

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

**Государственный научный центр Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**

**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*

*Российской академии наук*

**(ГНЦ ИБХ РАН)**

*На правах рукописи*

Котельникова Полина Александровна

**Конструкции на основе наночастиц и рекомбинантных белков**

**для онкотераностики**

Специальность: 1.5.3. – Молекулярная биология

**Диссертация**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,  
академик РАН, профессор Деев Сергей Михайлович

Москва, 2024 г.

## Оглавление

Введение.....	8
Актуальность исследования .....	8
Степень разработанности темы исследования .....	8
Цель и задачи .....	10
Новизна, практическая и научная значимость результатов проведенных исследований.....	10
Методология и методы исследования .....	12
Положения, выносимые на защиту.....	12
Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации .....	13
Степень достоверности и апробация работы.....	14
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Наночастицы для терапии и визуализации опухолей.....	16
1.1.1. Магнитные наночастицы.....	16
1.1.2. Плазмонные наночастицы.....	19
1.1.3. Полимерные наночастицы .....	22
1.2. Транспорт наночастиц к раковым клеткам .....	24
1.2.1. Повышенная проницаемость солидных опухолей .....	24
1.3. Активная доставка лекарств .....	27
1.3.1. HER2 рецептор .....	30
1.4. Альтернативные аффинные каркасные белки .....	33
1.4.1. Дарпины .....	36
1.4.2. Аффибоди .....	38

Аффибоди для визуализации .....	41
Аффибоди для терапии.....	42
1.5. Белковая пара барназа-барстар для создания самособирающихся многофункциональных наноконструкций .....	45
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	53
2.1. Материалы .....	53
2.2. Буферные растворы .....	54
2.3. Эукариотические клеточные линии.....	57
2.3.1. Линии эукариотических клеток.....	57
2.3.2. Анализ жизнеспособности клеток.....	58
2.3.3. Измерение уровня активных форм кислорода.....	60
2.3.4. Проточная цитометрия .....	61
2.4. Прокариотические клетки.....	61
2.4.1. Бактериальные штаммы .....	61
2.4.2. Получение компетентных клеток.....	62
2.4.3. Трансформация методом теплового шока.....	62
2.4.4. Нарботка и выделение плазмидной ДНК .....	63
2.5. Выделение и очистка белков .....	63
2.5.1. Экспрессия белков в бактериальной системе. Хроматографическая очистка белков .....	63
2.5.2. Электрофорез в ПААГ.....	66
2.5.3. Определение концентраций белков .....	66
2.5.4. Определение ферментативной активности белков.....	67
2.5.5. Модификации и мечение белков .....	68

2.6. Синтез, характеристика и модификация наночастиц .....	69
2.6.1. Сканирующая электронная микроскопия.....	69
2.6.2. Гидродинамическое рассеяние света .....	69
2.6.3. Количественный анализ связывания магнитных частиц с клетками .....	70
2.7. Синтез наночастиц PLGA, загруженных флуоресцентными красителями.....	71
2.7.1. Синтез наночастиц PLGA .....	71
2.7.2. Характеризация НЧ PLGA .....	72
2.7.3. Анализ специфичности связывания методом проточной цитометрии .....	73
2.7.4. Исследование фототермических свойств .....	74
2.7.5. Фототерапия <i>in vitro</i> .....	74
2.7.6. Конфокальная микроскопия .....	75
2.7.7. Мышиная модель HER2-положительной опухоли.....	75
2.7.8. Визуализация опухолей <i>in vivo</i> .....	76
2.8. Наночастицы магнетита.....	77
2.8.1. Флуоресцентная спектроскопия .....	77
2.8.2. Мечение клеток структурами DARPin9.29-Vn * Bs-C-Mms6-ФИТЦ .....	77
2.8.3. Мечение клеток DARPin9.29-Vn* ФИТЦ.....	77
2.8.4. Мечение клеток структурами DARPin9.29-Vn* Bs-c-Mms6-ФИТЦ	78
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	79
3.1. Наночастицы PLGA, загруженные двумя БИК красителями, для визуализации и фототерапии HER2-положительных раковых клеток .....	79

3.1.1. Синтез и характеристика наночастиц PLGA.....	79
3.1.2. Исследование фототермических свойств наночастиц PLGA, загруженных БИК красителями.....	81
3.1.3. Исследование фотосенсибилизирующих свойств наночастиц PLGA, загруженных БИК красителями.....	82
3.1.4. Направленная доставка наночастиц PLGA, нагруженных красителем, к HER2-положительным клеткам: оценка специфичности и цитотоксичности .....	83
3.1.5. Фототерапия <i>in vitro</i> с использованием НЧ PLGA, нагруженных БИК красителем.....	84
3.1.6. Визуализация опухолей EMT6/p-HER2 <i>in vivo</i> при помощи НЧ PLGA+IR-780+NB .....	86
3.1.7. Обсуждение .....	87
3.2. Сравнение белков, распознающих рецептор HER2, для модификации магнитных наночастиц для специфичного мечения HER2-положительных клеток .....	90
3.2.1. Выделение и очистка белков, распознающих рецептор HER2. Модификация магнитных наночастиц распознающими белками.....	90
3.2.2. Специфичность связывания конъюгатов магнитных наночастиц с HER2 положительными раковыми клетками .....	92
3.2.4. Обсуждение .....	93
3.3. Плазмонные наночастицы серебра, модифицированные аффибоди Z <sub>342</sub> , для фототермической терапии HER2-положительных опухолей.....	96
3.3.1. Характеризация плазмонных наночастиц серебра .....	96
3.3.2. Модификация поверхности наночастиц серебра.....	97

3.3.3. Мечение HER2-положительных раковых клеток при помощи наночастиц Ag-PEG-HER2 .....	98
3.3.4. Исследование фотосенсибилизирующих свойств наночастиц Ag-PEG-HER2 .....	100
3.4. Сочетанная терапия адресного иммунотоксина DARP-LoPE и наночастиц PLGA-аффибоди, нагруженных доксорубицином, нацеленных на разные участки рецептора HER2.....	102
3.4.1. Выделение рекомбинантных белков иммунотоксина DARP-LoPE и аффибоди Z <sub>HER2:342</sub> .....	102
3.4.2. Наночастицы PLGA-аффибоди для направленного воздействия на HER2-положительные клетки .....	103
3.4.5. Комбинированное воздействие наночастиц PLGA*DOX*аффибоди и иммунотоксина <i>in vitro</i> . .....	104
3.5. Метод модификации наночастиц магнетита с использованием магнетит-связывающего белка и белковой пары барназа-барстар для специфического воздействия на HER2-положительные клетки .....	106
3.5.1 Выделение и очистка белка Bs-C-Mms6.....	106
3.5.2. Проверка активности белка Bs-C-Mms6.....	106
3.5.3 Специфичная сборка белкового модуля барназа-барстар на поверхности клеток .....	108
3.5.4. Получение стабильных наночастиц МЧ*Bs–C–Mms6.....	109
3.5.5. Специфичная сборка белкового модуля барназа-барстар на поверхности наночастиц.....	110
3.5.6. Оценка биосовместимости белка Bs-C-Mms6 и модифицированных им наночастиц магнетита .....	110

3.5.7. Связывание МЧ*Bs-C-Mms6*DARPin9.29-Vn с клетками со сверхэкспрессией рецептора HER2 .....	111
Выводы.....	113
Список использованных сокращений .....	115
Список литературы .....	118

## **Введение**

### **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 [1,2]. 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 [3].

Дошедшие до испытания на людях адресные наночастицы, как правило, в качестве направляющего модуля содержат полноразмерные антитела [4] либо их фрагменты [5], трансферрин [6,7] или низкомолекулярные соединения [8].

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 [9–11].

Направляющие белки-скаффолды также проходят клинические испытания в качестве замены антител при доставке изотопов и контрастирующих агентов

[12,13] либо в терапии аутоиммунных заболеваний [14]. 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 меченых 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\*Dn-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<sub>HER:342</sub>. 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).

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Наночастицы для терапии и визуализации опухолей

Использование уникальных физико-химических свойств наночастиц позволит расширить возможности традиционного лечения онкологических заболеваний. Наночастицы помогают доставить лекарство в опухоль, защищая его от разрушения и увеличивая время циркуляции в кровотоке. Применение наночастиц позволяет повысить биодоступность нерастворимых препаратов, снизить системную токсичность, а также объединить действие препаратов с различными механизмами активности, эффективно воздействуя на резистентные опухоли.

Большинство одобренных наноконструкций имеют липосомальную или полимерную природу, однако стоит отметить применение и неорганических наночастиц, таких как магнитные наночастицы и частицы оксида гафния [15]. Среди успешно прошедших клинические испытания Doxil — липосомальный доксорубин, одобренный FDA (1995) и EMA (1996) для терапии второй линии рака яичников, ВИЧ-ассоциированной саркомы Капоши и множественной миеломы; липосомальный даунорубин, одобренный в 2005 году для первичной терапии ВИЧ-ассоциированной саркомы Капоши; паклитаксел, связанный с частицами альбумина, одобренный в 2005 году для лечения немелкоклеточного рака легкого, когда операция или облучение невозможны, метастатического рака молочной и поджелудочной железы. NanoTherm — наночастицы магнетита, покрытые аminosиланом, одобрены в Европе для гипертермии при опухолях мозга [16].

#### 1.1.1. Магнитные наночастицы

Магнитные наночастицы могут состоять из элементов с ферромагнитными свойствами, таких как железо, хром, гадолиний, кобальт, марганец, никель, и их



химических соединений, например оксидов, ферритов и сплавов. На сегодняшний день наибольшее применение нашли частицы с ядром из оксидов железа (обычно, магнетит  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  или магнемит  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Они обладают достаточной устойчивостью и сравнительно низкой токсичностью, к тому же они хорошо совместимы с различными биополимерами, что позволяет создавать многослойные конструкции [17,18]. Магнитные наночастицы можно специфично доставить к раковым клеткам: пассивно (благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания в опухолевых тканях) или активно (например, используя постоянное или переменное магнитное поле или конъюгаты МНЧ антителами или скаффолдовыми белками) [19].

Важно отметить, что среди магнитных частиц есть примеры допущенных к клиническим испытаниям или успешно прошедших их, например: Lumiren® и Gastromark® для визуализации кишечника, Endorem® и Feridex IV® для визуализации печени и селезенки, Combidex® для визуализации метастазов лимфоузлов, Feraheme® и Ferumoxytol® для лечения железодефицитной анемии [20].

Магнитные наночастицы могут выступать в качестве контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии. Контрастирующие агенты накапливаются в тканях и обеспечивают повышение контрастности путем сокращения продольного (T1) и поперечного времен (T2) релаксации окружающих протонов. Магнитные наночастицы сильнее влияют на время поперечной релаксации, поэтому обычно используются, чтобы обеспечить контраст T2-взвешенных изображений. После внутривенного или перорального введения МНЧ могут сокращать время релаксации окружающих протонов воды внутри различных органов, что приводит к контрасту на МРТ-изображениях [21].

Суперпарамагнитные частицы могут быть визуализированы и сами по себе в градиентном магнитном поле. Принцип визуализация магнитных частиц (MPI, magnetic particle imaging) основан на использовании МНЧ, статического

магнитного поля, осциллирующего поля и катушки приема сигнала. Статическое поле отлично от нуля во всех положениях, кроме одной точки (FFP), вблизи которой ориентация намагниченности ферромагнитных наночастиц согласовывается с приложенным осциллирующим полем. Поскольку частицы имеют нелинейную кривую намагничивания, переориентация намагниченности, происходящая вокруг точки, свободной от поля (FFP), индуцирует сигнал в приемных катушках с частотой возбуждающего поля, пропорционально концентрации частиц. Сканирование области осуществляется путем перемещения точки, свободной от поля [22]. При помощи этого метода можно визуализировать сосудистую систему и неинвазивно отслеживать перемещение клеток [23].

Небольшие МНЧ обладают суперпарамагнитными свойствами и в переменном магнитном поле могут нагреваться из-за процессов релаксации. Раковые клетки обладают повышенной термочувствительностью, поэтому их можно убивать воздействием высоких температур (41–45 °С). Гипертермией опухоли называют ее уничтожение путем локального повышения температуры [24]. Создание частиц, связывающихся только с раковыми клетками, а также локализация магнитного поля позволяют снизить нежелательное воздействие на здоровые ткани. Также в ряде доклинических испытаний показано, что локальная гипертермия опухоли может значительно повысить эффективность традиционной химиотерапии [25,26]

Другое применение гипертермии можно найти в высвобождении загруженного в наночастицах лекарства. Механизм состоит в присоединении молекул к частице через термозависимый линкер, который разрушается под действием тепла, или на изменении проницаемости частиц при нагревании. Например, было показано контролируемое высвобождение доксорубицина и паклитаксела из МНЧ, покрытых термочувствительным поливиниловым спиртом, с использованием внешнего магнитного поля [27,28].

Тепловое действие наночастиц можно применить не только для разрушения, но и для стимуляции клеток. Магнитогенетика (или магнитная термогенетика) основана на нагревании магнитных частиц под действием переменного магнитного поля, которое может проникать глубоко в ткань, не повреждая ее. Это минимально инвазивный метод: для стимуляции не нужны провода и хирургическое вмешательство, как в оптогенетике, или многократные инъекции. Была показана возможность доставки МНЧ в вентральную область покрышки мозга мышей, где частицы под воздействием переменного магнитного поля нагревались и стимулировали нейроны с целевым термозависимыми ионными каналами только в той области мозга, куда была произведена инъекция. После однократного введения частицы способны действовать на мозг в течение продолжительного времени [29].

Магнитные частицы могут применяться для магнетофекции – доставки в клетки нуклеиновых кислот под действием магнитного поля. Использование действия магнитного поля на частицы повышает эффективность и скорость трансфекции, позволяет уменьшать концентрации вектора и частиц, а также скорость трансфекции. Так как частицы, модифицированные катионным полимером, проникают в клетку путем эндоцитоза и пиноцитоза, магнетофекция не нарушает архитектуру мембраны, в отличие от электропорации и других физических методов. Сейчас наборы для магнетофекции различных типов клеток и вирусной магнетотрансдукции доступны коммерчески, например Magnetofection™ компании OZ Biosciences [30].

### **1.1.2. Плазмонные наночастицы**

Наночастицы благородных металлов (золота, серебра, платины) обладают свойством локализованного плазмонного резонанса. Локализованный плазмонный резонанс – уникальное взаимодействие наночастиц со светом, которое вызывает коллективные когерентные колебания электронов, что приводит либо к радиационному распаду с сильным видимым рассеянием света, либо к

безызлучательному распаду, который вызывает преобразование энергии света в тепловую. Резонансная частота зависит от размера, формы и состава материала наноструктуры. Тепловая энергия может быть применена для термоплазменной терапии рака. Если для золотых частиц существует множество таргетных конструкций для гипертермии [31,32] и успешных испытаний на модельных животных [33–35], то серебряные частицы все еще не нашли широкого практического применения. Из-за того, что максимум плазмонного резонанса для серебряных наносфер находится в области 400 нм и не попадает в окно прозрачности биологических тканей, часть исследований сосредоточена на получении частиц со спектром плазмонного резонанса в красной и инфракрасной областях. Ряд работ посвящен синтезу и применению анизотропных частиц, например, треугольных призм [36,37] или нанокубиков [38]. Другое направление исследований – создание гибридных частиц из нескольких материалов, например, частиц с золотым ядром и серебряной оболочкой [39,40] или серебряно-золотых нанозвезд [41]. Комбинированные наночастицы AuroShell на основе ядра из оксида кремния и золотой оболочки успешно проходят клинические испытания на пациентах с раком простаты. Технология AuroLase от компании Nanospectra Biosciences включает в себя наночастицы для внутривенного введения и одобренный FDA оптоволоконный зонд для доставки излучения к опухоли. Облучение светом ближней инфракрасной области приводит к нагреванию и разрушению опухоли [42].

Принято считать, что наночастицы золота обладают высокой биосовместимостью и химической инертностью. Однако есть сообщения о том, что золотые частицы могут вызывать опосредованный нарушением работы митохондрий апоптоз и нарушение клеточного цикла [43]. При синтезе анизотропных золотых наночастиц часто используются токсичные восстановители и детергенты, например, цетримониум бромид, повышающие цитотоксичность полученных структур [44].

Наночастицы серебра могут обладать собственной токсичностью. Доставив такие частицы к раковым клеткам, можно получить дополнительный противоопухолевый эффект [45,46]. Известно несколько механизмов токсичности серебра: она может быть связана с генерацией активных форм кислорода (АФК), что подтверждается измерением уровня АФК и снижением цитотоксичности при обработке клеток с серебряными наночастицами антиоксидантами [45,47,48]. Другие возможные причины – выделение токсичных ионов серебра [48], повреждение митохондрий и ДНК [49], повышение экспрессии генов матричных металлопротеиназ [50] или нарушение клеточного цикла [51].

При этом серебряные частицы могут выступать в качестве агентов фотодинамической терапии. Было показано, что при облучении светом они могут не только нагреваться, но и выделять цитотоксичные ионы серебра [52] и активные формы кислорода [53]. Также была продемонстрирована способность серебряных наночастиц усиливать генерацию активных форм кислорода при использовании традиционных фотосенсибилизаторов, таких как Бенгальский розовый [54–56] или присутствующего в клетках витамина рибофлавина [57,58].

Из-за способности рассеивать свет плазмонные наночастицы могут быть визуализированы методом темнопольной микроскопии. Например, была показана возможность окрашивания раковых клеток, сверхэкспрессирующих эпидермальный рецептор клеточного роста на 600% более специфичное, чем нераковых клеток [59]. Применение двухцветной темнопольной микроскопии позволяет вычитать собственное рассеяние клетки [60], а также измерять расстояние между клеточными структурами, используя «плазмонную линейку» [61].

Плазмонные наночастицы могут быть контрастирующими агентами и для фотоакустической визуализации. Например, контрастирование золотыми наносферами стволовых клеток позволило провести точную инъекцию клеток в спинной мозг под визуальным контролем и отследить их дальнейшую судьбу [62].

Контрастирование золотыми наностержнями позволило пометить и отслеживать в течение 15 дней  $2 \times 10^4$  стволовых клеток в живой мыши без влияния на их жизнеспособность или потенциал дифференцировки [63].

Таким образом уникальные физические свойства плазмонных наночастиц позволяют им выступать в роли не просто носителей для адресной доставки лекарств, а самостоятельных диагностических и терапевтических агентов.

### **1.1.3. Полимерные наночастицы**

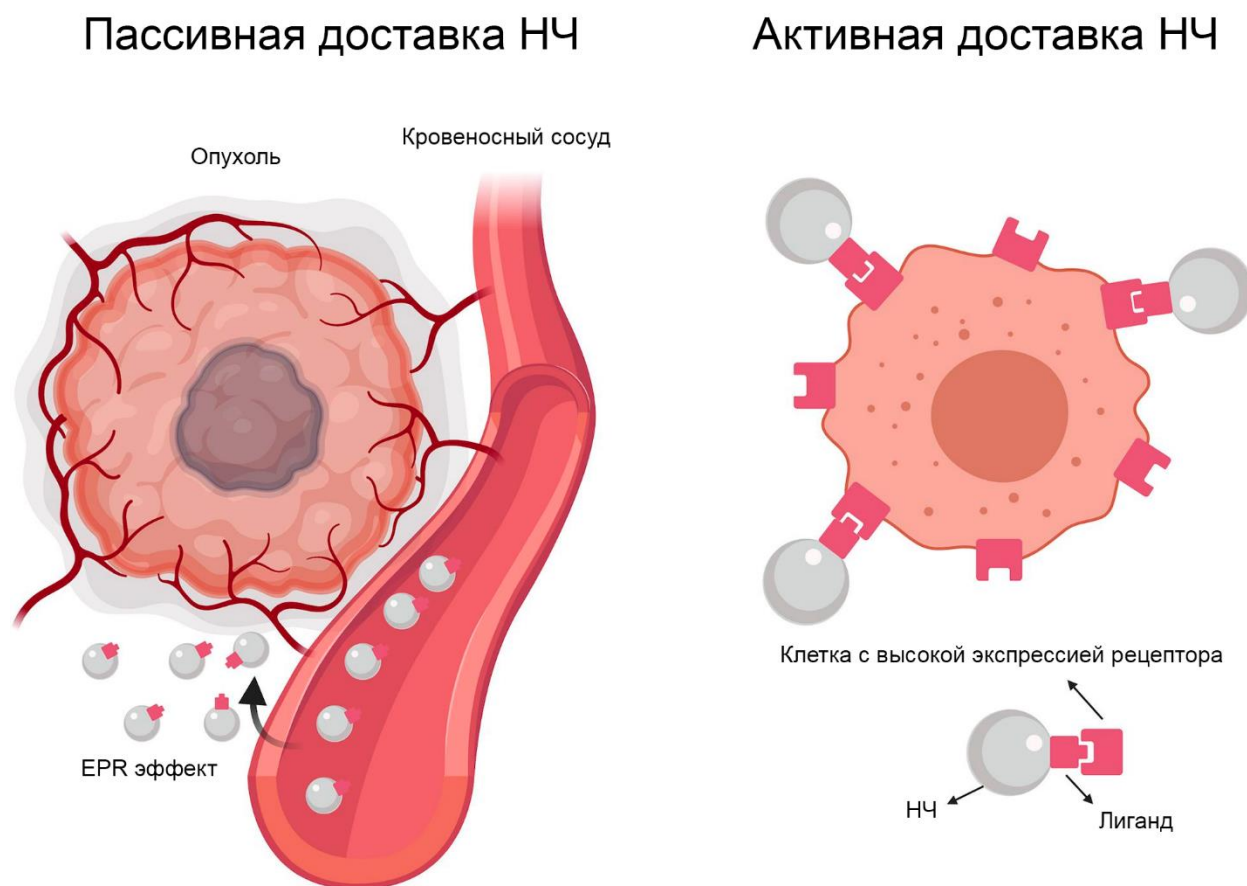
Полимерные наночастицы – один из наиболее представленных типов нанолекарств, допущенных к испытаниям на людях. Можно выделить две большие группы наночастиц: нанокapsулы (полимерные везикулы, где лекарство заключено в водной или масляной полости, окруженной полимерной оболочкой) и наносферы (полимерные матрицы, в которых лекарственное средство диспергировано по частицам) [64,65]. Например, мицеллы имеют лиофильное ядро и гидрофильный внешний слой. В них амфифильный полимер ограничивает липофильную полезную нагрузку. В качестве примера можно привести Genexol-PM, состоящий из сополимера ПЭГ и полимолочной кислоты, загруженный паклитакселом. Genexol-PM проходит клинические испытания на пациентах с раком молочной железы, поджелудочной железы, легких и яичников [66].

Так называемые твердые наночастицы представляют собой полимерную матрицу, загруженную терапевтическим или диагностическим препаратом. Такие конструкции позволяют контролируемо высвобождать препарат и защищают его при доставке. Примером такого препарата можно назвать BIND-014, наночастицы с гидрофобным ядром полимолочной кислоты, в поры которого загружен доцетаксел, и гидрофильной оболочкой из ПЭГ, модифицированные лигандами простатспецифического мембранного антигена. BIND-014 проходит вторую стадию клинических испытаний для лечения рака простаты и легких [67].

Ко второй группе относят и разнообразные полиплексные наночастицы. В препарате CRLX101 алкалоид камптотецин ковалентно связан с линейным сополимером циклодекстрина, который, в свою очередь, состоит из чередующихся субъединиц бета-циклодекстрина и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Наночастицы CRLX101 растворимы в воде и обеспечивают постепенное высвобождение химиотерапевтического препарата по мере гидролиза связей. CRLX101 проходит клинические испытания при раке почек, яичников и прямой кишки [68]. Наночастицы CALAA-01 нагружены малыми интерферирующими РНК для ингибирования роста опухоли путем РНК-интерференции. Полимерные наночастицы, содержащие циклодекстрины и ПЭГ, защищают молекулы РНК от деградации. Наночастицы нацелены на раковые клетки со сверхэкспрессией рецептора трансферрина. CALAA-01 проходил клинические испытания для лечения солидных опухолей [69].

Благодаря своей уникальной биосовместимости PLGA был одобрен в клинике для разработки биоразлагаемых хирургических и каркасных материалов, а также в качестве лекарственного носителя для лечения онкологических, эндокринных, инфекционных и сердечных заболеваний. Модифицируя наночастицы дополнительными полимерами, можно регулировать связывание с клетками и скорость высвобождения лекарств. Создание гибридных полимерных наночастиц на основе PLGA позволяет не только варьировать поверхностный заряд и возможности загрузки таких НЧ, но и маскировать их от иммунной системы [70].

## 1.2. Транспорт наночастиц к раковым клеткам



**Рисунок 1.** Пассивная и активная доставка наночастиц. Слева – доставка наночастиц, основанная на эффекте повышенной проницаемости опухолей. Справа – направленная доставка наночастиц, частицы модифицированы лигандами к рецепторам на поверхности раковых клеток. Адаптировано из [71]

### 1.2.1. Повышенная проницаемость солидных опухолей

Большинство солидных опухолей имеет аномальное строение кровеносных сосудов, и для них характерен EPR-эффект (enhanced permeability and retention (EPR) effect) - повышенная проницаемость и удерживание. Благодаря этому обеспечивается запас питательных веществ и кислорода для быстрого роста опухоли и облегчается транспортировка макромолекул в опухолевых тканях. С другой стороны, плохой лимфатический дренаж таких опухолей способствует



накоплению макромолекул и наночастиц. Таким образом, молекулы, конъюгированные с наночастицами, могут селективно проникать в опухоль и удерживаться в ней гораздо эффективнее, чем в здоровых тканях. Также EPR эффект позволяет доставлять лекарственные соединения в метастазы, не видимые при диагностике. Однако клинические испытания показали, что на людях EPR-опосредованная доставка работает гораздо хуже, чем на грызунах, поэтому необходимо разрабатывать системы активной доставки [72,73] (Рисунок 1).

Интенсивность EPR эффекта в реальности оказывается связанной с опухолевым микроокружением: соотношением между опухолевыми и стромальными клетками и их взаимодействием, структурой внеклеточного матрикса и особенностями экспрессии цитокинов, ангиогенных факторов и других эффективных молекул [74,75].

Проблема создания идеального нанопрепарата в том, что для успешной доставки в клетку требуется выполнить ряд противоречащих друг другу условий. Одни свойства помогают наночастице избегать захвата иммунной системой, печенью или почками и совсем другие требуются для успешной интернализации раковой клеткой и попадания в необходимый компартмент клетки. Наночастицы с большим по модулю зарядом принято считать более коллоидно-стабильными, однако сильно отрицательные НЧ склонны захватываться ретикулоэндотелиальной системой (РЭС) и накапливаться в печени и селезенке, а сильно положительные НЧ могут удерживаться в просвете эндотелия сосудов за счет высокого содержания там отрицательно заряженных фосфолипидов [76].

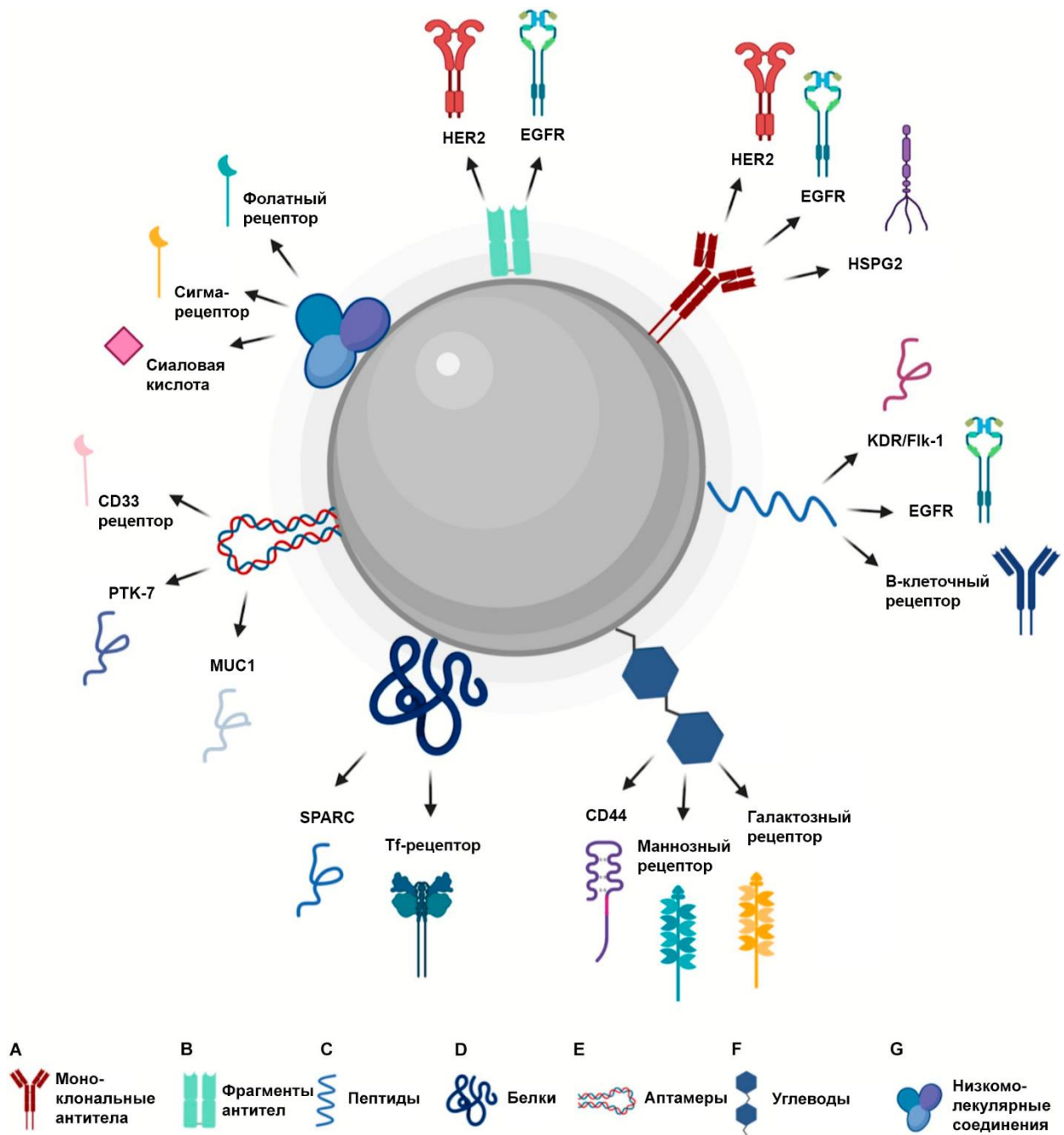
На биораспределение в организме, несомненно, влияют и другие физико-химические характеристики НЧ, такие как размер и форма. Например, НЧ размером менее 5-6 нм быстро выводятся из кровотока за счет почечного клиренса, а проникновение НЧ более 200 нм в опухоль затруднено. Исходя из этого многие исследователи сходятся в том, что оптимальный размер НЧ для накопления опухоли 50-150 нм [77]. Согласно некоторым данным, анизотропные наночастицы,

такие как наностержни, нанодиски и нанопроволоки, могут лучше сферических избегать захвата макрофагами и циркулировать в кровотоке дольше [78,79].

Однако оптимизация параметров наночастиц не увеличит их накопление в опухоли, если для данного типа опухоли EPR-эффект не характерен. Эффективность EPR-эффекта различается не только между разными типами опухолей, но даже у одного и того же пациента [80]. Например, карциномы печени и почек могут быть лучше васкуляризированы, чем опухоли поджелудочной железы и простаты, а значит, обладают лучшим EPR эффектом. К тому же повреждение сосудистой сети в центральной области опухоли с очень высоким давлением, тромбы и окклюзии также затрудняют проникновение в опухоль [81,82].

В дополнении к этому, проницаемость опухоли может изменяться со временем вместе с порами эндотелия и движением внутритуморальной жидкости [83]. Усилить EPR эффект возможно, воздействуя на кровеносные сосуды. Так ангиотензин 2 не вызывает вазоконстрикцию в опухоли из-за недостатка дифференцированных гладкомышечных клеток, но приводит к повышению давления и увеличению пор проницаемости эндотелия. Благодаря этому ангиотензин 2 повышал накопление наночастиц и макромолекул в солидных опухолях мышей и животных [84,85]. Применение брадикинина привело к 1,4–1,7-кратному улучшению кровоснабжения опухоли и 3-кратному увеличению накопления НЧ [86]. Применение TNF- $\alpha$  позволило в 10 раз повысить накопление НЧ за счет усиления проницаемости сосудов, изменения экспрессии белков клеточной адгезии и повышения уровня АФК.

### 1.3. Активная доставка лекарств



**Рисунок 2.** Дизайн наночастиц для активной доставки. Адаптировано из [71]

Активная доставка лекарств основана на модификации наноагентов специфичными лигандами, антителами или пептидами, которые могут связывать селективно представленные или сверхэкспрессируемые рецепторы на поверхности

раковых клеток (Рисунок 2). Первая стратегия – нацеливание непосредственно на раковые клетки, сверхэкспрессирующие эпидермальные рецепторы клеточного роста, рецепторы фолиевой кислоты, трансферритина или гликопротеинов. Вторая – нацеливание на эндотелий опухоли, сверхэкспрессирующий факторы роста эндотелия сосудов (VEGF),  $\alpha V\beta 3$  интегрины, васкулярная молекула клеточной адгезии 1 (VCAM-1), матриксные металлопротеиназы (ММР). Такие модифицированные наночастицы интернализуются путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и обеспечивают более эффективную доставку наночастиц в клетки, чем EPR эффект.

На сегодняшний день ни один таргетный нанопрепарат не одобрен для применения на людях, до клинических испытаний дошли только около 10 препаратов (Таблица 1) [3].

**Таблица 1.** Адресные нанопрепараты, проходящие клинические испытания

Тип	Название	Лиганд	Мишень	Носитель	Нагрузка	Назначение	Фаза КИ	Ссылка
Антитела	Targo-miRs	Анти-EGFR биспецифичное антитело	EGFR	Minicell	miR-16 миметик микроРНК	НМРЛ ЗМП	I	[79]
Фрагменты антител	C225-ILs-DOX	Anti-EGFR Fab'	EGFR	Липосомы	DOX	Солидные опухоли	I	[5]
	MM-302	Anti-HER2 scFv	HER2	Липосомы	DOX	РМЖ	I	[80]
	SGT-53	Anti-TfR scFv	TfR	Липосомы	p53 плазида	Солидные опухоли	I	[81]
						Рак поджелудочной	II	[82]
	SGT-94	Anti-TfR scFv	TfR	Липосомы	RB94 плазида	РМПС	I	[83]
	Lipovaxin-MM	Anti-DC-SIGN VH	DC-SIGN	Липосомы	Антигены меланомы и IFN- $\gamma$	Меланома	I	[84]

**Таблица 1 – продолжение.** Адресные нанопрепараты, проходящие клинические испытания

Белки	MBP-426	Tf	TfR	Липосомы	Оксали- платин	Солидные опухоли	I	[6]
						Рак пищевода или желудка	I/II	[85]
	CALAA- 01	Tf	TfR	Полимер- ные НЧ	RRM2 миРНК	Солидные опухоли	I	[7]
Пептиды	2B3-101	GSH	GSH trans- porters	Липосомы	Доксо- рубицин	РМЖ	I/II	[8]
						Rexin-G	vWF- мотив	Колла- ген
						Саркома	I/II	[86]
						Рак подже- лудочной	I/II	[87]
Низкомоле- кулярные соединения	BIND-014	Лиганд ПСМА	ПСМА	ПМК-ПЭГ	Доцетаксел	Рак простаты, НМРЛ	II	[67]

### 1.3.1. HER2 рецептор

HER2 рецептор, или рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-2, является членом семейства рецепторных тирозинкиназ EGFR. EGFR содержат внеклеточный лиганд-связывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный тирозинкиназный домен. Гетеродимеризация HER2 с другими рецепторами семейства приводит к аутофосфорилированию остатков тирозина в цитоплазматическом домене и инициирует различные сигнальные пути, ведущие к клеточной пролиферации, ингибированию апоптоза и онкогенезу [87,88].

Сверхэкспрессия HER2 рецептора отмечается в 15-20% (по некоторым оценкам, до 30%) опухолей молочной железы. Высокий уровень экспрессии HER2 рецептора ассоциирован с высоким риском метастазирования, агрессивностью опухоли и плохим прогнозом для пациента. Изменение уровня экспрессии HER2 отмечается и в других типах опухолей, включая рак желудка, прямой кишки, желчевыводящих путей, мочевого пузыря и немелкоклеточный рак легких. Добавление трастузумаба к химиотерапии первой линии улучшило общую выживаемость пациентов с HER2-положительным раком желудка и стало стандартом лечения для этой группы пациентов [89].

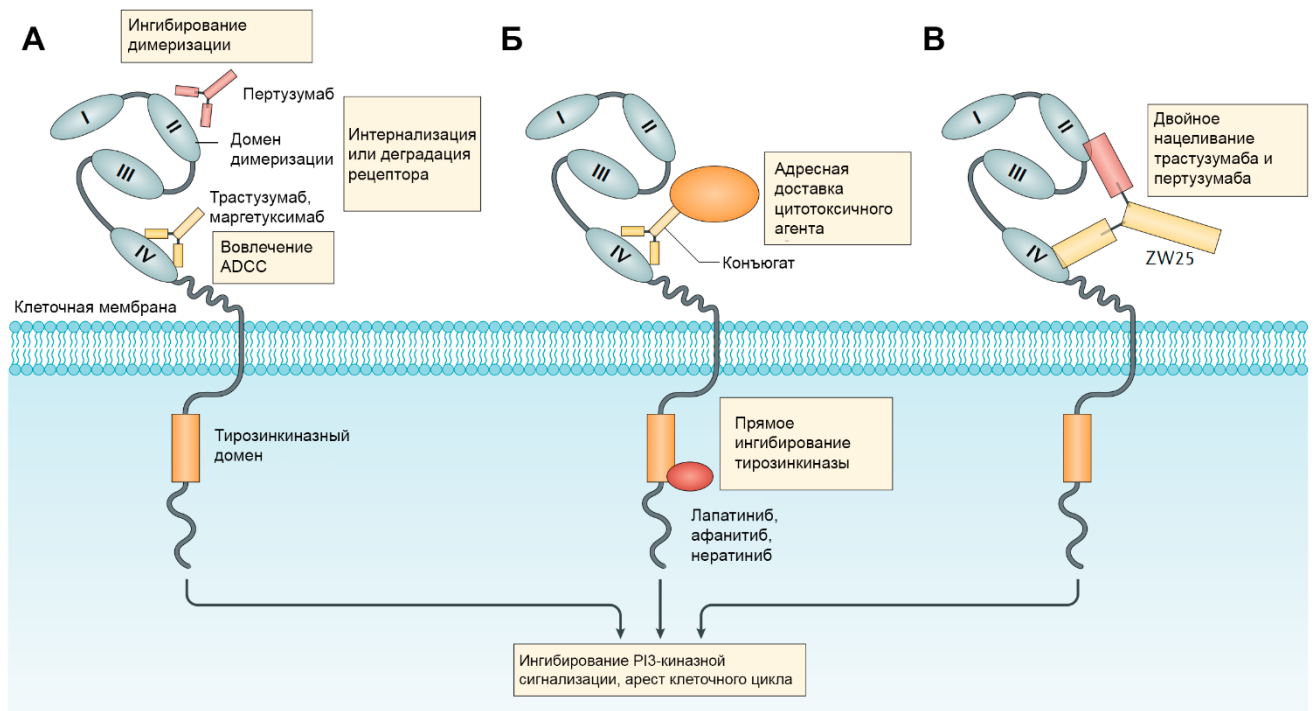
Трастузумаб, первое моноклональное антитело против HER2, разработанное в 1990 году и одобренное для применения на людях почти 25 лет назад, препятствует передаче сигналов HER2 посредством нескольких механизмов: ингибирование димеризации, интернализации и/или деградации рецептора, ингибирование сигнального пути PI3K-AKT и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) (Рисунок 3). Трастузумаб распознает IV внеклеточный субдомен рецептора HER2. Эффективность трастузумаба частично зависит от антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), опосредованной его Fc доменом. Моноклональное антитело пертузумаб связывается с внеклеточным субдоменом II, предотвращая гетеродимеризацию HER2 с HER1, HER3 и HER4 рецепторами, блокируя передачу сигналов (Рисунок 3). Новое моноклональное

антитело против HER2, маргетуксимаб, распознает тот же эпитоп, что и трастузумаб (IV), но имеет домен Fc, оптимизированный для увеличения сродства к активирующему рецептору Fcγ (CD16A) и снижения сродства к ингибирующему рецептору Fcγ (CD32B), экспрессируемому на иммунных эффекторных клетках, для более эффективной активации ADCC [90,91]

Сегодня различные препараты, включая моноклональные антитела и их конъюгаты и низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ (ИТК), одобрены для лечения HER2-положительного рака молочной железы. ИТК представляют собой небольшие молекулы, которые нацелены на внутриклеточный каталитический киназный домен HER2, конкурируя с АТФ, блокируя фосфорилирование и активацию сигнальных каскадов.

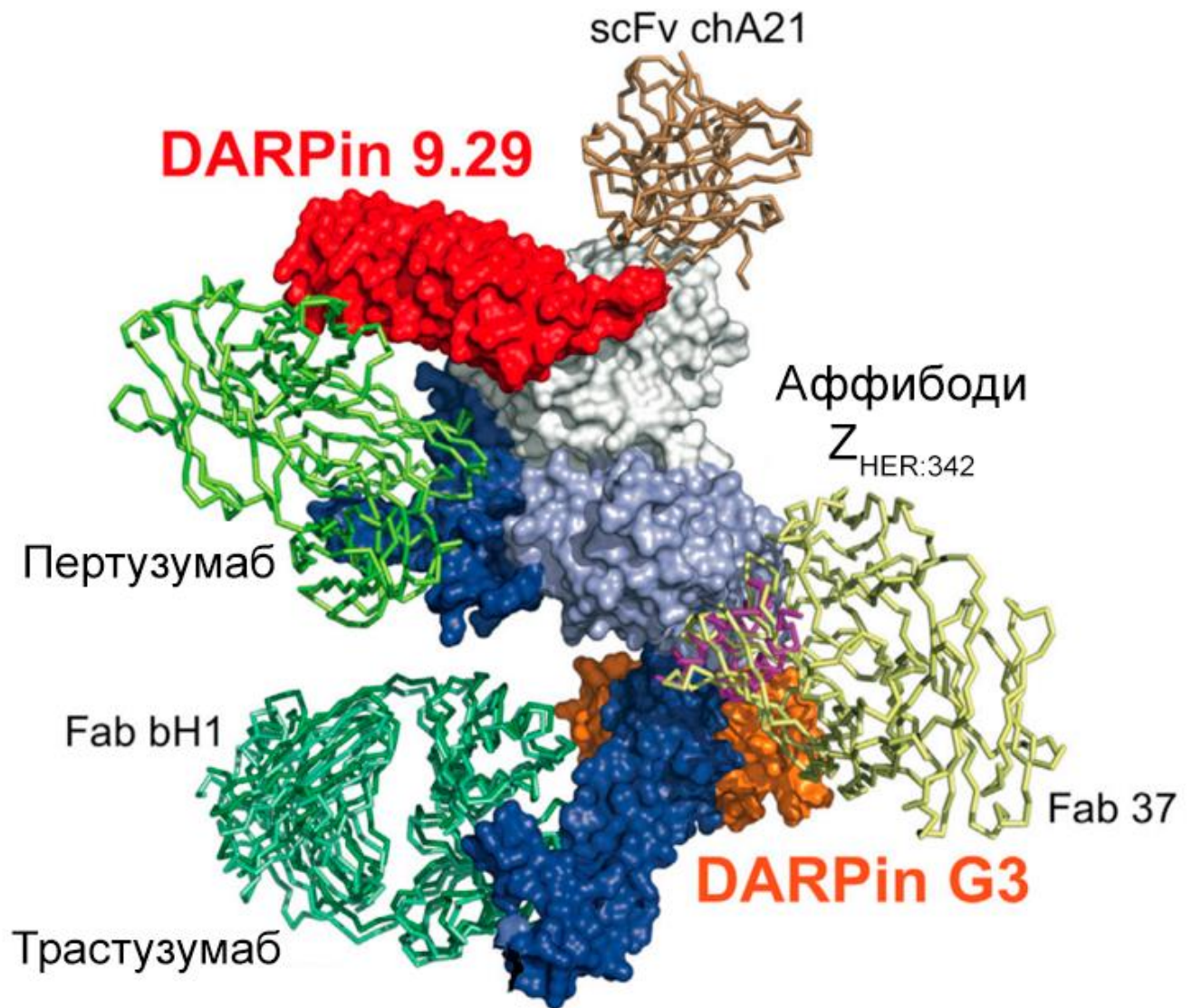
Опыт применения таргетных анти-HER2 препаратов привел к значительному увеличению продолжительности жизни пациентов. Новые конъюгаты антител и биспецифические антитела, нацеленные на HER2, а также таргетная терапия в сочетании с ингибированием иммунных контрольных точек находятся на стадии клинических испытаний.

Успехи таргетной терапии, направленной на HER2 рецептор, делают его перспективным кандидатом для нацеливания наночастиц. Распознавание различными белками разных участков внеклеточного домена HER2 рецептора открывает возможности для дизайна препаратов с наилучшим связыванием, а также для двойного нацеливания и поиска синергичных комбинаций (Рисунок 4).



**Рисунок 3.** Механизм действия агентов, нацеленных на HER2. А) Моноклональные антитела, такие как трастузумаб, маргетуксимаб и пертузумаб, связываются с одним из внеклеточных субдоменов HER2. Противоопухолевые эффекты этих препаратов опосредованы различными механизмами: ингибированием сигнальных путей, задействованием антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или, в случае пертузумаба, ингибированием димеризации рецепторов. Б) Конъюгаты антитело-лекарство (трастузумаб эмтанзин, трастузумаб дерукстекал и др.) также могут оказывать противоопухолевое действие по этим путям, хотя эти агенты также демонстрируют адресную цитотоксичность, высвобождая цитотоксический агент вблизи HER2-положительных опухолевых клеток. Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ связываются с внутриклеточным тирозинкиназным доменом HER2 и непосредственно ингибируют активацию пути PI3K. В) Биспецифические агенты, включая антитело ZW25, предназначены для воздействия более чем на одну внеклеточную область HER2. Адаптировано из [89]





**Рисунок 4.** Распознавание внеклеточного домена HER2 рецептора.  
Адаптировано из [92]

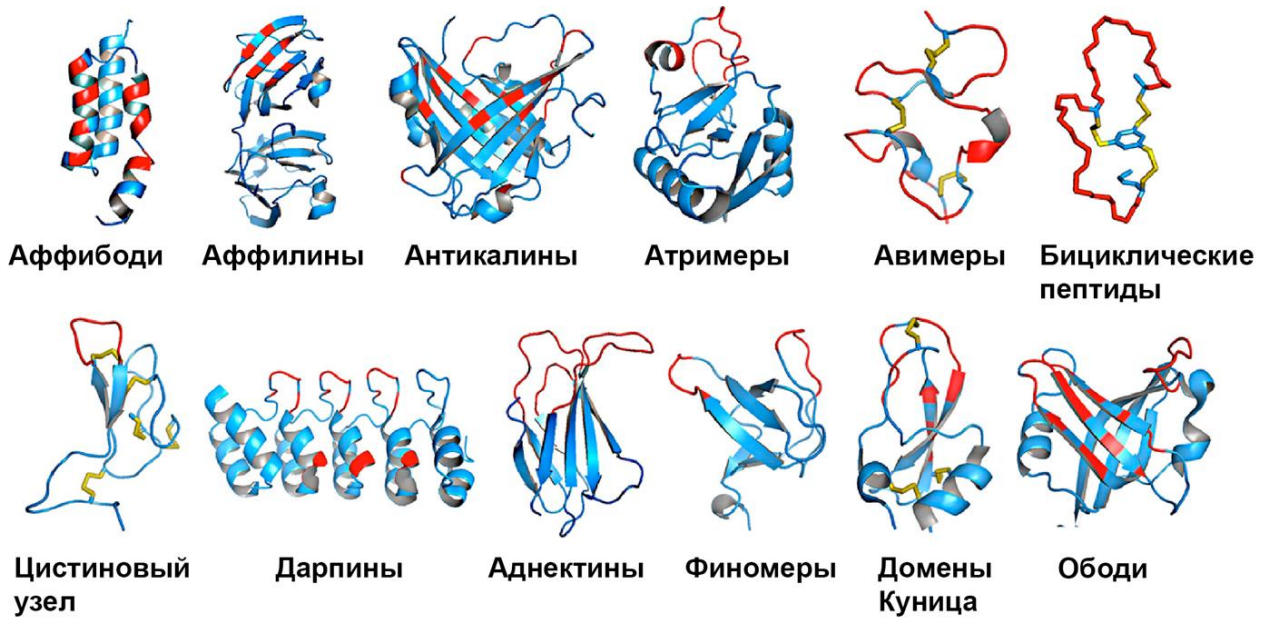
#### 1.4. Альтернативные аффинные каркасные белки

Современная медицина и биотехнология широко использует белки, связывающие различные лиганды. Большая часть исследований и практических применений связана с использованием моноклональных антител. Возможность получения высокоаффинных и специфичных антител сделало возможным современные иммунологические методы исследования, такие как иммуоферментный анализ, иммуногистохимия, вестерн-блоттинг, проточная цитометрия и разделение различных популяций клеток. В клинической практике

более 20 препаратов на основе моноклональных антител уже одобрены в Америке и Европе для терапии онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний, например трастузумаб против рака молочной железы, ритуксимаб против В-клеточных лимфом и ревматоидного артрита, инфликсимаб ревматоидного и псориатического артрита, болезни Крона и язвенного колита, паливизумаб для профилактики тяжелых инфекций нижних дыхательных путей, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом у детей. Десятки антител находятся на различных стадиях клинических испытаний [93].

Несмотря на повсеместное применение, антитела имеют ряд серьезных недостатков. Во-первых, константная часть антитела может вызывать нежелательную иммуногенность. Во-вторых, антитела имеют значительный размер (более 150 кДа), что затрудняет их проникновение в ткани. В-третьих, молекулы антител должны претерпеть ряд посттрансляционных модификаций, что вынуждает экспрессировать их в клетках млекопитающих, что делает их производство дорогим и сложным. Наконец, многие антитела требуют особых условий транспортировки и хранения и могут терять активность со временем [94].

Долгое время комбинаторные возможности иммунной системы оставались единственным способом создания белков, аффинных к различным лигандам. Однако развитие методов молекулярной и комбинаторной биологии, таких как полимеразная цепная реакция и геновая инженерия, фаговый, рибосомальный и дрожжевой дисплей, а также развитие компьютерной техники, сделавшее возможным рациональный дизайн биомолекул, позволили создавать связывающие белки не иммуноглобулиновой природы. Такие белки, часто называемые альтернативными скаффолдовыми (каркасными) белками, обладают рядом преимуществ, такие как малый размер, высокая стабильность и легкая экспрессия в бактериальных системах [10].



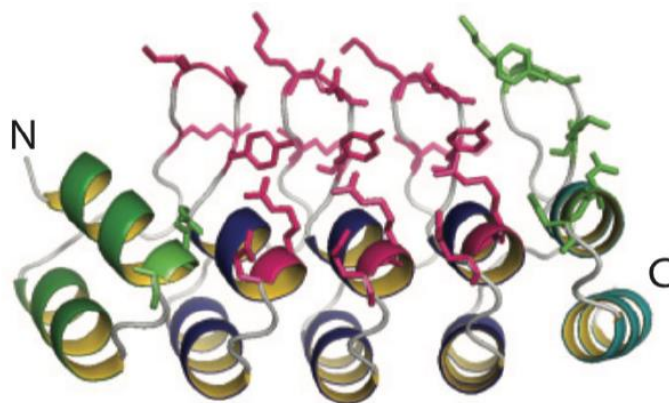
**Рисунок 5.** Структуры аффинных белков неиммуноглобулиновой природы. Адаптировано из [95]

Существует большое разнообразие каркасных белков, например, авимеры на основе А домена, аднектины (монободы) на основе 10 домена фибронектина III типа, антикалины на основе белков липокалинов, аффибоды на основе модифицированного В домена стафилококкового белка А, дарпины, содержащие анкириновые повторы, домен типа ингибитора Кунитца на основе АРРІ (ингибитора предшественника бета-амилоидного белка), тетранектин на основе лектиновый домен С-типа, PDZ-домен на основе RAS-связывающего белка AF-6 (Рисунок 5). Общий принцип создания таких белков – использование белка-каркаса, в природе распознающего определенные лиганды, определение аминокислот, отвечающих за структуру или связывание, создание комбинаторной библиотеки путем рандомизации распознающих аминокислот и отбор белков с наибольшей аффинностью методами фагового, рибосомального или клеточного дисплея [10,11].

### 1.4.1. Дарпины

Дарпины (DARPs, Designed Ankyrin Repeat Proteins) – класс направляющих белковых молекул неиммуноглобулиновой природы, содержащих анкириновые повторы. Дарпины построены из плотно упакованных повторов. Каждый анкириновый повтор имеет размер около 33 аминокислот и образует структурную единицу, состоящую из  $\beta$ -поворота, за которым следуют две антипараллельные  $\alpha$ -спирали. Большинство дарпинов обычно состоит из четырех-шести повторов, что приводит к образованию правосторонней соленоидной структуры с непрерывным гидрофобным ядром и большой, доступной для растворителя поверхностью. При этом связывающая поверхность становится похожей на бороздку (Рисунок 6). При создании библиотек остатки, формирующие каркас, оставляют консервативными, а участвующие в связывании рандомизируют, избегая остатков цистеина, пролина и глицина для сохранения структуры. Первый и последний повтор консервативны и оптимизированы для создания гидрофобных «кэпов». При помощи рибосомального дисплея были отобраны дарпины с константами связывания различных мишеней до пикомолярных концентраций белка. Отбор дарпинов методом фагового дисплея затруднён высокой скоростью фолдинга дарпинов, что снижало количество белка, представленного на поверхности фага. Проблема была решена присоединением SRP-зависимых сигнальных последовательностей к дарпинам, и таким образом были получены белки с константами аффинности в субнанолярном диапазоне. Дарпины к ряду лигандов были отобраны методом дрожжевого дисплея и методом комплементации фрагментов дигидрофолатредуктазы в цитоплазме [96].

Большинство дарпинов демонстрируют высокую термодинамическую стабильность, устойчивость к действию протеаз и денатурирующих веществ и могут экспрессироваться в бактериальных клетках с высоким выходом в растворимой форме, так как не нуждаются в посттрансляционных модификациях и не имеют дисульфидных связей [97].



**Рисунок 6.** Структура дарпина (DARPin, Designed Ankyrin Repeat Protein) – белка, содержащего анкириновые повторы. Адаптировано из [97]

Дарпины могут быть использованы для диагностики, например в иммуногистохимии, показывая сравнимую чувствительность, но большую специфичность, чем моноклональные антитела. Дарпины могут выступать в качестве самостоятельного терапевтического агента. Был получен ряд конструкций, связывающие различные эпитопы онкомаркера HER2. В наиболее эффективных конструкциях, где дарпин, связывающий внеклеточный домен I рецептора HER2, был объединен с дарпином, связывающим домен IV, при помощи очень короткого линкера, превосходили по цитотоксичности HER2-сверхэкспрессирующих клеток терапевтическое антитело трастузумаб [98].

Были получены конструкции слияния дарпинов к различным онкомаркерам с токсинами. Так, например, был получен белок слияния дарпина, связывающего молекулы клеточной адгезии эпителия (EрСАМ), с фрагментом экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) и экспрессирован в растворимой форме в цитоплазме *E. Coli*. Белок DARPin-ETA показал высокую цитотоксичность в отношении различных ЕрСАМ-положительных линий опухолевых клеток со значениями IC50 менее 0,005 пМ, а при системном введении мышам с привитыми опухолями показывал значительную противоопухолевую активность и вызывал у некоторых мышей полную регрессию опухолей [99].

По этому принципу были созданы и адресные токсины, нацеленные на рецептор эпидермального клеточного роста HER2. Белок DARPin-PE40, созданный на основе DARPin 9\_29 с фрагментом экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*, показал специфичную цитотоксичность *in vitro* в пикомолярных концентрациях и подавлял рост ксенографтных опухолей в мышах *in vivo* [100]. Проблема высокой иммуногенности псевдомонадного токсина была решена созданием белка LoPE путем внесения мутаций и удаления части эпитопов PE40. DARPin-LoPE при меньших побочных эффектах, системной токсичности и иммуногенности показал противоопухолевую активность *in vitro* (в пикомолярном диапазоне концентраций) *и in vivo* [101].

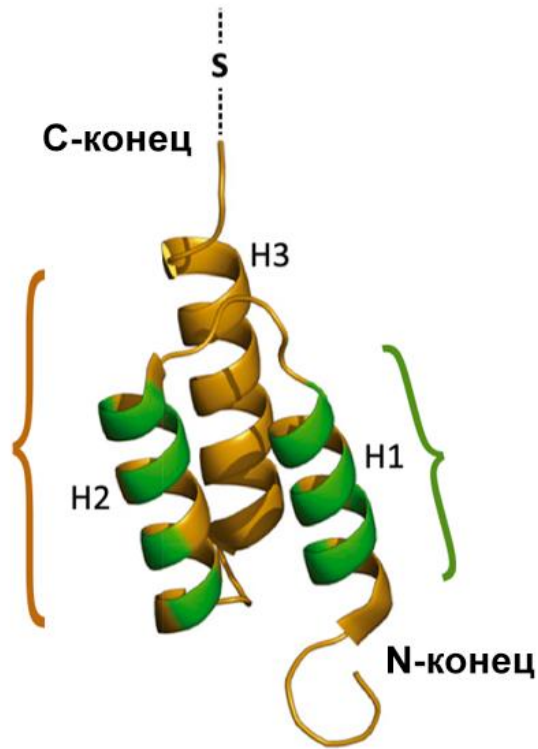
Дарпины могут быть использованы и как направляющие агенты для адресной доставки наночастиц. Для фототермической терапии HER2-положительных раковых клеток были синтезированы золотые наностержни, модифицированные дарпином 9\_29. Облучение светом длиной волны 850 нм приводило к нагреванию и гибели клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 [102]. Были получены липосомы, нагруженные фрагментом псевдомонадного экзотоксина А PE40. Поверхность липосом была модифицирована дарпином 9\_29. Липосомы использовали для направленного воздействия на клетки SK-BR-3 и SK-OV-3 со сверхэкспрессией HER2. Было показано, что полученные липосомы специфически связывают и убивают в субнанолярных концентрациях HER2-положительные клетки [103].

Таким образом, дарпины могут использоваться как эффективные терапевтические и диагностические агенты, не уступая антителам в эффективности и превосходя их по параметрам стабильности и легкости получения.

#### **1.4.2. Аффибоди**

Аффибоди – это класс универсальных аффинных белков, не иммуноглобулиновой природы, созданных с помощью комбинаторной белковой инженерии. Небольшой размер (от 6,5 кДа), отсутствие дисульфидных мостиков и

высокая стабильность делают их привлекательными для множества медицинских приложений, включая терапию и визуализацию опухолей, а также биохимические тесты, в которых традиционно используют антитела.



**Рисунок 7.** Структура белка аффибоди. Трехспиральная структура не содержит цистеинов. Зеленым отмечены вариабельные участки. N- и C-концевые участки доступны для модификации. Адаптировано из [9].

Первые аффибоди были получены 25 лет назад, и с тех пор опубликовано более четырех сотен исследований и разработано более 40 белков, аффинных к различным лигандам. Аффибоди первоначально сконструированы на основе В-домена в иммуноглобулинсвязывающей области стафилококкового белка А [104,105]. В-домен представляет собой относительно небольшой пептид из 58, свернутый пучок из трех  $\alpha$ -спиралей (Рисунок 7). Изучению В-домена способствовали его высокая растворимость и термостабильность. Методом внесения мутаций в ключевых положениях пептида был сконструирован так

называемый Z-домен, который отличался высокой химической стабильностью, сохранял сродство к Fc-части антитела, но утратил слабое сродство к Fab-области [106]. На основе каркаса Z-домена был создан ряд белков, связывающих разные лиганды (например, инсулин, фибриноген, трансферрин, фактор некроза опухоли- $\alpha$ , IL-8, CD28, человеческий сывороточный альбумин, IgA, IgE, IgM, HER2 и EGFR) с аффинностью ( $K_D$ ) в диапазоне от мкМ до пМ, которые и получили название аффибоди [107].

Создание белков-скаффолдов неиммуноглобулиновой природы выполняется с использованием синтетических комбинаторных библиотек и систем отбора *in vitro*. Большие «наивные» библиотеки аффинных молекул обычно конструируются путем комбинаторной рандомизации 13 аминокислотных положений в первой и второй спиральях трехспирального каркаса Z-домена, не содержащего цистеинов. Селекцию белков можно проводить с использованием любой подходящей технологии, включая фаговый, клеточный, рибосомальный или мРНК дисплей. Для повышения специфичности связывания применяют направленный мутагенез и перестановку спиралей в пучке. Выбранные варианты могут экспрессироваться в разных системах (например, бактериях, дрожжах, клетках млекопитающих или насекомых) в различных рекомбинантных конструкциях. Добавление единственного цистеина (например, в N- или C-конец) позволяет осуществлять сайтспецифическое мечение и конъюгацию с функционализирующими группами (например, флуорофорами, биотином, хелаторами радионуклидов или цитотоксическими лекарственными средствами) с использованием тиольной химии [9].

Благодаря небольшому размеру, аффибоди могут быть получены не только биотехнологически, но и методами пептидного синтеза, что облегчает введение изотопных меток, флуоресцентных зондов или хелатирующих групп. Кроме того, при включении в состав гибридных белков аффибоди практически не изменяют их размер и свойства [108], при этом сохраняя общий размер белка.



## Аффибоди для визуализации

Применение конъюгатов антител для контрастирования ограничено большим размером антитела и его фармакокинетикой. Время циркуляции антитела в кровотоке не позволяет получать контрастные изображения и использовать короткоживущие изотопы, при этом связано с длительным нахождением токсичной или радиоактивной метки в организме. Исследования на крысах и мышах показали, что аффибоди могут связывать клетки-мишени в течение первых часов после введения, что позволяет визуализировать опухоли на ксенографтных моделях уже через 30-60 минут после инъекции. При этом быстрая фармакокинетика *in vivo* делает молекулы аффибоди совместимыми как с очень короткоживущими позитрон-излучающими изотопами, такими как  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2}$  110 мин) или  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}$  68 мин), так и с гамма-излучающими изотопами с более длительным периодом полураспада для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), такими как  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $t_{1/2}$  6 часов) или  $^{111}\text{In}$  ( $t_{1/2}$  2,8 дня) [109].

Были проведены испытания на 3 пациентках с метастазирующим раком молочной железы. Пациентки получали конъюгат аффибоди, нацеленного на рецептор эпидермального клеточного роста HER2, и DOTA (1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7, 10-тетрауксусной кислоты), хелатирующей  $^{111}\text{In}$  или  $^{68}\text{Ga}$ . Изображения ОФЭКТ или ПЭТ/КТ сравнивались с более ранними результатами ПЭТ/КТ, контрастированных  $^{18}\text{F}$ -фтордэзоксиглюкозой. Была исследована кинетика препарата, а также показано, что конструкции на основе аффибоди могут быть использованы для визуализации метастазов, не доступных для биопсии, а также для определения представленности рецептора HER2 на поверхности опухоли [110].

Аффибоди АВУ-025, модифицированные  $^{111}\text{In}$  [111] или  $^{68}\text{G}$  [112], прошли ряд испытаний на людях и применяются в центре ПЭТ при Университетской больнице Упсалы для визуализации опухоли, метастазов и определения онкомаркеров на поверхности опухоли.

Для ПЭТ-визуализации молекулы аффибоди были конъюгированы с изотопами различных элементов, например с  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  и  $^{64}\text{Cu}$ . Конструкции показали эффективное контрастирование при визуализации ксенографтных моделей опухолей в мышцах [112,113].

Ряд исследований посвящен созданию и доклиническим испытаниям конструкций на основе аффибоди для флуоресцентной и магнитной томографии. Например, была показана возможность визуализации опухоли, вызванной вирусом папилломы человека. Аффибоди, связывающий вирус, был конъюгирован с красителем Dylight755. Высококонтрастное изображение опухоли было получено уже через 30 мин после введения [114]. Конъюгат аффибоди, связывающего EGFR, с БИК флуорофором (CN1055) был использован для визуализации плоскоклеточного рака человека [115], конъюгаты квантовых точек и аффибоди – для визуализации рака лёгкого [116]. Группа работ посвящена флуоресцентной и магнитной визуализации HER2-положительных [117,118], а также их комбинации с ПЭТ [119,120].

Небольшой размер, эффективное проникновение в опухоль и быстрая кинетика позволяют использовать аффибоди не только для диагностики, но и при сопровождении хирургических операций. На крысах было показано эффективное окрашивание глиомы при интраназальном введении, что говорит о проникновении аффибоди через гематоэнцефалический барьер [121]. Меченное инфракрасный красителем аффибоди АВУ-029 допущено до клинических испытаний при операциях на EGFR-положительных опухолях [9].

### **Аффибоди для терапии**

Аффибоди, как и антитела, могут выступать как самостоятельный терапевтический агент, связывая лиганды и блокируя белок-белковые взаимодействия, а также быть носителем для адресной доставки активных

соединений (например, токсинов, радионуклидов или химиотерапевтических соединений).

Было показано, что аффибоди, связывающий рецептор клеточного роста HER3, может конкурировать с лигандом HER3 нейрегулином, подавляя индуцированное нейрегулином фосфорилирование HER3, что приводило к ингибированию роста индуцированных нейрегулином раковых клеток *in vitro* [122], а в составе конъюгата с  $^{111}\text{In}$ -DOTA белок специфически накапливался в ксенографтных опухолях мышей и замедлял рост опухоли [123].

Были созданы конструкции, связывающие 2 разных участка одного рецептора фактора роста 2 эндотелия сосудов человека (VEGFR2), которые показали сродство к VEGFR2 более чем на два порядка величины выше, чем любая из его отдельных составляющих аффинных молекул, а также ингибировали лиганд-индуцированное фосфорилирование VEGFR2 и образование сосудов *in vitro* [124].

Биспецифичное аффибоди АВ-035 (изокибеп) шведской компании Affibody, связывающее интерлейкин 17 и альбумин, находится на второй стадии клинических испытаний как агент для терапии псориаза и псориатического артрита, а также допущено FDA до второй стадии испытаний терапии хронического неинфекционного уевита и анкилозирующего спондилоартрита. Клинические испытания аффибоди АВУ-039 (Alexion), нацеленного на неонатальный Fc рецептор, были остановлены после первой стадии из-за данных о переносимости препарата, однако АВУ-039 показал снижения титра антител в сыворотке испытуемых [9].

Небольшие размеры и отсутствие дисульфидных мостиков делают аффибоди перспективными для связывания внутриклеточных мишеней. Молекулы аффибоди могут быть доставлены в клетку как путем слияния с проникающим в клетку пептидом, так и с помощью плазмиды. Например, при введении в клетки линии МН7А, стимулированных TNF- $\alpha$ , аффибоди против H-Ras и Raf-1 ингибировали продукцию IL-6 и PGE2, а также пролиферацию клеток [125].

Для возможной терапии болезни Альцгеймера был создан аффибоди с аффинностью связывания бета-амилоидного пептида 17 нМ, который показал ингибирование образования амилоидных агрегатов у плодовых мушек [126,127]. Модифицированная молекула аффибоди с улучшенной константой связывания 300 пМ показала значительное снижение амилоидной нагрузки в мозге трансгенных мышей при внутривенном введении [128].

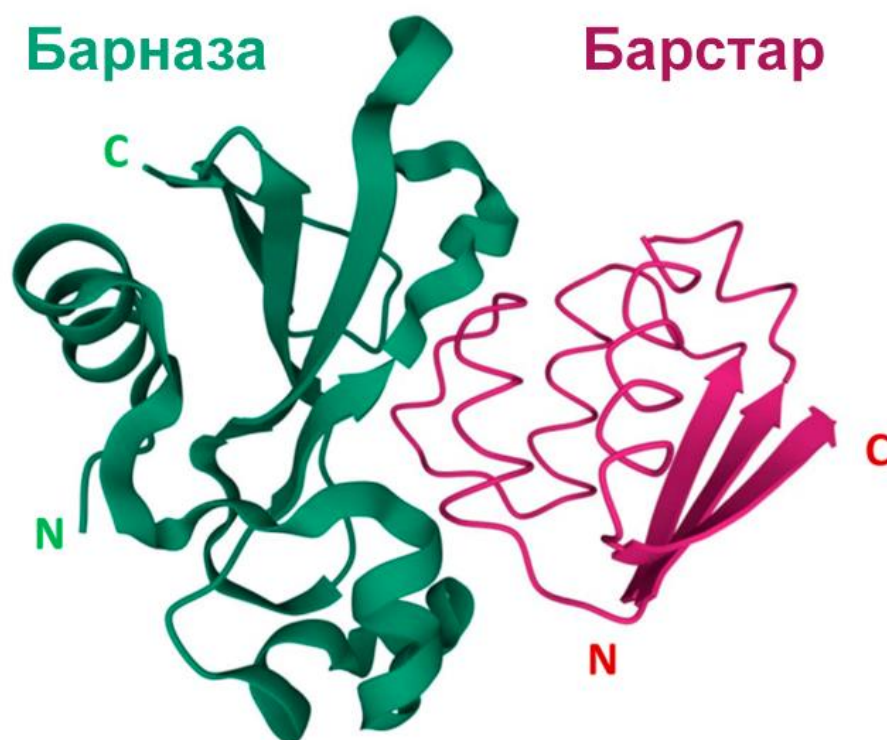
Для терапии аффибоди могут быть использованы в качестве носителя полезной нагрузки (токсина, радиоактивного изотопа и др.). Так, были получены белки слияния Аффибоди ZHER2:342 и усеченной версии псевдомонадного экзотоксина токсина PE38. Было показано специфичное связывание белка с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор HER2, также специфичное цитотоксическое действие. Для мышей 250 мкг/кг (5 мкг/мышь) белка («Аффитоксина»), введенного три или шесть раз, было достаточно для уничтожения крупных ксенотрансплантатов рака груди [129].

Также было продемонстрировано создание терапевтических конструкций на основе аффибоди и радионуклидов.  $^{90}\text{Y}$  или  $^{177}\text{Lu}$  были связаны с аффибоди Z<sub>HER2:342</sub> через хелатный лиганд DOTA. Было показано, что комплексы сохраняют специфичность связывания опухолевых клеток и благоприятный профиль биораспределения у мышей, не несущих опухоль [130]. Были получены направленные агенты фотодинамической терапии путем конъюгации аффибоди и фотосенсибилизирующего флуоресцентного красителя IR780 [131].

### 1.5. Белковая пара барназа-барстар для создания самособирающихся многофункциональных наноконструкций

Барназа (12 кДа) – бактериальная рибонуклеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*.

Наиболее интересным представляется применение барназы в паре с ее ингибитором барстаром для создания модульных многофункциональных конструкций. Барстар – небольшой (89 аминокислот) белок, который в *Bacillus amyloliquefaciens* служит для защиты клетки-хозяина от разрушительного действия барназы (Рисунок 8). Пара барназа-барстар образует комплекс с чрезвычайно высокой аффинностью  $K_D \sim 10^{-14}$  М [132–134], сопоставимой только с аффинностью пары биотина и стрептавидина  $K_D \sim 10^{-15}$  М [135].



**Рисунок 8.** Белковая пара барназа (изумрудный) и барстар (розовый).

При этом система барназа-барстар обладает рядом уникальных преимуществ. Во-первых, оба белка могут быть легко получены биотехнологически в клетках прокариот, поскольку они не требуют посттрансляционных модификаций, разделения олигомеров и не содержат дисульфидных связей. Во-вторых, участки

связывания в этих белках удалены и от С-, и от N-концов, поэтому оба конца этих белков доступны для слияния. В-третьих, барназа и барстар растворимы в воде и стабильны в широком диапазоне температур и значений рН и устойчивы к действию протеаз [136,137]. Таким образом, барназа и барстар могут быть адаптерами для сборки многофункциональных конструкций для биологии (Рисунок 9).

При помощи конструктора барназа-барстар показана возможность создания мультимерных комплексов активных молекул. Были получены белки слияния барназы и барстара с мини-антителом 4D5-scFV, связывающим рецептор HER2 на поверхности раковых клеток. Были описаны получение, очистка и свойства двух- и трехвалентных конструкций. С использованием гибкого пептидного линкера (EFPKPSTPPGSSGGAP) мини-антитело 4D5-scFV было слито с N-концом барназы и барстара. Также была получена конструкция 4D5-scFV-дибарназа, в которой две единицы барназы слиты голова к хвосту без линкера.

Было продемонстрировано значительное повышение avidности разработанных мультивалентных конструкций с рецептором HER2. Было показано их адресное связывание с раковыми клетками и изучено биораспределение полученных белков *in vivo* [138].

Для визуализации HER2-положительных раковых клеток был создан белок слияния EGFP-барназа. Для связывания с HER2 рецептором на поверхности клеток использовали 4D5-scFV-барстар, после отмывки его избытка производили окрашивание EGFP-барназой. Методом флуоресцентной микроскопии было показано специфичное связывание конструкций с поверхностью только HER2-положительных раковых клеток. Несомненным преимуществом использования модуля барназа-барстар является возможность варьировать распознающий и эффекторный модуль для терапии и диагностики опухолей с различными онкомаркерами на поверхности [139].

Предложена новая система иммуноцитохимической визуализации на основе золотых наночастиц (AuNP), мини-антитела к рецептору HER2 (scFv-4D5) и пары барназа-барстар. 4D5-scFV-дибарназа и конъюгат барстар-AuNP использовались для изучения распределения рецептора HER2 внутри и на поверхности разных типов клеток. После инкубации с конструкцией клетки фиксировали и исследовали методами флуоресцентной, лазерной конфокальной и электронной микроскопии. Было показано, что рецептор HER2 распределен на поверхности клеток неравномерно, преимущественно на выростах мембраны. При температуре 37 °C комплекс рецептора с 4D5-scFV-дибарназой интернализуется через везикулы и окаймленные ямки и концентрируется в эндосомах и мультивезикулярных тельцах.

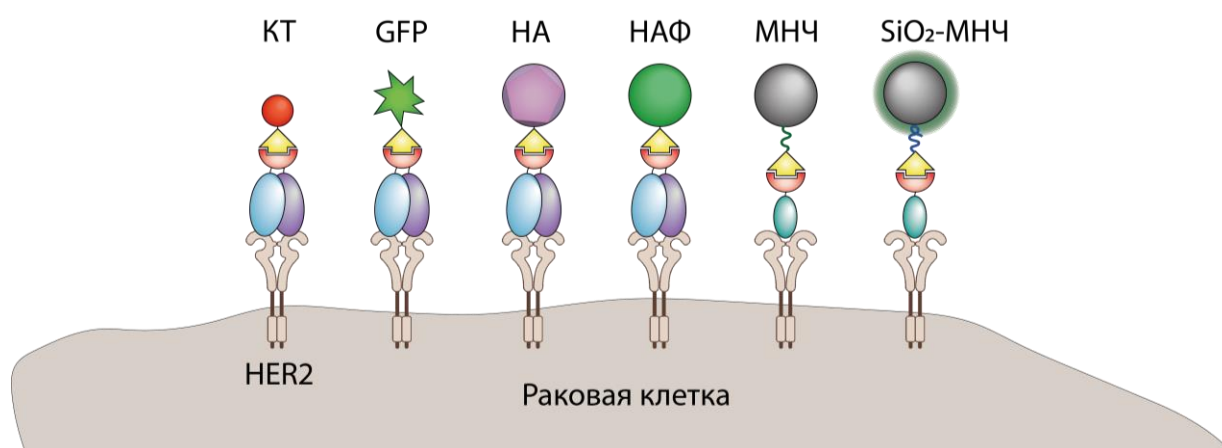
На основе модуля барназа-барстар получена конструкция для доставки экзогенного белка теплового шока 70 кДа (HSP70) к раковым клеткам. Для ряда раковых клеток отмечается транслокация внутриклеточного белка теплового шока 70 кДа (HSP70) на поверхность плазматической мембраны, где он может распознаваться иммунными клетками, в частности НК-клетками, и усиливать их цитолитическое действие на данные клетки-мишени. Привлечение на поверхность клеток дополнительных белков HSP70 и последующая активация цитотоксических эффекторов иммунной системы рассматривается как новое направление иммунотерапии опухолей. К N-концу HSP70 с помощью гибкого линкерного пептида IgG3 человека (ThrProLeuGlyAspThrThrHisThrSerGly) присоединили барстар. Аналогично была получена конструкция с активным C-концевым фрагментом (16кДа) HSP70/16. В качестве направляющего модуля работе использовался белок слияния 4D5-scFV-дибарназа. Методом проточной цитофлуориметрии было показано специфичное связывание конструкций со сверхэкспрессирующими рецептор HER2 клетками. Методом лазерной конфокальной микроскопии было подтверждено присутствие Hsp70 и Hsp70/16 на поверхности клеток-мишеней. *In vitro* было оценено взаимодействие раковых клеток с НК-клетками. Доставка Hsp70 к клеткам-мишеням приводила к 5-

кратному усилению, так и Hsp70/16 к 4-кратному усилению цитолитического действия НК-клеток [140].

Модульную систему барназа-барстар можно использовать для создания не только противораковых, но и для инновационных антибактериальных агентов. Были созданы белки слияния фрагмента эндолизина К из бактериофага золотистого стафилококка с барназой (СНАР-барназа) и фрагмента SH3b экзолизина лизостафина из *S. simulans* с барстаром (SH3b-барстар). При образовании пары барназа-барстар был получен функциональный лизин, демонстрирующий одновременно связывание с клеточной стенкой бактерий и стафилолитическую активность. Полученные конструкции могут быть использованы для борьбы с резистентными микроорганизмами [141].

Также модуль барназы-барстар использовался для создания гетеродимерных вакцин. Для нацеливания вакцины на антигенпрезентирующие клетки барназа и барстар с N-конца были слиты с фрагментом антитела, связывающими ГКГС класса II. К C-концу были присоединены антигены вакцины: флуоресцентный белок mCherry и фрагмент scFv315 моноклонального антитела, продуцируемого В-клеточной плазмоцитомой мышей МОРС315. *In vitro* была показана возможность секреции гетеродимеров с функциональными и доступными антигенами и участками связывания в клетках НЕК293. ДНК-вакцинация мышей этими парами слитых генов вызывала более высокий IgG1 иммунный ответ по сравнению с вакцинацией ненацеленными конструкциями [142,143].





**Рисунок 9.** Модульные конструкции на основе пары барназа-барстар. КТ – квантовые точки, GFP – зеленый флуоресцентный белок, НА – флуоресцентные наноалмазы, НАФ – апконвертирующие наночастицы, МНЧ – магнитные наночастицы, С-Mmsб – магнетит-связывающий белок SBP—SiO<sub>2</sub>-связывающий белок

Классические методы модификации наночастиц – физическая сорбция и химическая конъюгация – обладают рядом недостатков: невозможностью контролировать пространственную ориентацию и доступность биомолекул, снижением активности компонентов, низкой воспроизводимостью. Использование модульных белковых конструкций позволяет эффективно и контролируемо собирать надмолекулярные комплексы. Сборка таких конструкций не требует сложного оборудования и реагентов, и поэтому может быть применена в клинической или лабораторно-диагностической практике. Функциональные элементы могут быть собраны не только в лаборатории с высокотехнологичным оборудованием, но и просто соединены в пробирке или могут самособираться внутри организма при последовательном введении.

Барназа и барстар могут выступать в роли «молекулярного клея» для сборки супрамолекулярных конструкций. В ряде работ показано успешное создание таких наноконструкций. Как правило, один из белков пары барназа-барстар присоединяется к поверхности наночастицы методом химической конъюгации. На основе второго белка из пары и целевой молекулы, например, мини-антитела,

методами генной инженерии создается химерный белок. Финальная модификация частиц происходит простым объединением компонентов конструкции в пробирке. Белковый линкер барназа-барстар позволяет присоединить ровно 1 молекулу целевого белка к каждой молекуле линкера на поверхности.

Была показана возможность сборки не только белков, но и нано- и микроразмерных объектов при помощи пары барназа-барстар. Флуоресцентные частицы присоединяли к поверхности магнитных частиц. Было показано, что связь барназа-барстар достаточно сильная, чтобы удерживать между собой крупные частицы [144]. С использованием белка, в котором к С- и N-концам барназы присоединяли 2 молекулы мини-антитела scFv4D, были получены адресные гибридные магнитно-флуоресцентные структуры для флуоресцентной визуализации и магнитной сепарации эукариотических клеток. Была показана стабильность комплексов наночастиц при нагревании, высоких концентрациях гуанидина, мочевины и хлорида натрия, низких значениях pH [145]. Универсальность модуля барназа-барстар позволяет создавать множество комбинаций элементов с необходимыми свойствами.

Модификация наночастиц с использованием «молекулярного клея» была предложена и для люминесцентных наноалмазов (LND). Барстар присоединяли к поверхности частиц методом химической конъюгации. В отличие от немодифицированных наноалмазов, полученные частицы были стабильны в буферных растворах в течение нескольких месяцев. Для демонстрации универсальности модели барназа была соединена с зеленым флуоресцентным белком (EGFP) или золотыми наночастицами. Была показана возможность простой сборки конструкций в пробирке. Полученные конструкции были визуализированы методами конфокальной и электронной просвечивающей микроскопии [146].

Для диагностики рака молочной железы предложено использование апконвертирующих наночастиц с антистоксовой люминесценцией (UCNP). Частицы были стабилизированы амфифильным полимером. Специфичность

связывания конструкций с раковыми клетками обеспечивали мини-антитела scFv4D5 через линкер барназа-барстар. Диагностика рака молочной железы при помощи эпифлуоресцентной микроскопии была экспериментально смоделирована с помощью оптического фантома – монослоя клеток SK-BR-3, меченных UCNP, скрытых под тканью молочной железы. Полученные в работе наноконструкции позволили детектировать раковые клетки на глубине до 4 мм с 10-кратной контрастностью по сравнению с контрольными [147].

При помощи системы барназа-барстар были получены комплексы на основе квантовых точек и мини-антител к рецепторам HER1 и HER2 на поверхности раковых клеток. *In vitro* была показана универсальность системы на примере специфичного флуоресцентного мечения линий клеток со сверхэкспрессией одного из рецепторов [148]. Была продемонстрирована возможность доставки квантовых точек к раковым клеткам *in vivo* в ксенографтной модели опухоли молочной железы человека у иммунодефицитных мышей. Было показано значительно большее накопление в опухоли частиц, модифицированных мини-антителом к рецептору HER2 через линкер барназа-барстар, по сравнению с неадресными частицами [149].

Применение пептидов, связывающих твердую фазу (например, поверхность наночастиц), позволяет полностью избежать химической конъюгации. Была предложена универсальная платформа для модификации наночастиц направляющими агентами без необходимости химической конъюгации на основе связывающего поверхность частиц пептида и пары барназа-барстар [150]. Например, впервые эффективность системы была продемонстрирована с пептидом, связывающим диоксид кремния, на примере доставки SiO<sub>2</sub> частиц к клеткам с разной экспрессией рецептора HER2. С барстаром получали белок слияния с пептидами, специфично связывающими твердую фазу (SBP). С барназой были получены комплексы со связывающими рецептор HER2 мини-антителом и 4D5scFv и направляющим белком неиммуноглобулиновой природы DARPin9.29.

Было показано, что наноконструкции (NP\*SBP-Bs\*Bn-4D5scFv/DARPin9.29) успешно собираются в пробирке и специфично связываются с раковыми клетками со сверхэкспрессией рецептора HER2, также могут самособираться на поверхности клеток.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США: IR-780 йодид, Nile Blue А перхлорат (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США),

Sigma, Дармштадт, Германия: Поли(D,L-лактид-когликолид) (RG 858 S, Poly(D,L-lactide-co-glycolide) ester terminated, lactide:glycolide 85:15, Mw 190,000–240,000 Da),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , канамицин, Трис-буфер, EDC (гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  и ДМСО (диметилсульфоксид);

Sigma, Штайнхайм, Германия PVA (Mowiol 4-88), хитозан олигосахарид лактат (5 кДа),

Панеко, Москва, Россия: 2 mM L- глутамин, раствор Версена, пенициллин-стрептомицин;

Gibco, Пейсли, Великобритания: DMEM/F12 с добавлением 2 mM L-аланил-L-глутамина, Hoeschst33342 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США);

ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия: кристаллический фиолетовый, NuClone, Логан, Юта, США: фетальная бычья сыворотка;

AlfaAesar, Ланкашир, Великобритания: резазурина натриевая соль;

PanReac, Барселона, Испания: глицерин, триптон, акриламид, имидазол и нитрат серебра;

Serva, Гейдельберг, Германия: персульфат аммония, SDS (лаурилсульфат натрия), МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид); Molekula Ltd., Дарлингтон, Великобритания: TEMED (тетраметилэтилендиамин), трицин и DTT (дитиотриол);

Gerbu, Гейдельберг, Германия: дрожжевой экстракт для микробиологии; AppliChem, Дармштадт, Германия: хлорид натрия;

Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США: Кумасси синий G-250, набор для ВСА-теста, сульфо-NHS (сульфо-N-гидроксисукцинимид), CM-H<sub>2</sub>DCFDA, карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA, Hoechst33342, DyLight650-NHS-эфир и ФИТЦ (флуоресцеина изотиоцианат);

Biovetra, Ивановице-на-Хане, Чехия: Рометар;

Virbac, Каррос, Франция: Золетил 100;

Corning Life Sciences, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, США: Matrigel;

Promega, США: фуримазин;

Biopharma PEG Scientific Inc., Уотертаун, Массачусетс, США: мПЭГ-силан-СООН (5 кДа).

## 2.2. Буферные растворы

Натрий-фосфатный буфер PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,77 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,7 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, pH 7,4)

Фосфатный буфер P (3,2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16,8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, pH= 7,4)

Боратный буфер (0,4 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 70 мМ Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, pH 8,0)

Буфер MES (0,1 М MES, pH 5,0)

Буфер ТВ для получения компетентных клеток (10 мМ HEPES, 55 мМ MnCl<sub>2</sub>, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl)

## 2.3. Растворы для электрофореза

### 1. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэммли

#### Разделяющий гель

15% акриламид /0,4% бис-акриламид, 0,05% персульфат аммония и 0,001% TEMED, 0,375 М Tris, 0,1% SDS, pH 8,8

#### Концентрирующий гель

3,9% акриламид /0,1% бис-акриламид, 0,05% персульфат аммония и 0,001% TEMED, 0,1% SDS, 0,125 М Tris, pH 6,8

*Трис-глициновый электродный буфер*

0,25 М Tris base, 0,192 М глицин, 0,1% SDS

*Буфер для образцов, 2x*

0,125 М Tris·Cl, pH 6,8, 20% глицерин, 4% SDS, 0,2% 2-МЕ, 0,001% бромфеноловый синий

## 2. Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле в трис-трициновой системе

*Разделяющий гель*

9,8% акриламид /0,26% бис-акриламид, 13% глицерин, 0,05% персульфат аммония, 0,001% TEMED, 0,1% SDS, 1М Tris, pH 8,45

*Концентрирующий гель*

3,9% акриламид/0,1% бис-акриламид, 0,05% персульфат аммония, 0,001% TEMED, 0,075% SDS, 0,75 М Tris, pH 8,45

*Анодный буфер*

0,2 М Tris base, HCl до pH 8,9

*Катодный буфер*

0,1 М Tris base, 0,1 М трицин, 0,1% SDS

*Буфер для образцов, 2x*

24% глицерин, 8% SDS, 0,02% Кумасси G-250, 0,2 М DTT, 0,1М Tris, pH 6,8

## 2.4. Питательные среды для бактерий

Среда LB (1% триптон, 1% NaCl, 0,5% дрожжевого экстракта)

LB-агар (1% триптона, 1% NaCl, 0,5% дрожжевого экстракта, 1,5% агара)

2ZY (2% триптона, 1% дрожжевого экстракта)

2ZYМ-5052 среда для автоиндукции (2% триптона, 1% дрожжевого экстракта, 0,5% глицерина, 0,05% глюкозы, 0,02% лактозы, 25 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 5 мМ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>)

SOC-бульон (2% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 20 мМ глюкоза).

Векторы из коллекции лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН:

pET22\_Vs-C-Mms6 (Стремовский О.А., Агаева У.Ф.), pDARP-LoPE (Прошкина Г.М. и др.), pET39-Z342 (Шульга А.А.).

Рекомбинантные белки:

DARPin\_G3 (Шульга А.А.), DARPin9.29-Vn (Прошкина Г.М.), барназа и барстар (Стремовский О.А.) – выделены и очищены в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН; трастузумаб (Herceptin: Roche, Мангейм, Германия).



## 2.3. Эукариотические клеточные линии

### 2.3.1. Линии эукариотических клеток

**Таблица 2.** Клеточные линии коллекции лаборатории молекулярной иммунологии, использованные в работе

Линия	Организм	Орган	Заболевания	Морфология	Особенности
SK-BR-3	Homo sapiens	Молочная железа	Аденокарцинома	Эпителиальные	HER2++
BT-474	Homo sapiens	Молочная железа	Протоковая карцинома	Эпителиальные	HER2++
SK-OV-3	Homo sapiens	Яичник; асцит	Аденокарцинома	Эпителиальные	HER2++
SKOV3-1p (SKOVip)	Homo sapiens	Яичник; асцит	Аденокарцинома	Эпителиальные	HER2++ Получены из асцита мыши, которой были привиты клетки SK-OV-3
MCF-7	Homo sapiens	Молочная железа	Аденокарцинома	Эпителиальные	
A549	Homo sapiens	Легкие	Карцинома	Эпителиальные	
СНО	Cricetus griseus (Китайский хомячок)	Яичник		Эпителиоподобная	

Клеточные линии из коллекции Лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Таблица 2) культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки, 2 мМ L-аланил-L-глутамина и пенициллина/стрептомицина в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

Раствор Версена (раствор ЭДТА в PBS) использовали для удаления клеток с поверхности культурального пластика без использования трипсина для предотвращения разрушения поверхностных рецепторов.

Подсчет клеток проводили при помощи автоматического счетчика Luna II после окрашивания 0,4% раствора трипанового синего.

Для длительного хранения клетки подвергались криоконсервации. Для криоконсервации использовали культуральную среду с 10% ДМСО, 20% FBS.

### **2.3.2. Анализ жизнеспособности клеток**

#### **МТТ-тест**

Живые клетки способны восстанавливать тетразолевый краситель желтого цвета до пурпурного формазана, нерастворимого в воде. Оптическая плотность раствора формазана в ДМСО в каждой пробе пропорциональна количеству живых клеток.

Клетки рассеивали на 96-луночный планшет в количестве  $2 \times 10^3 - 10 \times 10^3$  клеток на лунку в 100 мкл питательной среды с 10% фетальной сыворотки телят. После культивирования клеток при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение суток к клеткам добавляли тестируемые частицы или белки в культуральной среде в различных концентрациях в объеме 100 мкл на лунку. После 24-48 часов инкубации при 37 °С в атмосфере CO<sub>2</sub> клетки промывали PBS, в лунки добавляли раствор МТТ в бессывороточной среде в количестве 100 мкл на лунку и концентрации 0,5 мг/мл. Образцы инкубировали 1 час при 37 °С в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Жидкость удаляли, в лунки добавляли по 100 мкл ДМСО. Микропланшеты встряхивались до полного растворения кристаллов. Интенсивность поглощения лунок измерялась на микропланшетном анализаторе TECAN Infinite M1000 PRO при 540 нм. Выживаемость клеток оценивалась как отношение оптической плотности

содержимого исследуемой лунки к контрольной (с клетками, инкубированными без добавления белка или частиц).

### **Резазурин-тест**

Резазурин (7-Гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид, натриевая соль) – синий феноксазиновый краситель, слабо флуоресцентный, нетоксичный, хорошо проникающий в клетки. В живых клетках резазурин может быть необратимо восстановлен до розового и сильно флуоресцентного резорурфина с максимумом возбуждения при 530–570 нм и эмиссии при 580–590 нм.

Клетки высевали по  $2-3 \times 10^3$  клеток/лунку в 96-луночный планшет и культивировали в течение ночи при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день к клеткам добавляли 100 мкл суспензии наночастиц и инкубировали в течение 24-72 часов. Затем клетки два раза тщательно промывали теплым PBS и добавляли по 100 мкл раствора резазурина (13 мг/л) в культуральной среде. После 3–5 часов инкубации при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> измеряли флуоресценцию при длинах волн  $\lambda_{ex} = 570$  нм и  $\lambda_{em} = 600$  нм с использованием микропланшетного анализатора Infinite M1000 PRO (Tecan, Австрия). Необработанные клетки принимали за 100%, а лунки с раствором резазурина без клеток принимали за базовый уровень.

### **Клоногенный анализ**

Для клоногенного анализа  $10^3$  клеток после облучения помещали в каждую лунку 12-луночного планшета в 1 мл DMEM/F12 с 10% FBS. Клетки культивировали в течение 10 дней до образования колоний со сменой среды каждые 3 дня. Затем среду удаляли и лунки последовательно промывали 1 мл PBS, 50% и 75% этанолом в PBS. Далее клетки фиксировали 96% этанолом в течение 15 мин. Затем этанол удаляли и лунки промывали водой. Клетки окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 30 мин. Затем краситель удаляли, лунки промывали водой и просушивали. Клеточные планшеты сканировали с помощью сканера Epson Perfection 2400 (Epson, Батам, Индонезия).

### **2.3.3. Измерение уровня активных форм кислорода**

Для оценки количества активных форм кислорода был использован индикатор окислительного стресса CM-H<sub>2</sub>DCFDA или карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA.

CM-H<sub>2</sub>DCFDA представляет собой хлорметилпроизводное H<sub>2</sub>DCFDA. CM-H<sub>2</sub>DCFDA может пассивно диффундировать в клетки, где его ацетатные группы расщепляются внутриклеточными эстеразами, а его тиол-реактивная хлорметильная группа реагирует с внутриклеточным глутатионом и другими тиолами. Ацетильные группы в структуре карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA улучшают проникающую способность реагента через клеточную мембрану. Карбокси-H<sub>2</sub>DCFDA имеет два дополнительных отрицательных заряда, которые препятствуют утечке индикатора из клетки. Последующее окисление дает флуоресцентную производную, которая захватывается внутри клетки.

### **Измерение уровня АФК в клетках с НЧ серебра**

$4,5 \times 10^5$  клеток инкубировали с наночастицами в DMEM с 10% FBS 30 минут, отмывали от несвязавшихся частиц и облучали светом длиной волны 465 нм с использованием диодной матрицы мощностью 95 мВт/см<sup>2</sup> в течение 0, 2 или 5 минут. Клетки без наночастиц облучали при тех же условиях. Затем добавляли CM-H<sub>2</sub>DCFDA, инкубировали образцы 1,5 часа в темноте при 37 градусах и немедленно анализировали на проточном цитометре Accuri C6 (BD Biosciences, USA) в канале FL1(488 нм; 533/30 нм).

### **Измерение уровня АФК в клетках с НЧ PLGA**

Клетки в культуральной среде DMEM/F12, не содержащей фенолового красного, инкубировали с наночастицами при 37 °C в течение 1 часа при осторожном перемешивании каждые 15 минут. Образцы облучали в течение 0, 10,

30 или 60 секунд лазером с длиной волны 808 нм и мощностью 1,2 Вт. К образцам добавляли индикатор АФК (карбокси-Н<sub>2</sub>DCFDA) согласно рекомендациям производителя. После инкубации в темноте клетки сразу же анализировали с помощью проточного цитометра Novocyte 3000 VYB при лазере возбуждения 488 нм, эмиссионном фильтре 530/30 нм. К положительному контролю добавляли перекись водорода (до получения конечной концентрации 0,03%).

### **2.3.4. Проточная цитометрия**

Для анализа клеток использовали проточные цитометры BD Accuri C6 (Becton Dickinson, Нью-Джерси, США) и Novocyte 3000 VYB flow cytometer (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США). В каждом образце анализировали как минимум 10 000 клеток. В качестве контроля (автофлуоресценция клеток) использовали образцы клеток, приготовленные без добавления белков. Полученные данные анализировали с помощью программ CFlow Plus, FlowJo или NovoExpress.

## **2.4. Прокариотические клетки**

### **2.4.1. Бактериальные штаммы**

#### ***E. coli* BL21 (DE3)**

*E. coli* В F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal* λ(DE3)

Штамм для экспрессии рекомбинантных белков. Штамм лизогенен по λDE3, который содержит ген T7 РНК-полимеразы под контролем *lacUV5* промотора. Экспрессия белка индуцируется IPTG и галактозой, репрессируется глюкозой в среде. *E. coli* BL21 (DE3) могут быть использованы с T7 системами экспрессии. Генетические маркеры помогают белку накапливаться до высоких уровней без деградации.

#### ***E. coli* XL1-Blue**

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15*  
Tn10(Tet<sup>R</sup>)]

Штамм для клонирования и наработки плазмидной ДНК. Бактерии устойчивы к тетрациклину. Частично инактивирована система рестрикции. Возможность бело-голубой селекции.

#### **2.4.2. Получение компетентных клеток**

Одиночную бактериальную колонию с чашки с LB-агаром переносили в 5 мл LB среды. Инкубировали при 37°C на шейкере в течение ночи. 300-600 мкл полученной культуры засеивали в 30 мл среды и инкубировали при 30°C до оптической плотности  $D_{600}=0,45-0,47$  и переносили в лед на 10 минут. Центрифугировали при 4°C, 2600 g 10 минут. Добавляли 10 мл холодного ТВ и инкубировали 10 минут на льду. Центрифугировали при 4°C при 2600 g 10 минут. Добавляли 10 мл холодного ТВ и инкубировали 10 минут на льду. Центрифугировали при 4°C, 2600 g 10 минут. Добавляли 2 мл холодного ТВ и 150 мкл ДМСО и инкубировали 10 минут на льду. Хранили в аликвотах по 200 мкл при -70°C.

#### **2.4.3. Трансформация методом теплового шока**

200 мкл замороженной суспензии компетентных клеток размораживали во льду, добавляли 10-20 нг плазмидной ДНК, аккуратно встряхивали и инкубировали во льду 30 минут для сорбции ДНК. Тепловой шок: выдерживали 50 секунд при 42°C, добавляли 800 мкл SOC-бульона и инкубировали при 37 °C час. Клетки высевали на чашки с LB-агаром (15 г/л) и селективным антибиотиком (100 мкг/мл). Чашки инкубировали при 37 °C в течение ночи.

#### **2.4.4. Нарботка и выделение плазмидной ДНК**

Единичную колонию с чашки засеивали в жидкую среду LB с селективным антибиотиком и выращивали при температуре 37 °С с аэрацией в течение ночи. 5 мл ночной культуры клеток центрифугировали при 5000g в течение 5 мин. Выделение проводили при помощи набора Wizard Plus, Miniprep (Promega) согласно рекомендациям производителя. Ресуспендировали осадок в 250 мкл буфера и добавляли 10 мкл раствора щелочных протеаз и 250 мкл лизирующего буфера, аккуратно перемешивали и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора, перемешивали и центрифугировали 10 минут при 16000g.

Супернатант наносили на колонку и центрифугировали 1 минуту при 16000g при комнатной температуре. Промывали колонку 750 мкл раствора для отмывки 2 раза, 2 минуты при 16000g. Помещали колону в стерильную пробирку на 1,5 мл, наносили 100 мкл воды и центрифугировали 1 минуту при 16000g. Удаляли колонку, хранили ДНК при -20 °С.

#### **2.5. Выделение и очистка белков**

##### **2.5.1. Экспрессия белков в бактериальной системе. Хроматографическая очистка белков**

###### **Bs-C-Mms6**

Для выделения рекомбинантного белка Bs-C-Mms6 компетентные клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) трансформировали плазмидой pET22\_Bs-C-Mms6. Единичную колонию с чашки засеивали в жидкую среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) и выращивали при температуре 37 °С с аэрацией в течение ночи. 5 мл ночной культуры клеток *E. coli* переносили в 500 мл жидкой среды LB с антибиотиком и растили при 37 °С с аэрацией до оптической плотности  $OD_{600}=0,6$ .

Синтез целевого белка индуцировали, добавляя к культуре бактерий ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ. Бактериальную биомассу культивировали при температуре 37 °С при интенсивном перемешивании в течение 4 ч. После этого клетки охлаждали и центрифугировали при 6000g в течение 10 мин при 4 °С.

Клеточный осадок ресуспендировали в фосфатном буфере Р (3,2 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 16,8 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 мМ  $\text{NaCl}$  pH 7,4) с добавлением лизоцима 0,1 г/л, клетки разрушали на ледяной бане с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 50000g в течение 30 мин. pH надосадочной жидкости доводили до 7,4 и фильтровали её через мембрану с порами 0,22 мкм. Фильтрат наносили на колонку Ni –NTA column (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером Р, со скоростью 0,5 мл/мин. Колонку промывали буфером Р с 25 мМ имидазола, белок элюировали буфером Р ступенчатыми концентрациями имидазола (от 50 до 250 мМ).

### **Аффибоди Z<sub>HER2:342</sub>**

Белок аффибоди Z<sub>HER2:342</sub> был получен из штамма *Escherichia coli* BL21(DE3).

*E. coli*, трансформированные ранее полученной плазмидой pET39-Z342 и высевали на чашку с LB агаром (1,5%) и канамицином (100 мкг/мл). Свежетрансформированные бактерии выращивали в среде для аутоиндукции ZYM-5052, содержащей 0,1 г/л канамицина. Культуру выращивали на термостатическом шейкере при 25 °С и 200 об/мин в течение ночи.

Далее клетки собирали центрифугированием при 5000g и 4 °С в течение 15 мин. Затем осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (3,2 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 16,8 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 7,5, 50 мкг/мл лизоцима) и разрушали ультразвуком. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 30000 g в течение 120 мин при 4 °С. К супертананту добавляли 30 мМ имидазола, фильтровали через 0,22 мкм мембрану и наносили на хроматографическую колонку HisTrap HP, 1 mL column (GE Healthcare), уравновешенную буфером (pH



7,5), содержащим 20 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и 30 мМ имидазола. Связавшиеся белки элюировали ступенчатым градиентом имидазола (25-500 мМ). Фракции анализировали при помощи денатурирующего электрофореза в ПААГ в трис-трициновой системе.

### **DARP-LoPE**

Бактериальные клетки *E. coli* BL21(DE3) были трансформированы плазмидой pDARP-LoPE и засеяны на чашки с LB, 1% агарозой и 0,1 г/л ампициллина. Свежие трансформанты (10 колоний на мл) переносили в 25 мл среды с ампициллином и инкубировали 1,5 часа при 37 °С при интенсивной аэрации (200 RPM). Затем клетки перемещали в 250 мл среды 2ZYM, содержащей 0,2 г/л ампициллина, и растили в 2-л колбе при 20 °С и 200 RPM до оптической плотности OD<sub>600</sub> = 0,5. Затем добавляли IPTG до финальной концентрации 1мМ в течение 24 часов. Затем клетки центрифугировали при 4 °С, 5000 g 15 минут. Осадок разбавили лизирующим буфером (3,2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16,8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 мМ NaCl, 50 мкг/мл лизоцима pH 7,5) до 75 мл и лизировали при 4 °С ультразвуковым гомогенизатором 8 раз по 30 секунд с перерывом на охлаждение 2-5 минут. Лизат был центрифугирован 90 минут при 4 °С 20000 g. Супернатант был профильтрован последовательно через фильтры с порами 0,45 мкм и 0,22 мкм и нанесен на хроматографическую колонку Ni<sup>2+</sup>-NTA (GE Healthcare, United States), предварительно уравновешенную фосфатным буфером (3,2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16,8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 мМ NaCl, pH 7,5). Колонку промывали фосфатным буфером с концентрациями 0, 10мМ, 25 мМ имидазола. Связавшиеся белки элюировали ступенчатым градиентом имидазола (50-500 мМ). Фракции исследовали при помощи денатурирующего электрофореза в 15% ПААГ.

### 2.5.2. Электрофорез в ПААГ

Фракции после хроматографии анализировали и идентичность белков подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Свежеприготовленный разделяющий гель нанесли на стеклянный сэндвич, наслаивали изобутиловый спирт и полимеризовали гель при комнатной температуре. Затем слой изобутилового спирта удаляли и промывали гель дистиллированной водой. Наносили концентрирующий гель, вставляли гребенку и оставляли гель полимеризоваться при комнатной температуре. После этого гребенку удаляли, гель промывали и загружали в камеру BIO-RAD Mini-Protean Tetra System.

Образец разбавляли двукратным буфером для образцов (содержащим SDS и  $\beta$ - меркаптоэтанол), нагревали в течение 5 минут при 99 °C и наносили на дно лунок вместе с белковым маркером. Электрофорез проводили при 200 В до тех пор, пока краситель не достигал дна разделяющего геля. Гель окрашивали в течение 15 мин красящим раствором Кумасси G-250 и промывали водой или 10% уксусной кислотой до тех пор, пока фон не становился прозрачным.

DAR-LoPE, Bs-C-Mms6 и трастузумаб анализировали с использованием денатурирующего электрофореза по Лэммли в 15% ПААГ.

Каркасные полипептиды DARPin\_G3 и аффибоди Z<sub>HER2:342</sub> анализировали с помощью денатурирующего электрофореза в трис-трициновой системе.

### 2.5.3. Определение концентраций белков

Метод Бредфорда основан на взаимодействии красителя Кумасси G-250 с аминокислотными остатками белка. При добавлении белка цвет реактива Бредфорда меняется с коричневого на синий. Для приготовления реактива Бредфорда 5 мг Кумасси G-250 растворяли в 2,5 мл этилового спирта, добавляли 5 мл ортофосфорной кислоты. Объем доводили до 50 мл деионизированной водой [151]. Полученную смесь фильтровали через мембрану 0,45 мкм.

Для определения концентрации белка к 100 мкл реактива Бредфорда добавляли 10 мкл исследуемого раствора белка (до финальной концентрации 1-10 мкг/мл), перемешивали и измеряли поглощение на 595 нм в микропланшетном анализаторе.

Концентрацию белков определяли с ВСА-теста (Thermo) в соответствии с рекомендациями производителей. Реактивы для ВСА-теста содержат бицинхониновую кислоту, которая может образовывать комплексы пурпурного цвета с ионами меди  $\text{Cu}^{1+}$ , восстановленными из  $\text{Cu}^{2+}$  в ходе биуретовой реакции с белком. При этом цвет раствора меняется с зеленого на пурпурный, интенсивность окраски пропорциональна концентрации белка. Для проведения теста смешивали 50 частей реактива А (содержащего бицинхониновую кислоту) и 1 часть реактива В (содержащего  $\text{Cu}^{2+}$ ). К 100 мкл смеси добавляли 10 мкл белка до финальной концентрации 10-100 мкг/мл, инкубировали 30 минут и измеряли поглощения на 562 нм в микропланшетном анализаторе. Концентрацию белка определяли согласно калибровочной кривой.

#### **2.5.4. Определение ферментативной активности белков**

Определение ферментативной активности барназы методом растворимого осадка. Для определения ферментативной активности барназы белок разводили с шагом в 5 раз в триплетах по 40 мкл. К образцам добавляли 160 мкл раствора дрожжевой РНК 2 мг/мл в Tris-буфере (0,125 М, рН=8,5), быстро перемешивали и инкубировали 15 минут при 37 °С. Затем к образцам добавляли по 200 мкл ледяной хлорной кислоты (7%) и инкубировали на льду 15 минут. Затем образцы центрифугировали при 0 °С, 16000 g 10 минут. Супернатант разбавляли в 10 раз водой и изменяли его оптическую плотность при 260 нм на спектрофотометре.

Определение активности барстара и Bs-C-Mms6  
Качество белка определяли по его способности ингибировать рибонуклеазную активность барназы. Белок разводили с шагом в 5 раз в триплетах по 40 мкл и

инкубировали с 40 мкл раствора барназы (2 нМ) в Tris-буфере (0,125 М, рН=8,5). К образцам добавляли 120 мкл раствора дрожжевой РНК 2,7 мг/мл в Tris-буфере (0,125 М, рН=8,5), быстро перемешивали и инкубировали 15 минут при 37 °С. Затем к образцам добавляли по 200 мкл ледяной хлорной кислоты (7%) и инкубировали на льду 15 минут. Затем образцы центрифугировали 0 °С, у при 16000 g 10 минут. Супернатант разбавляли в 10 раз водой и изменяли его оптическую плотность при 260 нм на спектрофотометре.

### 2.5.5. Модификации и мечение белков

Для конъюгации белков с флуоресцентными метками к 100 мкг белка в 90 мкл соответствующего буфера добавляли 10 мкл красителя при перемешивании на вортексе (Таблица 3). Белки инкубировали при комнатной температуре в течение ночи в темноте и очищали от несвязавшихся молекул при помощи колонки Zeba Spin Desalting Columns.

**Таблица 3.** Условия конъюгации белков с флуоресцентными метками

Белок	Растворитель	Метка	Концентрация	Растворитель
Z <sub>HER2:342</sub>	PBS	ФИТЦ	7 г/л	ДМСО
DARP-LoPE	PBS	ФИТЦ	1,4 г/л.	ДМСО
Z <sub>HER2:342</sub>	0,5 М NaCl	sulfo-Cyanine5.5 NHS ester	2 г/л	H <sub>2</sub> O
DARP-LoPE	0,5 М NaCl	sulfo-Cyanine5.5 NHS ester	2 г/л	H <sub>2</sub> O

Трастузумаб	PBS	DyLight650	0,54 г/л	ДМСО
DARPin9.29-Bn	PBS	ФИТЦ	3 г/л	ДМСО
Bs-C-Mms6	PBS	ФИТЦ	6 г/л	ДМСО

## **2.6. Синтез, характеристика и модификация наночастиц**

### **2.6.1. Сканирующая электронная микроскопия**

Морфологию и размер наночастиц изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа MAIA3 (Tescan, Брно, Чехия). 1 мкл наночастиц 50 мкг/л в воде наносили на кремниевую пластину и сушили на воздухе. СЭМ-изображения были получены при ускоряющем напряжении 7 кВ для PLGA, 20 кВ для магнитных и серебряных НЧ. СЭМ изображения обрабатывались с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53k. Гистограммы распределения по НЧ размерам и их анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.

### **2.6.2. Гидродинамическое рассеяние света**

Гидродинамический размер и  $\zeta$ -потенциал наночастиц измеряли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Малверн, Вустершир, Великобритания). Измерения проводили в PBS (гидродинамический размер) или 10 mM NaCl ( $\zeta$ -потенциал) при температуре 25 °C. Измерения проводились как минимум в трехкратной повторности.

### **2.6.3. Количественный анализ связывания магнитных частиц с клетками**

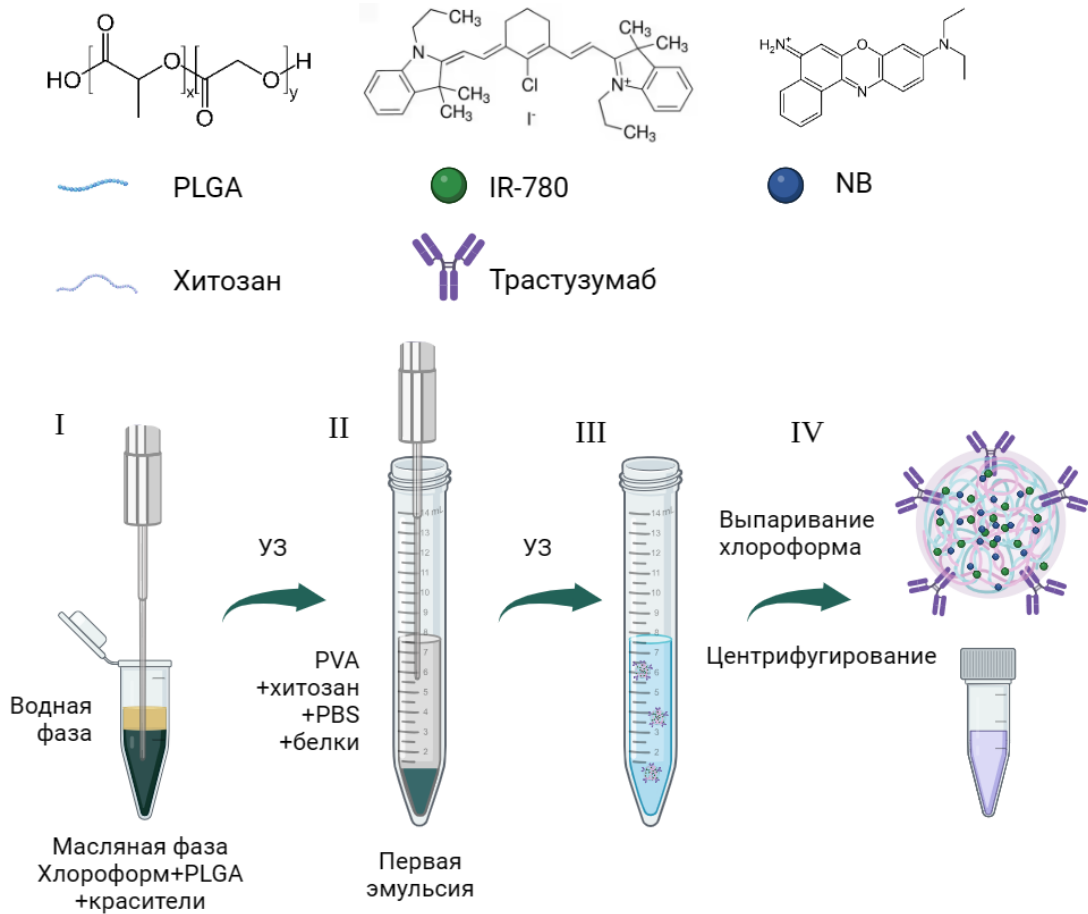
Количественную оценку связывания магнитных наночастиц с клетками проводили с помощью разработанного ранее метода МРQ-цитометрии. Суспензию клеток, меченных наночастицами, в объеме 30 мкл помещали в измерительную зону прибора в пластиковой трубке диаметром 3 мм. Возбуждение наночастиц в измерительной катушке детектора осуществлялось на частотах  $f_1 = 87$  кГц и  $f_2 = 702$  Гц с амплитудами  $H_2 = 64 \pm 6$  Э,  $H_1 = 33 \pm 3$  Э соответственно, отклик регистрировался на комбинаторной частоте  $f_1 + 2f_2$  [152].

## **2.7. Синтез наночастиц PLGA, загруженных флуоресцентными красителями**

### **2.7.1. Синтез наночастиц PLGA**

Наночастицы были приготовлены разработанным нами ранее методом двойной эмульсии с модификациями.

12 мг PLGA растворяли в 300 мкл хлороформа, затем добавляли 25 мкл нильского голубого (1 г/л) и 25 мкл IR-780 (3 г/л) в хлороформе. Для первой эмульсии к PLGA добавляли 150 мкл деионизированной воды и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин с использованием ультразвукового дезинтегратора VCX750 (Sonics & Materials, Ньютаун, Коннектикут, США), оснащенного ступенчатым наконечником 1/8"—630-0422, с максимальной мощностью 750 Вт и выходной частотой 20 кГц. Образцы обрабатывали ультразвуком с амплитудой 38% в течение 1 минуты. Затем первую эмульсию переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл, содержащую 1,125% PVA, 0,625% БСА, 0,3 мг лактата олигосахарида хитозана и 0,75 мг трастузумаба в 3 мл PBS, и обрабатывали ультразвуком с амплитудой 38% в течение 1 мин. Хлороформ выпаривали под вытяжкой при осторожном перемешивании в возвратно-поступательном режиме на ротаторе Biosan RS-24 в течение не менее 4 часов. Затем НЧ трижды промывали PBS центрифугированием и ресуспендировали в 200 мкл PBS (Рисунок 10). Концентрацию наночастиц определяли после сушки водной суспензии при температуре 70 °С.



**Рисунок 10.** Общая схема синтеза наночастиц. Первую эмульсию получали ультразвуковой обработкой раствора красителей в хлороформе с водной фазой. Затем эту эмульсию помещали в пробирку с PVA и раствором белка в PBS и эмульгировали ультразвуком. После выпаривания хлороформа НЧ промывали и ресуспендировали в PBS.

### 2.7.2. Характеризация НЧ PLGA

Морфологию и размер наночастиц изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа MAIA3 при ускоряющем напряжении 7 кВ. СЭМ изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения ImageJ 1.53k. Гистограммы распределения НЧ по размерам и их анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.5 после измерения не менее чем 1000 наночастиц.



Оптические свойства НЧ изучали с помощью микропланшетного анализатора Infinite M1000 PRO (Tecan, Зальцбург, Австрия).

Для измерения эффективности загрузки красителя 10 мкл НЧ растворяли в 90 мкл ДМСО. Калибровочные растворы готовили растворением красителей в ДМСО, поскольку IR-780 не растворяется в воде. Спектры поглощения получали с помощью микропланшетного анализатора Infinite M1000 PRO. В качестве базовой линии использовали оптическую плотность лунки со 100 мкл ДМСО.

Для измерения флуоресценции наночастиц в клетках клетки высевали из расчета  $15 \times 10^3$  клеток на лунку в 100 мкл клеточной среды, не содержащей фенолового красного. Затем к клеткам добавляли по 10 мкл наночастиц (30 г/л) и инкубировали в течение 4 часов при 37 °С, чтобы позволить частицам проникнуть в клетки. Затем спектры флуоресценции записывали с помощью микропланшетного анализатора Infinite M1000 PRO. Все измерения были проведены минимум трижды.

### **2.7.3. Анализ специфичности связывания методом проточной цитометрии**

Клеточные линии A549, CHO, SK-BR-3 и BT474 ресуспендировали в концентрации  $10^6$  клеток/мл в культуральной среде DMEM/F12, не содержащей фенолового красного, с 10% FBS. НЧ (10 мкл, 30 г/л) добавляли к 300 мкл клеточной суспензии и тщательно перемешивали. Клетки инкубировали при 4 °С в течение 30 мин при непрерывном медленном перемешивании. Клетки отделяли от несвязавшихся НЧ центрифугированием при 100 g в течение 5 минут дважды, ресуспендировали в 100 мкл клеточной среды DMEM/F12 (без фенолового красного) и анализировали с использованием проточного цитометра Novocyte 3000 VYB (ACEA Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США) с лазером возбуждения 561 нм и эмиссионным фильтром 660/20 нм.

#### 2.7.4. Исследование фототермических свойств

Для оценки фототермических свойств наночастиц PLGA+IR-780+NB 100 мкл суспензии НЧ в PBS облучали в пробирках объемом 1,5 мл лазером с длиной волны 808 нм мощностью 1,2 Вт и 0,27 Вт. Данные измерения температуры получали с помощью тепловизионной камеры FLIR C3 (FLIR Systems, Уилсонвилл, Орегон, США). Для анализа использовали максимальное значение температуры в выбранной области. В качестве базовой использовали температуру пробирки до измерения, хранившейся при комнатной температуре. В качестве контроля использовали пробирку со 100 мкл PBS при идентичных условиях облучения.

#### 2.7.5. Фототерапия *in vitro*

Клетки SK-BR-3 ресуспендировали в концентрации  $10^6$  клеток/мл в клеточной среде DMEM/F12, не содержащей фенолового красного. НЧ (18 мкл, 30 г/л) добавляли к 450 мкл клеточной суспензии в центрифужных пробирках емкостью 1,5 мл. После инкубации при 37 °С в течение 1 часа при осторожном перемешивании каждые 15 минут клетки отделяли от несвязавшихся НЧ центрифугированием при 100 g в течение 5 минут и ресуспендировали в 450 мкл клеточной среды DMEM/F12, не содержащей фенолового красного. Затем 100 мкл образца помещали в пробирки емкостью 1,5 мл и облучали в течение 0, 1,5 или 15 мин лазером с длиной волны 808 нм и мощностью 0,27 Вт. После облучения к каждому образцу добавляли по 1,4 мл DMEM/F12 и очень аккуратно перемешивали.

100 мкл клеточной суспензии помещали в лунку 96-луночного планшета и культивировали в течение 48 часов. Далее добавляли 100 мкл раствора резазурина в культуральной среде до финальной концентрации 13 мкг/мл. Через 3–5 часов инкубации измеряли флуоресценцию с помощью микропланшетного анализатора.

Для клоногенного анализа  $1 \times 10^3$  клеток после облучения помещали в каждую лунку 12-луночного планшета в 1 мл DMEM/F12 с 10% FBS. Клетки

культивировали в течение 10 дней до образования колоний со сменой среды каждые 3 дня. Затем среду удаляли и лунки последовательно промывали 1 мл PBS, 50% и 75% этанолом в PBS. Далее клетки фиксировали 96% этанолом в течение 15 мин. Затем этанол удаляли и лунки промывали водой. Клетки окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 30 мин. Затем краситель удаляли и лунки промывали водой. Клеточные планшеты сканировали с помощью сканера Epson Perfection 2400 (Epson, Батам, Индонезия).

### **2.7.6. Конфокальная микроскопия**

Клетки SK-BR-3 высевали на культуральный планшет со стеклянным дном и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С в течение ночи. Затем в каждую лунку добавляли краситель Hoechst 33342 в конечной концентрации 1 мкг/мл. После инкубации в течение 1 часа клеточную среду заменяли на PLGA+IR-780+NB в культуральной среде, не содержащей фенолового красного. Через 2 часа несвязавшиеся НЧ удаляли осторожным промыванием предварительно нагретой клеточной средой, не содержащей фенолового красного.

Конфокальную микроскопию проводили с использованием микроскопа LSM 980 (Zeiss, Jena, Germany) при следующих условиях: возбуждение 405 нм, эмиссия 408–501 нм для Hoechst 33342; возбуждение 543 нм, эмиссия 552–694 нм для НЧ.

### **2.7.7. Мышиная модель HER2-положительной опухоли**

Самки мышей BALB/c массой 22–25 г были приобретены в питомнике «Столбовая» (г. Столбовая, Московская область, Россия) и содержались в Виварии ИБХ РАН (Москва, Россия). Все процедуры одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Института биоорганической химии им. Шемякина-Овчинникова РАН (Москва, Россия) согласно протоколу IACUC № 367/2022.

Самкам мышей вводили  $1 \times 10^6$  клеток EMT6/P-HER2 [153] в 100 мкл культуральной среды в подкожно-жировую клетчатку молочной железы для получения ортотопических опухолей. Перед инокуляцией опухоли мышей анестезировали путем ингаляции 1,5% газовой смеси изофлюран/кислород с использованием системы анестезии для грызунов (Perkin Elmer, Хопкинтон, Массачусетс, США).

### **2.7.8. Визуализация опухолей *in vivo***

На восьмые сутки после инокуляции опухоли мышам под газовым наркозом внутривенно вводили в ретроорбитальный синус 1 мг наночастиц PLGA+IR-780+NB в 100 мкл PBS.

Через 24 часа мышей анестезировали 1,5% смесью изофлурана и кислорода в течение 3–5 минут и переносили в систему биовизуализации IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, Хопкинтон, Массачусетс, США). Поддержание анестезии обеспечивалось путем ингаляции газовой смесью (1,5% изофлюран/кислород). Температуру тела мыши поддерживали за счет нагрева столика во время измерения.

## **2.8. Наночастицы магнетита**

### **2.8.1. Флуоресцентная спектроскопия**

15 мкг наночастиц, инкубированных с флуоресцентно мечеными белками, помещали в 96-луночный планшет и анализировали с помощью микропланшетного ридера Infinite M1000 Pro при длинах волн возбуждения и эмиссии флуоресценции 490 нм и 525 нм соответственно, при частоте вспышек 400 Гц, с усилением 190.

Связывание Bs-C-Mms6 с наночастицами магнетита оценивали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Наночастицы, предварительно инкубированные с белком (Bs-C-Mms6 или БСА), отмывали от несвязавшегося белка, ресуспендировали в воде и добавляли раствор Vn-ФИТЦ. После инкубации частицы отмывали центрифугированием, суспензию наночастиц в лунки 96-луночного планшета и интенсивность флуоресценции образцов измеряли на микропланшетном анализаторе TECAN Infinite M1000 PRO при  $\lambda = 490$  нм (возбуждение) и  $\lambda = 515$  нм (эмиссия). Измерения проводили как минимум трижды.

### **2.8.2. Мечение клеток структурами DARPin9.29-Vn \* Bs-C-Mms6-ФИТЦ**

Клетки, собранные с поверхности культурального пластика, промывали PBS, ресуспендировали в 500 мкл PBS с 1% БСА в концентрации  $10^6$  клеток/мл и охлаждали до +4 °С. Затем к клеткам добавляли DARPin9.29-Vn до конечной концентрации 10 мкг/мл и инкубировали 15 мин при +4 °С. Затем клетки дважды промывали PBS с 1% БСА, ресуспендировали в 500 мкл PBS с 1% БСА и добавляли к клеткам Bs-C-Mms6, меченный ФИТЦ (Bs-C-Mms6-ФИТЦ). Клетки инкубировали в течение 15 мин при +4 °С, дважды промывали PBS с 1% БСА и ресуспендировали в 200 мкл PBS с 1% БСА для анализа проточной цитометрией.

### **2.8.3. Мечение клеток DARPin9.29-Vn\* ФИТЦ**

Клетки, снятые с поверхности культурального пластика, дважды промывали PBS, ресуспендировали в 500 мкл PBS с 1% БСА, в концентрации  $10^6$  клеток/мл и охлаждали до +4 °С. Затем добавляли DARPin9.29-Vn\*ФИТЦ до финальной концентрации 20 мкг/мл и инкубировали 50 мин при +4 °С, после чего клетки трижды промывали PBS с 1% БСА, ресуспендировали в 500 мкл PBS с 1% БСА и анализировали на проточном цитофлуориметре.

#### **2.8.4. Мечение клеток структурами DARPin9.29-Vn\* Vs-c-Mms6-ФИТЦ**

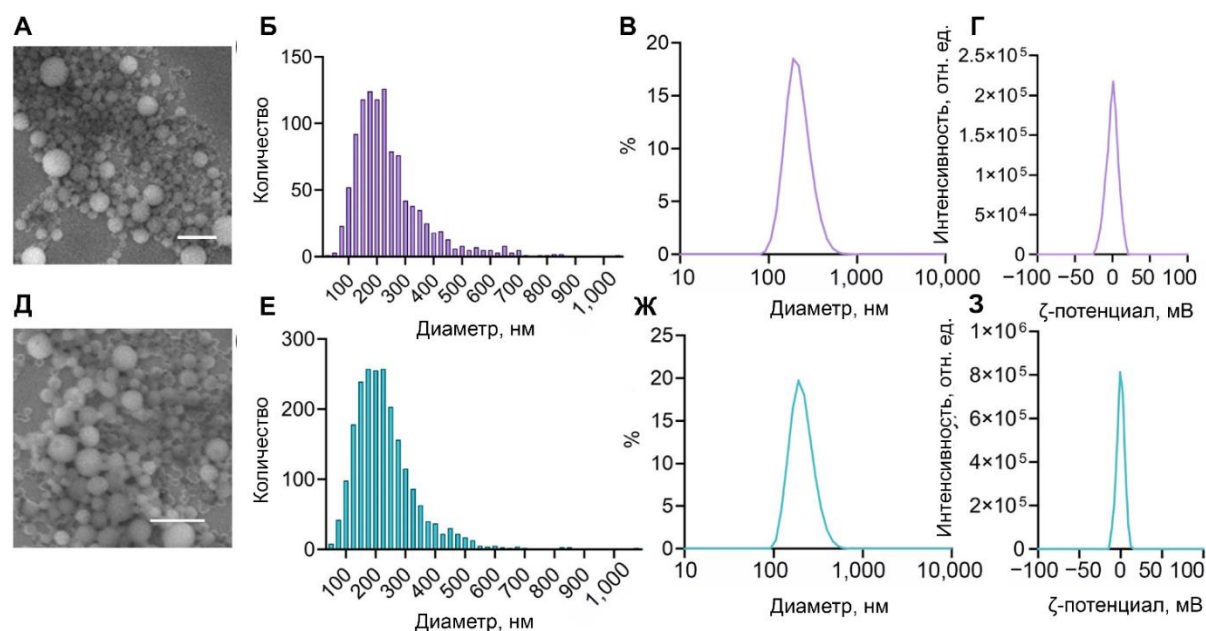
Клетки, снятые с поверхности культурального пластика, промывали PBS, ресуспендировали в 400 мкл PBS с 3% сухого молока, в концентрации  $10^6$  клеток/мл и охлаждали до +4 °С. Затем к клеткам добавляли DARPin9.29-Vn до финальной концентрации 25 мкг/мл и инкубировали в течение 15 мин при +4 °С. Затем клетки дважды промывали PBS с 3% молока, ресуспендировали в 350 мкл PBS с 1% БСА, и к клеткам добавляли 50 мкл Vs-c-Mms6-ФИТЦ до финальной концентрации 3 мкг/мл. Клетки инкубировали 15 мин при +4 °С и дважды промывали PBS с 1% БСА, финально ресуспендируя в 100 мкл PBS с 1% БСА для анализа методом проточной цитометрии.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

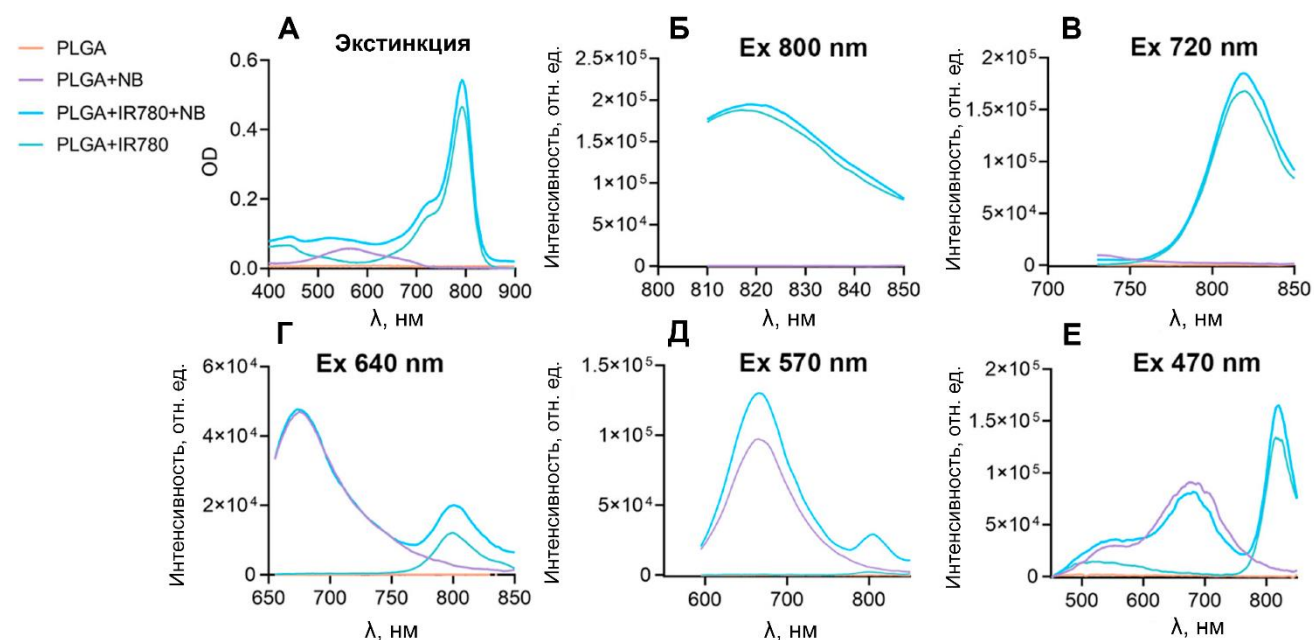
##### 3.1.1. Синтез и характеристика наночастиц PLGA

Мы синтезировали наночастицы PLGA, загруженные двумя красителями с флуоресценцией в ближнеинфракрасной области, а именно йодидом IR-780 и нильским голубым (NB). Концентрация НЧ составила  $31 \pm 2$  г/л. Размер НЧ измеряли методами ДРС и СЭМ. По данным ДРС размеры НЧ составили  $227 \pm 71$  нм и  $222 \pm 77$  нм, а размер, определенный по СЭМ-изображениям, составил  $234 \pm 111$  нм и  $241 \pm 127$  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 (Рисунок 11).



**Рисунок 11.** А, Д) СЭМ-изображения PLGA (А) и PLGA+IR-780+NB (Д). Масштаб 1 мкм. Б, Е) Распределение размеров PLGA (Б) и PLGA+IR-780+NB (Е) по данным СЭМ. (В, Ж) Гистограммы гидродинамического распределения по размерам наночастиц PLGA (В) и PLGA+IR-780+NB (Ж) в PBS. Г, З) Распределение дзета-потенциала PLGA (Г) и PLGA+IR-780+NB (З) в 10 mM NaCl.

Поскольку оптические свойства нильского голубого сильно зависят от растворителя (сольватохромизм) [154], было важно определить, будет ли наблюдаться флуоресценция нильского голубого и резонансный перенос энергии между двумя красителями после поглощения клетками и в опухоли. Будучи интернализированными клетками, наночастицы, загруженные NB, имели максимум поглощения при 570 нм и максимум эмиссии при 670 нм (Рисунок 12 А). Наночастицы, нагруженные IR-780 и NB, имели максимум поглощения при 790 нм и максимум эмиссии при 820 нм (Рисунок 12 Б, В). 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 (Рисунок 12 Д-Е). Резонансный перенос энергии между красителями расширяет их диагностические и терапевтические применения.



**Рисунок 12.** Оптические свойства НЧ PLGA: экстинкция, флуоресценция и FRET. А) Спектры поглощения растворов НЧ. Б–Е) Эмиссионные спектры NB после возбуждения на длинах волн 800 нм (Б), 720 нм (В), 640 нм (Г), 570 нм (Д), 470 нм (Е). Дополнительный пик эмиссии в БИК для PLGA+IR-780+NB показывает перенос энергии между двумя красителями.



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. Краситель NB составлял 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.

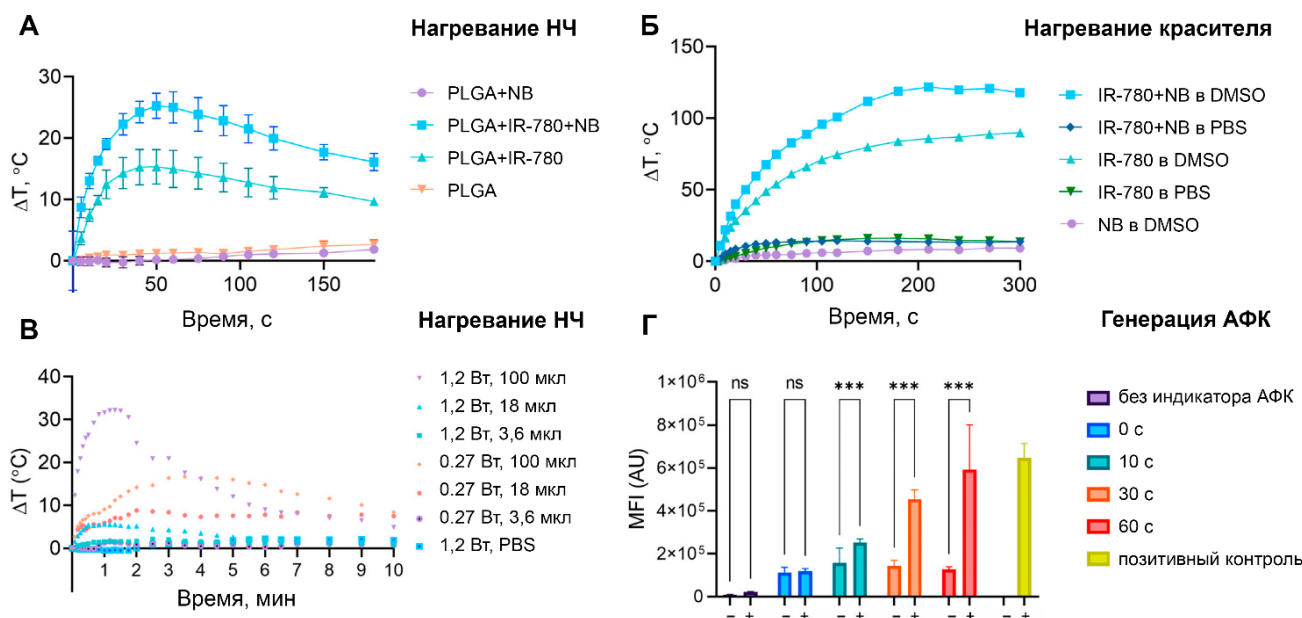
### **3.1.2. Исследование фототермических свойств наночастиц PLGA, загруженных БИК красителями**

Суспензию НЧ PLGA+IR-780+NB облучали лазером с длиной волны 808 нм мощностью 1,2 Вт или 0,27 Вт. При лазерном облучении мощностью 1,2 Вт температура образцов резко возрастала, достигая максимума через 1 мин, и затем снижалась почти до исходного значения. Быстрое повышение температуры более чем на 30 °С в минуту может стать интересным инструментом для абляции тканей (например, лазерной хирургии мягких тканей, LASIK или эндовенозной (эндовазальной) лазерной абляции). Однако в большинстве случаев во избежание нежелательного воспаления требуется осторожное нагревание, приводящее к апоптозу. Снижение мощности лазера привело к плавному повышению температуры с более длинным плато (Рисунок 13 В). Таким образом, для экспериментов по фототерапии *in vitro* мы использовали лазер 808 нм мощностью 0,27 Вт. В общей сложности 18 мкл наночастиц (0,45 мкг IR-780) в 100 мкл PBS продемонстрировали нагревание лазерным облучением (808 нм, 0,27 Вт) на 8,8 °С без снижения температуры в течение не менее 10 минут. Такие концентрации красителя могут быть достигнуты в опухоли мыши, что делает частицы перспективными для применения *in vivo*. Стоит отметить, что частицы, загруженные только нильским голубым, практически не нагревались; однако комбинация красителей привела к более эффективному нагреву, чем у НЧ с одним IR-780 (Рисунок 13 А). Тот же эффект наблюдался для свободных красителей (30 мг/л), нагретых в ДМСО. Комбинация IR-780+NB показала больший рост

температуры по сравнению с IR-780 при той же концентрации, тогда как чистый NB вообще не нагревался. Свежеполученные растворы IR-780+NB и IR-780 в PBS также не нагревались. Это может указывать на агрегацию красителя в PBS и подтверждает необходимость инкапсуляции IR-780 в полимерные наночастицы (Рисунок 13 Б).

### 3.1.3. Исследование фотосенсибилизирующих свойств наночастиц PLGA, загруженных БИК красителями

Всего к 450 мкл клеточной суспензии добавляли 18 мкл (30 г/л) наночастиц (конечная концентрация IR-780 составляла 1,2 мкМ). Образцы облучали в течение 10–60 с лазером с длиной волны 808 нм и мощностью 1,2 Вт. Было показано, что добавление наночастиц к клеткам не приводило к повышению уровня АФК, тогда как уровень АФК увеличивался пропорционально времени облучения в клетках с наночастицами PLGA+IR-780+NB, но не в клетках без частиц (Рисунок 13 Г).



**Рисунок 13.** А, В) Нагревание НЧ PLGA, нагруженных NB, IR-780 или NB+IR-780, лазером с длиной волны 808 нм (1,2 Вт или 0,27 Вт). Б) Нагревание свободных красителей и их комбинации). Г) Генерация АФК в HER2-положительных клетках SK-BR-3 с наночастиц или без них после облучения (808

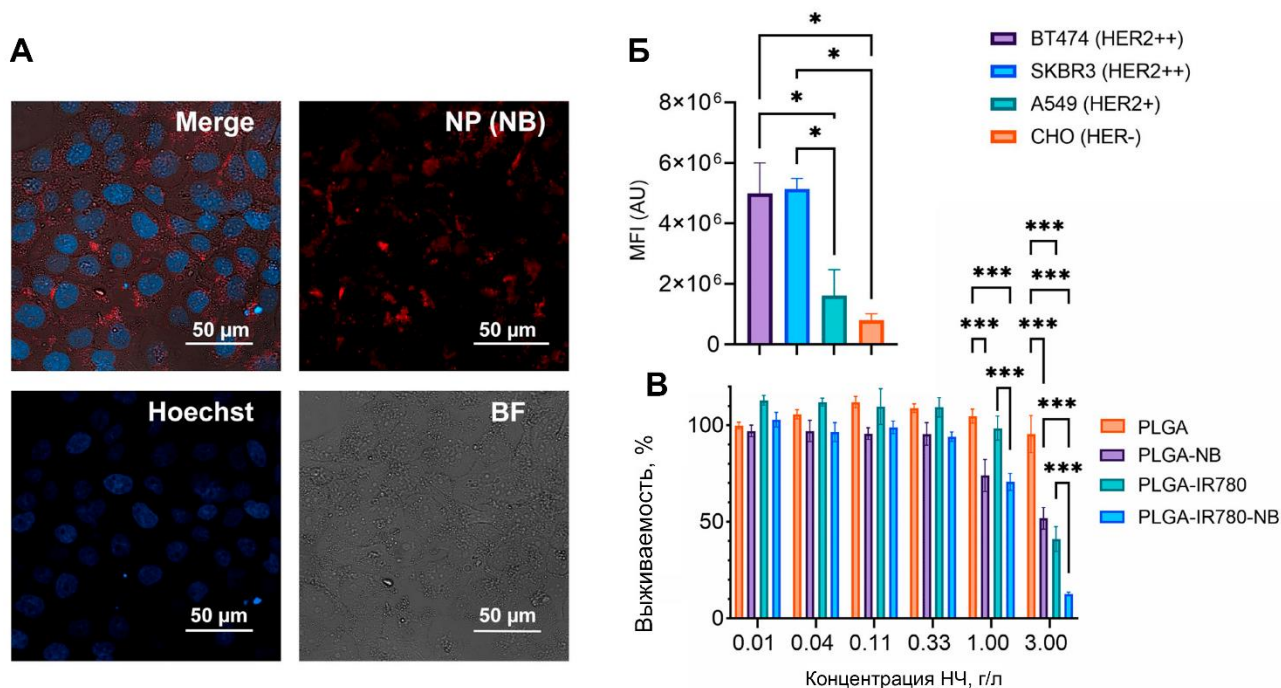
нм, 1,2 Вт). «+» – клетки с НЧ; «-» – клетки без НЧ. Желтая полоса – положительный контроль (добавлена  $H_2O_2$ ). Звездочки обозначают значения р следующим образом: 0,12 (ns), <0,001 (\*\*\*)).

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

Были выбраны четыре клеточные линии с разными уровнями экспрессии HER2: линии клеток рака молочной железы человека BT474 и SK-BR-3 со сверхэкспрессией HER2, карцинома легкого человека A549 с низкой экспрессией HER2 и клетки СНО яичника китайского хомячка в качестве HER2-негативных клеток.

Клетки инкубировали с наночастицами, отмывали от несвязавшихся наночастиц и анализировали с помощью проточного цитометра в канале, соответствующем флуоресценции нильского голубого. Наночастицы продемонстрировали специфическое связывание с HER2-положительными клетками, а именно более чем в шесть раз более сильное с BT474 и SK-BR-3, чем с HER2-отрицательным СНО (Рисунок 14 Б). Связывание с HER2-положительными клетками SKBR-3 подтверждали методом конфокальной микроскопии (Рисунок 14 А).

Чтобы оценить токсичность наночастиц, нагруженных красителями, мы добавили наночастицы в клетки и инкубировали их без промывания в течение 72 часов (Рисунок 14 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. Что касается концентрации красителя, IC50 составляла 2,5 мг/л для IR-780 (4 мМ) и 6 мг/л для NB (14 мМ).

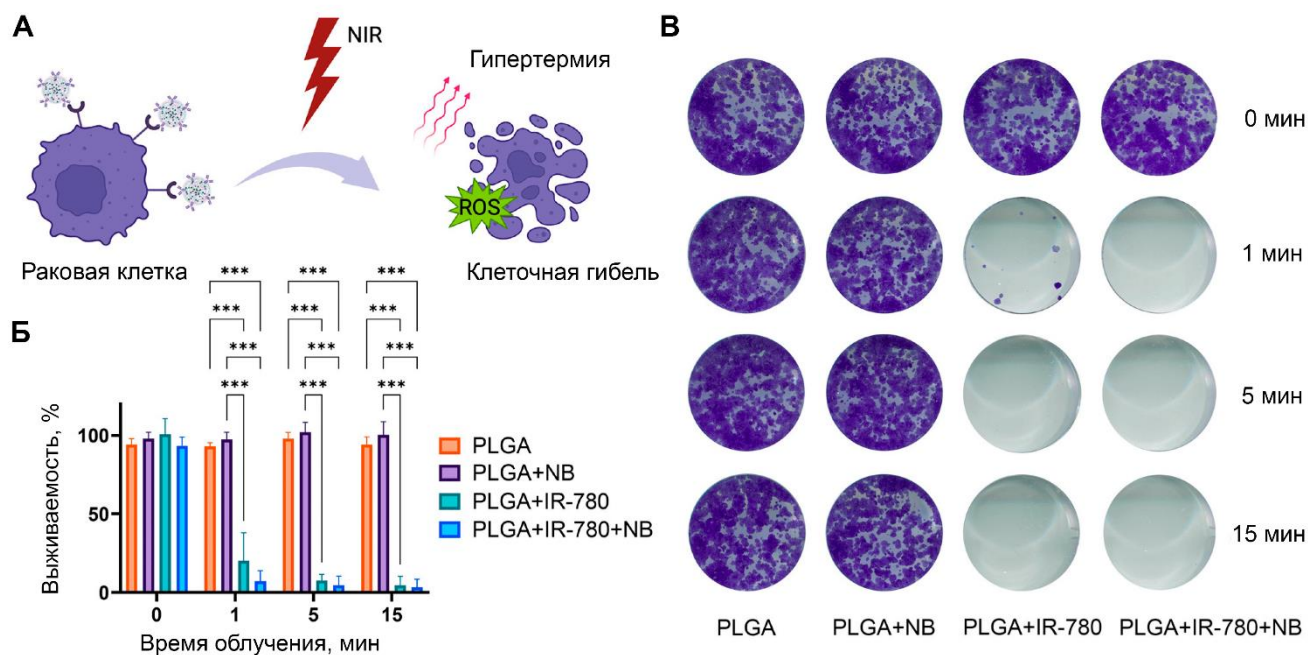


**Рисунок 14.** Специфичность связывания с HER2-положительными клетками адресных наночастиц PLGA и тесты на цитотоксичность. А) Конфокальная микроскопия клеток SK-BR-3 после инкубации с наночастицами PLGA+IR-780+NB. Б) Связывание НЧ с клетками с разным уровнем экспрессии HER2, измеренное с помощью проточной цитометрии. В) Тест на цитотоксичность НЧ, нагруженных NB, IR-780 и NB + IR-780, выполненный с помощью резазурин-теста. Необработанные клетки использовали в качестве 100%. Звездочки обозначают значения  $p$  следующим образом: 0,033 (\*), <0,001 (\*\*\*)

### 3.1.5. 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. Затем к 450 мкл клеточной суспензии добавляли 18 мкл частиц (конечная концентрация IR-780 составляла 1,2 мкМ, концентрация NB – 7 мМ). После инкубации излишки наночастиц удаляли центрифугированием, а затем клетки облучали лазером с длиной волны 808 нм при мощности 0,27 Вт.

Клетки ресуспендировали в полной 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 (Рисунок 15 А, Б).



**Рисунок 15.** Фототерапия с использованием наночастиц PLGA–IR-780–NB.

А) Направленные НЧ связываются преимущественно с раковыми клетками. БИК-облучение IR-780 приводит к локальной гипертермии и генерации АФК. Б) Резазурин-тест клеток SK-BR-3, облученных лазером 808 нм (0,27 Вт) после инкубации с PLGA+NB и/или IR-780. В) Клоногенный анализ клеток SK-BR-3, облученных лазером 808 нм (0,27 Вт) после инкубации с PLGA+NB и/или IR-780. Звездочки обозначают значения  $p$  следующим образом:  $<0,001$  (\*\*\*)

Поскольку колориметрические тесты не показали существенной разницы между эффективностью наночастиц с IR-780 и IR-780+NB, мы использовали клоногенный анализ. Клоногенный анализ помогает оценить пролиферативную активность клеток по способности образовывать колонии из одиночных клеток. 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 (Рисунок 15 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 пролиферативной активности.

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

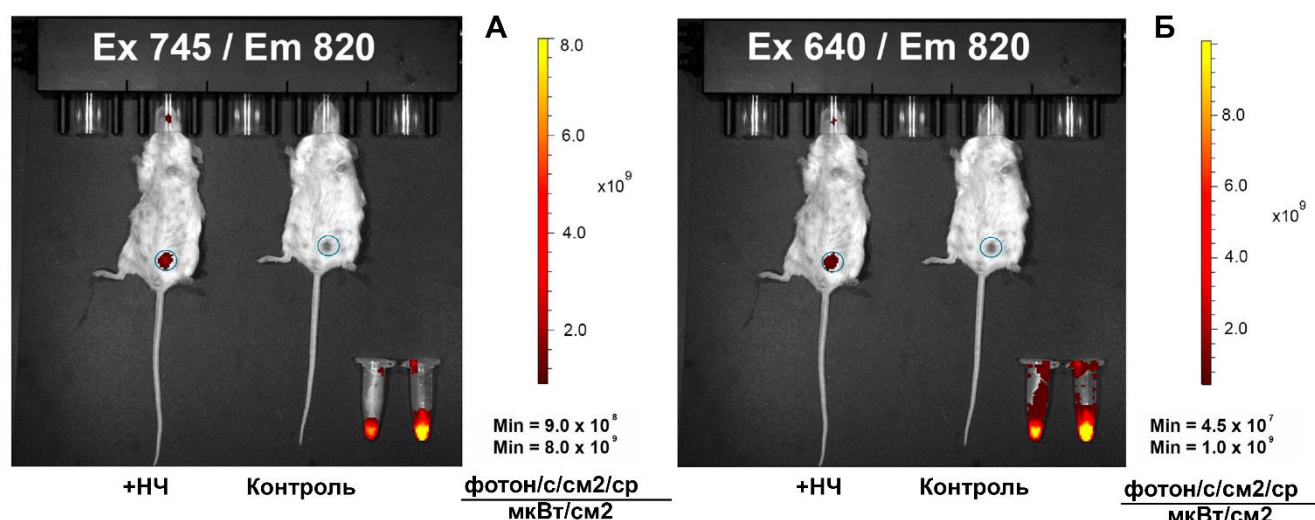
Визуализацию *in vivo* проводили на ортотопической мышинной модели рака молочной железы. Ортотопические модели опухоли могут быть более репрезентативными, чем подкожная инъекция в бок мыши, поскольку они могут более точно воспроизводить микроокружение опухоли [155,156]. EMT6/p представляет собой высококанцерогенную линию рака молочной железы у мышей. Модификация EMT6/p-HER2 позволяет исследовать таргетную терапию на неиммунодефицитных мышах.

Мышам вводили  $1 \times 10^6$  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. Флуоресценция в области опухоли значительно превышала флуоресценцию фона (Рисунок 16). Удаление шерсти не требовалось для четкой визуализации опухоли. Стоит отметить, что после внутривенного введения наночастиц острых побочных реакций не наблюдалось.

НЧ PLGA+IR-780+NB можно считать перспективными агентами для визуализации опухолей.



**Рисунок 16.** 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).

### 3.1.7. Обсуждение

Были синтезированы HER2-нацеленные наночастицы PLGA-хитозан, нагруженные двумя БИК-красителями, а именно IR-780 и NB. Полученные частицы размером около 200 нм все еще позволяют проникать в опухоль посредством EPR. При этом трастузумаб на поверхности полученных частиц обеспечивал в шесть раз более сильное связывание с HER2-положительными клетками *in vitro*. Мы полагаем, что трастузумаб позволил эффективно накапливать и удерживать наночастицы в опухолях мышей.

Методы оптической диагностики и сенсбилизации БИК и видимого света, как правило, более безопасны для тканей, чем рентгеновское облучение. Однако

они связаны с определенными ограничениями, например, с ограниченной светопрозрачностью биологических тканей. Видимый свет может проникать лишь на несколько миллиметров. Область БИК, так называемое окно биологической прозрачности, считается наиболее выгодной для диагностики. Мы получили четкие изображения небольших опухолей молочной железы с помощью оптической системы IVIS с использованием флуоресцентных фильтров (Ex 640–745/Em 800–840 нм), хотя максимум возбуждения IR-780 находится в диапазоне 780–800 нм, что расширяет диапазон возможные системы визуализации, которые можно использовать. Мы применили моноклональное антитело трастузумаб для достижения специфического связывания с клетками, сверхэкспрессирующими HER2. IR-780 продемонстрировал выдающиеся фотосенсибилизирующие способности. Благодаря синергизму ФТТ и ФДТ одной минуты облучения было достаточно для подавления пролиферативной активности клеток. Отмечено кардинально различное поведение красителя при разных режимах облучения. Высокая мощность приводила к быстрому нагреву за 1 мин для всех трех концентраций НЧ с последующим охлаждением до исходного уровня даже при непрерывном облучении. При низкой мощности лазера температурное плато, достаточное для успешной гипертермии, сохранялось не менее 10 мин. РТТ с использованием наночастиц PLGA+IR-780+NB можно проводить в более мягких условиях облучения по сравнению с золото-кремниевыми наночастицами, проходящим клинические испытания, где требуются субабляционная мощность лазера и граммовые количества НЧ [157,158].

Падение температуры при облучении лазером мощностью 1,2 Вт, вероятно, связано с фотодеградацией IR-780. Разрушение IR-780 под воздействием лазерного облучения было описано в некоторых предыдущих исследованиях. Инкапсуляция IR-780 в полимерную, белковую или липидную оболочку повышает фотостабильность и эффективность фототерапии [159–161]. Локально температура частиц может подниматься значительно выше, чем измеренная камерой. Это может привести к более быстрому высвобождению красителя и его деградации под

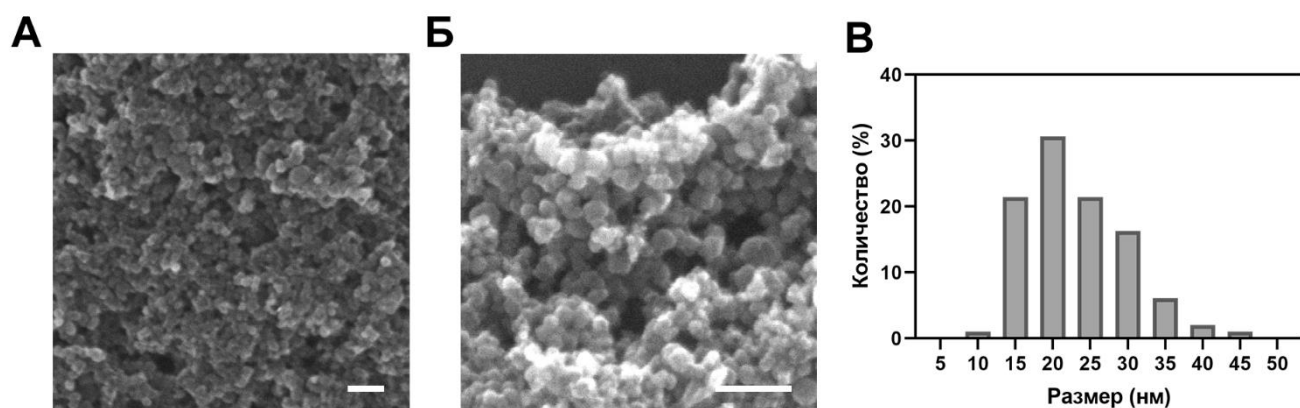


воздействием облучения. Стабильность и время высвобождения лекарственного средства можно оптимизировать путем изменения полимерного состава частиц. Соотношение гликозида и лактата влияет на температуру плавления сополимера. В ряде работ нано- и микрокапсулы PLGA использовались для термически активируемого высвобождения лекарств: а именно, путем нагревания магнитных наночастиц в магнитном поле [162,163], плазмонных частиц [164] под действием света. Свойство «плавления» наночастиц PLGA-хитозан открывает два направления для дальнейших исследований, в частности, для разработки мгновенного выброса термостабильного лекарственного средства за 1 мин под мощным лазерным воздействием либо долговременной «мягкой» гипертермии.

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

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

В работе были использованы магнитные частицы, синтезированные в лаборатории молекулярной иммунологии Колесниковой О.А. методом восстановления солей железа в микроэмульсии вода в масле. Автором данные наночастицы были исследованы методом сканирующей электронной микроскопии. Средний размер магнитных наночастиц был равен  $23,3 \pm 6,4$  нм, согласно результатам сканирующей электронной микроскопии (Рисунок 17), и  $223 \pm 111$  нм по методу гидродинамического светорассеяния. Полученные частицы не были стабильны в растворе соли и не могли применяться в физиологических условиях. Заключение ядер магнетита в полимерную оболочку позволило создать частицы, стабильные в солевых растворах и физиологических условиях, с размером  $264 \pm 113$  нм по ДРС.

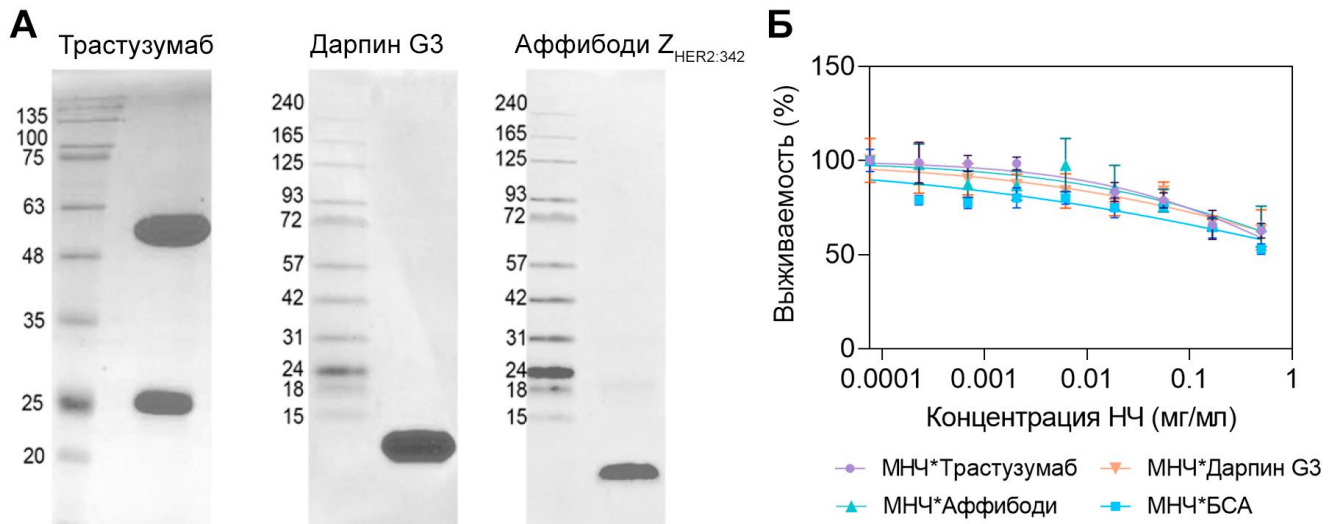


**Рисунок 17.** Характеризация магнитных наночастиц. А, Б) Сканирующая электронная микроскопия. Шкала 100 нм. В) Распределение частиц по размеру согласно СЭМ.

После покрытия карбоксиметилдекстраном наночастицы были конъюгированы с белками, специфично распознающими рецептор HER2. Первый использованный белок – полноразмерное антитело трастузумаб, применяемое в клинической практике. Трастузумаб связывает IV домен HER2 рецептора с  $K_d = 560$  pM. Второй – аффибоди  $Z_{HER2:342}$ , который связывается с соединением доменов III и IV с 22 pM. Третий – белок семейства дарпинов DARPin\_G3, который 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 или гель-фильтрации. На рисунке 18 А представлен денатурирующий гель-электрофорез белков в ПААГ.

Карбодимидную конъюгацию проводили в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Колесникова О.А.). В качестве контроля были получены наночастицы, конъюгированные с бычьим сывороточным альбумином. 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 наночастицы практически не обладали цитотоксичностью в широком диапазоне концентраций, по результатам резазурин-теста: значения IC50 составило 1,08 г/л для наночастиц, 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 (Рисунок 18 Б).



**Рисунок 18.** А) Денатурирующий электрофорез по Лэммли в 15% ПААГ. Полосы соответствуют легким и тяжелым цепям антитела. Денатурирующий электрофорез в трис-трициновой системе DARPIn\_G3 и Z<sub>HER2:342</sub>. Б) Выживаемость клеток после инкубации с конъюгатами магнитных частиц и белками.

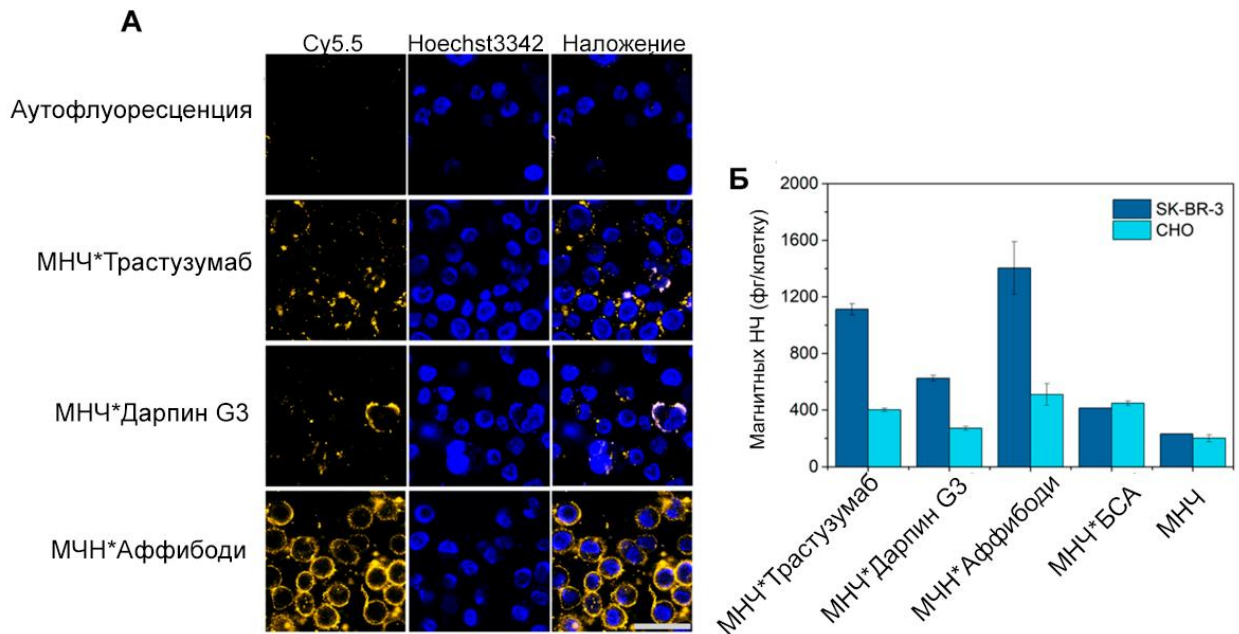
### 3.2.2. Специфичность связывания конъюгатов магнитных наночастиц с HER2 положительными раковыми клетками

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 методом MPQ-цитометрии (Magnetic Particle Quantification Cytometry) в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Шипунова В.О., Колесникова О.А.). Принцип детекции MPQ-цитометрии основан на анализе нелинейных суперпарамагнетиков, таких как магнитные наночастицы, относительно фоновых сигналов линейных диа- и парамагнетиков, таких как клетки или пластик. Согласно результатам MPQ-цитометрии, количество связавшихся наночастиц с HER2-положительными клетками SK-BR-3 составило  $1113 \pm 39$  фг/клетку для наночастиц, конъюгированных с трастузумабом,  $1431 \pm 186$  фг/клетку для НЧ с аффибоди и  $625 \pm 21$  фг/клетку для НЧ с дарпином G3. Было показано, что наиболее

эффективным для доставки наночастиц к клеткам является аффибоди (Рисунок 19 Б).

Специфичность связывания частиц с клетками подтверждали при помощи конфокальной микроскопии в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Шипунова В.О., Колесникова О.А.). Для визуализации такого взаимодействия все конъюгаты были помечены флуоресцентным красителем Cy5.5. Согласно данным конфокальной микроскопии наноконструкции с аффибоди ZHER2:342 связывались с HER2-положительными клетками эффективнее конструкций с дарпином и полноразмерным антителом (Рисунок 19 А).



**Рисунок 19.** 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 (конъюгаты наночастиц с белками). Шкала 20 мкм. Б) МРQ-цитометрический анализ связывания магнитных наночастиц клетками.

### 3.2.4. Обсуждение

Модификация наночастиц аффибоди дает возможность присоединить к поверхности частицы до 40 раз большее количество молекул до достижения

насыщения при тех же условиях конъюгации. Используя аффибоди в качестве нацеливающих агентов, можно эффективно настраивать свойства наночастиц для различных приложений, в том числе для МРТ-контрастирования, гипертермии, адресной доставки или иммуноанализа, так как в предыдущих работах было показано, что оптимально число лигандов отличается для разных применений.

Мы показали преимущество аффибоди перед трастузумабом и дарпином G3 для адресной доставки. При этом без наночастиц белки показали одинаковую эффективность связывания с HER2-положительными клетками по результатам проточной цитометрии.

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 немаловажно, что и C-, и N- концы аффибоди удалены от сайта связывания таким образом, что конъюгация не влияет на его распознающие свойства.

Стоит отметить, что большее количество лигандов на поверхности частицы не всегда означает лучшее связывание с клетками. Слишком плотная посадка лигандов на поверхности может приводить к стерическим трудностям в распознавании мишени или конкуренции между двумя лигандами. Ранее было показано, что для ряда нацеливающих молекул, таких как фолиевая кислота или аффибоди, существует колоколообразная зависимость между количеством поверхностных лигандов и их способностью специфически связываться с клетками-мишенями. При этом, основными факторами, влияющими на способность наночастицы распознавать мишень, а также интернализироваться в клетку, являлись именно свойства лиганд на поверхности наночастицы [165].

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 и связан с липидными рафтами размером около 67 нм, состоящими

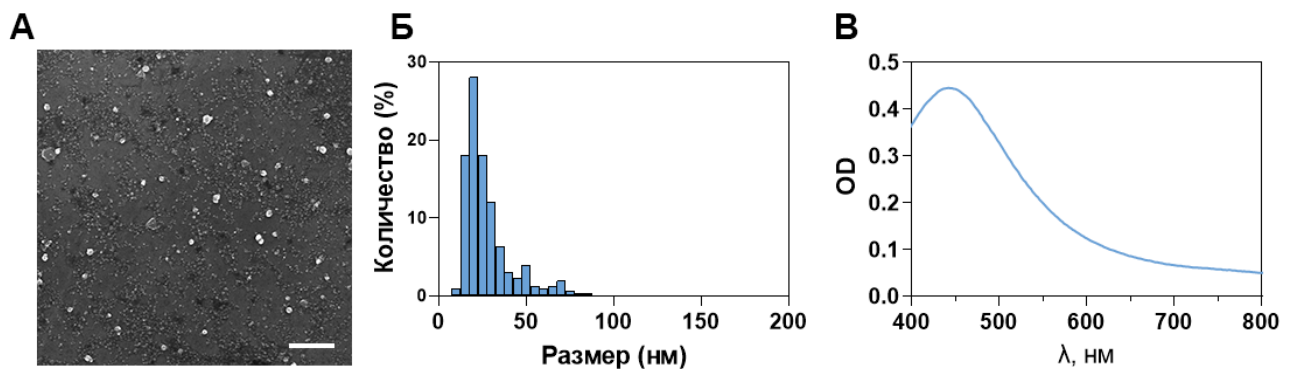
примерно из 9 рецепторов [166]. Если на такую систему направлен наноагент с низкой плотностью лиганда, то связывание, скорее всего, описывается стехиометрическим соотношением, равным 1:1. При использовании наночастиц с высокой плотностью лиганда связывание, скорее всего, будет многоточечным, что приведет к более высокой avidности такого взаимодействия. Важно отметить, что этот эффект рафтинга характерен для различных поверхностных рецепторов, например, онкомаркеров – рецепторов фолиевой кислоты и трансферрина или ICAM-1.

### 3.3. Плазмонные наночастицы серебра, модифицированные аффибоди Z<sub>342</sub>, для фототермической терапии HER2-положительных опухолей

#### 3.3.1. Характеризация плазмонных наночастиц серебра

В работе использовали наночастицы серебра, синтезированные синтезировали методом восстановления нитрата серебра вторичными метаболитами *Lavandula angustifolia* Mill в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН (Белова М.М.).

Согласно результатам сканирующей электронной микроскопии, наночастицы имели преимущественно сферическую форму и размер  $35,4 \pm 1,6$  нм (Рисунок 20 А, Б). Наночастицы имели максимум поглощения при 450 нм, обусловленный плазмонными свойствами серебра (Рисунок 20 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/см<sup>2</sup> на 10 градусов относительно воды.



**Рисунок 20.** Синтез и характеризация наночастиц серебра

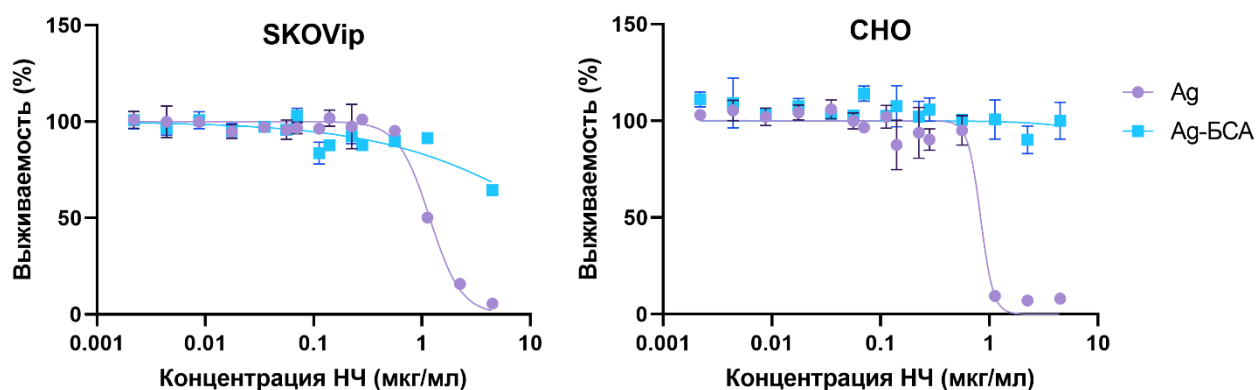
А) Сканирующая электронная микроскопия полученных наночастиц, шкала 500 нм; Б) Распределение наночастиц по размеру; В) Спектр поглощения наночастиц серебра.



### 3.3.2. Модификация поверхности наночастиц серебра

Не покрытые полимерами наночастицы проявляли неспецифичную цитотоксичность, возможно, связанную с остаточными компонентами экстракта лаванды на поверхности даже после нескольких отмывок. Однако эта проблема решалась экранированием поверхности наночастиц биосовместимыми молекулами, например, бычьим сывороточным альбумином. Действительно, покрытие поверхности наночастиц БСА значительно повысило выживаемость клеток IC50 вырос с 1,17 до 11,6 мкг/мл для клеток SKOV3-1ip и 0,55 до 116,4 мкг/мл для клеток CHO. Согласно данным МТТ теста, выживаемость клеток превысила 85% для SKOV3-1ip и 90% для клеток CHO при концентрациях частиц меньше 2 мкг/мл, при которых полученные наночастицы можно считать безопасными для клеток (Рисунок 21).

Для адресного воздействия на опухолевые клетки было предложено в качестве экранирующего слоя использовать направляющий белок неиммуноглобулиновой природы, а именно аффибоди Z<sub>HER2:342</sub>, с константой связывания с рецептором HER2 22 пМ.



**Рисунок 21.** Снижение токсичности наночастиц серебра при экранировании поверхности БСА.

Адресные наноконструкции получали путем карбодимидной конъюгации аффибоди ПЭГилированными наночастицами серебра. В качестве гибкого линкера

нами было выбрано бифункциональное производное полиэтиленгликоля метокси-ПЭГ-силан (mPEG-silane-COOH). Наличие карбоксильной группы делает возможным ковалентное присоединение белков карбодимидным методом с использованием EDC и NHS.

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-БСА наночастицы и до 10,6 раз больше, чем с HER2-отрицательными клетками.

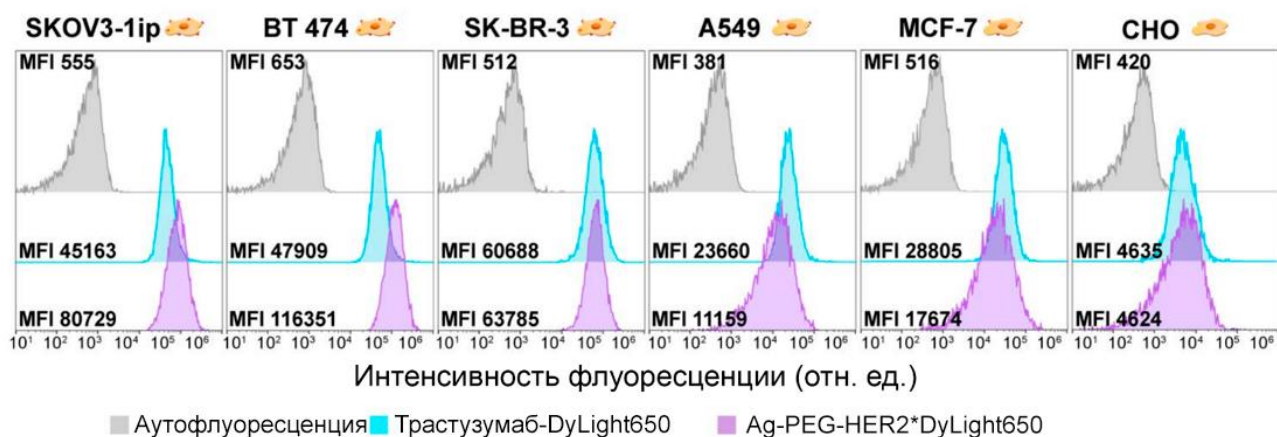
### **3.3.3. Мечение HER2-положительных раковых клеток при помощи наночастиц Ag-PEG-HER2**

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.

Клетки SKOV3-1p были помечены флуоресцентными наноконструкциями и визуализованы при помощи конфокального микроскопа. Ядра клеток окрашивали Hoechst33342. Согласно данным микроскопии, наночастицы специфично связывались с поверхностью HER2-положительных клеток и интернализировались через 2 часа инкубации.

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: SKOV3-1p, 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 (Рисунок 22).

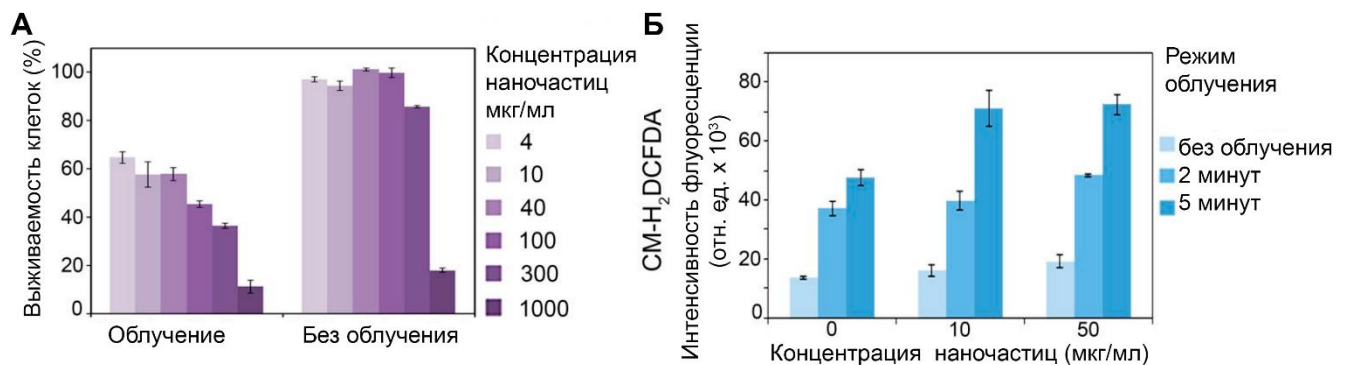


**Рисунок 22.** Проточная цитометрия клеток с различной экспрессией HER2, меченных трастузумаб-DyLight65 и Ag-PEG-HER2\*DyLight650. Серый – аутофлуоресценция, голубой – трастузумаб, сиреневый – наночастицы.

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.

### 3.3.4. Исследование фотосенсибилизирующих свойств наночастиц Ag-PEG-HER2

Полученные наночастицы использовались для адресной доставки к HER2-положительным клеткам и фотоиндуцированной гипертермии раковых клеток. Клетки инкубировали с наночастицами серебра, отмывали от несвязавшихся частиц, 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 (Рисунок 23 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<sub>2</sub>DCFDA. CM-H<sub>2</sub>DCFDA может пассивно проникать в клетки, где его ацетатные группы расщепляются внутриклеточными эстеразами, последующее окисление приводит к образованию флуоресцентной производной, интенсивность флуоресценции при этом может служить для оценки количества активных форм кислорода в клетке. Максимальная интенсивность флуоресценции для клеток с частицами, облученных в течение 5 минут, в 4,4 раза превысила флуоресценцию контрольных образцов (Рисунок 23 Б).



**Рисунок 23.** А) Выживаемость клеток SKOV3-1p в зависимости от концентрации адресных наночастиц и режима облучения по данным МТТ-теста. Б) Генерация активных форм кислорода под действием синего света клеток с наночастицами серебра по данным проточной цитометрии с индикатором окислительного стресса.

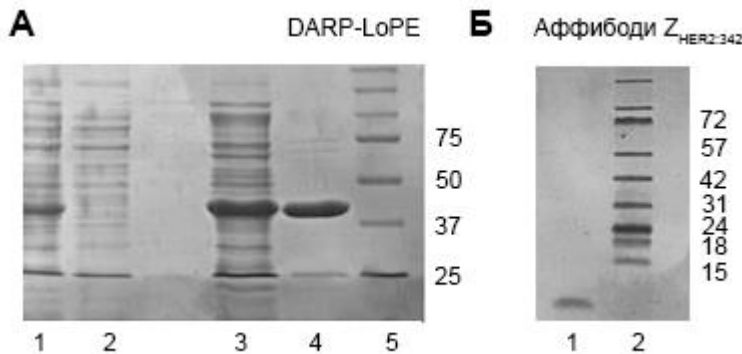
Для направленного воздействия на раковые клетки наночастицы серебра были конъюгированы с каркасным полипептидом, аффибоди  $Z_{HER2:342}$ , который распознает клинически значимый онкомаркер HER2. Конъюгацию осуществляли с помощью ПЭГ линкера. Тесты проточной цитометрии показали, что частицы Ag-PEG-HER2 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.

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

#### 3.4.1. Выделение рекомбинантных белков иммунотоксина DARP-LoPE и аффибоди Z<sub>HER2:342</sub>

Был выделен в бактериальной системе и очищен методами аффинной хроматографии рекомбинантный иммунотоксин DARP-LoPE (Рисунок 24 А). Этот агент состоит из каркасного белка DARP<sub>in9.29</sub>, который связывается с доменом I рецептора HER2, и низкоиммуногенной модификации экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* (LoPE), который блокирует эукариотический фактор элонгации II. DARP-LoPE обладает высокой эффективностью для HER2-положительных клеток.

Был выделен в бактериальной системе и очищен методами аффинной хроматографии белок аффибоди Z<sub>HER2:342</sub>, связывающийся с внеклеточной частью HER2 рецептора между субдоменами III и IV (Рисунок 24 Б).

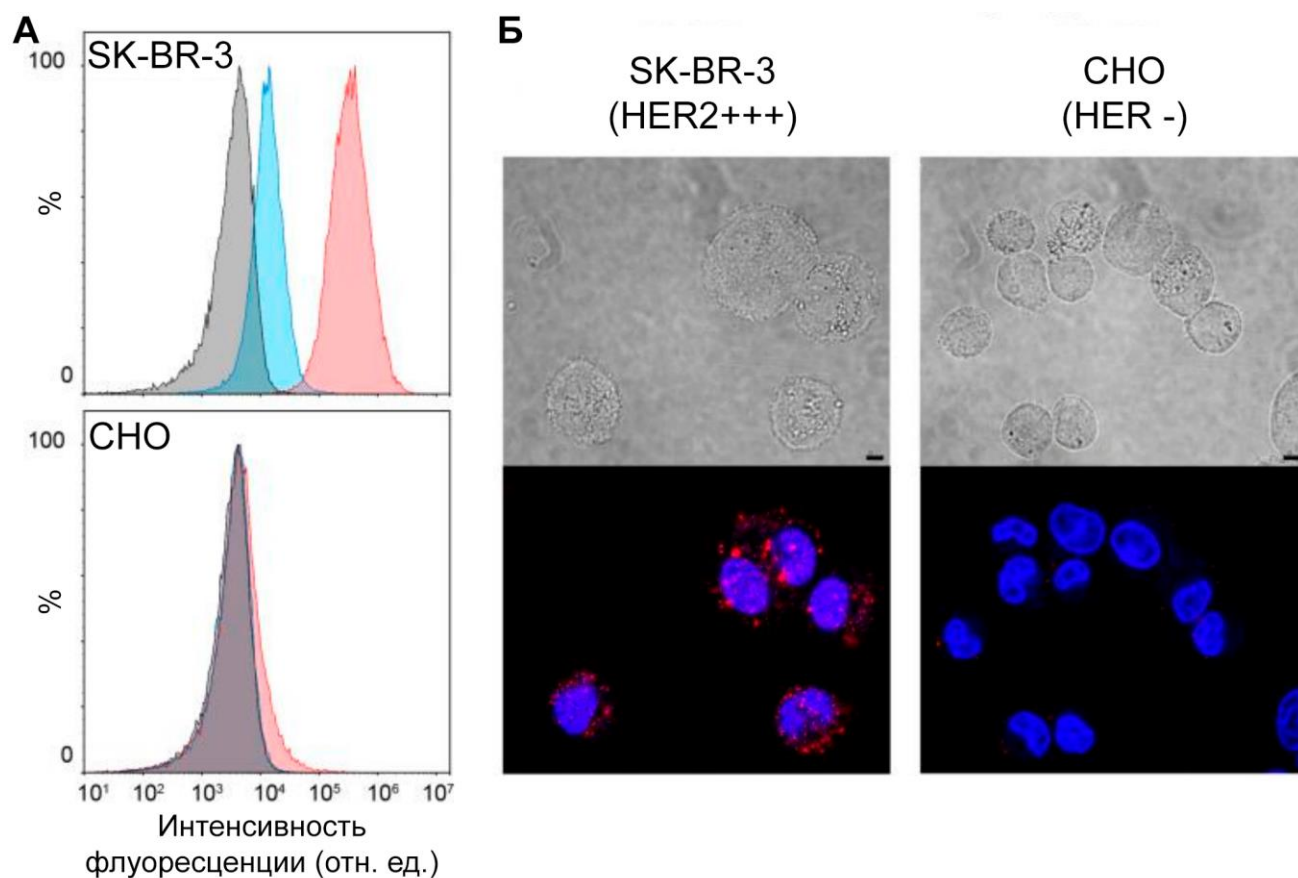


**Рисунок 24.** А) Денатурирующий электрофорез DARP-LoPE в 15% ПААГ. 1 – суммарный лизат бактерий после индукции, 2 – суммарный лизат бактерий до индукции, 3 – растворимая фракция, нанесенная на колонку, 4 – выделенный белок, 5 – белковый маркер. Б) Денатурирующий электрофорез аффибоди в тристрициновой системе: 1 – белок, элюированный 150 мМ имидазола; 2 – белковый маркер.

### 3.4.2. Наночастицы PLGA-аффибоди для направленного воздействия на HER2-положительные клетки

Полученный белок аффибоди использовали для создания адресных противораковых наночастиц. Синтез, конъюгацию и характеризацию 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  $186 \pm 65$  нм, согласно ДРС, в то время как  $\zeta$ -потенциал составил  $-23,4 \pm 1,4$  мВ в 10 мМ  $\text{KNO}_3$ .

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 (Рисунок 25 А). С помощью конфокальной микроскопии было показано специфичное связывание полученных конструкций с раковыми клетками со сверхэкспрессией HER2, успешная визуализация клеток *in vitro* и интернализация частиц в клетку после связывания (Рисунок 25 Б).



**Рисунок 25.** 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 наночастиц клетками SK-BR-3, но не клетками CHO. Синий – Hoechst 33342 (ядра клеток), красный – NR (PLGA\*DOX\*аффибоди).

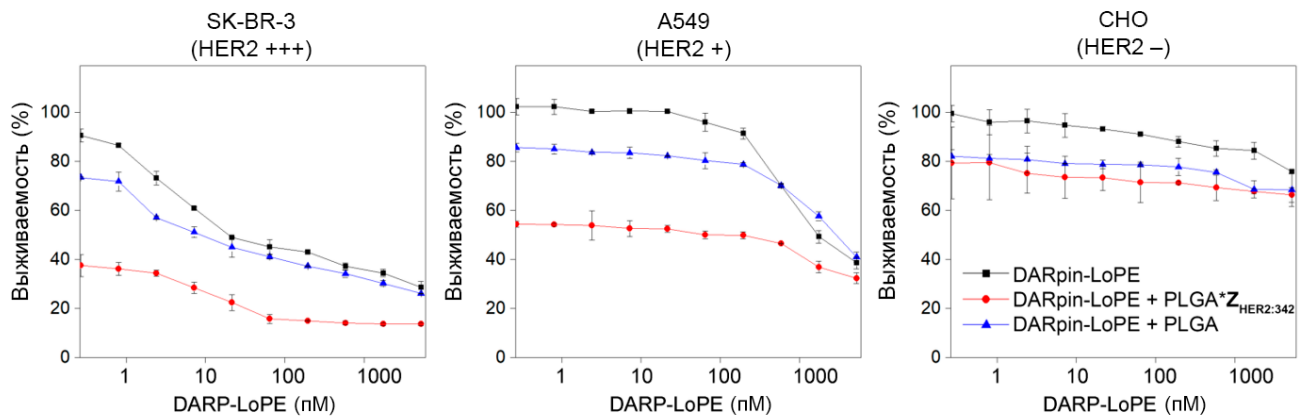
### **3.4.5. Комбинированное воздействие наночастиц PLGA\*DOX\*аффибоди и иммунотоксина *in vitro*.**

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 (Рисунок 26). Комбинированное действие двух нацеленных агентов позволило на три порядка снизить эффективную концентрацию иммунотоксина *in vitro*.



**Рисунок 26.** 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-).

### **3.5. Метод модификации наночастиц магнетита с использованием магнетит-связывающего белка и белковой пары барназа-барстар для специфического воздействия на HER2-положительные клетки**

#### **3.5.1 Выделение и очистка белка Bs-C-Mms6**

Был получен рекомбинантный белок Bs-C-Mms6. Mms6, пептид из магнитотактической бактерии АМВ-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.

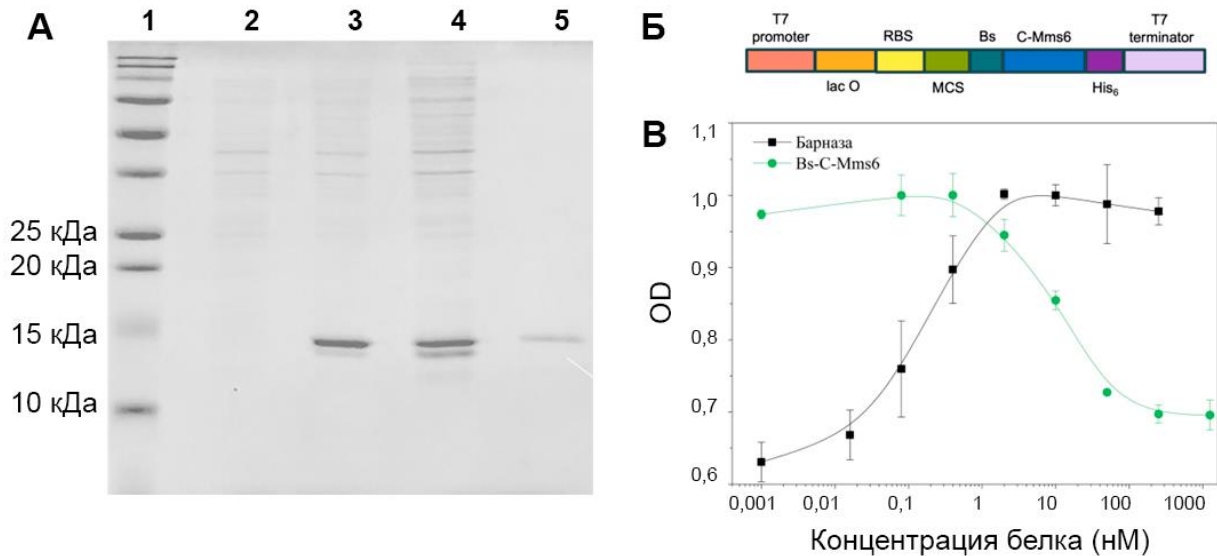
Для выделения белка были получены компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3). Компетентные клетки были трансформированы методом теплового шока плазмидой рЕТ22\_Bs-C-Mms6 (лаборатория молекулярной иммунологии ИБХ РАН), в которой ген, кодирующий целевой белок Bs-C-Mms6, находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы бактериофага Т7 и *lac*-оператора (Рисунок 27 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 (Рисунок 27 А).

#### **3.5.2. Проверка активности белка Bs-C-Mms6**

Полученный рекомбинантный белок должен сохранять способность барстара связывать барназу. Специфичность белка была показана по ингибированию рибонуклеазной активности барназы.

Рибонуклеазная активность барназы определялась методом кислотно-нерастворимого осадка. Барназу в различных концентрациях инкубировали с раствором дрожжевой РНК и останавливали реакцию хлорной кислотой. Осадок крупных молекул РНК отделяли центрифугированием и измеряли оптическую плотность супернатанта. Таким образом подобрали концентрацию барназы (2 мМ) дальнейших измерений в линейном диапазоне.

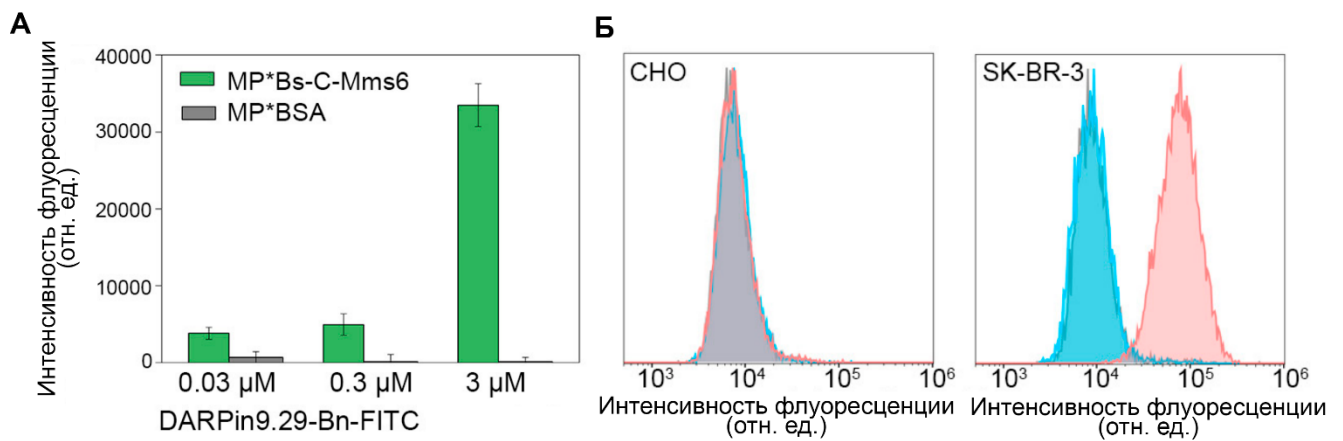
Затем измерили активность барназы в присутствии нескольких концентраций Bs-C-Mms6. Bs-C-Mms6 показал способность ингибировать ферментативную активность барназы, а значит и специфично связываться с ней (Рисунок 27 В).



**Рисунок 27.** А) Денатурирующий электрофорез в 15% ПААГ. 1 – маркер, 2 – проба до индукции, 3 – после индукции целевого белка, 4 – нанесение на колонку, 5 – чистый белок. Б) Схемы области клонирования вектора pETBsC-Mms6: RBS (ribosome binding site) – сайт связывания рибосомы, MCS (multiple cloning site) – полилинкер, His<sub>6</sub> – гистидиновая метка. В) Определение рибонуклеазной активности барназы методом кислотно-нерастворимого осадка. Активность Bs-C-Mms6 определяли по его способности ингибировать ферментативную активность барназы. Черная линия, квадраты – барназа, зеленая линия, круги - Bs-C-Mms6.

### 3.5.3 Специфичная сборка белкового модуля барназа-барстар на поверхности клеток

Далее была продемонстрирована способность сборки Bs-C-Mms6 с барназой на поверхности клеток. Для этого мы выбрали линию клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующую рецептор HER2, и клетки яичников китайского хомячка CHO без этого рецептора. В качестве направляющей молекулы мы использовали белок слияния барназы и DARPin.9.29, высокоаффинно распознающего рецептор HER2 ( $K_D = 3,8 \text{ нМ}$ ).



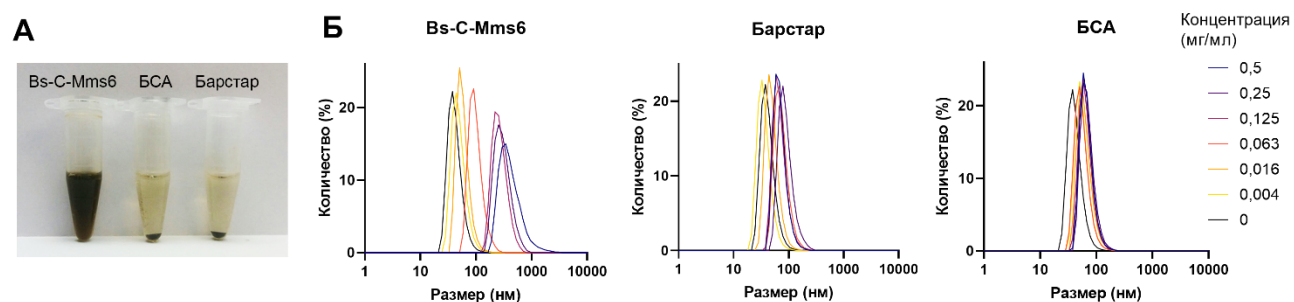
**Рисунок 28.** А) Интенсивность флуоресценции частиц, предварительно модифицированных Bs-C-Mms6 или БСА, после инкубации с различными концентрациями DARPin9.29-Bn\*ФИТЦ. Б) Сборка конструкции DARPin9.29-Bn\*Bs-Mms6\*ФИТЦ на поверхности клеток. Данные проточной цитофлуориметрии. Серые гистограммы – аутофлуоресценция клеток, голубые – клетки, инкубированные только с DARPin9.29-Bn, розовые – клетки, инкубированные последовательно с DARPin9.29-Bn и Bs-Mms6\*ФИТЦ.

В следующем эксперименте клетки SK-BR-3 и CHO сначала инкубировали с DARPin.9.29-Bn на льду для предотвращения интернализации, а после отмывки добавляли к клеткам конъюгат Bs-C-Mms6 и флуоресцеин изотиоцианата. 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

(Рисунок 28 Б). Это доказывает возможность сборки 2 белковых модулей на поверхности клеток и отсутствие заметного неспецифического взаимодействия Vs-C-Mms6 с клетками.

### 3.5.4. Получение стабильных наночастиц МЧ\*Vs–C–Mms6

Наночастицы магнетита (МЧ) были синтезированы методом копреципитации солей железа  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в щелочных условиях. Далее частицы были инкубированы с различными концентрациями белков Vs-C-Mms6, барстара и бычьего сывороточного альбумина. Размер частиц был измерен методом гидродинамического светорассеяния (Zetasizer, Malvern) совместно с Шипуновой В.О. В дальнейшем были использованы частицы  $137 \pm 38$  нм (Рисунок 29 Б).



**Рисунок 29.** А) Фотография наночастиц, модифицированных Vs-C-Mms6, БСА и барстаром в натрий-фосфатном буфере. Только Vs-C-Mms6 стабилизирует частицы. Б) Распределение по размерам наночастиц, модифицированных Vs-C-Mms6, барстаром и БСА, полученное методом гидродинамического светорассеяния на анализаторе наночастиц Zetasizer ZS (Malvern).

После инкубации с контрольными белками (барстаром и БСА) размер частиц увеличивался, однако в фосфатно-солевом буфере они агрегировали в течение нескольких минут (Рисунок 29 А). Связывание с Vs-C-Mms6 наиболее заметно увеличивало размер частиц пропорционально концентрации Vs-C-Mms6. При этом только Vs-C-Mms6 показал способность стабилизировать наночастицы. МЧ

сохраняли устойчивость к агрегации и седиментации в воде и в фосфатно-солевом буфере как минимум в течение двух месяцев.

Таким образом, нам удалось получить стабильные в фосфатно-солевом буфере наночастицы магнетита, модифицированные белком без предварительного покрытия полимерами и применения методов химической конъюгации.

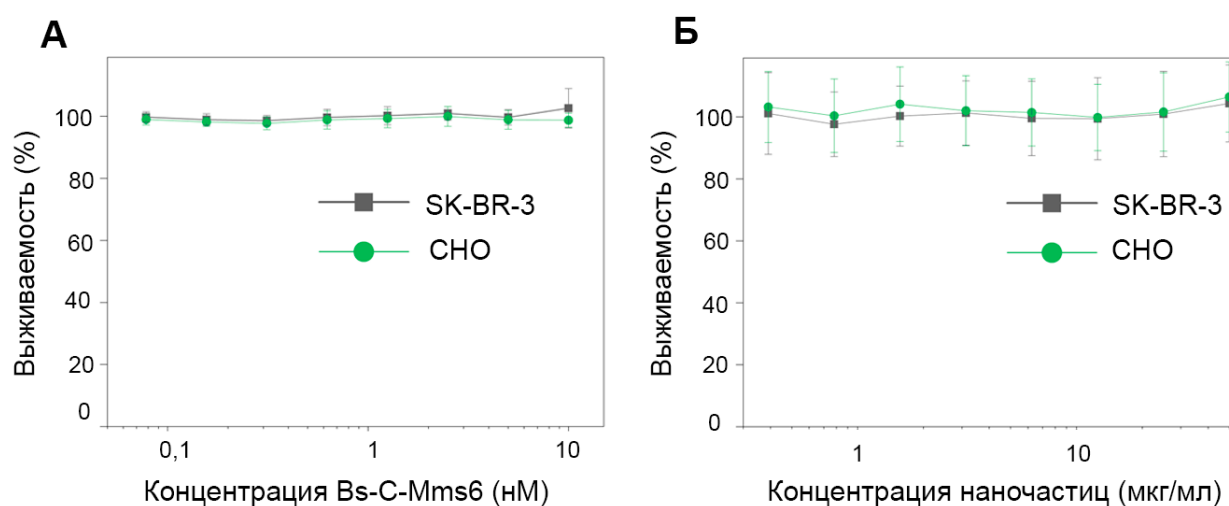
### **3.5.5. Специфичная сборка белкового модуля барназа-барстар на поверхности наночастиц**

Далее нами было показано, что белок сохраняет способность связывать барназу и на поверхности наночастиц магнетита. Для этого частицы магнетита, модифицированные Bs-C-Mms6 и БСА (в качестве контроля), инкубировали с DARPin.9.29-Vn, конъюгированным с флуоресцеин изотиоцианатом. После отмывки измеряли флуоресценцию частиц. Интенсивность флуоресценции МЧ, модифицированных Bs-C-Mms6, значительно превышала интенсивность флуоресценции контрольных частиц и возрастала пропорционально концентрации добавленного конъюгата (Рисунок 28 А). Это подтверждает связывание Bs-C-Mms6 с магнетитом, способность специфичной сборки белковой пары на поверхности наночастиц и ее возможность выступать «адаптером» в нашей модульной системе.

### **3.5.6. Оценка биосовместимости белка Bs-C-Mms6 и модифицированных им наночастиц магнетита**

Для дальнейшего применения белка в тераностике важно, чтобы он сам не оказывал цитотоксического действия. Для оценки токсичности белка был поставлен МТТ-тест с белком в концентрации от 10 мкМ до 0,08 мкМ на 2 линиях эукариотических клеток: SK-BR-3 и CHO. В широком диапазоне концентраций белок не оказал заметного влияния на выживаемость клеток (Рисунок 30 А).

Для проверки потенциальной цитотоксичности модифицированных частиц был проведен МТТ-тест с 2 линиями эукариотических клеток: SK-BR-3 и CHO. В широком диапазоне концентраций частицы с Vs-C-Mms6 не оказали токсического действия на клетки (Рисунок 30 Б).



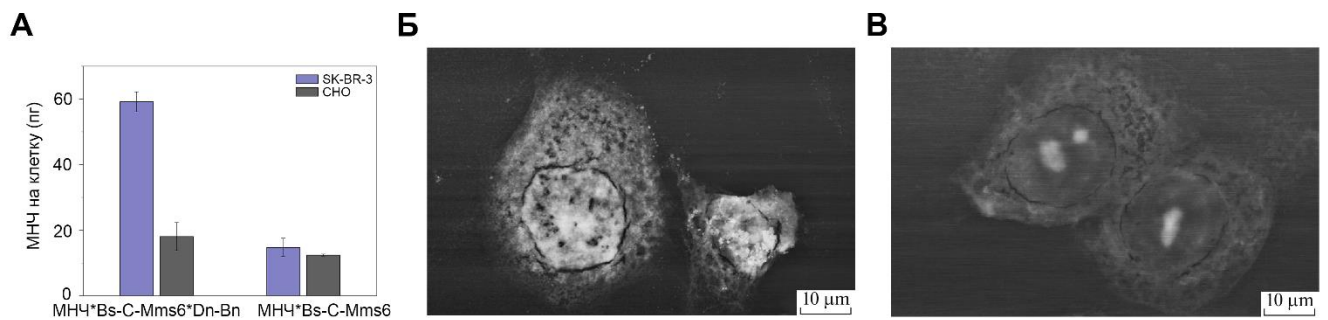
**Рисунок 30.** А) Биосовместимость белка Vs-C-Mms6 *in vitro*. Данные МТТ-теста. Серая линия, квадраты – SK-BR-3, зеленая линия, круги – CHO. Б) Биосовместимость *in vitro* наночастиц магнетита, модифицированных белком Vs-C-Mms6. Данные МТТ-теста. Серая линия, квадраты – SK-BR-3. Зеленая линия, круги – CHO.

### 3.5.7. Связывание МЧ\*Vs-C-Mms6\*DARPin9.29-Vn с клетками со сверхэкспрессией рецептора HER2

Наконец, в работе была продемонстрирована возможность специфического связывания полной конструкции с клетками.

Меченые полученными структурами клетки были визуализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии лантаноидным контрастированием И.А. Новиковым (ФГБНУ "НИИГБ") (Рисунок 31 Б, В).

Количество частиц, связавшихся с клетками, было оценено методом МРQ-цитометрии. С клетками SK-BR-3 связалось  $59 \pm 3$  фг/клетку, с контрольными клетками CHO –  $18 \pm 4$  фг/клетку. Таким образом, полученные конструкции МЧ\*Bs–C–Mms6\*DARPin9.9–Bn показали более чем в 3 раза специфичное связывание с раковыми клетками, гиперэкспрессирующими рецептор HER2. (Рисунок 31 А).



**Рисунок 31.** 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.

Эффективность распознавания дарпинов на поверхности наночастиц можно улучшить при помощи линкера, например, белковой пары барназа-барстар. Охарактеризован новый способ модификации наночастиц магнетита. Получен белок слияния С-концевой части белка магнитотактических бактерий Mms6 и барстара (далее Bs–C–Mms6). Наночастицы магнетита были модифицированы белком Bs–Mms6 без предварительного покрытия полимером и химической конъюгации. Bs–C–Mms6 показал способность стабилизировать наночастицы магнетита в воде и фосфатно-солевом буфере. Показано, что Bs–C–Mms6 и модифицированные им частицы в широком диапазоне концентраций не оказывают цитотоксического действия. Продемонстрирована возможность сборки полученных тераностических агентов на поверхности раковых клеток. 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-положительными 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.

## **Благодарности**

Автор выражает глубокую благодарность соавторам исследований, особенно Дееву С.М., Шипуновой В.О., Комедчиковой Е.Н., Колесниковой О.А., Беловой М.М., и всему коллективу лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН.

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

### Список использованных сокращений

ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)

Bn – барназа (barnase)

Bs – барстар (barstar)

DARPin - Designed Ankyrin Repeat Protein, искусственные белки с анкириновыми повторами

DOTA – Tetraxetan, 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid

DOX – доксорубицин (doxorubicin)

EDC– гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor)

EMA – Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency)

EpCAM – молекула клеточной адгезии эпителия (Epithelial cell adhesion molecule)

EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания (enhanced permeability and retention effect)

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration)

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2 (human epidermal growth factor receptor 2)

MFI – медианная интенсивность флуоресценции (Median fluorescence intensity)

MPQ – количественная оценка магнитных частиц (Magnetic Particle Quantification)

NB – нильский голубой (Nile Blue)

NHS – N-Гидроксисукцинимид (N-hydroxysuccinimide)

NIR – ближний инфракрасный (near-infrared)

NK – естественные киллеры (Natural killer cells)

NR – нильский красный (Nile Red)

PE – псевдомонадный экзотоксин А (Pseudomonas exotoxin A)  
PEG – полиэтиленгликоль (polyethylene glycol)  
PLGA – полилактид-ко-гликолид (poly(lactic-co-glycolic acid))  
PVA – поливиниловый спирт (polyvinyl alcohol)  
SBP – пептиды, специфично связывающие оксид кремния (SiO<sub>2</sub>-binding peptide)  
SDS – додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)  
Tf – трансферрин  
vWF – фактор фон Виллебранда  
АФК – активные формы кислорода  
БИК – ближний инфракрасный диапазон  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
ГКГС – главный комплекс гистосовместимости  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ДРС – динамическое рассеяние света  
ЗМП – злокачественная мезотелиома плевры  
ИК – инфракрасный  
КТ – компьютерная томография  
МНЧ – магнитные наночастицы  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
МРТ – магнитно-резонансная томография  
МЧ – наночастицы магнетита  
НМРЛ – немелкоклеточный рак легких  
НЧ – наночастицы  
НЧ – наночастицы  
ПМК – полимолочная кислота  
ПСМА – простатспецифический мембранный антиген  
ПЭГ – полиэтиленгликоль  
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография  
РМПС – рак мочевого пузыря

РЭС – ретикуло-эндотелиальная система

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФИТЦ – флуоресцеина изотиоцианат

ФТТ – фототермическая терапия

**Список литературы**

1. Wicki A. et al. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. // *J Control Release*. 2015. Vol. 200. P. 138–157.
2. Rodríguez F. et al. Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges // *Biomolecules*. 2022. Vol. 12, № 6. P. 784.
3. Fan D. et al. Nanomedicine in cancer therapy. // *Signal Transduct Target Ther*. 2023. Vol. 8, № 1. P. 293.
4. van Zandwijk N. et al. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. // *Lancet Oncol*. 2017. Vol. 18, № 10. P. 1386–1396.
5. Mamot C. et al. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. // *Lancet Oncol*. 2012. Vol. 13, № 12. P. 1234–1241.
6. Sankhala K.K. et al. A phase I pharmacokinetic (PK) study of MBP-426, a novel liposome encapsulated oxaliplatin // *Journal of Clinical Oncology*. 2009. Vol. 27, № 15\_suppl. P. 2535–2535.
7. Zuckerman J.E. et al. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. Vol. 111, № 31. P. 11449–11454.
8. Aftimos P.G. et al. Abstract P6-16-04: Phase 1/2a study of glutathione PEGylated liposomal doxorubicin (2B3-101) in breast cancer patients with brain metastases // *Cancer Res*. 2015. Vol. 75, № 9\_Supplement. P. P6-16-04-P6-16-04.
9. Ståhl S. et al. Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications. // *Trends Biotechnol*. 2017. Vol. 35, № 8. P. 691–712.
10. Stumpp M.T., Dawson K.M., Binz H.K. Beyond Antibodies: The DARPin® Drug Platform. // *BioDrugs*. 2020. Vol. 34, № 4. P. 423–433.

11. Shipunova V.O., Deyev S.M. Artificial Scaffold Polypeptides As an Efficient Tool for the Targeted Delivery of Nanostructures In Vitro and In Vivo // *Acta Naturae*. 2022. Vol. 14, № 1. P. 54–72.
12. Tolmachev V., Vorobyeva A. Radionuclides in Diagnostics and Therapy of Malignant Tumors: New Development. // *Cancers (Basel)*. 2022. Vol. 14, № 2.
13. Bragina O. et al. Phase I clinical evaluation of <sup>99m</sup>Tc-labeled Affibody molecule for imaging HER2 expression in breast cancer. // *Theranostics*. 2023. Vol. 13, № 14. P. 4858–4871.
14. Klint S. et al. Izokibep: Preclinical development and first-in-human study of a novel IL-17A neutralizing Affibody molecule in patients with plaque psoriasis // *MAbs*. 2023. Vol. 15, № 1.
15. Anselmo A.C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update // *Bioeng Transl Med*. 2019. Vol. 4, № 3.
16. Anselmo A.C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. // *Bioeng Transl Med*. 2016. Vol. 1, № 1. P. 10–29.
17. Faraji A.H., Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. // *Bioorg Med Chem*. 2009. Vol. 17, № 8. P. 2950–2962.
18. Singh A., Sahoo S.K. Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. // *Drug Discov Today*. 2014. Vol. 19, № 4. P. 474–481.
19. Liu Y.-L. et al. A review of magnet systems for targeted drug delivery. // *J Control Release*. 2019. Vol. 302. P. 90–104.
20. Das P., Colombo M., Prospero D. Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019. Vol. 174. P. 42–55.
21. Wu K. et al. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. // *Nanotechnology*. 2019. Vol. 30, № 50. P. 502003.
22. Weizenecker J. et al. Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging. // *Phys Med Biol*. 2009. Vol. 54, № 5. P. L1–L10.
23. Wu L.C. et al. A Review of Magnetic Particle Imaging and Perspectives on Neuroimaging. // *AJNR Am J Neuroradiol*. 2019. Vol. 40, № 2. P. 206–212.

24. Giustini A.J. et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. // *Nano Life*. 2010. Vol. 1, № 1n02.
25. Phung D.C. et al. Combined hyperthermia and chemotherapy as a synergistic anticancer treatment // *J Pharm Investig*. 2019. Vol. 49, № 5. P. 519–526.
26. Datta N.R. et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future // *Cancer Treat Rev*. 2015. Vol. 41, № 9. P. 742–753.
27. Purushotham S., Ramanujan R. V. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. // *Acta Biomater*. 2010. Vol. 6, № 2. P. 502–510.
28. Hu S.-H. et al. Core-shell nanocapsules stabilized by single-component polymer and nanoparticles for magneto-chemotherapy/hyperthermia with multiple drugs. // *Adv Mater*. 2012. Vol. 24, № 27. P. 3627–3632.
29. Chen R. et al. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. // *Science*. 2015. Vol. 347, № 6229. P. 1477–1480.
30. Mykhaylyk O. et al. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. // *Nat Protoc*. 2007. Vol. 2, № 10. P. 2391–2411.
31. Curley S.A. et al. Noninvasive radiofrequency field-induced hyperthermic cytotoxicity in human cancer cells using cetuximab-targeted gold nanoparticles. // *J Exp Ther Oncol*. 2008. Vol. 7, № 4. P. 313–326.
32. Proshkina G. et al. DARPin<sub>9-29</sub>-Targeted Mini Gold Nanorods Specifically Eliminate HER2-Overexpressing Cancer Cells. // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019. Vol. 11, № 38. P. 34645–34651.
33. Jang B. et al. Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo. // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 2. P. 1086–1094.
34. Choi W. Il et al. Tumor regression in vivo by photothermal therapy based on gold-nanorod-loaded, functional nanocarriers. // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 3. P. 1995–2003.



35. Melancon M.P. et al. In vitro and in vivo targeting of hollow gold nanoshells directed at epidermal growth factor receptor for photothermal ablation therapy. // *Mol Cancer Ther.* 2008. Vol. 7, № 6. P. 1730–1739.
36. Boca S.C. et al. Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy. // *Cancer Lett.* 2011. Vol. 311, № 2. P. 131–140.
37. Thompson E.A. et al. Differential response of MCF7, MDA-MB-231, and MCF 10A cells to hyperthermia, silver nanoparticles and silver nanoparticle-induced photothermal therapy. // *Int J Hyperthermia.* 2014. Vol. 30, № 5. P. 312–323.
38. Bian K. et al. Peptide-Directed Hierarchical Mineralized Silver Nanocages for Anti-Tumor Photothermal Therapy // *ACS Sustain Chem Eng.* 2018. Vol. 6, № 6. P. 7574–7588.
39. Wu P. et al. High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high SERS active aptamer-silver-gold shell-core nanostructures. // *Analyst.* 2013. Vol. 138, № 21. P. 6501–6510.
40. Wu P. et al. Aptamer-guided silver-gold bimetallic nanostructures with highly active surface-enhanced Raman scattering for specific detection and near-infrared photothermal therapy of human breast cancer cells. // *Anal Chem.* 2012. Vol. 84, № 18. P. 7692–7699.
41. Cheng L.-C. et al. Seedless, silver-induced synthesis of star-shaped gold/silver bimetallic nanoparticles as high efficiency photothermal therapy reagent // *J. Mater. Chem.* 2012. Vol. 22, № 5. P. 2244–2253.
42. Stern J.M. et al. Initial Evaluation of the Safety of Nanoshell-Directed Photothermal Therapy in the Treatment of Prostate Disease. // *Int J Toxicol.* 2016. Vol. 35, № 1. P. 38–46.
43. Ramalingam V. et al. Gold nanoparticle induces mitochondria-mediated apoptosis and cell cycle arrest in nonsmall cell lung cancer cells // *Gold Bull.* 2017. Vol. 50, № 2. P. 177–189.

44. Carnovale C. et al. Identifying Trends in Gold Nanoparticle Toxicity and Uptake: Size, Shape, Capping Ligand, and Biological Corona // *ACS Omega*. 2019. Vol. 4, № 1. P. 242–256.
45. Guo D. et al. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34, № 32. P. 7884–7894.
46. Liu J. et al. TAT-modified nanosilver for combating multidrug-resistant cancer. // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, № 26. P. 6155–6161.
47. Singh R.P., Ramarao P. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. // *Toxicol Lett*. 2012. Vol. 213, № 2. P. 249–259.
48. Beer C. et al. Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion? // *Toxicol Lett*. 2012. Vol. 208, № 3. P. 286–292.
49. AshaRani P. V et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. // *ACS Nano*. 2009. Vol. 3, № 2. P. 279–290.
50. Park E.-J. et al. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. // *Toxicol In Vitro*. 2010. Vol. 24, № 3. P. 872–878.
51. Chairuankitti P. et al. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. // *Toxicol In Vitro*. 2013. Vol. 27, № 1. P. 330–338.
52. Wang Z. et al. Janus Silver/Silica Nanoplatfoms for Light-Activated Liver Cancer Chemo/Photothermal Therapy. // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017. Vol. 9, № 36. P. 30306–30317.
53. Vankayala R. et al. Morphology dependent photosensitization and formation of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) by gold and silver nanoparticles and its application in cancer treatment. // *J Mater Chem B*. 2013. Vol. 1, № 35. P. 4379–4387.
54. Zhang Y. et al. Metal-enhanced Singlet Oxygen Generation: A Consequence of Plasmon Enhanced Triplet Yields // *J Fluoresc*. 2007. Vol. 17, № 4. P. 345–349.
55. Zhang Y. et al. Plasmonic engineering of singlet oxygen generation. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, № 6. P. 1798–1802.

56. Mooi S.M., Heyne B. Amplified Production of Singlet Oxygen in Aqueous Solution Using Metal Enhancement Effects. // *Photochem Photobiol.* 2014. Vol. 90, № 1. P. 85–91.
57. Rivas Aiello M.B. et al. Photodynamic Therapy in HeLa Cells Incubated with Riboflavin and Pectin-coated Silver Nanoparticles. // *Photochem Photobiol.* 2018. Vol. 94, № 6. P. 1159–1166.
58. Rivas Aiello M.B. et al. Correction to “Effect of Silver Nanoparticles on the Photophysics of Riboflavin: Consequences on the ROS Generation” // *The Journal of Physical Chemistry C.* 2016. Vol. 120, № 44. P. 25638–25638.
59. Curry A.C., Crow M., Wax A. Molecular imaging of epidermal growth factor receptor in live cells with refractive index sensitivity using dark-field microspectroscopy and immunotargeted nanoparticles // *J Biomed Opt.* 2008. Vol. 13, № 1. P. 014022.
60. Rodríguez-Fajardo V. et al. Two-color dark-field (TCDF) microscopy for metal nanoparticle imaging inside cells. // *Nanoscale.* 2018. Vol. 10, № 8. P. 4019–4027.
61. Rong G., Wang H., Reinhard B.M. Insights from a nanoparticle minuet: two-dimensional membrane profiling through silver plasmon ruler tracking. // *Nano Lett.* 2010. Vol. 10, № 1. P. 230–238.
62. Donnelly E.M. et al. Photoacoustic Image-Guided Delivery of Plasmonic-Nanoparticle-Labeled Mesenchymal Stem Cells to the Spinal Cord. // *Nano Lett.* 2018. Vol. 18, № 10. P. 6625–6632.
63. Comenge J. et al. Preventing Plasmon Coupling between Gold Nanorods Improves the Sensitivity of Photoacoustic Detection of Labeled Stem Cells in Vivo. // *ACS Nano.* 2016. Vol. 10, № 7. P. 7106–7116.
64. Joshi M.D., Patravale V., Prabhu R. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights // *Int J Nanomedicine.* 2015. P. 1001.
65. Cheng C.J. et al. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. // *Nat Rev Drug Discov.* 2015. Vol. 14, № 4. P. 239–247.

66. Lee K.S. et al. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer // *Breast Cancer Res Treat.* 2008. Vol. 108, № 2. P. 241–250.
67. Autio K.A. et al. Safety and Efficacy of BIND-014, a Docetaxel Nanoparticle Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. // *JAMA Oncol.* 2018. Vol. 4, № 10. P. 1344–1351.
68. Voss M.H. et al. A randomized phase II trial of CRLX101 in combination with bevacizumab versus standard of care in patients with advanced renal cell carcinoma // *Annals of Oncology.* 2017. Vol. 28, № 11. P. 2754–2760.
69. Zuckerman J.E. et al. Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014. Vol. 111, № 31. P. 11449–11454.
70. Ghitman J. et al. Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine // *Mater Des. Elsevier,* 2020. Vol. 193. P. 108805.
71. Sanità G., Carrese B., Lamberti A. Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization // *Front Mol Biosci.* 2020. Vol. 7.
72. Kobayashi H., Watanabe R., Choyke P.L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? // *Theranostics.* 2013. Vol. 4, № 1. P. 81–89.
73. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? // *Journal of Controlled Release.* 2016. Vol. 244. P. 108–121.
74. Golombek S.K. et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. // *Adv Drug Deliv Rev.* 2018. Vol. 130. P. 17–38.

75. Matsumura Y. Cancer stromal targeting therapy to overcome the pitfall of EPR effect. // *Adv Drug Deliv Rev.* 2020. Vol. 154–155. P. 142–150.
76. Fang J., Islam W., Maeda H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. // *Adv Drug Deliv Rev.* 2020. Vol. 157. P. 142–160.
77. Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. // *Nat Rev Drug Discov.* 2008. Vol. 7, № 9. P. 771–782.
78. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. // *Nat Biotechnol.* 2015. Vol. 33, № 9. P. 941–951.
79. Kinnear C. et al. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. // *Chem Rev.* 2017. Vol. 117, № 17. P. 11476–11521.
80. Shi J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. // *Nat Rev Cancer.* 2017. Vol. 17, № 1. P. 20–37.
81. Maeda H., Khatami M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs // *Clin Transl Med.* 2018. Vol. 7, № 1.
82. Kalyane D. et al. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019. Vol. 98. P. 1252–1276.
83. Matsumoto Y. et al. Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. // *Nat Nanotechnol.* 2016. Vol. 11, № 6. P. 533–538.
84. Nagamitsu A., Greish K., Maeda H. Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor-targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: cases of advanced solid tumors. // *Jpn J Clin Oncol.* 2009. Vol. 39, № 11. P. 756–766.

85. Li C.J. et al. Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure. // *Br J Cancer*. 1993. Vol. 67, № 5. P. 975–980.
86. Appiah E. et al. Acid-responsive HPMA copolymer-bradykinin conjugate enhances tumor-targeted delivery of nanomedicine. // *J Control Release*. 2021. Vol. 337. P. 546–556.
87. Loibl S., Gianni L. HER2-positive breast cancer // *The Lancet*. 2017. Vol. 389, № 10087. P. 2415–2429.
88. Swain S.M., Shastry M., Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions // *Nat Rev Drug Discov*. 2023. Vol. 22, № 2. P. 101–126.
89. Oh D.-Y., Bang Y.-J. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer // *Nat Rev Clin Oncol*. 2020. Vol. 17, № 1. P. 33–48.
90. Liu L. et al. Abstract 1538: Margetuximab mediates greater Fc-dependent anti-tumor activities than trastuzumab or pertuzumab in vitro // *Cancer Res*. 2019. Vol. 79, № 13\_Supplement. P. 1538–1538.
91. Rugo H.S. et al. Efficacy of Margetuximab vs Trastuzumab in Patients With Pretreated ERBB2-Positive Advanced Breast Cancer // *JAMA Oncol*. 2021. Vol. 7, № 4. P. 573.
92. Jost C. et al. Structural Basis for Eliciting a Cytotoxic Effect in HER2-Overexpressing Cancer Cells via Binding to the Extracellular Domain of HER2 // *Structure*. 2013. Vol. 21, № 11. P. 1979–1991.
93. Reichert J.M. et al. Monoclonal antibody successes in the clinic. // *Nat Biotechnol*. 2005. Vol. 23, № 9. P. 1073–1078.
94. Simeon R., Chen Z. In vitro-engineered non-antibody protein therapeutics. // *Protein Cell*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 3–14.
95. Vazquez-Lombardi R. et al. Challenges and opportunities for non-antibody scaffold drugs // *Drug Discov Today. Elsevier Current Trends*, 2015. Vol. 20, № 10. P. 1271–1283.

96. Li J., Mahajan A., Tsai M.-D. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. // *Biochemistry*. 2006. Vol. 45, № 51. P. 15168–15178.
97. Plückthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPin): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015. Vol. 55. P. 489–511.
98. Theurillat J.-P. et al. Designed ankyrin repeat proteins: a novel tool for testing epidermal growth factor receptor 2 expression in breast cancer. // *Mod Pathol*. 2010. Vol. 23, № 9. P. 1289–1297.
99. Martin-Killias P. et al. A novel fusion toxin derived from an EpCAM-specific designed ankyrin repeat protein has potent antitumor activity. // *Clin Cancer Res*. 2011. Vol. 17, № 1. P. 100–110.
100. Sokolova E. et al. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPin possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo. // *J Control Release*. 2016. Vol. 233. P. 48–56.
101. Sokolova E.A. et al. HER2-Specific Targeted Toxin DARPin-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model. // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, № 10.
102. Proshkina G. et al. DARPin\_9-29-Targeted Mini Gold Nanorods Specifically Eliminate HER2-Overexpressing Cancer Cells. // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019. Vol. 11, № 38. P. 34645–34651.
103. Deyev S. et al. Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPin-functionalized liposomes. // *Eur J Pharm Biopharm*. 2018. Vol. 130. P. 296–305.
104. Löfblom J., Frejd F.Y., Ståhl S. Non-immunoglobulin based protein scaffolds. // *Curr Opin Biotechnol*. 2011. Vol. 22, № 6. P. 843–848.
105. Nord K. et al. A combinatorial library of an alpha-helical bacterial receptor domain. // *Protein Eng*. 1995. Vol. 8, № 6. P. 601–608.
106. Nilsson B. et al. A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. // *Protein Eng*. 1987. Vol. 1, № 2. P. 107–113.

107. Nygren P.-A. Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. // FEBS J. 2008. Vol. 275, № 11. P. 2668–2676.
108. Friedman M. et al. Engineering and characterization of a bispecific HER2 x EGFR-binding affibody molecule. // Biotechnol Appl Biochem. 2009. Vol. 54, № 2. P. 121–131.
109. Wällberg H., Ståhl S. Design and evaluation of radiolabeled tracers for tumor imaging. // Biotechnol Appl Biochem. 2013. Vol. 60, № 4. P. 365–383.
110. Baum R.P. et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. // J Nucl Med. 2010. Vol. 51, № 6. P. 892–897.
111. Sörensen J. et al. First-in-human molecular imaging of HER2 expression in breast cancer metastases using the <sup>111</sup>In-ABY-025 affibody molecule. // J Nucl Med. 2014. Vol. 55, № 5. P. 730–735.
112. Sörensen J. et al. Measuring HER2-Receptor Expression In Metastatic Breast Cancer Using [<sup>68</sup>Ga]ABY-025 Affibody PET/CT. // Theranostics. 2016. Vol. 6, № 2. P. 262–271.
113. Rosestedt M. et al. Affibody-mediated PET imaging of HER3 expression in malignant tumours. // Sci Rep. 2015. Vol. 5. P. 15226.
114. Xue X. et al. Generation of affibody molecules specific for HPV16 E7 recognition. // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 45. P. 73995–74005.
115. Antaris A.L. et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging. // Nat Mater. 2016. Vol. 15, № 2. P. 235–242.
116. Zhao N. et al. Small-Protein-Stabilized Semiconductor Nanoprobe for Targeted Imaging of Cancer Cells. // Chembiochem. 2016. Vol. 17, № 13. P. 1202–1206.
117. Satpathy M. et al. Optical imaging of ovarian cancer using HER-2 affibody conjugated nanoparticles. // Methods Mol Biol. 2015. Vol. 1219. P. 171–185.



118. Vargo K.B. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle micelles stabilized by recombinant oleosin for targeted magnetic resonance imaging. // *Small*. 2015. Vol. 11, № 12. P. 1409–1413.
119. Wang Y. et al. A novel Affibody bioconjugate for dual-modality imaging of ovarian cancer. // *Chem Commun (Camb)*. 2014. Vol. 50, № 85. P. 12832–12835.
120. Yang M. et al. Affibody modified and radiolabeled gold-iron oxide hetero-nanostructures for tumor PET, optical and MR imaging. // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34, № 11. P. 2796–2806.
121. de Souza A.L.R. et al. Fluorescent Affibody Molecule Administered In Vivo at a Microdose Level Labels EGFR Expressing Glioma Tumor Regions. // *Mol Imaging Biol*. 2017. Vol. 19, № 1. P. 41–48.
122. Kronqvist N. et al. Combining phage and staphylococcal surface display for generation of ErbB3-specific Affibody molecules // *Protein Engineering Design and Selection*. 2011. Vol. 24, № 4. P. 385–396.
123. Bass T.Z. et al. In vivo evaluation of a novel format of a bivalent HER3-targeting and albumin-binding therapeutic affibody construct // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 43118.
124. Fleetwood F. et al. Simultaneous targeting of two ligand-binding sites on VEGFR2 using biparatopic Affibody molecules results in dramatically improved affinity. // *Sci Rep*. 2014. Vol. 4. P. 7518.
125. Shibasaki S. et al. Inhibitory effects of H-Ras/Raf-1-binding affibody molecules on synovial cell function. // *AMB Express*. 2014. Vol. 4, № 1. P. 82.
126. Hoyer W. et al. Stabilization of a beta-hairpin in monomeric Alzheimer's amyloid-beta peptide inhibits amyloid formation. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, № 13. P. 5099–5104.
127. Luheshi L.M. et al. Sequestration of the Aβ peptide prevents toxicity and promotes degradation in vivo. // *PLoS Biol*. 2010. Vol. 8, № 3. P. e1000334.

128. Boutajangout A. et al. Affibody-Mediated Sequestration of Amyloid  $\beta$  Demonstrates Preventive Efficacy in a Transgenic Alzheimer's Disease Mouse Model. // *Front Aging Neurosci.* 2019. Vol. 11. P. 64.
129. Zielinski R. et al. Affitoxin--a novel recombinant, HER2-specific, anticancer agent for targeted therapy of HER2-positive tumors. // *J Immunother.* 2009. Vol. 32, № 8. P. 817–825.
130. Fortin M.-A. et al. Labelling chemistry and characterization of [90Y/177Lu]-DOTA-ZHER2:342-3 Affibody molecule, a candidate agent for locoregional treatment of urinary bladder carcinoma. // *Int J Mol Med.* 2007. Vol. 19, № 2. P. 285–291.
131. Mączyńska J. et al. Immunomodulatory activity of IR700-labelled affibody targeting HER2. // *Cell Death Dis.* 2020. Vol. 11, № 10. P. 886.
132. Schreiber G. Methods for studying the interaction of barnase with its inhibitor barstar. // *Methods Mol Biol.* 2001. Vol. 160. P. 213–226.
133. Schreiber G., Fersht A.R. Rapid, electrostatically assisted association of proteins. // *Nat Struct Biol.* 1996. Vol. 3, № 5. P. 427–431.
134. Hartley R.W. Barnase-barstar interaction. // *Methods Enzymol.* 2001. Vol. 341. P. 599–611.
135. Green N.M. Thermodynamics of the binding of biotin and some analogues by avidin. // *Biochem J.* 1966. Vol. 101, № 3. P. 774–780.
136. Guillet V., Laphorn A., Mauguen Y. Three-dimensional structure of a barnase-3'GMP complex at 2.2Å resolution. // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 330, № 2. P. 137–140.
137. Buckle A.M., Schreiber G., Fersht A.R. Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution. // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33, № 30. P. 8878–8889.
138. Deyev S.M. et al. Design of multivalent complexes using the barnase\*barstar module. // *Nat Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 12. P. 1486–1492.
139. Lebedenko E.N. et al. Visualization of cancer cells by means of the fluorescent EGFP-barnase protein. // *Dokl Biochem Biophys.* 2007. Vol. 414. P. 120–123.

140. Sapozhnikov A.M. et al. A Novel Approach to Anticancer Therapy: Molecular Modules Based on the Barnase:Barstar Pair for Targeted Delivery of HSP70 to Tumor Cells. // *Acta Naturae*. 2018. Vol. 10, № 3. P. 85–91.
141. Hjelm L.C. et al. Lysis of Staphylococcal Cells by Modular Lysin Domains Linked via a Non-covalent Barnase-Barstar Interaction Bridge. // *Front Microbiol*. 2019. Vol. 10. P. 558.
142. Spång H.C.L., Braathen R., Bogen B. Heterodimeric barnase-barstar vaccine molecules: influence of one versus two targeting units specific for antigen presenting cells. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 9. P. e45393.
143. Braathen R. et al. A DNA Vaccine That Encodes an Antigen-Presenting Cell-Specific Heterodimeric Protein Protects against Cancer and Influenza. // *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020. Vol. 17. P. 378–392.
144. Nikitin M.P. et al. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107, № 13. P. 5827–5832.
145. Aghayeva U.F. et al. Denaturation-resistant bifunctional colloidal superstructures assembled via the proteinaceous barnase-barstar interface. // *ACS Nano*. 2013. Vol. 7, № 2. P. 950–961.
146. Sreenivasan V.K.A. et al. Barstar:barnase — a versatile platform for colloidal diamond bioconjugation // *J. Mater. Chem*. 2011. Vol. 21, № 1. P. 65–68.
147. Grebenik E.A. et al. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes. // *J Biomed Opt*. 2013. Vol. 18, № 7. P. 76004.
148. Zdobnova T.A. et al. Self-assembling complexes of quantum dots and scFv antibodies for cancer cell targeting and imaging. // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 10. P. e48248.
149. Balalaeva I. V et al. [Targeted Delivery of Quantum Dots to HER2-Expressing Tumor Using Recombinant Antibodies]. // *Bioorg Khim*. 2015. Vol. 41, № 5. P. 599–605.

150. Shipunova V.O. et al. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO<sub>2</sub>-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase\*Barstar Interface. // ACS Appl Mater Interfaces. 2018. Vol. 10, № 20. P. 17437–17447.
151. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. Academic Press, 1976. Vol. 72, № 1–2. P. 248–254.
152. Shipunova V.O. et al. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle–cell interactions // Nanoscale. 2016. Vol. 8, № 25. P. 12764–12772.
153. Shipunova V.O. et al. Targeted Two-Step Delivery of Oncotheranostic Nano-PLGA for HER2-Positive Tumor Imaging and Therapy In Vivo: Improved Effectiveness Compared to One-Step Strategy. // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15, № 3.
154. Martinez V., Henary M. Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. // Chemistry. 2016. Vol. 22, № 39. P. 13764–13782.
155. Lunt S.J. et al. Interstitial fluid pressure, vascularity and metastasis in ectopic, orthotopic and spontaneous tumours // BMC Cancer. 2008. Vol. 8, № 1. P. 2.
156. Okano M. et al. Orthotopic Implantation Achieves Better Engraftment and Faster Growth Than Subcutaneous Implantation in Breast Cancer Patient-Derived Xenografts. // J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2020. Vol. 25, № 1. P. 27–36.
157. Zhang R. et al. Clinical translation of gold nanoparticles. // Drug Deliv Transl Res. 2023. Vol. 13, № 2. P. 378–385.
158. Rastinehad A.R. et al. Gold nanoshell-localized photothermal ablation of prostate tumors in a clinical pilot device study. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2019. Vol. 116, № 37. P. 18590–18596.
159. Zhang S. et al. Phase-Change Materials Based Nanoparticles for Controlled Hypoxia Modulation and Enhanced Phototherapy // Adv Funct Mater. 2019. Vol. 29, № 49.

160. Yuan A. et al. Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for in vivo imaging and cancer therapy. // *Biomaterials*. 2015. Vol. 51. P. 184–193.
161. Rajendrakumar S.K. et al. A Lipophilic IR-780 Dye-Encapsulated Zwitterionic Polymer-Lipid Micellar Nanoparticle for Enhanced Photothermal Therapy and NIR-Based Fluorescence Imaging in a Cervical Tumor Mouse Model. // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, № 4.
162. Chiang W.-L. et al. Pulsatile drug release from PLGA hollow microspheres by controlling the permeability of their walls with a magnetic field. // *Small*. 2012. Vol. 8, № 23. P. 3584–3588.
163. Zahn D. et al. Temperature controlled camptothecin release from biodegradable magnetic PLGA microspheres // *J Magn Magn Mater*. 2019. Vol. 469. P. 698–703.
164. Hao Y. et al. The tumor-targeting core-shell structured DTX-loaded PLGA@Au nanoparticles for chemo-photothermal therapy and X-ray imaging. // *J Control Release*. 2015. Vol. 220, № Pt A. P. 545–555.
165. Elias D.R. et al. Effect of ligand density, receptor density, and nanoparticle size on cell targeting // *Nanomedicine*. Elsevier, 2013. Vol. 9, № 2. P. 194–201.
166. Kaufmann R. et al. Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy. // *J Microsc*. 2011. Vol. 242, № 1. P. 46–54.