситфалоцианина кобальта растворяли в 0.5 мл пиридина, при интенсивном перемешивании добавляли 2.5 мг NSI и 4.5 мг DCC, оставляли на ночь. Затем реакционную смесь центрифугировали 10 мин при 2000 об/мин. Определяли концентрацию октакарбокситфалоцианина кобальта в супернатанте спектрофотометрически по оптическому поглощению раствора при длине волны 680 нм. К 1 мл 50 mM карбонатного буфера, pH 9.0, добавляли 120 мкл раствора антител в том же буфере, pH 9.1 (13.7 мг белка/мл, или  $9.13 \times 10^{-5}$  M) и при интенсивном перемешивании добавляли 4–19.5 мкл раствора октакарбокситфалоцианина кобальта в пиридине, интенсивно перемешивали 1 ч при комнатной температуре и выдерживали смесь при той же температуре в течение ночи. Выпавший осадок удаляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант наносили на колонку для хроматографической очистки (см. ниже).



**Выделение конъюгатов из обращенных мицелл путем экстракции фосфатно-солевым буфером.** К 2 мл реакционной смеси добавляли 1.2 мл буфера (0.1 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 М  $\text{NaCl}$ , pH 7.4), экстрагировали при перемешивании в течение 3 ч при 4° С. Затем систему инкубировали 0.2–1 ч без перемешивания для расслаивания, нижнюю водную фазу отсасывали пипеткой и наносили на колонку для хроматографической очистки (см. ниже).

**Выделение конъюгатов из обращенных мицелл путем осаждения избытком ацетона.** К 2 мл реакционной смеси добавляли 18 мл охлажденного ацетона, центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин, осадок промывали дважды ацетоном, после чего сушили на воздухе при комнатной температуре в темноте. Высушенный осадок растворяли в 1 мл буфера 50 мМ трис (pH 8.15) или PBS (pH 8.15) для проведения хроматографической очистки (см. ниже).

**Определение молярных коэффициентов поглощения фталоцианинов кобальта/алюминия.** 2.5 мг сульфохлорида фталоцианина кобальта растворяли в 50 мкл DMSO, затем в 1 мл 0.1 М карбонатного буфера (pH 9.0) и оставляли в темноте при комнатной температуре на 10 сут для прохождения гидролиза. Полученный раствор сульфохлорида фталоцианина кобальта ( $2.6 \times 10^{-3}$  М) последовательно разводили до требуемой концентрации для последующих измерений. 3.2 мг октакарбокситфалоцианина кобальта растворяли в 1 мл 0.01 М КОН. Полученный раствор октакарбокситфалоцианина кобальта ( $3.5 \times 10^{-3}$  М) последовательно разводили до требуемой концентрации для последующих измерений. Измеряли спектры поглощения растворов фталоцианинов в диапазоне длин волн 250–850 нм. На основании полученных данных рассчитали молярные коэффициенты поглощения:

для гидролизованного сульфохлорида фталоцианина кобальта

$$\epsilon_{670}^{\text{CoPc}} = 41870, \quad \epsilon_{280}^{\text{CoPc}} = 25200 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1};$$

для гидролизованного сульфохлорида фталоцианина алюминия

$$\epsilon_{670}^{\text{AlPc}} = 69250, \quad \epsilon_{280}^{\text{AlPc}} = 9350 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1};$$

для октакарбокситфалоцианина кобальта

$$\epsilon_{680}^{\text{CoPc}} = 22980, \quad \epsilon_{280}^{\text{CoPc}} = 23490 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}.$$

**Хроматографическую очистку конъюгатов** проводили на комбинированной колонке (диаметр 19 мм), заполненной сефадексом G-50 (верхний слой, 9 см) и сефарозой CL-6B (нижний слой, 22 см). Скорость потока 0.66 мл/мин. Объем нанесенного образца составлял 0.5–1.5 мл. В качестве элюента использовали буферы: 50 мМ трис,

pH 8.15, или PBS (0.01 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 М  $\text{NaCl}$ ), pH 8.15. Для дальнейших исследований использовали фракцию с временем выхода ~61–65 мин (соответствующую смеси конъюгата и немодифицированных антител). Фракции с меньшим временем выхода (агрегаты антител, меченные фталоцианином) и большим временем выхода (несвязанный фталоцианин) отбрасывали.

**Определение иммунологической активности конъюгатов с модельными антителами.** В лунки 96-луночного полистирольного микропланшета вносили по 100 мкл раствора конъюгата копропорфирин палладия – овалбумин А (10 мкг/мл в 0.1 М карбонатном буфере, pH 9.0) и инкубировали 2 ч при 37° С, а затем ночь при 4° С. Для насыщения незанятых центров сорбции на поверхности полистирола в лунки вносили по 200 мкл 6% раствора маннита в буфере PBS, pH 7.4. Планшеты промывали 3 раза водой и хранили в холодильнике при 4° С. Имобилизованный на планшете антиген инкубировали 1 ч при 37° С с исследуемым раствором конъюгата антител с фталоцианином кобальта или немодифицированными антителами (в качестве контроля) с начальной концентрацией антител 10 мкг/мл и последовательными разведениями в 2 или 3 раза в буфере PBS-АТ. После окончания реакции и удаления несвязавшихся антител 8-кратной промывкой водой в лунки добавляли по 100 мкл конъюгата кроличьих антимышинных антител с пероксидазой хрена в PBS-АТ. Через 1 ч инкубации при 37° С планшет промывали 8 раз водой и 1 раз дистиллированной водой. Затем в лунки добавляли по 100 мкл раствора субстрата: 10 мл цитратного буфера (9.6 г/л лимонной кислоты в бидистиллированной воде, pH 4.0), 50 мкл раствора АВТС (22 мг/мл бидистиллированной воды) и 5 мкл 30% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Через 0.5 ч встряхивания регистрировали оптическое поглощение раствора в лунках в двухлучевом режиме ( $\lambda$  405 и 492 нм).

**Кинетика окисления аскорбиновой кислоты в присутствии фталоцианинов кобальта и их конъюгатов с антителами.** Изучаемая система содержала  $5 \times 10^{-4}$  М аскорбиновую кислоту и  $5 \times 10^{-6}$  М фталоцианин кобальта. В качестве растворителя был использован 0.05 М фосфатный буфер, pH 7.2. Кинетику окисления аскорбиновой кислоты регистрировали по убыванию оптического поглощения раствора на длине волны 263 нм в течение первых 3 мин после начала реакции (в этом интервале наблюдалась линейная зависимость оптического поглощения аскорбиновой кислоты от времени реакции). Измерения проводили с использованием двух стеклянных кювет толщиной 1 см (в контрольной кювете находился раствор фталоцианина кобальта или его конъюгата с антителами той же концентрации, что и в кювете с аскорбиновой кислотой) по кинетической программе. Перед измерениями растворы конъюга-

тов фталоцианинов кобальта с антителами были диализованы против буфера, в котором проводились измерения, в течение 4 ч с трехкратной сменной буфера.

Авторы выражают глубокую признательность О.Л. Калия и Е.А. Лукьянцу (ГНЦ РФ НИИОПиК, Москва) за любезно предоставленные фталоцианины кобальта и алюминия, Н.Ю. Крайновой (ИНЭОС РАН, Москва) за консультации по определению каталитической активности фталоцианинов кобальта, а также М.В. Демчевой (ИНБИ РАН, Москва) за любезно предоставленный препарат моноклональных антител.

Работа частично финансирована грантом Международной ассоциации содействия сотрудничеству с учеными независимых государств бывшего Советского Союза (INTAS, грант № 93-2223-ext).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kelly T.A., Hunter C.A., Schindele D.C., Pepich B.V. // Clin. Chem. 1991. V. 37. P. 1283–1286.
2. Graf G., Holsle G., Reineert G. European Patent Application № 0 153 278. 1985.
3. Milgrom L.R., Oneill F. // Tetrahedron. 1995. V. 51. P. 2137–2144.
4. Morgan J., Lottman H., Abbou C.C., Chopin D.K. // J. Photochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 486–496.
5. Savitsky A.P., Lopatin K.V., Golubeva N.A., Poroshina M.Yu., Chernyaeva E.V., Stepanova N.V., Solovieva L.I., Lukyanets E.A. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1992. V. 13. P. 327–333.
6. Savitsky A.P., Lopatin K.V., Golubeva N.A., Chernyaeva E.V., Solovieva L.I., Lukyanets E.A., Galpern M.G., Roder B., Nather D. // Proc. SPIE. 1992. V. 1922. P. 245–254.
7. Chernyaeva E.V., Porochina M.Yu., Savitsky A.P., Leeuwen A.-M., Greve J., De Groot B. // Proc. SPIE. 1994. V. 2325. P. 198–211.
8. Тоневицкий А.Г. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. XXXII. С. 533–540.
9. Левашов А.В., Кабанов А.В., Хмельницкий Ю.Л., Березин И.И., Мартинек К. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. С. 246–248.
10. Кабанов А.В., Алахов В.Ю., Клинский В.Ю., Хруцкая М.М., Рахнянская А.А., Полинский А.С., Ярославов А.А., Северин Е.С., Левашов А.В., Кабанов В.А. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. С. 735–738.
11. Peri J.B. // J. Am. Chem. Soc. 1958. V. 35. P. 110–117.
12. Christen H., Eicke H.-F., Hammerich H., Strahm U. // Helv. Chim. Acta. 1976. V. 59. P. 1297–1306.
13. Martin C.A., Magid L.J. // J. Phys. Chem. 1981. V. 85. P. 3938–3944.
14. Fletcher P.D.I., Robinson B.H. // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1986. V. 82. P. 2311–2321.
15. Tekle E., Schelly Z.A. // J. Phys. Chem. 1994. V. 98. P. 7657–7664.
16. Kurumada K., Shioi A., Harada M. // J. Phys. Chem. 1996. V. 100. P. 1020–1026.
17. Lu X.-M., Fischman A.J., Stevens E., Lee T.T., Strong L., Tompkins R.G., Yarmush M.L. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 156. P. 85–99.
18. Вольпин М.Е., Крайнова Е.Ю., Москалева И.В., Новодарова В.Н., Ворожцов Г.Н., Гальперн М.Г., Калия О.Л., Лукьянец Е.А., Михаленко С.А. // Изв. РАН. Сер. хим. 1996. № 8. С. 2105–2111.
19. Savitsky A.P., Demcheva M.V., Mantrova E.Yu., Ponomarev G.V. // FEBS Lett. 1994. V. 355. P. 314–316.

## The Synthesis of Conjugates of Phthalocyanines with Monoclonal Antibodies in AOT/*n*-Octane Reversed Micelles and in Water–Organic Mixtures

E. G. Matveeva, I. G. Meerovich, and A. P. Savitsky

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, GSP-7 Moscow, 117071 Russia*

**Abstract**—Conjugates of cobalt and aluminum phthalocyanines with monoclonal antibodies were synthesized using an AOT/*n*-octane reversed micellar system or water–organic mixtures with a low content of organic solvent as media. The effect of the degree of hydration of the micelles and the concentration of phthalocyanines on the composition of conjugates was studied. The immune activity of the resulting conjugates in comparison to that of native antibodies was evaluated. The catalytic activity of free cobalt phthalocyanines and their antibody conjugates was studied in the reaction of ascorbic acid oxidation.

**Key words:** conjugates, monoclonal antibodies, cobalt phthalocyanines, aluminum phthalocyanines, reversed micelles.