

Новые подходы к адресной терапии злокачественных новообразований с использованием инновационного направляющего модуля неиммуноглобулиновой природы (проект КОМФИ 17-00-00121-Н)

Деев С.М. (рук.), Киселева Д.В., Кузичкина Е.О., Лебеденко Е.Н., Прошкина Г.М., Черных О.Н., Шипунова В.О., Шрамова Е.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва

Данный Научный проект является интегральной составляющей Комплексного проекта КОМФИ 17-00-00122-К, выполняемого совместно с коллективами №2 (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника») и №3 (ННГУ им. Н.И. Лобачевского) и направленного на создание комплекса новых технологий для высокоселективной оптической диагностики и эффективной терапии онкологических заболеваний.

Цель научного проекта: разработка фундаментальных подходов к конструированию мультифункциональных агентов нового поколения на основе как неорганических наноматериалов, так и рекомбинантных белков для эффективной диагностики и терапии онкологических заболеваний.

На 1 этапе получены следующие результаты:

1. Получен и оптимизирован для направленной доставки диагностических и цитотоксических модулей к опухолевым клеткам высоко-аффинный направляющий модуль неиммуноглобулиновой природы DARPin ($K_D=2.0 \times 10^{-8}$ М), специфичный к поверхностному опухолевому маркеру HER2 (Рис. 1). Совместно с коллективом №3 получены и охарактеризованы визуализирующие (диагностические) комплексы на основе нанофосфоров состава $\text{NaY:Yb:Er:Tm:F}_4/\text{NaYF}_4$ (НАФ), синтезированных коллективом №2, и направляющего модуля DARPin (Рис. 2).

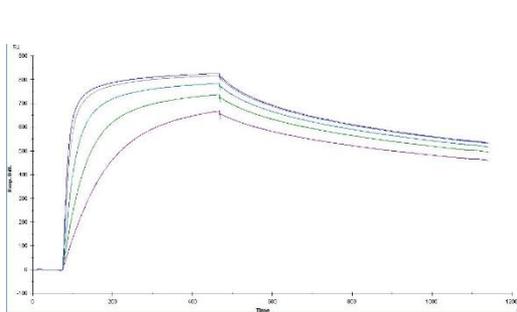


Рис. 1. Сенсограммы связывания адресного полипептида DARPin с рекомбинантным антигеном p185HER2^{ECD}, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore).

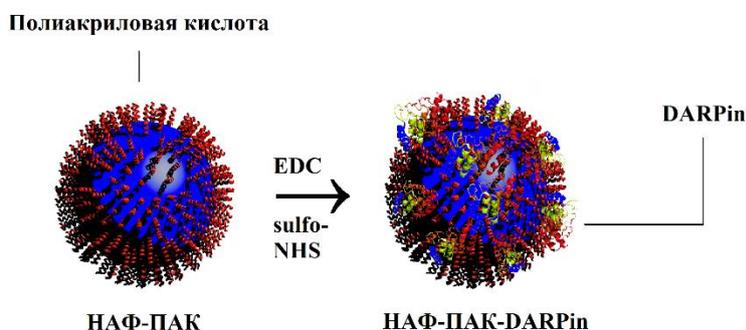


Рис. 2. Схема сборки комплексов НАФ-ПАК-DARPin

2. В качестве цитотоксического компонента создаваемых мультифункциональных тераностических соединений использован низкоиммуногенный фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (LoPE40). Разработана методика экспрессии гибридного гена на основе HER2-специфичного модуля DARPin и низкоиммуногенного варианта фрагмента псевдомонадного экзотоксина А (DARPin-LoPE40) в бактериальной системе. Показано, что адресный токсин DARPin-LoPE40 в пиколярных концентрациях обладает высокой избирательной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, сверхэкспрессирующим маркер HER2, и не влияет на жизнеспособность HER2-отрицательных клеток. Изучен внутриклеточный путь транспорта бифункционального гибридного белка DARPin-LoPE40.

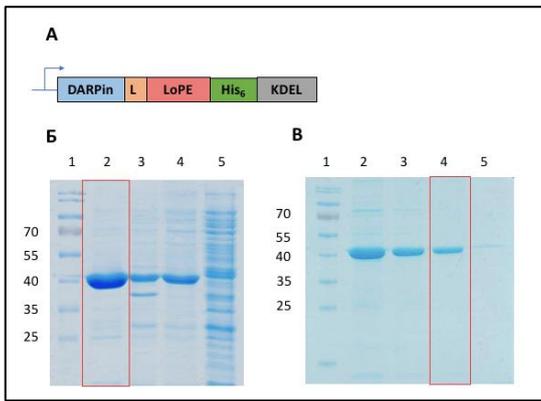


Рис. 2. Схема генетической конструкции DARPin-LoPE40 и экспрессия соответствующего белка в бактериальной системе.

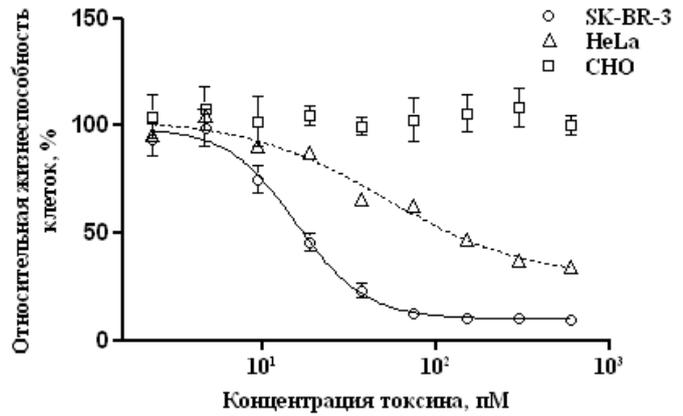


Рис. 3. Относительная жизнеспособность клеток с различным уровнем экспрессии HER2 после обработки DARPin-LoPE40 в течение 72 ч.

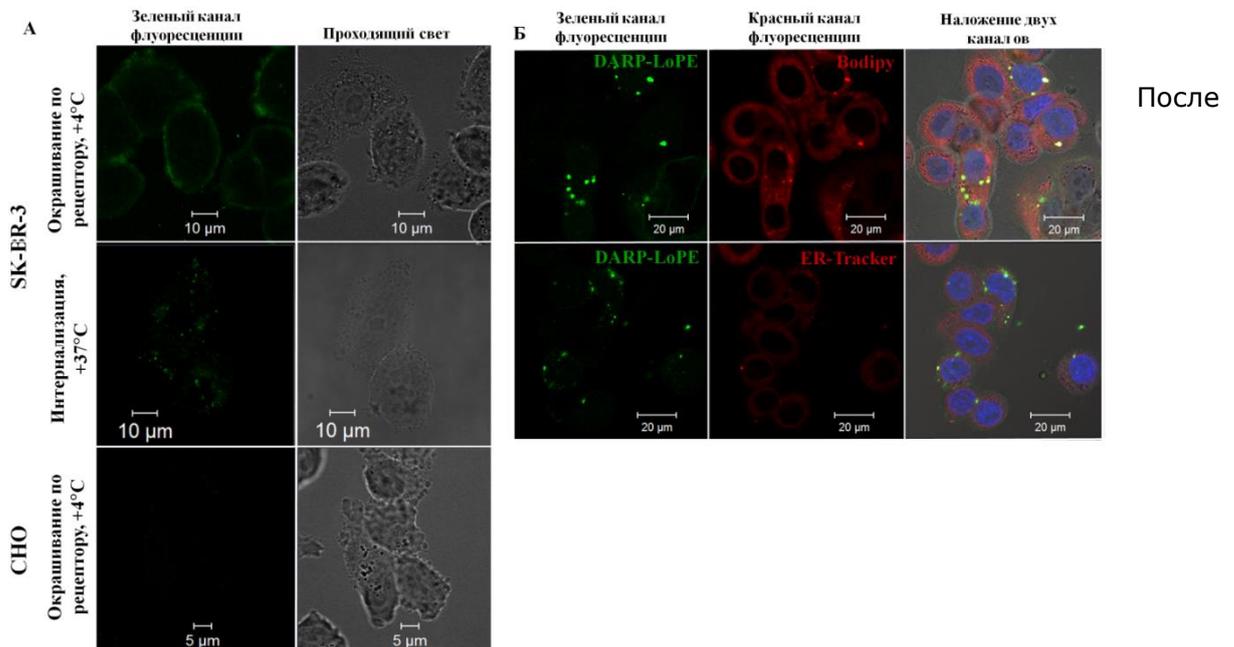


Рис. 3. Взаимодействие адресного гибридного токсина DARPin-LoPE с рецептором HER2 (А) и его внутриклеточная локализация (Б) по данным конфокальной микроскопии. При 4°C DARPin-LoPE специфично связывается с поверхностью HER2-положительных клеток SK-BR-3, а при 37°C интернализуется в них (А). DARPin-LoPE, конъюгированный с FITC (зеленый канал флуоресценции), колокализуется в опухолевой клетке с комплексом Гольджи (флуоресцентный маркер Bodipy) и ЭПР (маркер ER-Tracker) (красный канал флуоресценции). Появление желтых пикселей при наложении двух каналов флуоресценции свидетельствует о колокализации белка и красителя органеллы (Б).

3. Для создания биосовместимых тераностических комплексов на основе адресных цитотоксических модулей и люминесцентных наночастиц (нанофосфоров) в бактериальной экспрессионной системе наработан гибридный адресный токсин DARPin-PE40. Совместно с коллективом №3 Комплексного проекта начата работа по изучению противоопухолевой активности полученных адресных токсинов DARPin-PE40 и его неиммуногенного варианта. Предварительные эксперименты показали перспективность созданных соединений. Начата совместная работа с коллективом №2 и №3 Комплексного проекта по получению мультифункциональных тераностических комплексов на основе НАФ и адресного токсина DARPin-PE40 и исследованию их противоопухолевой активности.