

**Проект РФФ №14-24-00106п.**  
**Комплексный подход к биоинженерии мультифункциональных соединений**  
**направленного действия для диагностики и терапии рака**

**2017-2018 гг.**

Разработка новых соединений, методов и подходов для высокочувствительной диагностики и адресной терапии опухолевых заболеваний на сегодняшний день являются наиболее актуальными и активно развивающимися направлениями в биологии и медицине. Настоящий проект является продолжением успешно завершеного в 2016 году проекта РФФ №14-24-00106с тем же названием и представляет собой многопрофильное исследование на стыке молекулярной иммунологии, биохимии, белковой химии и физико-химии наноструктур по созданию нового поколения соединений для тераностики рака. Основной идеей этой новой стратегии в медицине является создание мультифункциональных соединений направленного действия, позволяющих одновременно визуализировать очаг болезни, оказывать селективное терапевтическое воздействие на него, следить за кинетикой доставки лекарства к патологическому очагу и в процессе мониторинга лечения регулировать схему терапии.

Целью настоящего проекта является разработка комплексного подхода к биоинженерии новых противоопухолевых соединений для тераностики, основу которых составляют адресные мультифункциональные рекомбинантные белки с различными механизмами действия, а также наночастицы, позволяющие применить разного рода физическое воздействие на опухолевую клетку (облучение, магнитное поле, нагрев). Такой комплексный подход в полной мере отвечает современным представлениям о необходимости множественного воздействия на опухоли с учетом молекулярного профиля заболевания и индивидуальных особенностей каждого онкологического пациента. Создаваемые гибридные мультифункциональные конструкции представляют собой пример интегральных соединений с качественно новыми свойствами, когда «целое больше, чем сумма составляющих его частей».

В ходе выполнения проекта в 2017-2018 гг. коллективом были получены следующие основные результаты:

Впервые для **адресной фототермической терапии** HER2-положительных опухолей получены гибридные мультифункциональные наноконструкции DARPIn-GNP на основе золотых наночастиц диаметром 5 нм (GNP) и инновационного адресного модуля неиммуноглобулиновой природы DARPIn, специфичного к распространенному опухолевому маркеру HER2. При облучении красным светом эти гибридные наноконструкции вызывают гибель HER2-положительных раковых клеток, снижая жизнеспособность опухолевых клеток вдвое в концентрации 240 нМ. На основании полученных экспериментальных данных предложен механизм цитотоксического действия DARPIn-GNP [Deyev et al., *Bioconjugate Chemistry*, 2017].

Для **фотодинамической терапии рака** на глубине тканей были получены две гибридных наноконструкции на основе антистоксовых нанофосфоров (НАФ) и функционально активных белков. НАФ в этих конструкциях играют роль *внутренних источников света*, которые поглощают внешнее излучение в ближнем ИК-диапазоне, проникающем вглубь биоткани, и конвертируют его в УФ или видимый свет. Этот свет, в зависимости от состава гибридной конструкции, активизирует эндогенные фотосенсибилизаторы или фототоксичный белок, что приводит к генерации активных форм кислорода, убивающих опухолевые клетки [Mironova et al., *Nanoscale*, 2017; Liang et al., *Acta Biomaterialia*, 2017].

Для **адресной терапии рака** разработан метод получения малых (80-90 нм в диаметре) моноламеллярных липосом, содержащих большие количества (до 2000 молекул белка на липосому) токсина PE40. Разработана методика функционализации поверхности протеолипосом адресным модулем DARPIn, специфичным к опухолевым HER2-положительным клеткам. В опытах *in vitro* показано, что дарпинизированные липосомы, нагруженные токсином PE40, индуцируют апоптоз в HER2-положительных раковых клетках. [Deyev et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018; Kiseleva et al., *Tumor Biology journal*, 2018].

Было продолжено исследование адресных токсинов, полученных ранее в рамках данного проекта на основе полипептидов, специфичных к разным эпитопам опухолевого маркера HER2 (миниантитела и инновационные полипептиды DARPin), и токсичных белков с разным механизмом действия (различные варианты фрагмента PE40 псевдомонадного токсина А; белковый фотосенсибилизатор miniSOG). Прояснен механизм действия адресного токсина 4D5scFv-PE40 на HER2-положительные опухолевые клетки [Sokolova E.A. et al., *Oncotarget*, 2017]; проведен углубленный анализ влияния адресного токсина DARPin-PE40 на динамику роста ксенографтных опухолей у мышей [Соколова Е.А. и др., *Acta naturae*, 2017]. Получен и охарактеризован новый гибридный адресный токсин DARPin-LoPE, в пиколярной концентрации вызывающий гибель HER2-положительных опухолевых клеток [Прошкина и др., *Молекулярная биология*, 2017]. Сравнительное исследование общей токсичности DARPin-LoPE и его исходного варианта DARPin-PE40 на здоровых иммунокомпетентных мышах показало значительно меньшую общую токсичность и низкую иммуногенность адресного токсина DARPin-LoPE по сравнению с DARPin-PE40 [Шилова и др., доклад на XXX Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2018]. Благодаря очень высокой селективной цитотоксичности в отношении HER2-положительных опухолевых клеток человека, а также низкой общей токсичности и иммуногенности, адресный токсин нового состава DARPin-LoPE представляет значительный интерес для дальнейшего изучения *in vivo* в качестве тераностического агента для терапии HER2-положительных опухолей.

Показано, что цитотоксичность адресных токсинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG, специфичных к разным эпитопам опухолевого маркера HER2, зависит от времени нахождения фототоксина в липидном бислое клеточной мембраны, где его повреждающее действие оказывается максимальным, то есть определяется скоростью их интернализации в опухолевые клетки [Шилова О.Н. и др., ДАН, 2017]. Выяснен механизм угасания флуоресценции адресных фототоксинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG при связывании с HER2-положительными клетками и последующей интернализации, показано, что значимый вклад в изменение флуоресцентных свойств вносит не деградация белка, а экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки, в том числе, цитохромом с [Кузичкина и др., ДАН, 2018; Кузичкина и др., *Acta naturae*, 2018]. На примере адресного фототоксина DARPin-miniSOG проведено методическое исследование по влиянию различных экспериментальных процедур (фиксация, нагрев и др.) на базовый уровень аутофлуоресценции клеток [Shilova O.N. et al., *Cytometry Part A*, 2017].

Особое внимание при продолжении проекта в 2018 году уделено оптимизации физиологических характеристик создаваемых конструкций с целью увеличения времени их циркуляции в кровяном русле, минимизации нежелательного накопления в почках, печени и других органах, а также разработке новых методов неинвазивного мониторинга циркуляции, накопления (выведения) наноагентов в организме животного.

Для создания магнитных маркеров клеточных антигенов разработан простой двухстадийный метод синтеза, позволяющий получать покрытые кремнием магнитные и магнитно-флуоресцентные наночастицы с заданным набором функциональных свойств (магнетизм, флуоресценция, контролируемые поверхностные свойства). Для экспериментов на клетках и в живом организме отобраны агрегационно и седиментационно устойчивые наночастицы с магнитными характеристиками, оптимизированными для детекции оригинальной технологией MPQ, разработанной на предыдущем этапе проекта [Shipunova V.O. et al., 2016], с низким пределом детекции этим методом до 2.7 нг в 20 мкл раствора [Zelepukin I.V. et al., *Acta naturae*, 2017]. Синтезированы наночастицы магнетита, стабилизированные рекомбинантным белком, состоящим из барстара и С-концевой части белка Mms6, участвующего в синтезе магнитосом в магнитотактических бактериях *Magnetospirillum magneticum*. Показано, что синтезированные наночастицы сохраняют отличную коллоидную стабильность в течение длительного времени (до 2 месяцев) [Shipunova, *Data in Brief*, 2018].

Показана высокая достоверность неинвазивного метода детекции магнитных наночастиц с применением технологии MPQ, разработанной авторами на предыдущем этапе проекта [Shipunova et al., *Nanoscale*, 2016]. Корреляционный коэффициент Пирсона

для МРQ-анализа и традиционного инвазивного метода составил  $r=0.987$  [Зелепукин И.В. и др., IX Международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития", 2017; Шипунова В.О., Никитин М.П. и др., VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», 2017].

Изучены *in vivo* на мышах деградация, время циркуляции в кровотоке и биораспределение синтезированных наночастиц магнетита с различными вариантами покрытия (декстран, карбоксиметилдекстран, их смесь в соотношении 1:1, низкомолекулярный цитрат-анион, полимер молочного гликолевых кислот, глюкуроновая кислота). Установлено, что время циркуляции наночастиц магнетита в кровотоке уменьшается в ряду наночастиц со следующими полимерными покрытиями: глюкуроновая кислота > карбоксиметилдекстран > полистеринсульфонат > полиэтиленгликоль-фосфат; полиакриловая кислота. Показано преимущественное поглощение наночастиц магнетита печенью и селезенкой, вне зависимости от покрытия и свойств этих наночастиц, а также меньшее поглощение частиц в тканях легких при увеличении по модулю  $\zeta$ -потенциала поверхности. Применение физических неинвазивных методов исследования для детекции наночастиц (МРQ-детекция, магнитно-резонансная томография) позволило использовать в экспериментах минимальное число животных без вовлечения технических погрешностей, связанных с забором крови, препарированием животного и пр. [Зелепукин и др. XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 12-15 февраля 2018 г. Доклад.]

Для продления времени циркуляции малых доз терапевтических наночастиц предложен метод неспецифичной блокировки макрофагов высокими дозами низкотоксичных частиц магнетита. Показано увеличение времени циркуляции второй малой дозы (300 мкг) коммерческих наночастиц магнетита при блокировке макрофагов высокими дозами (от 1,25 мг до 10 мг) тех же наночастиц. Показано, что эффективность блокировки растет с увеличением дозы блокирующих наночастиц; максимально удалось увеличить время циркуляции наночастиц магнетита в 8,5 раз.

**Для радионуклидной визуализации** онкомаркера HER2 проведено сравнительное исследование адресного полипептида DARPin2.29, меченного радиоактивным изотопом иод-125 и аквакарбонильным комплексом технеция-99m. Установлено, что радиоактивный иод-125 является предпочтительной меткой для адресного пептида DARPin9\_29, поскольку обеспечивает более высокое соотношение опухоль:органы по сравнению с технецием-99m и не вызывает высокого неспецифического накопления радионуклида в органах [Vorobyeva et al., Contrast Media Mol. Imaging. 2018].

Намечен новый подход к противоопухолевой терапии путем направленной доставки белка HSP70 и его C-концевого фрагмента HSP70/16 на поверхность опухолевых клеток с помощью супрамолекулярных конструкций на основе пары барназа:барстар и противоопухолевого миниантитела [Сапожников и др., Acta naturae, 2018].

Проведена оценка значимости p21-активируемых киназ I группы (PAK1/2/3) в качестве потенциальных мишеней для терапии злокачественных опухолей оболочек периферических нервов. Показано, что воздействие специфических ингибиторов на эти мишени, а также их генетический нокаун снижает пролиферативную и инвазивную способность клеток злокачественных опухолей [Semenova G. et al., Oncogene, 2017; Semenova G. et al., Biochimie, 2017]. По данным литературы предложены новые возможные источники агентов для комбинированной противоопухолевой терапии [Shilova et al., J. Contr. Rel., 2018].

Задачи проекта на 2017-2018 годы полностью выполнены. Результаты работ по созданию бифункциональных гибридных наноструктур на основе адресных полипептидов и наночастиц различной природы (нанозолото, апконвертирующие нанофосфаты, магнитные наночастицы) в качестве модулей, обеспечивающих визуализацию и различное повреждающее воздействие на раковые клетки, полученные авторами в рамках настоящего проекта РФФИ, суммированы в обзоре [Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Молекулярная биология, 2017].