

На правах рукописи

Котельникова Полина Александровна

**КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ И
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ
ДЛЯ ОНКОТЕРАНОСТИКИ**

Специальность: 1.5.3. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель

д.б.н., академик РАН, профессор Деев Сергей Михайлович

Официальные оппоненты:

Власов Валентин Викторович, д.х.н., академик РАН, профессор, научный руководитель ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Хомутов Алексей Радиевич, д.х.н., в.н.с. лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится 27 ноября 2024 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н. В. А. Олейников



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Рак является второй по значимости причиной смерти в мире после сердечно-сосудистых заболеваний. Современный уровень медицины позволяет увеличить продолжительность и улучшить качество жизни пациентов, однако причины появления рака изучены недостаточно, а совершенное лекарство все еще не найдено. Применяемые методы часто ограничены отсутствием специфичности к опухолевым клеткам и поэтому связаны со значительными и долгосрочными побочными эффектами, необходимостью использования высоких доз и появлением лекарственной устойчивости.

Применение наночастиц и направляющих белков, селективно связывающих молекулы-мишени на поверхности раковых клеток, позволит создать направленные противораковые агенты с различными механизмами противоопухолевой активности, специфично визуализировать опухоль и метастазы, а также снизить нежелательное воздействие на здоровые ткани. Разработка биосовместимых наночастиц открывает перспективы для создания совершенно новых методов для диагностики и лечения опухолей.

Степень разработанности темы исследования

Наночастицы продемонстрировали высокий потенциал для повышения чувствительности обнаружения опухолей и развития методов ранней диагностики. Нанотехнологии используются также для адресной доставки лекарств и создания эффективной противораковой терапии. Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных наночастицам, вопрос безопасности и стабильности нанопрепаратов остается открытым. Абсолютное большинство нанотехнологий не могут быть транслированы в клинику из-за нестабильности наночастиц и ограничения их применимости в физиологических условиях, а те частицы, что эффективны и безопасны на клеточном уровне, часто показывают неудовлетворительное распределение в организме. Таким образом, актуальной задачей становится не столько создание новых материалов, сколько модификация наночастиц для направленного воздействия на раковые клетки, улучшения накопления в опухоли и изучение дальнейшей судьбы наночастиц в организме.

Стоит отметить, что если ранее реальность применения наночастиц в клинике вызывала вопросы исследователей, то последние десятилетия ситуация на фармацевтическом рынке и отношение к нанопрепаратам

радикально меняются. На 2023 год не менее 15 нанопрепаратов одобрены для терапии и диагностики рака, несколько десятков находятся на разных стадиях клинических испытаний по всему миру. Однако на сегодняшний день ни один таргетный нанопрепарат не одобрен для применения на людях, до клинических испытаний дошли только около 10 препаратов.

Дошедшие до испытания на людях адресные наночастицы, как правило, в качестве направляющего модуля содержат полноразмерные антитела либо их фрагменты, трансферрин или низкомолекулярные соединения.

Традиционные полноразмерные антитела обладают рядом недостатков, таких как низкая стабильность, сложность производства и транспортировки, что повышает стоимость таких препаратов, при этом их использование может быть связано с нежелательными иммунными реакциями. Этим недостаткам лишены новые распознающие молекулы – белки-скаффолды. Созданные на основе природных связывающих белковых доменов, эти белки могут быть рационально сконструированы без дисульфидных связей, посттрансляционных модификаций и экспрессированы в бактериальных системах. Отобранные белки отличаются аффинностью, сравнимой или превосходящей антитела, при этом могут быть неиммуногенны и исключительно стабильны.

Направляющие белки-скаффолды также проходят клинические испытания в качестве замены антител при доставке изотопов и контрастирующих агентов либо в терапии аутоиммунных заболеваний. В комбинации с наночастицами белки-скаффолды применяли лишь в фундаментальных исследованиях. Несмотря на многообещающие результаты, данных об эффективности и безопасности таких сочетаний пока недостаточно.

Цель и задачи

Целью исследования является создание и характеристика наноконструкций, модифицированных рекомбинантными белками, для направленного воздействия на раковые клетки. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) синтез, характеристика наночастиц, в том числе магнитных, плазмонных и полимерных;
- 2) выделение и очистка белков, связывающих рецептор HER2 на поверхности клеток, а именно дарпинов и аффибоди;
- 3) разработка методов стабилизации и функционализации наночастиц направляющими молекулами, характеристика стабильности

в физиологических условиях и биосовместимости *in vitro* полученных конструкций;

4) изучение специфичности связывания наноагентов с клетками со сверхэкспрессией рецептора HER2, сравнение эффективности модификации наночастиц различными белками, связывающими рецептор HER2, в терминах связывания с HER2-положительными клетками;

5) создание на основе наночастиц адресных фотосенсибилизирующих препаратов для направленных фототермической и фотодинамической терапии раковых клеток;

6) применение наночастиц для визуализации опухолей *in vivo*.

Новизна, практическая и научная значимость результатов проведенных исследований

Впервые проведено сравнение ряда флуоресцентно меченных направляющих белков для адресной доставки к раковым клеткам со сверхэкспрессией HER2 рецептора с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Полученный результат поможет создавать наиболее эффективные агенты таргетной терапии и диагностики.

Охарактеризованы адресные плазмонные наночастицы серебра, специфично связывающие рецептор HER2, а именно показана высокая специфичность связывания с HER2-положительными клетками *in vitro*, сопоставимая с моноклональными антителами и даже превосходящая их. Практическим применением данных частиц может быть высокоспецифичное мечение раковых клеток при определении HER2-статуса опухоли и выборе противораковой терапии у пациентов.

Были показаны эффективное накопление в опухоли и ее визуализация, а также фотосенсибилизирующий эффект PLGA-наночастиц, нагруженных флуоресцентными красителями. Разработанные подходы модификации наночастиц направляющими белками обладают высоким потенциалом для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Продемонстрирована возможность использования адресного анти-HER2 иммунотоксина DARP-LoPE в комбинации с анти-HER2 полимерными наночастицами, модифицированными аффибоди и загруженными доксорубицином, для селективного воздействия на HER2-сверхэкспрессирующие раковые клетки. Показано, что малый размер белков-скаффолдов дарпина и аффибоди позволяет их эффективно использовать в комбинации при нацеливании на одну молекулу рецептора HER2. Данный результат подтверждает

необходимость поиска сочетаний уже существующих препаратов, позволяющих на порядки снизить необходимые дозировки.

Разработан новый способ стабилизации и направленной доставки к раковым клеткам наночастиц магнетита (МЧ). Впервые получен химерный белок, содержащий барстар и связывающий магнетит белок магнитотактических бактерий. Показана способность белка к стабилизации поверхности магнетита без дополнительных полимеров и самосборке конструкции МЧ*Bs-Mms6*Darpin-Vn за счет белковой пары барназа (Vn)-барстар (Bs). Разработанный подход позволяет получать многофункциональные конструкции в одной пробирке, без использования методов химической конъюгации, при этом обеспечивает контролируемую ориентацию биомолекул.

Методология и методы исследования

Синтезированные наночастицы были всесторонне охарактеризованы с применением методов динамического и электрофоретического светорассеяния, электронной микроскопии, оптической спектроскопии. Используемые в работе белки нарабатывали в бактериальной системе экспрессии и выделяли методами аффинной хроматографии с использованием стандартных методов молекулярной биологии и биохимии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле, гель-фильтрация и ультрафильтрация. Для анализа взаимодействия наночастиц с раковыми клетками применяли методы клеточной биологии, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, а также методы определения цитотоксичности, такие как МТТ- и резазурин-тесты и клоногенный анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. С целью выбора оптимальных направляющих молекул для адресной доставки противораковых агентов проведено сравнение белков, распознающих рецептор HER2: полноразмерного антитела трастузумаб, дарпина G3 и аффибоди Z_{HER:342}. Установлено, что для эффективности воздействия на опухолевые клетки-мишени более важную роль, чем константа диссоциации рецептора и адресного белка, могут играть субдомен рецептора, с которым связывается белок, а также стерическая доступность и плотность направляющих молекул на поверхности наночастиц.

2. Аффибоди Z_{HER:342} является эффективным направляющим модулем для доставки плазмонных наночастиц серебра к HER2-положительным раковым клеткам. Высокая плотность молекул аффибоди на

поверхности наночастиц позволяет таким частицам быть более специфичной меткой, чем полноразмерное антитело.

3. Распознающие белки-скаффолды неиммуноглобулиновой природы являются эффективным инструментом для сочетанного воздействия на разные субдомены одного рецептора для усиления эффективности адресной химиотерапии.

4. Одновременная инкапсуляция двух БИК-красителей, способных к резонансному переносу энергии, в HER2-направленные наночастицы PLGA позволяет осуществлять эффективную фототерапию опухоли *in vitro*, а также контрастировать опухоль молочной железы мыши в окне прозрачности ткани при внутривенном введении наночастиц.

5. Разработан новый метод функционализации наночастиц магнетита с применением белковой пары барназа-барстар, дающий возможность проводить самосборку направленной конструкции. Рекомбинантный белок, состоящий из связывающего магнетит пептида и барстара, позволяет стабилизировать наночастицы без использования полимеров, в то время как вторая часть модуля, состоящая из адресного пептида и барназы, обеспечивает направленность доставки. Специфичность и биосовместимость продемонстрированы на примере белка DARPIn-барназа и клеток с различной экспрессией HER2 рецептора.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под руководством д.б.н., проф. Деева С.М., к.б.н. ст. науч. сотр. Шипуновой В.О. Личный вклад диссертанта в представленной работе складывается из непосредственного участия в выборе направления научного поиска, разработке цели и задач исследований по теме диссертационной работы, проведении клеточных, молекулярных и других исследований, обосновании полученных результатов. Основные эксперименты по наработке и очистке рекомбинантных белков, синтезу и характеристике наночастиц PLGA, электронной микроскопии наночастиц, изучению токсичности *in vitro*, специфичности связывания с клетками наночастиц и белков, а также визуализация ортотопической опухоли молочной железы мышей BALB/C, описанные в диссертации, выполнены лично автором, если не указано иное. Автор выражает глубокую благодарность соавторам исследований, и особенно Шипуновой В.О., Комедчиковой Е.Н., Колесниковой О.А., Беловой М.М.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии и нанотехнологии, тщательным учетом и критическим анализом результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных. Материалы диссертации были опубликованы соискателем в 9 статьях в рецензируемых международных научных журналах. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях:

XXX, XXXII и XXXIV Зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018, 2020 и 2022); II Международная научная конференция «Инновационные технологии ядерной медицины и лучевой диагностики и терапии» (Москва, 2023); The 7th and the 8th International Symposium and School for Young Scientists on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine (Москва, 2022, 2023); International Conference Laser Optics (ICLO) (Санкт-Петербург, 2022); VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020); The FEBS Congress (Краков, 2019); MagMeet 2018 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, (Копенгаген, 2018); Международный форум Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (Москва, 2018); 60 и 62 Всероссийские научные конференции МФТИ (Долгопрудный, 2017, 2019).

Объём и структура работы

Диссертационная работа изложена на 133 страницах, содержит 31 рисунок, 3 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 166 источников.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Наночастицы PLGA, загруженные двумя БИК красителями, для визуализации и фототерапии HER2-положительных раковых клеток

Синтез и характеристика наночастиц PLGA

Мы синтезировали наночастицы PLGA, загруженные двумя красителями с флуоресценцией в ближнеинфракрасной (БИК) области, а именно йодидом IR-780 и нильским голубым (NB). По данным ДРС размеры НЧ составили 227 ± 71 нм и 222 ± 77 нм, а размер, определенный по СЭМ-изображениям, составил 234 ± 111 нм и 241 ± 127 нм, для наночастиц PLGA и PLGA+IR-780+NB. Дзета-потенциал составлял $-0,32 \pm 4,61$ мВ для PLGA и $-0,41 \pm 7,89$ мВ для PLGA+IR-780+NB соответственно (Рис. 1).

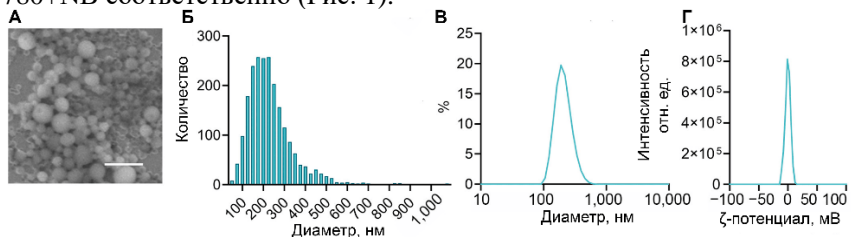


Рис. 1. А, Д) СЭМ-изображения PLGA+IR-780+NB (А). Масштаб 1 мкм. Б) Распределение размеров по данным СЭМ. (В) Гистограммы гидродинамического распределения по размерам наночастиц в PBS. (Г) Распределение дзета-потенциала.

По данным спектров поглощения в ДМСО, концентрация красителя IR-780 в полученных НЧ составила 25 мкг/мл для PLGA+IR-780 и 23 мкг/мл для PLGA+IR-780+NB. Концентрация NB составила 59 мкг/мл PLGA+NB и 74 мкг/мл для PLGA+IR-780+NB. Полученные данные показывают, что 50–60% добавленного NB и только 6–7% IR-780 были инкапсулированы в наночастицы PLGA.

Поскольку оптические свойства NB зависят от растворителя, было важно определить, будет ли наблюдаться резонансный перенос энергии между двумя красителями после поглощения клетками. Флуоресценция чистого IR-780 не возбуждалась светом с длиной волны 570 нм; однако возбуждение комбинации IR-780 и NB при 570 нм и 640 нм привело к появлению двух пиков эмиссии, а именно 670 нм для NB и 820 нм для эмиссии IR-780. Резонансный перенос энергии между красителями расширяет их диагностические и терапевтические применения.

Направленная доставка наночастиц PLGA, нагруженных красителем, к HER2-положительным клеткам: оценка специфичности и цитотоксичности

Были выбраны четыре клеточные линии с разными уровнями экспрессии HER2: BT474 и SK-BR-3 со сверхэкспрессией HER2, A549 с низкой экспрессией HER2 и CHO в качестве HER2-негативных клеток. По результатам проточной цитометрии, НЧ PLGA+IR-780+NB продемонстрировали в шесть раз большее связывание HER2-положительными клетками (Рис. 3 Б). Связывание с HER2-положительными клетками SKBR-3 подтверждали методом конфокальной микроскопии (Рис. 3 А).

Чтобы оценить токсичность наночастиц, нагруженных красителями, мы добавили наночастицы к клеткам и инкубировали их в течение 72 часов (Рис. 3 В). Частицы не оказывали существенного токсического действия в широком диапазоне концентраций. IC50 для PLGA+NB и PLGA+IR-780 составляла 3 г/л и 1,5 г/л для PLGA+IR-780+NB (4 мМ IR-780 и 14 мМ NB).

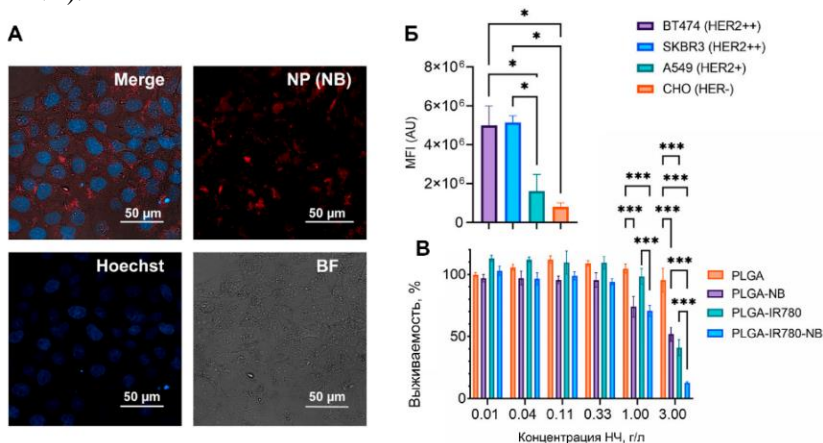


Рис. 3. А) Конфокальная микроскопия клеток SK-BR-3 после инкубации с НЧ PLGA+IR-780+NB. Б) Связывание НЧ с клетками с разным уровнем экспрессии HER2. В) Тест на цитотоксичность НЧ, нагруженных NB, IR-780 и NB + IR-780.

Фототерапия *in vitro* с использованием НЧ PLGA, нагруженных БИК красителем

Чтобы оценить вклад каждого из красителей в фотосенсибилизацию, мы синтезировали наночастицы, нагруженные нильским голубым, IR-

780 или двумя красителями одновременно. Клетки инкубировали с НЧ, а затем облучали лазером (808 нм, 0,27 Вт). Клетки ресуспендировали в культуральной среде и высевали в 96-луночный планшет. Для оценки жизнеспособности клеток использовали тест с резазурином. Ни PLGA, ни PLGA+NB не показали значительной фототоксичности. Наночастицы, нагруженные IR-780 и IR-780+NB, убивали почти все раковые клетки даже после 1 мин БИК-облучения (Рис. 4 А, Б).

Колориметрические тесты не показали существенной разницы между эффективностью наночастиц с IR-780 и IR-780+NB. Клоногенный анализ показал, что после 5 и 15 мин облучения лазером 808 нм (0,27 Вт) в образцах с PLGA+IR-780 и PLGA+IR-780+NB не осталось ни одной клетки, способной образовывать колонию. После 1 мин облучения из 1000 засеянных клеток с PLGA+IR-780 образовалось всего несколько колоний на лунку (Рис. 4 В). Облучение клеток с НЧ, нагруженными комбинацией красителей, приводило к полной гибели клеток. Важно отметить, что облучение клеток без наночастиц даже в течение 15 мин не вызывало снижения количества колоний.

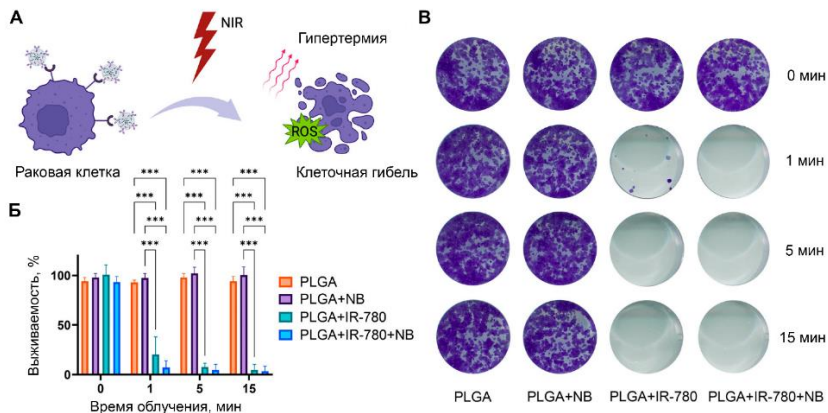


Рис. 4. А) Направленные НЧ связываются преимущественно с раковыми клетками. БИК-облучение IR-780 приводит к локальной гипертермии и генерации АФК. Б, В) Фототерапия с использованием наночастиц PLGA–IR-780–NB. Резазурин-тест (Б) и клоногенный анализ клеток SK-BR-3 (В).

Визуализация опухолей EMT6/p-HER2 *in vivo* при помощи НЧ PLGA+IR-780+NB

Визуализацию *in vivo* проводили на ортотопической мышинной модели опухоли молочной железы. EMT6/p представляет собой высококанцерогенную линию карциномы молочной железы у мышей.

Модификация EMT6/p-HER2 позволяет исследовать таргетную терапию на иммунодефицитных мышах. Мышам вводили 1×10^6 клеток EMT6/p-HER2 в молочную железу в 100 мкл культуральной среды. Через неделю трансплантированная опухоль в молочной железе имела вид эллипсоидного образования диаметром около 5 мм, соответствующего месту инъекции клеток.

Мышам внутривенно вводили 1 мг НЧ PLGA+IR-780+NB в PBS и через 24 ч изучали накопление в опухоли с помощью оптического визуализатора IVIS. Были получены изображения с фильтрами возбуждения флуоресценции 640–745 нм и фильтрами эмиссии 800–840 нм. (Рис. 5) НЧ PLGA+IR-780+NB можно считать перспективными агентами для визуализации опухолей.

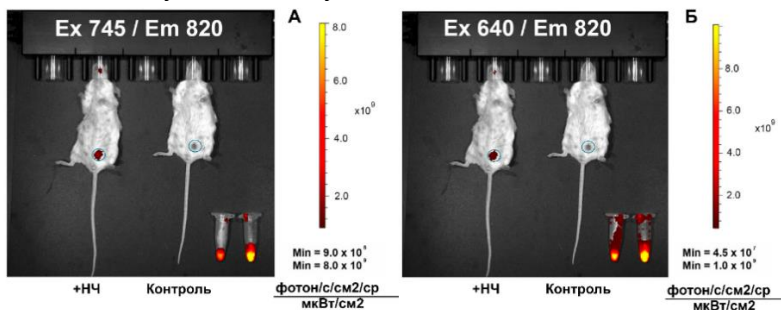


Рис. 5. БИК-визуализация HER2-позитивной опухоли *in vivo* через 24 часа после внутривенной инъекции, полученная с помощью оптического томографа IVIS со следующими оптическими фильтрами: А) возбуждение 745 нм/эмиссия 820 нм; Б) возбуждение 640 нм/эмиссия 820 нм. Пробирки содержат 1 мг НЧ PLGA+IR-780+NB в PBS (слева) и ДМСО (справа).

2. Сравнение белков, распознающих рецептор HER2, для модификации магнитных наночастиц для специфичного мечения HER2-положительных клеток

Выделение и очистка белков, распознающих рецептор HER2. Модификация магнитных наночастиц распознающими белками

В работе были использованы магнитные частицы, синтезированные в лаборатории молекулярной иммунологии, со средний размер магнитных наночастиц был равен $23,3 \pm 6,4$ нм, согласно результатам СЭМ (Рис. 6), и 223 ± 111 нм по методу ДРС. Полученные частицы не были стабильны в растворе соли и для применения в физиологических условиях были заключены полимерную оболочку. Гидродинамический размер покрытых частиц составил 264 ± 113 нм по ДРС.

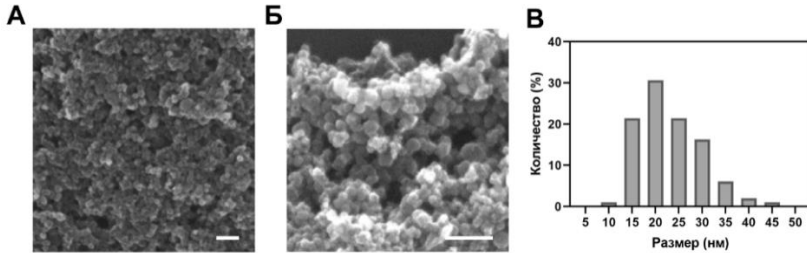


Рис. 6. Характеризация магнитных наночастиц. А, Б) Сканирующая электронная микроскопия. Шкала 100 нм. В) Распределение частиц по размеру согласно СЭМ.

Покрытые карбоксиметилдекстраном наночастицы были конъюгированы с белками, специфично распознающими рецептор HER2: полноразмерное антитело трастузумаб (связывает IV домен рецептора с $K_d = 560$ pM), аффибоди $Z_{HER2:342}$, (связывается с соединением доменов III и IV с $K_d = 122$ pM), DARPin_G3 (связывает домен IV с $K_d = 91$ pM). Аффибоди и дарпин были получены в *E. coli* и очищены методами аффинной хроматографии. Трастузумаб был очищен от стабилизирующих агентов из коммерческого препарата Herceptin (Roche) методами аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Карбодиимидную конъюгацию проводили в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Колесникова О.А.). Количество белка на 1 мг наночастиц составило $(41 \pm 3) \times 10^{-12}$ моль трастузумаба, $(1644 \pm 30) \times 10^{-12}$ моль аффибоди, $(433 \pm 4) \times 10^{-12}$ моль дарпина.

Разработанные НЧ практически не обладали цитотоксичностью по результатам резазурин-теста: значения IC_{50} составило 1,08 г/л для НЧ, конъюгированных с трастузумабом, 1,12 г/л для НЧ с аффибоди, 1,25 г/л для НЧ с дарпином и 1,13 г/л для НЧ с БСА (Рис. 7 Б).

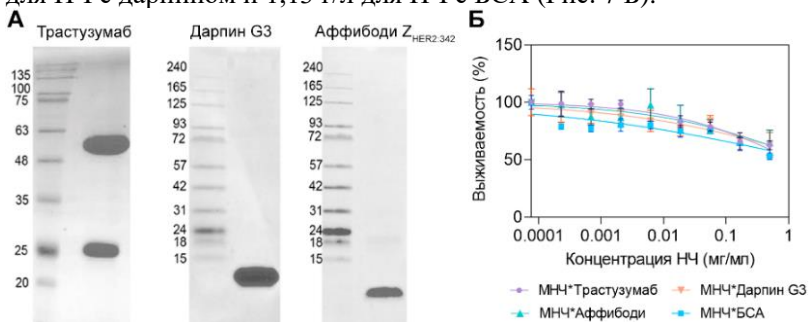


Рис. 7. А) Денатурирующий электрофорез по Лэммли в 15% ПААГ. Денатурирующий электрофорез в трис-трициновой системе DARPin_G3 и $Z_{HER2:342}$. Б) Выживаемость клеток после инкубации с конъюгатами МНЧ.

Специфичность связывания конъюгатов магнитных наночастиц с HER2 положительными раковыми клетками

Для оценки связывания полученных наночастиц были использованы две клеточные линии с различной экспрессией HER2: SK-BR-3 (HER2-положительные) и CHO (HER2-отрицательные).

Количественное связывание наноконструкций с клетками оценивали в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Шипунова В.О., Колесникова О.А.) методом МРQ-цитометрии (Magnetic Particle Quantification Cytometry). Количество связавшихся наночастиц с HER2-позитивными клетками SK-BR-3 составило 1113 ± 39 фг/клетку для наночастиц, конъюгированных с трастузумабом, 1431 ± 186 фг/клетку для НЧ с аффибоди и 625 ± 21 фг/клетку для НЧ с дарпином G3. Было показано, что наиболее эффективным для доставки наночастиц к клеткам является аффибоди (Рис. 8 Б). Специфичность связывания частиц с клетками подтверждали при помощи конфокальной микроскопии. Для визуализации такого взаимодействия все конъюгаты были помечены флуоресцентным красителем Cy5.5. Согласно данным конфокальной микроскопии, наноконструкции с аффибоди Z_{HER2:342} связывались с HER2-положительными клетками эффективнее конструкций с дарпином G3 и трастузумабом (Рис. 8 А).

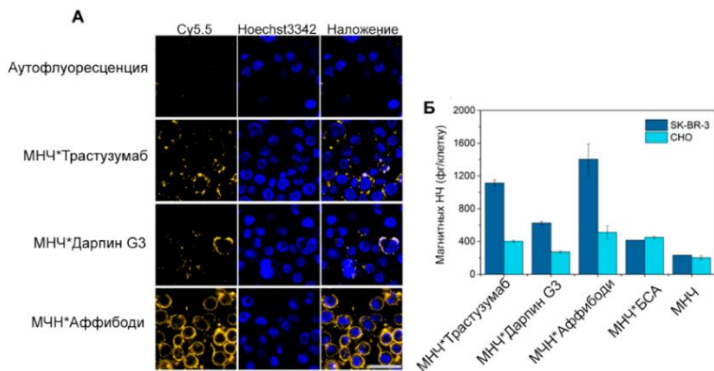


Рис. 8. А) Конфокальная микроскопия клеток, меченных Cy5.5-модифицированными конъюгатами МНЧ*Трастузумаб, МНЧ*Аффибоди и МНЧ*Дарпин G3. Синий – Hoechst 33342 (ядра клеток), желтый – Cy5.5 (НЧ). Шкала 20 мкм. Б) МРQ-цитометрический анализ связывания магнитных наночастиц клетками.

Небольшой размер (8 кДа) по сравнению с дарпином (14 кДа) и полноразмерным антителом (150 кДа) является наиболее вероятной причиной плотной посадки аффибоди на поверхности наночастицы.

Также более высокий уровень связывания модифицированных аффибоди наночастиц с клетками можно объяснить более высокой авидностью системы «наночастица*рецептор». Рецептор HER2 в клеточной мембране существует в виде кластеров, состоящими примерно из 9 рецепторов. При использовании наночастиц с высокой плотностью лиганда связывание будет многоточечным, что приведет к более высокой авидности такого взаимодействия. Также немаловажно, что и С-, и N- концы аффибоди удалены от сайта связывания таким образом, что конъюгация не влияет на его распознающие свойства.

3. Плазмонные наночастицы серебра, модифицированные аффибоди Z₃₄₂, для фототермической терапии HER2-положительных опухолей

Характеризация плазмонных наночастиц серебра

В работе использовали наночастицы серебра, синтезированные в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН. Согласно результатам сканирующей электронной микроскопии, наночастицы имели преимущественно сферическую форму и размер $35,4 \pm 1,6$ нм (Рис. 9 А, Б). Наночастицы имели максимум поглощения при 450 нм, обусловленный плазмонными свойствами серебра (Рис. 9 В). Облучение плазмонных частиц светом резонансной длины волны может приводить к нагреванию частиц, генерации активных форм кислорода либо переизлучению света. Наночастицы продемонстрировали нагревание светом 465 нм мощностью 95 мВт/см² на 10 градусов относительно воды.

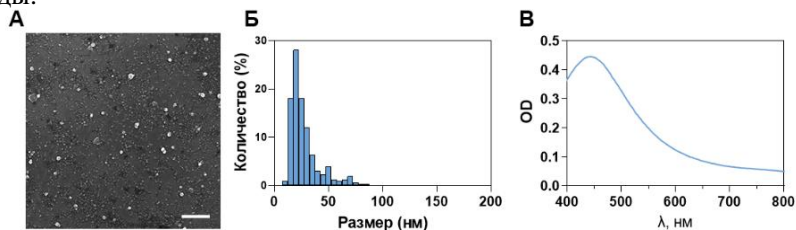


Рис. 9. Синтез и характеристика наночастиц серебра

А) Сканирующая электронная микроскопия полученных наночастиц, шкала 500 нм; Б) Распределение наночастиц по размеру; В) Спектр поглощения наночастиц серебра.

Модификация поверхности наночастиц серебра

Адресные наноконструкции получали путем карбодиимидной конъюгации аффибоди $Z_{HER2:342}$ с ПЭГилированными наночастицами серебра. В качестве гибкого линкера был выбран mPEG-Silane-COOH.

Оценку связывания полученных конструкций с клетками проводили методом проточной цитометрии в канале бокового светорассеяния, так как связавшиеся с поверхностью металлические наночастицы делают клетку более шероховатой, увеличивая рассеяние света, и могут быть использованы как самостоятельные метки без флуоресцентных красителей. Было показано, что адресные наноконструкции Ag-PEG-HER2 связываются с HER2-положительными клетками до 143 раз сильнее, чем Ag-BCA наночастицы и до 10,6 раз больше, чем с HER2-отрицательными клетками.

Мечение HER2-положительных раковых клеток при помощи наночастиц Ag-PEG-HER2

Для того чтобы визуализировать наночастицы, мы модифицировали их флуоресцентной меткой DyLight650, максимум возбуждения и эмиссии которой (652 и 672 нм, соответственно) лежат в области окна биологической прозрачности тканей.

Мы сравнили визуализирующие свойства полученных наночастиц с флуоресцентно меченым полноразмерным антителом трастузумабом. Для этого мы протестировали ряд клеточных линий с различной степенью экспрессии рецептора HER2: SKOV3-1ip, BT474, и SK-BR-3 со сверхэкспрессией, A549 и MCF-7 с нормальной экспрессией и HER2-отрицательные клетки CHO. Мы обнаружили, что наночастицы связываются со сверхэкспрессирующими рецептор HER2 клетками эффективнее, чем трастузумаб, при этом меньше связываются с клетками с нормальной экспрессией рецептора (Рис. 10).

Причиной этому может быть более высокая avidность полученных наноконструкций к рецептору на поверхности клеток, чем у молекулярного антитела. На поверхности наночастицы присутствует сразу несколько молекул аффибоди, поэтому такие частицы могут осуществлять многоточечное связывание с клеткой и проявляют большую эффективность связывания с клетками с высокой плотностью рецептора, но не с клетками с небольшим количеством рецептора на поверхности. Такое мультивалентное связывание, обусловленное презентацией аффибоди на поверхности наночастицы, приводит к большей специфичности полученных конструкций.

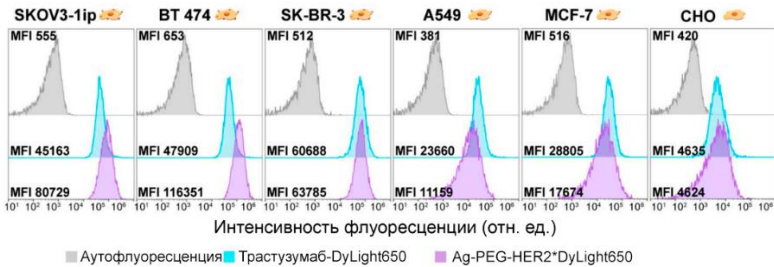


Рис. 10 Проточная цитометрия клеток с различной экспрессией HER2, меченных трастузумаб-DyLight65 и Ag-PEG-HER2*DyLight650. Серый – автофлуоресценция, голубой – трастузумаб, сиреневый – наночастицы.

Исследование фотосенсибилизирующих свойств наночастиц Ag-PEG-HER2

Клетки инкубировали с наночастицами серебра, облучали синим светом и проводили исследование цитотоксичности методом МТТ-теста после инкубации 48 часов. Облучение приводило к гибели клеток в зависимости от концентрации наночастиц серебра (Рис. 11 А). Наиболее вероятно, клетки погибали из-за растворения наночастиц серебра с образованием токсичных ионов Ag^+ или из-за окислительного стресса. Генерацию активных форм кислорода оценивали с использованием $CM-H_2DCFDA$. Максимальная интенсивность флуоресценции для клеток с частицами, облученных в течение 5 минут, в 4,4 раза превысила флуоресценцию контрольных образцов (Рис. 11 Б).

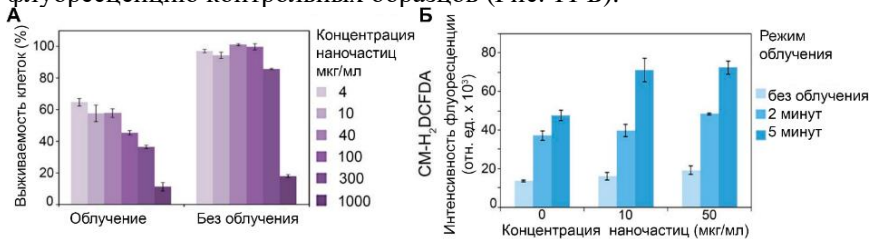


Рис. 11. А) Выживаемость клеток SKOV3-1ip в зависимости от концентрации адресных наночастиц и режима облучения по данным МТТ-теста. Б) Генерация АФК под действием синего света клеток с наночастицами серебра по данным проточной цитометрии с индикатором окислительного стресса.

Для направленного воздействия на раковые клетки наночастицы серебра были конъюгированы с каркасным полипептидом, аффибоди $Z_{HER2:342}$, который распознает клинически значимый онкомаркер HER2.

Конъюгацию осуществляли с помощью ПЭГ линкера. Тесты проточной цитометрии показали, что частицы Ag-PEG-HER2 успешно связываются с клетками, сверхэкспрессирующими HER2, со специфичностью, сравнимой со специфичностью полноразмерных анти-HER2 IgG. Исследование конфокальной микроскопии показало эффективную интернализацию Ag-PEG-HER2 в клетки менее чем за 2 часа инкубации. Анализы цитотоксичности продемонстрировали эффективную гибель клеток при воздействии Ag-PEG-HER2 и облучении, вызванную выработкой активных форм кислорода. На дальнейших этапах работы коллегами из лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ была показана успешная фототермическая терапия HER2-положительных ксенографтных опухолей мышей, результатами которой стали полная элиминация первичной опухоли и предотвращение развития метастазов.

4. Сочетанная терапия адресного иммунотоксина DARP-LoPE и наночастиц PLGA-аффибоди, нагруженных доксорубицином, нацеленных на разные участки рецептора HER2

Выделение рекомбинантных белков иммунотоксина DARP-LoPE и аффибоди Z_{HER2:342}

Был выделен в бактериальной системе и очищен методами аффинной хроматографии рекомбинантный иммунотоксин DARP-LoPE (Рис. 12 А). Этот агент состоит из каркасного белка DARP_{in9.29}, который связывается с доменом I рецептора HER2, и низкоиммуногенной модификации экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa* (LoPE), который блокирует эукариотический фактор элонгации II. Был выделен и очищен методами аффинной хроматографии белок аффибоди Z_{HER2:342}, связывающийся с внеклеточной частью HER2 рецептора между субдоменами III и IV (Рис. 12 Б).

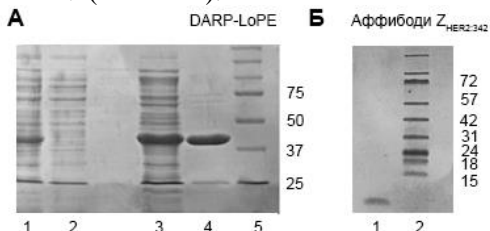


Рис. 12. А) Денатурирующий электрофорез DARP-LoPE в 15% ПААГ. 1 – после индукции, 2 – до индукции, 3 – растворимая фракция, 4 – выделенный белок, 5 – маркер. Б) Денатурирующий электрофорез аффибоди в тристециновой системе: 1 – выделенный белок; 2 – маркер.

Наночастицы PLGA-аффибоди для направленного воздействия на HER2-положительные клетки

Аффибоди Z_{HER2:342} использовали для создания адресных противораковых наночастиц. Синтез, конъюгацию и характеристику наночастиц проводили в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Шипунова В.О., Комедчикова Е.Н.) В работе использовали наночастицы PLGA, нагруженные химиотерапевтическим агентом доксорубицином и диагностическим флуоресцентным красителем (нильский красный). Конъюгацию с аффибоди проводили карбодиимидным методом. Количество белка на поверхности частицы было равным 7,2 мкг на 1 мг PLGA. Размер наночастиц после конъюгации составил 186 ± 65 нм, согласно ДРС, в то время как ζ -потенциал составил $-23,4 \pm 1,4$ мВ в 10 мМ KNO₃.

Наночастицы, конъюгированные с аффибоди, в 81,4 раза специфичнее связывались с HER2-положительными клетками SK-BR-3, чем с HER2-отрицательными клетками CHO, согласно данным проточной цитометрии (Рис. 13 А). С помощью конфокальной микроскопии было показано специфичное связывание PLGA*аффибоди с раковыми клетками со сверхэкспрессией HER2 и интернализация частиц в клетку после связывания (Рис. 13 Б).

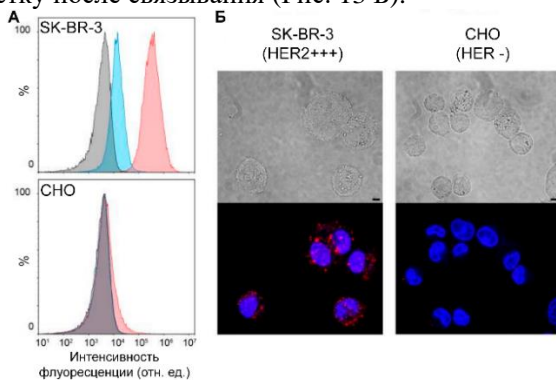


Рис. 13. А) Анализ связывания наночастиц PLGA и PLGA*аффибоди с клетками. Серый – автофлуоресценция, голубой – клетки с PLGA, красный – клетки с PLGA*аффибоди. Б) Конфокальная микроскопия, подтверждающие поглощение наночастиц клетками SK-BR-3, но не клетками CHO. Синий – Hoechst 33342 (ядра клеток), красный – NR (PLGA*DOX*аффибоди).

Комбинированное воздействие наночастиц PLGA*DOX*аффибоди и иммунотоксина *in vitro*.

Комбинированное воздействие полученного в работе иммунотоксина и наночастиц PLGA*DOX*аффибоди *in vitro* оценивали в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Шипунова В.О. и Комедчикова Е.Н.) методом МТТ-теста.

Токсическое действие наночастиц PLGA*DOX*аффибоди оценивали на клетках SK-BR-3 и CHO после 48 часов инкубации. Значение IC₅₀ для наночастиц PLGA*DOX*аффибоди в клетках SK-BR-3 составило 80 мкг/мл.

К клеткам с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 добавляли наночастицы в концентрации, соответствующей IC₅₀ для клеток SK-BR-3, и иммунотоксин DARP-LoPE. МТТ-тест проводили через 48 часов инкубации. Так как при комбинации двух терапевтических агентов кривые выживаемости клеток не соответствовали сигмоидам, что затрудняло стандартный расчёт IC₅₀, мы оценивали концентрацию иммунотоксина, необходимую для достижения 65% гибели клеток, который соответствовал линейному участку кривых. Для достижения 65% гибели клеток была необходима концентрация иммунотоксина DARP-LoPE 1,7 нМ, а в сочетании с наночастицами PLGA*DOX*аффибоди эта концентрация снижалась в 944 раза, до 1,8 пМ (Рис. 14). Комбинированное действие двух нацеленных агентов позволило на три порядка снизить эффективную концентрацию иммунотоксина *in vitro*.

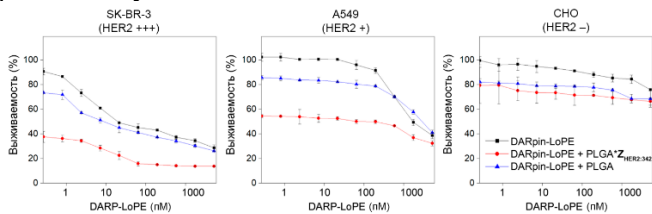


Рис. 14. Тесты на цитотоксичность DARP-LoPE и наночастиц PLGA на 3 линиях клеток с различной экспрессией HER2: SK-BR-3 (сверхэкспрессия); A549 (нормальная экспрессия); CHO (HER2-).

5. Метод модификации наночастиц магнетита с использованием магнетит-связывающего белка и белковой пары барназа-барстар для специфичного воздействия на HER2-положительные клетки

Выделение и очистка белка Bs-C-Mms6

Был получен рекомбинантный белок Bs-C-Mms6. Mms6, пептид из магнитотактической бактерии AMB-1, был выбран благодаря способности связывать магнетит своей С-концевой частью. Барстар – бактериальный белок массой 10,4 кДа, способный очень специфично и прочно связываться с барназой (бактериальной РНКазой). Рекомбинантный белок должен был сохранять высокое сродство и к магнетиту, и к барназе.

Для выделения белка компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) были трансформированы плазмидой pET22_Bs-C-Mms6, в которой ген, кодирующий целевой белок Bs-C-Mms6, находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага T7 и lac-оператора (Рис. 15 Б). Затем нарабатывалась биомасса клеток, к которой добавляли IPTG для индукции экспрессии. После выделения белка его очищали с помощью металл-аффинной хроматографии. Образцы, собранные на каждом шаге, были проанализированы с помощью денатурирующего электрофореза по Лэммли в 15% ПААГ (Рис. 15 А).

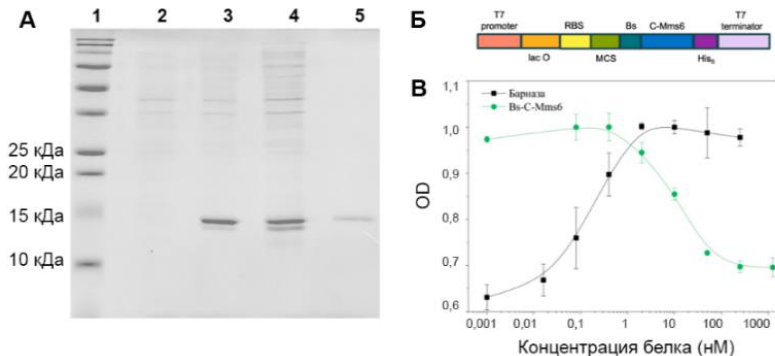


Рис. 15. А) Денатурирующий электрофорез в 15% ПААГ. 1 – маркер, 2 – до индукции, 3 – после индукции, 4 – нанесение, 5 – чистый белок. Б) Схемы области клонирования вектора pETBsC-Mms6: RBS (ribosome binding site) – сайт связывания рибосомы, MCS (multiple cloning site) – полилинкер, His₆ – гистидиновая метка. В) Определение активности Bs-C-Mms6 по его способности ингибировать ферментативную активность барназы. Черный – барназа, зеленый – Bs-C-Mms6.

Проверка активности белка Bs-C-Mms6

Рибонуклеазная активность барназы определялась методом кислотно-нерастворимого осадка. Таким образом подобрали концентрацию барназы (2 мМ) дальнейших измерений в линейном диапазоне. Затем измерили активность барназы в присутствии нескольких концентраций Bs-C-Mms6. Bs-C-Mms6 показал способность ингибировать ферментативную активность барназы, а значит и специфично связываться с ней (Рис. 15 В).

Специфичная сборка белкового модуля барназа-барстар на поверхности клеток

Была продемонстрирована способность сборки Bs-C-Mms6 с барназой на поверхности клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2. В качестве направляющей молекулы мы использовали белок слияния барназы и DARPIn.9.29, высокоаффинно распознающего рецептор HER2 ($K_d = 3,8$ нМ).

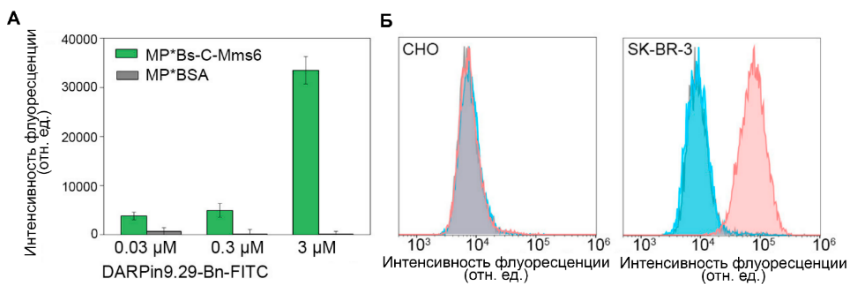


Рис. 16. А) Интенсивность флуоресценции частиц, предварительно модифицированных Bs-C-Mms6 или БСА, после инкубации с различными концентрациями DARPIn.9.29-Bn*ФИТЦ. Б) Сборка конструкции DARPIn.9.29-Bn*Bs-Mms6*ФИТЦ на поверхности клеток. Данные проточной цитофлуориметрии. Серый – аутофлуоресценция клеток, голубой – клетки с DARPIn.9.29-Bn, розовый – клетки с DARPIn.9.29-Bn и Bs-Mms6*ФИТЦ.

Клетки инкубировали с DARPIn.9.29-Bn, а после отмывки добавляли Bs-C-Mms6-ФИТЦ. Связывание наблюдалось только у клеток SK-BR-3 и только в том случае, если к ним были добавлены одновременно DARPIn.9.29-Bn и Bs-C-Mms6*ФИТЦ (Рис. 16 Б). Это доказывает возможность сборки 2 белковых модулей на поверхности клеток и отсутствие заметного неспецифического взаимодействия Bs-C-Mms6 с клетками.

Получение стабильных наночастиц МЧ*Vs–C–Mms6

В работе были использованы частицы магнетита с гидродинамическим размером 137 ± 38 нм (Рис. 17 А). Vs-C-Mms6 показал способность стабилизировать наночастицы магнетита в воде и фосфатно-солевом буфере. Связывание с Vs-C-Mms6 увеличивало гидродинамический размер частиц пропорционально концентрации Vs-C-Mms6. После инкубации с контрольными белками (барстаром и БСА) размер частиц увеличивался, однако в фосфатно-солевом буфере они агрегировали в течение нескольких минут (Рис. 17 А).

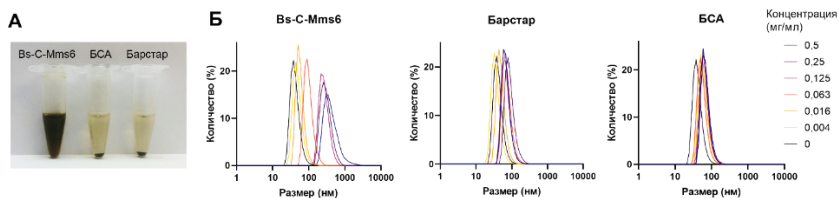


Рис. 17. А) Фотография НЧ, модифицированных Vs-C-Mms6, БСА и барстаром в натрий-фосфатном буфере. Только Vs-C-Mms6 стабилизирует частицы. Б) Гидродинамический размер наночастиц, модифицированных Vs-C-Mms6, барстаром и БСА.

Специфичная сборка белкового модуля барназа-барстар на поверхности наночастиц

После инкубации с DARPin.9.29-Vn-ФИТЦ интенсивность флюоресценции МЧ*Vs-C-Mms6 значительно превышала интенсивность флюоресценции частиц МЧ*БСА и возрастала пропорционально концентрации добавленного конъюгата (Рис. 17 А). Это подтверждает связывание Vs-C-Mms6 с магнетитом, способность специфичной сборки белковой пары на поверхности наночастиц и ее возможность выступать «адаптером» в нашей модульной системе

Оценка биосовместимости белка Vs-C-Mms6 и модифицированных им наночастиц магнетита

Для проверки цитотоксичности белка Vs-C-Mms6 и модифицированных наночастиц был проведен МТТ-тест с клетками SK-BR-3 и СНО. В широком диапазоне концентраций (от 80 нМ до 10 мкМ) добавление белка не приводило к снижению выживаемости клеток. НЧ магнетита, модифицированные Vs-C-Mms6, при концентрациях 0,1-50 мг/л не оказывали токсического действия на клетки.

Связывание МЧ*Bs-C-Mms6*DArPin9.29-Bn с клетками со сверхэкспрессией рецептора HER2

Была продемонстрирована возможность специфического связывания полной конструкции МЧ*Bs-C-Mms6*DArPin9.9-Bn с клетками. Полученные наноконструкции показали более чем в 3 раза специфичное связывание с раковыми клетками SK-BR-3, гиперэкспрессирующими рецептор HER2 (59 ± 3 фг/клетку), относительно HER2-негативных клеток CHO (18 ± 4 фг/клетку).

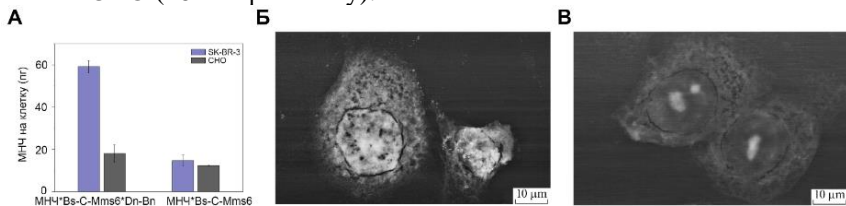


Рис. 18. А) Количество наночастиц, связавшихся с клетками, определенное методом МРQ-цитометрии. Б, В) Электронная микрофотография клеток SK-BR-3, меченных наноструктурами МЧ*Bs-C-Mms6*DArPin9.29-Bn, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа Zeiss EVO LS10.

Новый способ модификации наночастиц магнетита без химической конъюгации позволяет повысить эффективность распознавания дарпинов на поверхности наночастиц. Лёгкость сборки, безопасность и специфичность конструкции делают ее перспективной для применения в тераностике.

Выводы

1. Сконструированы адресные наночастицы PLGA-хитозан, загруженные двумя БИК-красителями для фототерапии и визуализации HER2-положительных опухолей. Показана возможность прижизненной визуализации опухолей молочной железы мыши и эффективность фототермической и фотодинамической терапии (ФТТ и ФДТ) в окне прозрачности биологических тканей.

2. Показано, что наночастицы серебра, конъюгированные с аффибоди $Z_{HER:342}$, могут выступать более специфичной меткой HER2-положительных клеток, чем полноразмерное антитело трастузумаб. Благодаря плазмонным свойствам, такие наночастицы могут быть использованы как фотосенсибилизатор.

3. Показано, что магнитные наночастицы, конъюгированные с аффибоди, лучше распознают HER2-положительные клетки, чем частицы, конъюгированные с дарпином G3 или полноразмерным антителом.

4. Показано, что малый размер белков-скаффолдов – дарпина и аффибоди позволяет эффективно использовать их в комбинации для нацеливания на разные субдомены одного рецептора HER2 для усиления эффективности таргетной терапии. Показан высокий синергизм комбинированного действия иммунотоксина DARPIn-LoPE и наночастиц PLGA*DOX*аффибоди.

5. Разработана технология стабилизации и модификации наночастиц магнетита на основе белковой пары барназа-барстар и связывающего магнетит белка Mms6 из магнитотактических бактерий. Технология характеризуется универсальностью и позволяет избежать использования полимеров для покрытия наночастиц и последующей конъюгации с адресными молекулами.

Публикации

1. Kotelnikova P. A., Shipunova, V. O and Deyev, S. M. Targeted PLGA-Chitosan Nanoparticles for NIR-Triggered Phototherapy and Imaging of HER2-Positive Tumors//Pharmaceutics, 2024. Vol. 16, № 1.
2. Shipunova, V. O., Belova, M. M., Kotelnikova, P. A., Shilova, O. N., Mirkasymov, A. B., Danilova, N. V., ... & Nikitin, M. P. Photothermal Therapy with HER2-Targeted Silver Nanoparticles Leading to Cancer Remission // Pharmaceutics. MDPI, 2022. Vol. 14, № 5.
3. Shipunova, V. O., Kolesnikova, O. A., Kotelnikova, P. A., Soloviev, V. D., Popov, A. A., Proshkina, G. M., ... & Deyev, S. M. Comparative evaluation of engineered polypeptide scaffolds in HER2-targeting magnetic nanocarrier delivery // ACS Omega. American Chemical Society, 2021. Vol. 6, № 24. P. 16000–16008.
4. Shilova, O., Kotelnikova, P., Proshkina, G., Shramova, E., & Deyev, S. et al. Barnase-Barstar Pair: Contemporary Application in Cancer Research and Nanotechnology // Molecules. MDPI, 2021. Vol. 26, № 22.
5. Shipunova, V. O., Komedchikova, E. N., Kotelnikova, P. A., Zelepukin, I. V., Schulga, A. A., Proshkina, G. M., ... & Prasad, P. N. et al. Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment // ACS Nano. American Chemical Society, 2020. Vol. 14, № 10. P. pp.
6. Shipunova, V. O., Kotelnikova, P. A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. Self-assembling nanoparticles biofunctionalized with magnetite-binding protein for the targeted delivery to HER2/neu overexpressing cancer cells // J Magn Magn Mater. Elsevier B.V., 2019. Vol. 469. P. 450–455.
7. Belova, M. M., Shipunova, V. O., Kotelnikova, P. A., Babenyshev, A. V., Rogozhin, E. A., Cherednichenko, M. Y., & Deyev, S. M. “Green” Synthesis of Cytotoxic Silver Nanoparticles Based on Secondary Metabolites of Lavandula Angustifolia Mill //Acta Naturae, 2019. Vol. 11, № 2. P. 47–53.
8. Kotelnikova P. A. Shipunova, V. O., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Novikov I.A., Schulga A.A., Deyev S.M., Petrov R.V. Synthesis of Magnetic Nanoparticles Stabilized by Magnetite-Binding Protein for Targeted Delivery to Cancer Cells // Dokl Biochem Biophys. Pleiades Publishing, 2018. Vol. 481, № 1. P. 198–200.
9. Shipunova, V. O., Kotelnikova, P. A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. Data on characterization of magnetic nanoparticles stabilized with fusion protein of Barstar and C-term part of Mms6 // Data Brief. 2018. Vol. 21. P. 1659–1663.