

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

На правах рукописи

Шипунова Виктория Олеговна

**МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫЕ
КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА
КЛЕТКИ *IN VITRO* И *IN VIVO***

Специальность – 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Сергей Михайлович Деев, член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Владимир Сергеевич Прасолов, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук;

Анатолий Виталиевич Жердев, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии Института биохимии имени А.Н. Баха, Федеральное государственное учреждение “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования и науки “Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет Российской академии наук”.

Защита состоится «15» марта 2017 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » декабря 2016 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На сегодняшний день нанобиотехнология открывает широкие возможности для поиска новых подходов к решению актуальных проблем диагностики и терапии тяжёлых заболеваний, а также для развития персонафицированной медицины. Особое внимание в качестве новых и уникальных терапевтических и диагностических агентов привлекают к себе наночастицы и структуры на их основе, обладающие принципиально иными физико-химическими свойствами по сравнению с макро- и микроразмерными объектами. Важным свойством наночастиц является возможность модификации их поверхности различными биомолекулами, обеспечивающими биологическую активность частиц, в частности, возможность их “нагрузки” токсичным агентом и доставки только к определённому типу клеток (адресной доставки). Такое свойство делает возможным реализацию концепции “магической пули”, сформулированную основоположником химиотерапии, лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 1908 года, Паулем Эрлихом. Под “магической пулей” понимается идеальный терапевтический агент, который способен селективно поражать очаг болезни, не задевая здоровые ткани и не имея при этом побочных эффектов.

Однако для большинства заболеваний, как правило, неизвестны такие абсолютно специфичные маркёры, которые могут точно идентифицировать заболевание и быть мишенью для адресной доставки препарата. Часто требуется анализировать гораздо бóльший массив биохимической информации – например, растворимые соединения в биологических жидкостях, антигены на поверхности клеток или внутриклеточные вещества. Соответственно, возникает необходимость разработки автономных систем, способных анализировать набор биохимических параметров и производить необходимое заблаговременно запрограммированное действие на основе данного анализа (например, высвобождать токсин или связываться с чётко определённой клеточной популяцией). Одним из подходов к созданию таких систем является разработка биороботов на основе наночастиц и биомолекул, способных осуществлять элементарные логические функции на основе анализа молекулярного микроокружения и выполнять заранее заданные действия на основе проведённых вычислений.

Интерес исследователей к наночастицам также связан с возможным их использованием в качестве тераностических агентов, т.е. структур, выполняющих функции одновременной диагностики и терапии заболевания в случае его наличия. Наночастицы, обладающие целым рядом уникальных свойств, по сравнению с веществами в молекулярной форме, дополненные также биокомпьютерными возможностями, представляются как новые уникальные средства тераностики, нацеленные на решение актуальных проблем биомедицины. При этом для создания удачных тераностических агентов на основе наночастиц необходимы не только поиск новых подходов к их дизайну, но и разработка простых и, в то же время, высокочувствительных методов количественной детекции наночастиц как для *in vitro*, так и для *in vivo* применений.

Целью работы являлась разработка и всестороннее исследование многофункциональных комплексов на основе наночастиц, предназначенных для селективного взаимодействия с клетками-мишенями и контролируемого воздействия на них.

Для достижения данной цели были сформулированы следующие **задачи**:

- 1) Разработать новый высокочувствительный метод количественной детекции наночастиц, взаимодействующих с эукариотическими клетками-мишенями.
- 2) Разработать конструкции, состоящие из наночастиц магнетита и полноразмерных антител либо рекомбинантных мини-антител, для селективного мечения клеток и количественного анализа экспрессии мембранного рецептора HER2/neu.
- 3) Разработать эффективную систему мечения клеток магнитными частицами на основе специфического взаимодействия наночастиц, модифицированных лектинами, с гликозилированными белками на поверхности эукариотических клеток.
- 4) Разработать и охарактеризовать биокomпьютерные комплексы на основе наночастиц, способные выполнять логические вычисления под воздействием низкомолекулярных соединений как входных сигналов.
- 5) Исследовать возможности эффективного и высоко селективного мечения клеток *in vitro* биокomпьютерными комплексами с лектинами в качестве направляющих агентов.
- 6) Исследовать динамики циркуляции биокomпьютерных комплексов в организме млекопитающего и возможность реализации унарных и бинарных логических операций *in vivo* под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови.

Научная новизна. Впервые предложен высокочувствительный метод детекции наночастиц, связавшихся с клетками эукариот, на основе регистрации нелинейных магнетиков на комбинаторных частотах. Впервые получены конъюгаты магнитных наночастиц с анти-HER2/neu антителами, не уступающие по специфичности взаимодействия с опухолевыми клетками индивидуальных антител. Впервые проведено комплексное исследование взаимодействия ряда лектинов с гликопротеинами в составе наночастиц различной природы. Впервые получены и охарактеризованы биокomпьютерные комплексы на основе наночастиц и белкового интерфейса, подвергающегося дезинтеграции под воздействием молекулярных входных сигналов и позволяющего реализовать полный набор булевых функций, и показано селективное мечение клеток *in vitro* данными биокomпьютерными комплексами. Впервые исследованы динамики циркуляции биокomпьютерных комплексов в кровотоке млекопитающего. Впервые на примере полученных биокomпьютерных комплексов показана возможность выполнения унарных и бинарных логических операций *ex vivo* в цельной крови и *in vivo* в организме млекопитающего под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови.

Практическая значимость. Разработанный метод МРQ-цитометрии для количественной детекции наночастиц представляет собой новый высокочувствительный метод, применимый для широкого спектра фундаментальных исследований в области

нанобиотехнологии. Разработанный метод может быть также использован для диагностики различных мембраноассоциированных маркёров заболеваний и служить альтернативой некоторым методам *in vitro* и *ex vivo* диагностики в случаях, когда использование дорогого и непортативного оборудования невозможно, например, в полевых условиях или в развивающихся странах.

Комплексные данные об эффективном взаимодействии лектинов с гликопротеинами в составе наночастиц различной природы могут быть использованы при создании платформы для самосборки наночастиц с целью конструирования тераностических агентов с заранее заданным набором функций.

Разработанный подход к конструированию биокомпьютерных структур на основе наночастиц и белкового интерфейса позволяет анализировать одновременно несколько параметров биохимической информации и проводить логические операции *in vivo* в организме млекопитающих под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови. Одновременная мультипараметрическая обработка биохимических сигналов может быть использована для увеличения специфичности адресной доставки лекарств и, как следствие, для уменьшения системной токсичности. Ранее применимость биокомпьютинга *in vivo* была показана на примере систем на основе ДНК только в организме насекомого (ввиду низкой нуклеазной активности по отношению к ДНК), и оставалось неясно, могут ли биокомпьютерные структуры быть использованы *in vivo* в других живых организмах. Показанная в работе возможность проведения логических операций *in vivo* непосредственно в организме млекопитающих открывает большие возможности для создания нового поколения лекарств, работающих по принципу “магической пули”, и развития тераностики в целом.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 121 странице и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, который содержит 203 ссылки. Диссертация содержит 52 рисунка и 12 таблиц.

Публикации. По материалам работы опубликованы 4 статьи в рецензируемых научных журналах.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: 17th International Conference “Laser Optics” (Санкт-Петербург, 2016); XXVIII, XXVII, XXV Зимние молодёжные научные школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2016, 2015, 2013); 58-я научная конференция Московского Физико-Технического Института (Москва-Долгопрудный-Жуковский, 2015); IEEE Nano-2015 (Рим, 2015); 19-я и 17-я Международные Пущинские школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2015, 2013); 10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers (Дрезден, 2014); X конференция “Нанотехнологии в онкологии” (Москва, 2012); IV Nanotechnology International Forum RusNanoTech (Москва, 2011).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка нового метода количественной детекции наночастиц, взаимодействующих с эукариотическими клетками-мишенями

1.1. МРQ-цитометрия: метод количественной детекции взаимодействия наночастиц с клетками и оценки уровня экспрессии поверхностных антигенов клеток

Для количественной детекции взаимодействия наночастиц с клетками эукариот был разработан метод, *МРQ-цитометрия*, основанный на детекции нелинейных магнетиков на комбинаторных частотах (рис. 1А). Метод основан на введении магнитных компонентов в состав наночастиц и последующей детекции данных компонентов с использованием технологии МРQ (*Magnetic Particle Quantification*) [Nikitin et al., *J. Magn. Magn. Mater.*, 2007].

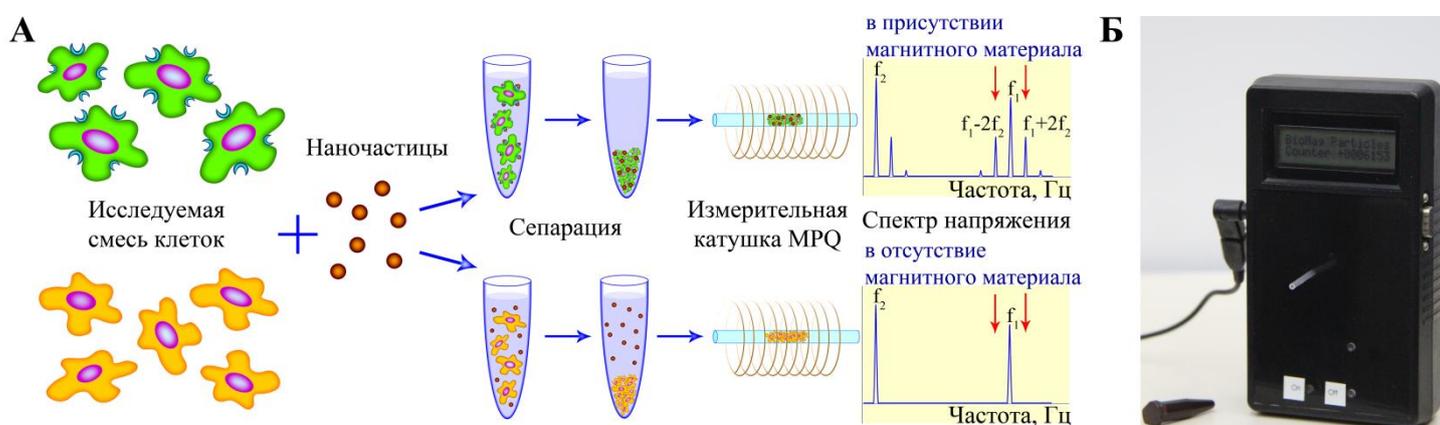


Рис. 1. Разработка метода МРQ-цитометрии. **А)** Схема метода: мечение клеток и детекция наночастиц, связанных с клетками. Исследуемую смесь клеток инкубируют с суспензией наночастиц, несвязавшиеся частицы сепарируют (например, центрифугированием). Количество связанных с клетками частиц измеряют с помощью технологии МРQ (*Magnetic Particle Quantification*), детектирующей количество нелинейных магнитных материалов на комбинаторных частотах. **Б)** Фото МРQ-регистратора (ВхШхГ: 18x10x4 см).

Для разработки данного метода была выбрана модельная система, включающая в себя шесть линий клеток эукариот с различным уровнем экспрессии мембранного рецептора HER2/neu, и специально синтезированные суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, способные специфично связываться с данным рецептором. HER2/neu является членом семейства EGFR и гиперэкспрессируется в 20-30% случаев опухолей молочной железы, а также при некоторых других видах злокачественных новообразований. Данный рецептор в меньшем количестве представлен на некоторых типах здоровых клеток человека, и его точное количественное определение имеет важное клиническое значение, а выбранная клеточная модель является удобной для оценки уровней экспрессии поверхностных клеточных антигенов. В качестве “нацеливающего” модуля на поверхности наночастиц использовали полноразмерное антитело Трастузумаб (Герцептин®), специфичное к внеклеточному домену HER2/neu и широко применяемое в клинической практике для терапии HER2/neu-положительных опухолей.

Суперпарамагнитные наночастицы, обозначенные далее CMD100 (рис. 2), были синтезированы методом копреципитации солей железа Fe(II) и Fe(III) с последующей стабилизацией карбоксиметилдекстрановой полимерной оболочкой. Предел детекции синтезированных частиц CMD100, достигнутый методом MPQ-цитометрии, составил **0.33 нг** (или, $6.5 \cdot 10^{-18}$ моль частиц) в 30 мкл образца по 2σ критерию, согласно которому, минимально детектируемое количество суперпарамагнитных наночастиц определяли как значение специфического сигнала, превышающее двойное стандартное отклонение от сигнала буфера без магнитного материала.

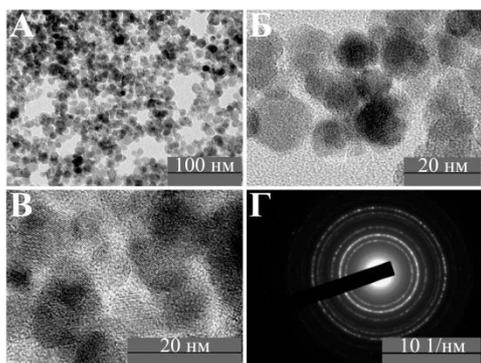


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия наночастиц CMD100. **А)** Характерное изображение наночастиц. **Б, В)** Изображения высокого разрешения наночастиц CMD100 (получены на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100). Ядра магнетита представляют собой монокристаллические сферы размером 10.9 ± 1.9 нм. **Г)** Картина электронной дифракции наночастиц CMD100. Кольца соответствуют 0.298, 0.253, 0.209, 0.173, 0.163, 0.149, 0.129, 0.478 нм. Данные электронной дифракции свидетельствуют о двух кристаллических модификациях оксида железа: гамма- Fe_2O_3 и магнетит Fe_3O_4 .

Для селективного мечения клеток суперпарамагнитные наночастицы CMD100 конъюгировали с Трастузумабом (далее, CMD100-Трастузумаб) карбодиимидным методом с использованием EDC/сульфо-NHS в качестве кроссшивающих реагентов. Гидродинамический диаметр конъюгатов по данным кумулянтного анализа составил 105 ± 31 нм, ζ -потенциал -8.9 ± 0.9 мВ.

Полученные конъюгаты использовали для количественного анализа экспрессии HER2/neu на поверхности клеток. Для этого были выбраны две линии клеток, а именно, линия SK-OV-3, гиперэкспрессирующая HER2/neu, и линия CHO, не экспрессирующая рецепторы семейства EGFR. Клетки SK-OV-3 и CHO инкубировали с CMD100-Трастузумаб, после чего несвязавшиеся конъюгаты сепарировали центрифугированием. Осадок, содержащий меченные наночастицами клетки, помещали в измерительную зону MPQ-регистратора (рис. 1Б).

Количество наночастиц конъюгатов CMD100-Трастузумаб, связанных с клетками, зависело от их концентрации, при этом специфичность взаимодействия сохранялась в тестируемом диапазоне концентраций ($18 \div 72$ мкг/мл). Максимальное соотношение CMD100-Трастузумаб, связанных с клетками SK-OV-3 и CHO, оказалось более чем 130, что демонстрирует высокую селективность метода для анализа экспрессии HER2/neu рецептора при его использовании с соответствующими нацеленными частицами.

Отсутствие неспецифического взаимодействия наночастиц с клетками при выбранной концентрации было подтверждено дополнительными отрицательными контролями, включающими исходные наночастицы без Трастузумаба, а также конъюгаты наночастиц с поликлональными человеческими IgG и неспецифичным

белком – БСА, связывание которых как с клетками SK-OV-3, так и с CHO было относительно низким (рис. 3А).

Также мы исследовали зависимость количества CMD100-Трастузумаб, связавшихся с клетками при инкубации от числа клеток. Согласно данным, представленным на рис. 3Б, CMD100-Трастузумаб сохраняют специфичность взаимодействия с клетками при увеличении их числа в суспензии, и МРQ-цитометрия может быть использована для подсчёта частиц, связанных с клетками, даже в образцах, содержащих достаточно большое число клеток (здесь до $3 \cdot 10^6$ клеток в образце).

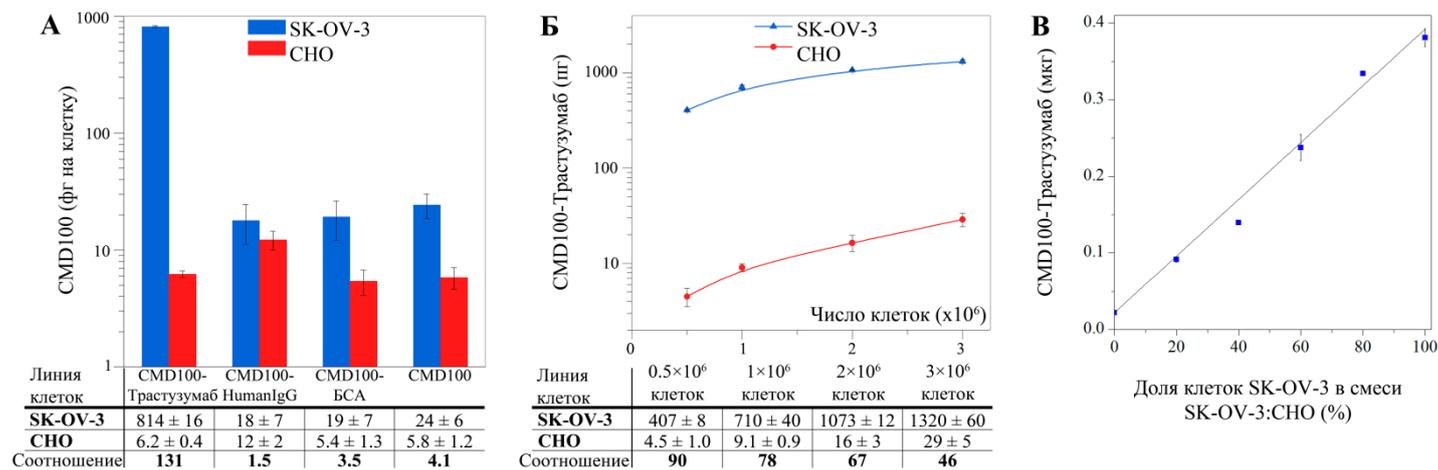


Рис. 3. Количественный анализ взаимодействия конъюгатов CMD100-Трастузумаб с клетками методом МРQ-цитометрии. **А)** Система контролей специфичности взаимодействия CMD100-Трастузумаб с HER2/neu на поверхности клеток. Клетки SK-OV-3 и CHO инкубировали с CMD100-Трастузумаб, CMD100-БСА, CMD100-HumanIgG и CMD100; количество наночастиц представлено в логарифмической шкале. **Б)** Интегральное количество CMD100-Трастузумаб, связавшееся с клетками SK-OV-3 и CHO, в зависимости от числа клеток в образце при инкубации с частицами. **В)** Количество конъюгатов CMD100-Трастузумаб в образцах, содержащих смесь клеток SK-OV-3 и CHO, в зависимости от доли клеток SK-OV-3 в смеси. Планки погрешностей – стандартное отклонение.

Метод МРQ-цитометрии для детекции наночастиц, которые специфично связываются с поверхностью клеток за счёт рецептор-опосредованного взаимодействия, может применяться для детекции доли клеток, экспрессирующих определённый антиген, в составе сложной смеси. Мы продемонстрировали эту возможность, смешав в разных пропорциях клетки SK-OV-3 и CHO (с фиксированным общим числом клеток) и проинкубировав данные образцы с конъюгатами CMD100-Трастузумаб, определив количество связанных частиц методом МРQ-цитометрии. Результирующее количество CMD100-Трастузумаб в образцах зависит линейно от доли клеток SK-OV-3 в смеси (рис. 3В).

1.2. Неселективное мечение клеток наночастицами с полиэтиленминовой полимерной оболочкой

Помимо наночастиц, селективно взаимодействующих с клетками на основе, например, лиганд-рецепторных взаимодействий, внимание исследователей привлекают наночастицы для неселективного мечения клеток. Представляется перспективным использование таких наночастиц для модификации клеток в регенеративной медицине:

для инженерии тканей и клеточной терапии, а также прослеживания распределения таких клеток в организме на протяжении длительного времени. Такие наночастицы востребованы также в других областях биотехнологии и биомедицины, например, в генной доставке для увеличения эффективности трансфекции. Для описанных выше задач необходимо создание биосовместимых магнитных наночастиц, которые способны эффективно связываться с клеточной поверхностью, не повреждая клетку и сохраняя ее жизнеспособность.

Нами были синтезированы наночастицы оксида железа, стабилизированные 25 кДа полиэтиленгликолем (обозначены далее как PEI40), в качестве перспективных маркёров клеточной поверхности. Электронная микрофотография наночастиц PEI40 представлена на **рис. 4А**.

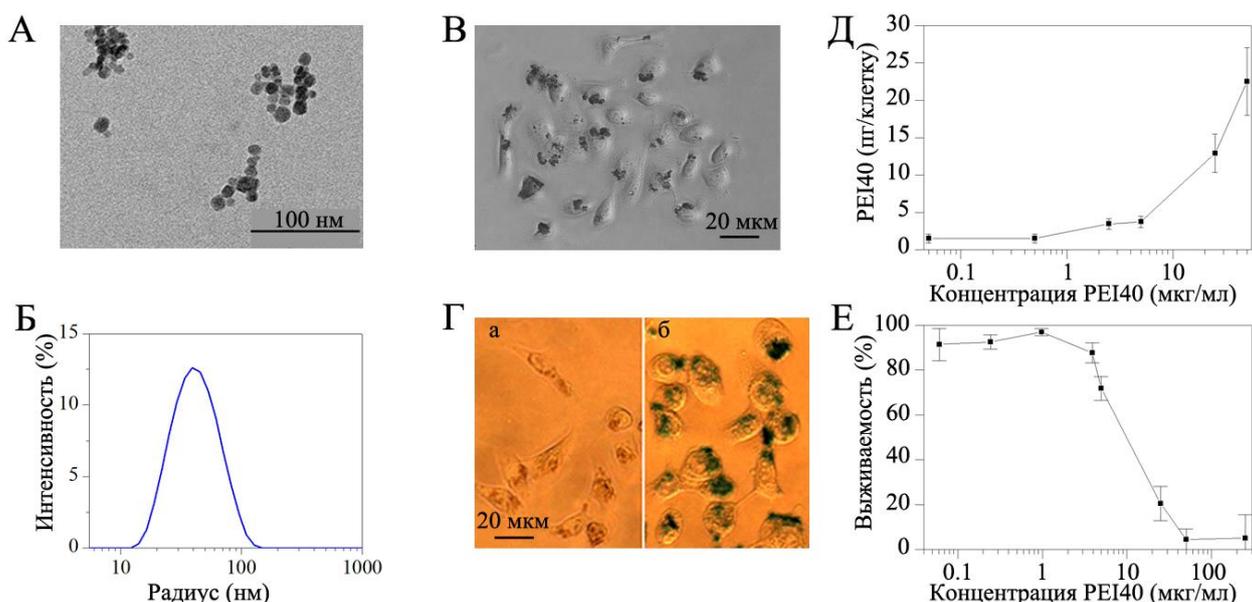


Рис. 4. Наночастицы оксида железа с полиэтиленгликолевой полимерной оболочкой и их характеристика. **А)** Электронная микрофотография наночастиц PEI40, полученная на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100. **Б)** Распределение PEI40 по гидродинамическим размерам. **В)** Микрофотография клеток SK-OV-3, полученная на микроскопе Axiovert 200, после инкубации с PEI40. **Г)** Микрофотография клеток SK-OV-3, полученная на микроскопе Axiovert 200, после инкубации с PEI40 с последующим окрашиванием наночастиц гексацианоферратом калия: а) без добавления $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$, б) с добавлением $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$. **Д)** Количество PEI40, связавшихся с клетками, в зависимости от концентрации частиц при инкубации, определенное методом MRQ-цитометрии. **Е)** Цитотоксичность наночастиц PEI40.

Было установлено, что наиболее вероятная фаза магнитных оксидов железа в данных наночастицах – магнетит Fe_3O_4 с пространственной симметрией $Fd\bar{3}m$. Гидродинамический радиус частиц составил 37.3 ± 14.9 нм (**рис. 4Б**), ζ -потенциал – 15.9 ± 0.8 мВ: поверхность частиц заряжена положительно, что позволяет сорбировать на их поверхности отрицательно заряженные молекулы (например, ДНК), либо использовать такие наночастицы для мечения поверхности эукариотических клеток, поскольку большинство эукариотических клеток имеют отрицательный поверхностный заряд. Было продемонстрировано активное взаимодействие наночастиц PEI40 с клетками SK-OV-3 методом оптической микроскопии (**рис. 4В**) и со специфическим прокрашиванием для

визуализации PEI40 (**рис. 4Г**), а также методом MPQ-цитометрии исследовано количество наночастиц, связавшееся с клетками в зависимости от концентрации при инкубации (**рис. 4Д**). Поскольку имеются данные о том, что полиэтиленимин, хотя и является широко используемым трансфекционным реагентом, обладает цитотоксичностью, то следовало ожидать, что и PEI40 будут также обладать токсическим эффектом. Токсичность PEI40 исследовали с помощью МТТ-теста (**рис. 4Е**). Было установлено, что IC50 и IC20 наночастиц PEI40 составляют 11 и 3 мкг/мл, соответственно. Поскольку для эффективной трансфекции с использованием комплексов плазмидной ДНК, сорбированной на наночастицах с полиэтилениминовой оболочкой, необходима концентрация наночастиц около 5 мкг/мл [Mykhaylyk et al. *Nat. Protoc.*, 2007], то выявленные значения токсичности PEI40 являются вполне приемлемыми. Следует отметить, что при данной концентрации наночастицы PEI40 отчётливо визуализировались с помощью оптической микроскопии на поверхности клеток SK-OV-3.

1.3. Корреляция метода MPQ-цитометрии с другими методами молекулярной и клеточной биологии

С целью верификации разработанного метода MPQ-цитометрии как для количественного анализа наночастиц, связанных с клетками, так и для детекции поверхностных антигенов, мы сравнили его с методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии, широко используемыми в молекулярной и клеточной биологии. Для этого мы выбрали шесть линий клеток различного происхождения: три линии, гиперэкспрессирующие рецептор HER2/neu (SK-OV-3, SK-OV-3-1ip и SK-BR-3), две линии с нормальным уровнем экспрессии HER2/neu (HeLa, MCF-7), и одна линия без экспрессии HER2/neu (CHO) (**рис. 5**). Клетки данных линий инкубировали как с флуоресцентно мечеными анти-HER2/neu антителами (**рис. 5Б**), так и с флуоресцентно мечеными конъюгатами наночастиц CMD100-Трастузумаб (**рис. 5А,В**). Из данных, представленных на **рис. 5**, можно видеть, что данные MPQ-цитометрии (**рис. 5В** – оранжевые столбцы) находятся в корреляции с качественными данными оптической флуоресцентной микроскопии (**рис. 5А**) и количественными данными двух меточных методов, основанных на флуоресценции – проточной цитометрии (**рис. 5Б, В** – зелёные столбцы) и флуоресцентной спектроскопии (**рис. 5В** – фиолетовые столбцы).

Разработанный метод MPQ-цитометрии представляет собой высокочувствительный способ количественной характеристики взаимодействия наноструктур с живыми клетками и нацелен на применение в исследованиях различных процессов взаимодействий между наночастицами и клетками, таких, как интернализация и деградация, специфичное и неспецифичное связывание, с целью выбора оптимальных частиц для биомедицинских применений: адресной доставки лекарств, мониторинга клеток, магнитоуправляемой инженерии тканей и др. Что касается потенциальных клинических применений MPQ-цитометрии, мы полагаем, что разработанный метод

может быть использован для диагностики различных мембрано-ассоциированных маркёров заболеваний, например, как альтернатива или дополнение к классической проточной цитофлуориметрии в случаях, когда использование дорогого и непортативного оборудования невозможно, например, в полевых условиях или в развивающихся странах.

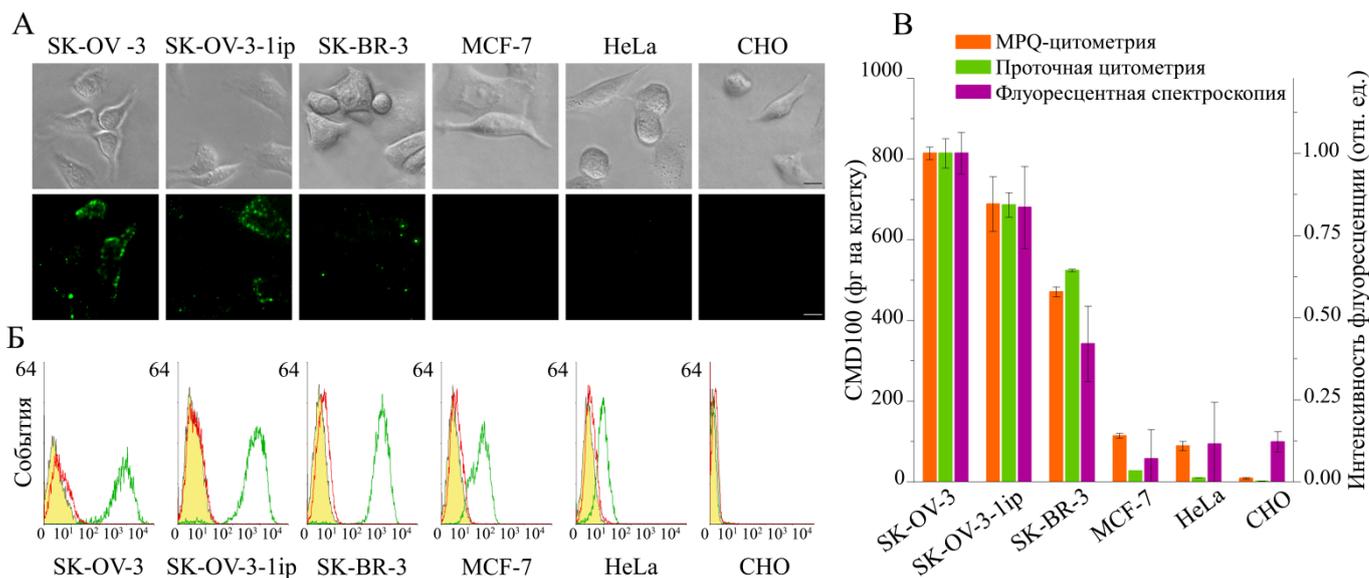


Рис. 5. Исследование экспрессии HER2/неи на поверхности клеток методом МРQ-цитометрии в сравнении с методами флуоресцентной микроскопии, проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии, широко используемыми в молекулярной и клеточной биологии. **А)** Визуализация клеток, инкубированных с CMD100-Трастузумаб-ФИТЦ методом флуоресцентной микроскопии: верхняя панель – проходящий свет, нижняя панель – при возбуждении флуоресценции. Шкалы – 20 мкм. **Б)** Исследование клеток, окрашенных антителами Трастузумаб-ФИТЦ и HumanIgG-ФИТЦ, методом проточной цитометрии: жёлтые заполненные гистограммы – аутофлуоресценция клеток, красные незаполненные гистограммы – HumanIgG-ФИТЦ, зелёные незаполненные гистограммы – Трастузумаб-ФИТЦ. **В)** Сравнение данных, полученных методом МРQ-цитометрии с данными проточной цитометрии и флуоресцентной спектроскопии: оранжевые столбцы – количество CMD100-Трастузумаб в фемтограммах на клетку, измеренное МРQ-цитометрией (левая у-ось), зелёные столбцы – данные проточной цитометрии, а именно, средняя интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Трастузумаб-ФИТЦ, нормализованная на единицу (правая у-ось), фиолетовые столбцы – данные флуоресцентной спектроскопии, а именно, интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных Трастузумаб-ФИТЦ с вычетом аутофлуоресценции клеток, нормализованная на единицу (правая у-ось). Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

В отличие от оптических методов, включая те, которые основаны на флуоресценции, на результаты измерений МРQ-цитометрии не влияют оптические свойства образца. Таким образом, метод позволяет детектировать наночастицы, связанные с клетками, даже в оптически непрозрачных средах и вне зависимости от многих факторов, которые влияют на оптические свойства образца, например, выгорание или окисление меток, зависимость их свойств от рН или температуры, аутофлуоресценция образцов, модификация наночастиц после интернализации в клетки и ряда других.

2. Создание конъюгатов и надмолекулярных конструкций на основе наночастиц магнетита, мини-антител и белкового модуля “барназа:барстар” для селективного мечения клеток

Для адресной доставки наночастиц к клеткам-мишеням в качестве направляющих агентов успешно используются полноразмерные антитела, различными способами иммобилизованные на поверхности наночастиц. Однако в некоторых случаях более перспективным представляется использование конструкций на основе антигенсвязывающих участков антител, например, мини-антител формата scFv. Малый размер и отсутствие константного домена понижает иммуногенность таких молекул. Следует также отметить лёгкость их биотехнологической наработки и возможность создания генно-инженерных конструкций с токсичными/визуализирующими блоками.

Первоначально нами были получены надмолекулярные конструкции на основе наночастиц CMD100 и генно-инженерных рекомбинантных мини-антител 4D5scFv, высоко специфичных к внеклеточному домену рецептора HER2/neu. Конъюгаты наночастиц CMD100 с 4D5scFv (CMD100-4D5scFv) неспецифично взаимодействовали с с HER2/neu-гиперэкспрессирующими клетками SK-BR-3, в равной степени связываясь с HER2/neu-отрицательными клетками CHO. Вероятно, это связано с агрегацией частиц при конъюгации, вызванной формированием локально положительных зарядов на поверхности частиц, т.к. 4D5scFv – небольшой положительно заряженный белок при pH = 7.4 (pI = 8.5). Проблема специфичности связывания может также возникать вследствие стерических затруднений (из-за небольшого размера мини-антитела) при распознавании антигена, либо из-за того, что одна молекула белка может связываться с поверхностью наночастиц при конъюгации посредством нескольких аминокислотных групп, что может вызывать частичную денатурацию, приводя к потере функциональной активности.

Для преодоления проблемы агрегации наночастиц и сохранения функциональной активности мини-антител в составе конструкций на основе наночастиц нами была использована система молекулярных адапторов барназа:барстар. Барназа (Vn), бактериальная рибонуклеаза *Bacillus amyloliquefaciens*, и ее природный ингибитор барстар (Vs) – небольшие белки (12 и 10 кДа, соответственно), которые характеризуются чрезвычайно быстрой кинетикой взаимодействия ($k_{on} \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$) и высокой аффинностью связывания ($K_a \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$). Присоединение одного из этих белков к наночастице, а другого – к мини-антителам 4D5scFv, позволяет создавать структуры, специфично распознающие HER2/neu на поверхности клеток. При этом предоставляется возможность двустадийной доставки наночастиц к клеткам и формирование функционально активного комплекса тогда, когда это необходимо.

Для направленной доставки частиц был использован белок слияния 4D5scFv-Vn-4D5scFv, состоящий из двух молекул мини-антитела 4D5scFv и одной молекулы Vn, компонента системы Vn:Vs. Для присоединения к поверхности наночастиц был выбран Vs, так как в нейтральных условиях этот белок заряжен отрицательно (pI 4.6) и, как следствие, при конъюгации он не должен вызывать агрегацию частиц из-за гашения их поверхностного заряда. Действительно, конъюгаты CMD100-Vs не

агрегировали – после конъюгации их размер и ζ -потенциал практически не изменялись. Анализ количества конструкций (CMD100-Bs):(4D5scFv-Bn-4D5scFv) (рис. 6А), связавшихся с клетками, проводили с использованием МРQ-цитометрии, результаты взаимодействия полученных структур с клетками представлены на рис. 6Б. Таким образом, использование модуля Bn:Bs позволило получить коллоидно стабильные конъюгаты магнитных наночастиц с мини-антителами формата scFv, специфично распознающие раковые клетки, гиперэкспрессирующие онкомаркёр HER2/neu.

Среди преимуществ мини-антител следует также выделить возможность создания полностью генетически кодируемых конструкций направленного действия для визуализации раковых клеток. Соединение таких конструкций с наночастицами позволяет создавать многофункциональные агенты, которые делают возможным как визуальную, так и количественную оценку экспрессии определённых антигенов на клеточной поверхности, что может найти применение в диагностике заболеваний. Нами были созданы коллоидно стабильные конъюгаты CMD100 с белком слияния 4D5scFv-mCherry (рис. 6А). Флуоресцентный белок mCherry – один из наиболее популярных белков из серии mFruits, обладающий оптимальным сочетанием времени созревания, фотостабильности и яркости, а также длины волны испускания флуоресценции. Поскольку mCherry заряжен отрицательно (расчётное значение pI 3.8), мини-антитело 4D5scFv, находясь в составе такого белка слияния, не вызывает агрегации наночастиц при конъюгации, сохраняя при этом свою функциональную активность. Данные конъюгаты CMD100-(4D5scFv-mCherry) специфично окрашивали поверхность раковых клеток, гиперэкспрессирующих HER2/neu, что было продемонстрировано визуально с использованием флуоресцентной микроскопии (рис. 6В).

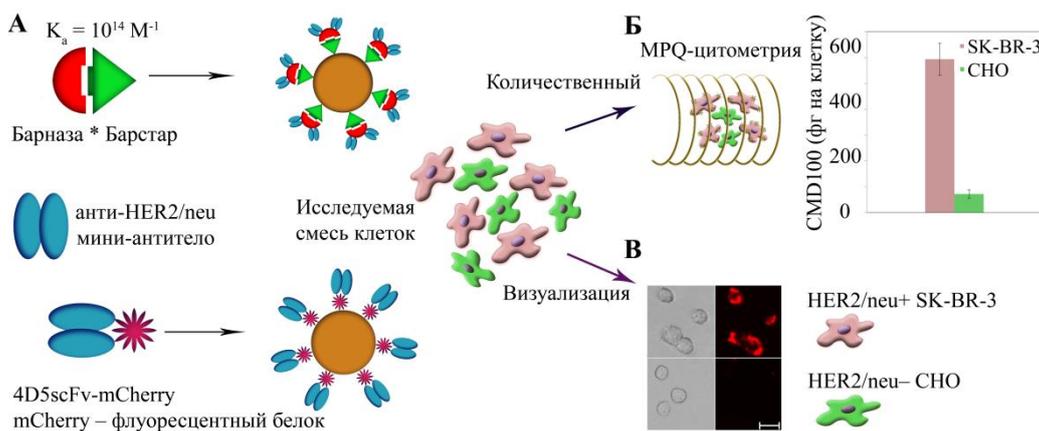


Рис. 6. Селективное мечение клеток конструкциями на основе наночастиц CMD100 и мини-антител. **А)** Схема конструкций. **Б)** МРQ-цитометрия клеток SK-BR-3 и CHO после связывания с суспензией конструкций (CMD100-Bs):(4D5scFv-Bn-4D5scFv). **В)** Специфичная визуализация HER2/neu на поверхности клеток конъюгатами CMD100-(4D5scFv-mCherry) с помощью флуоресцентной микроскопии; левая панель – изображения в проходящем свете; правая панель – при возбуждении флуоресценции. Шкала – 20 мкм.

3. Адресная доставка наночастиц к клеткам-мишеням на основе специфического взаимодействия наночастиц, модифицированных лектинами, с гликозилированными белками на поверхности клеток

3.1. Исследование взаимодействия “лектин-гликопротеин” в составе наночастиц различной природы

Данная часть работы была направлена на изучение молекулярной пары “лектин–углеводный остаток в составе гликопротеина” как универсальной платформы для сборки наночастиц различной природы и их адресной доставки к клеткам. Представляется перспективным использование лектинов в качестве направляющего модуля для адресной доставки диагностических и терапевтических агентов к раковым клеткам, поскольку профиль гликозилирования раковых клеток может отличаться от такового у нормальных клеток.

Было проведено комплексное исследование взаимодействия гликопротеинов с рядом лектинов растительного происхождения разной специфичности с использованием наночастиц различной природы, а именно, магнитных и золотых, с целью поиска эффективно взаимодействующих белковых пар для создания новых классов многофункциональных наноагентов, основанных на белок-опосредованной сборке. В составе пар для исследования взаимодействия использовали следующие лектины разной специфичности к моносахаридам: агглютинин чечевицы пищевой (*Lens culinaris* agglutinin, LCA), конканавалин А (лектин из *Canavalia ensiformis*, ConA), агглютинин зародыша пшеницы (wheat germ agglutinin, WGA), агглютинин из соевых бобов (soybean agglutinin, SBA) и следующие гликопротеины: овальбумин из яичного белка, асиалофетуин сыворотки телёнка, фетуин бычьей сыворотки, бычий трансферрин, бычий лактоферрин, человеческий лактоферрин, овомукоид из яичного белка (ингибитор трипсина) и муцин из свиного желудка.

Нами была исследована специфичность взаимодействия гликопротеинов с магнитными наночастицами, ковалентно связанными с лектинами, а также лектинов с золотыми наночастицами, на которых были электростатически сорбированы гликопротеины. В качестве магнитных наночастиц использовали наночастицы fluidMAG-ARA 250 нм (Chemicell), состоящие из магнетита, покрытого полимером глюкуроновой кислоты, с доступными для конъюгации –COOH группами (далее, ARA250). Данные магнитные частицы были модифицированы лектинами посредством ковалентного присоединения карбодиимидным методом. Была исследована проблема универсальности полученных результатов взаимодействий “лектин–гликопротеин” для принципиально других по своим физико-химическим свойствам наночастиц, в качестве которых были выбраны золотые наночастицы (ЗЧ). Эти частицы обладают свойствами локализованного поверхностного плазмонного резонанса, являясь удобными оптическими маркерами биохимических реакций. Модификацию гликопротеинами наночастиц золота, синтезированных восстановлением HAuCl_4 цитратом натрия, проводили путём адсорбции исследуемого белка на поверхности частицы при рН, соответствующем изоэлектрической точке белка.

Изучение специфичности связывания наночастиц, модифицированных лектинами (или гликопротеинами), с гликопротеинами (или лектинами соответственно) проводили с помощью метода иммунохроматографии на нитроцеллюлозных тест-полосках (**рис. 7**). Был установлен сходный характер взаимодействия в паре “лектин–гликопротеин” как при взаимодействии с гликопротеинами наночастиц ARA250 (**рис. 7**, левая панель), модифицированных лектинами, так и при взаимодействии с лектинами золотых частиц, модифицированных гликопротеинами (**рис. 7**, правая панель). Все полученные данные о взаимодействиях “лектин–гликопротеин” объединены в **табл. 1**, где самому сильному взаимодействию присвоено значение по условной шкале “3”, а самому слабому “0”.

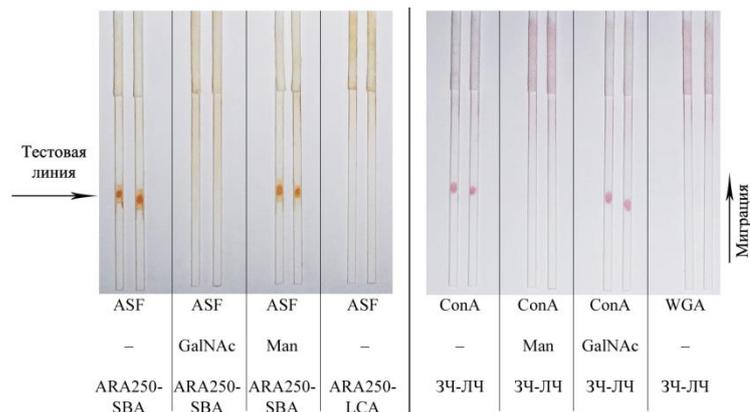


Рис. 7. Исследование взаимодействий лектинов с гликопротеинами методом иммунохроматографии. Левая панель: на тест-полоски нанесён асиалофетуин (ASF), в качестве анализата – наночастицы ARA250, конъюгированные с агглютинином соевых бобов (ARA250-SBA). Слева направо в 2-х повторах расположены по порядку: полоски без блокирующего моносахарида, далее с N-ацетилгалактозой (GalNAc) и с маннозой (Man). Последние две полоски – отсутствие взаимодействия с ASF магнитных наночастиц, конъюгированных с агглютинином LCA. Правая панель: на тест-полоски нанесён конканавалин А (ConA), в качестве анализата – золотые частицы с иммобилизованным лактоферрином человека (ЗЧ-ЛЧ). Слева направо в 2-х повторах расположены по порядку: полоски без блокирующего моносахарида, далее с Man и с GalNAc. Последние две полоски – отсутствие взаимодействия ЗЧ-ЛЧ с нанесённым на тест-полоску агглютинином зародыша пшеницы (WGA).

3.2. Конструкции на основе магнитных частиц и лектинов для специфичного мечения клеток

Методом МРQ-цитометрии было проведено исследование возможности специфичного мечения клеток эукариот полученными конъюгатами магнитных частиц с лектинами. Исследовали взаимодействие конъюгатов с клетками Т-лимфобластной лейкемии Jurkat. В качестве контроля специфичности взаимодействия использовали блокировку моносахаридом, специфичным к лектину, во время инкубации. На **рис. 8А** представлены результаты связывания конъюгатов ARA250 с опухолевыми клетками. Поскольку для всех видов конъюгатов удалось получить значимую разницу в основном и контрольном эксперименте, мы предположили, что данные конъюгаты могут быть использованы для различения клеточных линий с различным профилем гликозилирования поверхностных белков.

Это предположение подтвердили мечением двух линий клеток – Jurkat и 7.16.4 наночастицами ARA250, конъюгированными с лектинами (**рис. 8Б**). Действительно,

количество конъюгатов ARA250-WGA, связавшихся с линией Jurkat, превышало таковое для линии 7.16.4 в 3.91 ± 0.14 раза. Более того, обратимость связывания лектинов с гликопротеинами сохраняется и в составе их конъюгатов с магнитными частицами, что было показано на примере двух типов конъюгатов наночастиц ARA250 – с конканавалином А и агглютинином зародыша пшеницы (рис. 8В).

Таблица 1. Специфичность взаимодействия лектинов с гликопротеинами, определённая методом иммунохроматографии на тест-полосках.

| Гликопротеин | Блокирующий моносахарид | Лектин | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| | | Агглютинин чечевицы пищевой (LCA) | Конканавалин А (ConA) | Агглютинин зародыша пшеницы (WGA) | Агглютинин соевых бобов (SBA) |
| Овальбумин из яичного белка | | 0 | 1 | 2 | 0 |
| | Man | 0 | 0 | 2 | |
| | GlcNAc | | 0 | 0 | |
| | GalNAc | | 1 | 0 | 0 |
| Асиалофетuin сыворотки теленка | | 0 | 0 | 0 | 2 |
| | Man | 0 | 0 | | 1 |
| | GlcNAc | | | 0 | 1 |
| | GalNAc | | | | 0 |
| Фетuin бычьей сыворотки | | 1 | 0 | 2 | 0 |
| | Man | 0 | 0 | 2 | |
| | GlcNAc | | | 0 | |
| | GalNAc | | | 0 | 0 |
| Бычий трансферрин | | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | Man | 0 | 1 | 0 | |
| | GlcNAc | | | 0 | |
| | GalNAc | | | 0 | 0 |
| Бычий лактоферрин | | 2 | 3 | 3 | 0 |
| | Man | 0 | 0 | 3 | |
| | GlcNAc | 0 | 3 | 0 | |
| | GalNAc | 1 | 3 | 3 | 0 |
| Человеческий лактоферрин | | 1 | 3 | 0 | 0 |
| | Man | 0 | 1 | | |
| | GlcNAc | 0 | 3 | 0 | |
| | GalNAc | 1 | 3 | | 0 |
| Овомукоид из яичного белка | | 0 | 0 | 2 | 0 |
| | Man | 0 | 0 | 2 | |
| | GlcNAc | | | 0 | |
| | GalNAc | | | 1 | 0 |
| Муцин из свиного желудка | | 0 | 2 | 3 | 2 |
| | Man | 0 | 0 | 3 | 2 |
| | GlcNAc | | 0 | 0 | 2 |
| | GalNAc | | 2 | 3 | 0 |

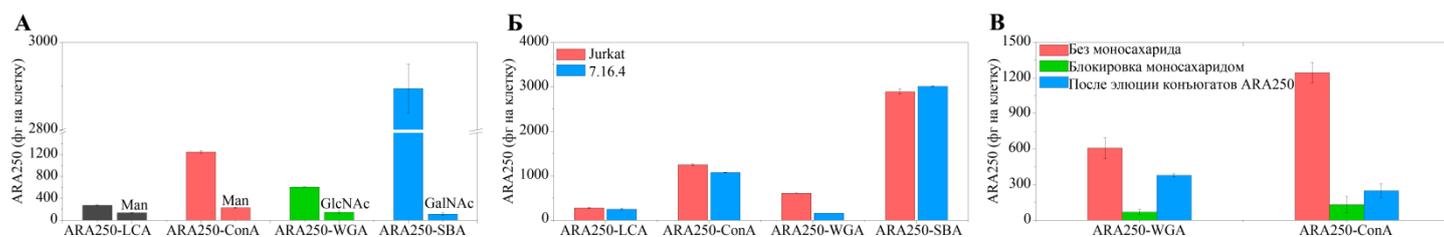


Рис. 8. Результаты связывания наночастиц ARA250, конъюгированных с лектинами, с опухолевыми клетками. **А)** Взаимодействие ARA250, конъюгированных с четырьмя лектинами различной специфичности, с клетками Jurkat в отсутствие и в присутствии блокирующего моносахарида. **Б)** Взаимодействие ARA250, конъюгированных с лектинами, с клеточными линиями Jurkat и 7.16.4. **В)** Обратимость связывания ARA250, конъюгированных с лектинами с поверхностью клеток Jurkat. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

4. Контролируемое мечение клеток *in vitro* на основе биокомпьютерного анализа входных сигналов

Одним из подходов к созданию автономных систем, анализирующих большой набор биохимической информации для задач тераностики, является разработка биороботов на основе биомолекул, способных осуществлять элементарные логические функции и выполнять заранее заданные действия на основе вычислений.

В последние два десятилетия был разработан ряд систем, которые выполняют логические вычисления с использованием биомолекул (ДНК/РНК, белков, пептидов и низкомолекулярных соединений) и наночастиц. Ранее было показано, что только системы на основе ДНК/РНК могут выполнять полный набор булевых функций. Наночастицы, обладающие развитой поверхностью для связывания и возможностью приборной детекции, дополненные биокомпьютерными возможностями, представляются как новые уникальные средства тераностики, нацеленные на решение актуальных проблем биомедицины. В нашей лаборатории был предложен новый подход к созданию биокомпьютерных комплексов на основе практически любых типов наночастиц [Nikitin *et al.*, *Nat. Nanotech.*, 2014]. Данный принцип позволяет конструировать биокомпьютерные комплексы, реализующие полную систему булевых функций. Принципы конструирования таких комплексов схематично представлены на **рис. 9**.

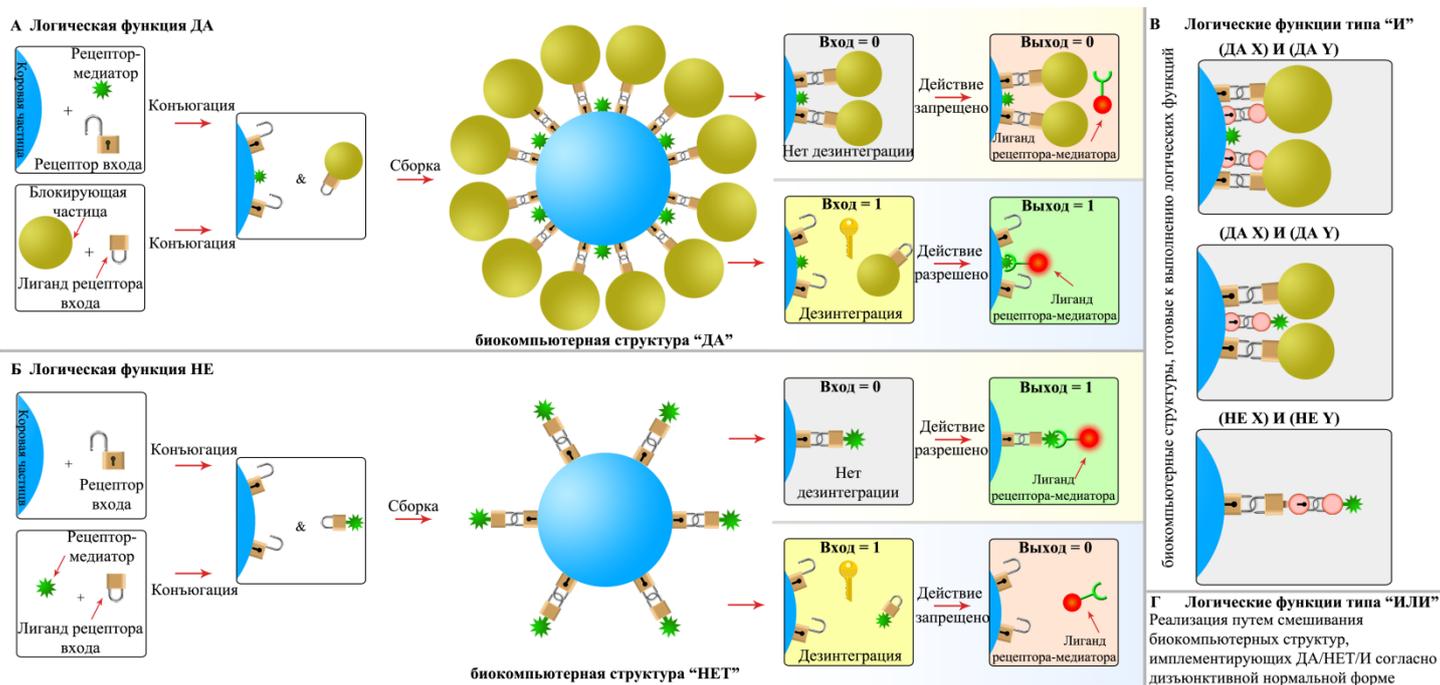


Рис. 9. Принципы конструирования биокомпьютерных структур на основе наночастиц, имплементирующих логические функции “ДА”/”НЕТ”/”И”/”ИЛИ”. А) Сборка и действие биокомпьютерной структуры “ДА”. Б) Сборка и действие биокомпьютерной структуры “НЕТ”. В) Конструирование трёх различных биокомпьютерных структур типа “И” с операндами “ДА” и “НЕТ”. Г) Функции типа “ИЛИ” реализуются путём смешивания структур “ДА”, “НЕТ”, “И” согласно дизъюнктивной нормальной форме [Nikitin *et al.*, *Nat. Nanotech.*, 2014].

В качестве демонстрации применимости разработанного подхода к созданию универсальных биокомпьютерных структур для потенциальных биомедицинских задач,

наряду с различными форматами иммуноанализа [Nikitin et al., Nat. Nanotech., 2014], была продемонстрирована адресная доставка таких структур к клеткам эукариот на основе логического анализа молекулярных входных сигналов. Растворимые соединения в организме являются важными биохимическими данными для автономных тераностических агентов, поскольку организм использует кровь и другие биологические жидкости для передачи биохимической информации между клетками. Распознавание такой информации может позволить таким агентам идентифицировать определённые заболевания (например, диабет) и процессы (например, воспаление или ангиогенез), а возможность использовать рецептор-медиатор взаимодействия для специфичного связывания с определёнными клетками как действие, соответствующее выходу логической функции, может быть использована для селективного уничтожения патогенных клеток.

Для нацеливания на клетки были выбраны наночастицы fluidMAG-ARA 100 нм (Chemicell, далее, ARA100) в качестве коровых частиц, а в качестве модельного рецептора-медиатора взаимодействия использовали лектин WGA, который специфично связывает остатки N-ацетил-D-глюкозамина и сиаловой кислоты. В качестве входных сигналов выступали низкомолекулярные соединения: сукцинат хлорамфеникола (сХАФ) и флуоресцеин-этаноламин (ФЛУО). Интерфейсом, который подвергался дезинтеграции, под воздействием входных сигналов, служили взаимодействия “антиген:антитело”, а именно, анти-ФИТЦ IgG:ФИТЦ/ФЛУО и анти-ХАФ IgG:cХАФ. Детальное конструирование данных структур схематично представлено на **рис. 10**.

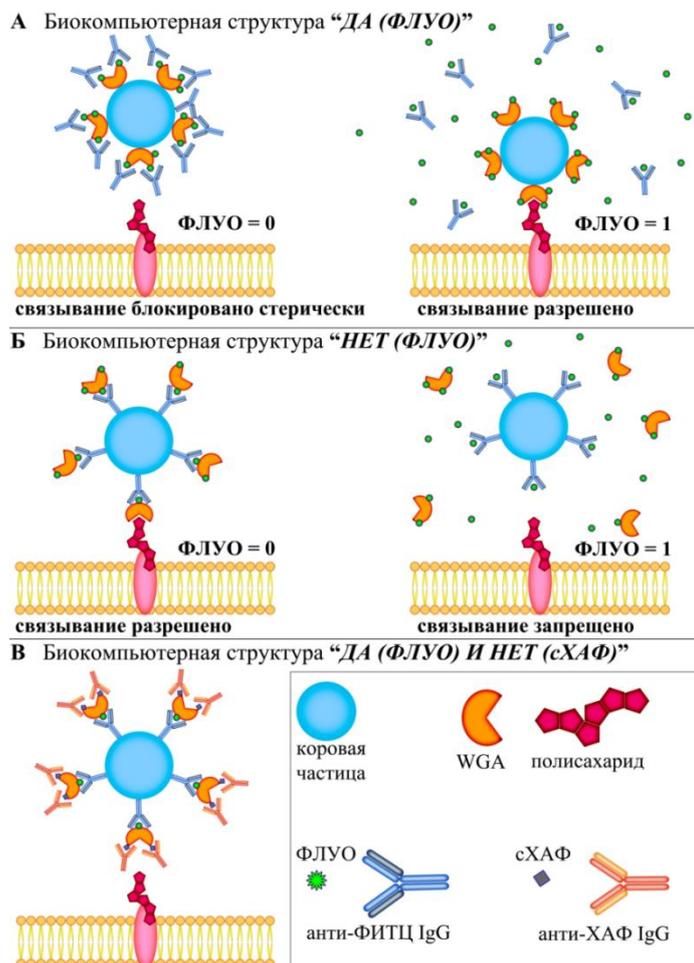


Рис. 10. Конструирование биокomпьютерных структур “ДА (ФЛУО)”, “НЕТ (ФЛУО)” и “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)”. **А)** При отсутствии входа (ФЛУО = 0) связывание коровой частицы с поверхностью клетки заблокировано стерически анти-ФИТЦ антителами. При наличии входа (ФЛУО = 1) происходит дезинтеграция ФЛУО:анти-ФИТЦ IgG интерфейса, и связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток разрешено. **Б)** При ФЛУО = 1 связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток разрешено, при ФЛУО = 0 происходит дезинтеграция ФЛУО:анти-ФИТЦ IgG интерфейса и связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток невозможно. **В)** Бинарная операция “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)” представляет собой суперпозицию унарных операций – ДА и НЕТ. Связывание коровой частицы с клеткой возможно только при наличии входа сХАФ=1, разрушающего сХАФ:анти-ХАФ IgG интерфейс. Отсутствие входов (сХАФ = 0, ФЛУО = 0) запрещает связывание стерически, наличие ФЛУО (ФЛУО = 1) помимо сХАФ дезинтегрирует ФЛУО:анти-ФИТЦ IgG интерфейс и запрещает WGA-опосредованное связывание коровой частицы с полисахаридами на поверхности клеток.

В качестве блокирующих компонентов, стерически препятствующих взаимодействию коровых частиц с мишенью, выступали молекулы IgG, размер которых ($\approx 7-14$ нм) достаточен для стерической блокировки взаимодействия лектина WGA, иммобилизованного на коровой частице, с остатками полисахаридов на клеточной мембране.

Как было показано в предыдущей главе, данный лектин может быть использован для адресной доставки наночастиц к Т-клеткам Jurkat. В качестве доказательства концепции, была реализована доставка наночастиц к клеткам на основе выполнения двух унарных операций: “ДА (ФЛУО)” и “НЕТ (ФЛУО)” и одной бинарной операции “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)”. Биокomпьютерные структуры инкубировали с молекулярными входными сигналами и затем инкубировали с суспензией клеток. Количество связанных с клетками структур определяли методом MPQ-цитометрии.

Специфичность адресной доставки подтверждали тестированием взаимодействия биокomпьютерных структур в тех же условиях с клетками линии Jurkat в присутствии блокирующего моносахарида, а также с клетками линии 7.16.4. Выше (раздел 3.2) было показано, что клетки данной линии гораздо слабее взаимодействуют с конъюгатами наночастиц с лектином WGA по сравнению с клеточной линией Jurkat.

Как видно из данных, представленных на **рис. 11**, дезинтеграция комплексов, вызванная наличием молекулярных входов (сХАФ и ФЛУО), действует как результат биокomпьютерных операций только на клетки Jurkat и практически не влияет на неспецифичное связывание с линией 7.16.4 и на связывание с линией Jurkat в присутствии блокирующего моносахарида GlcNAc.

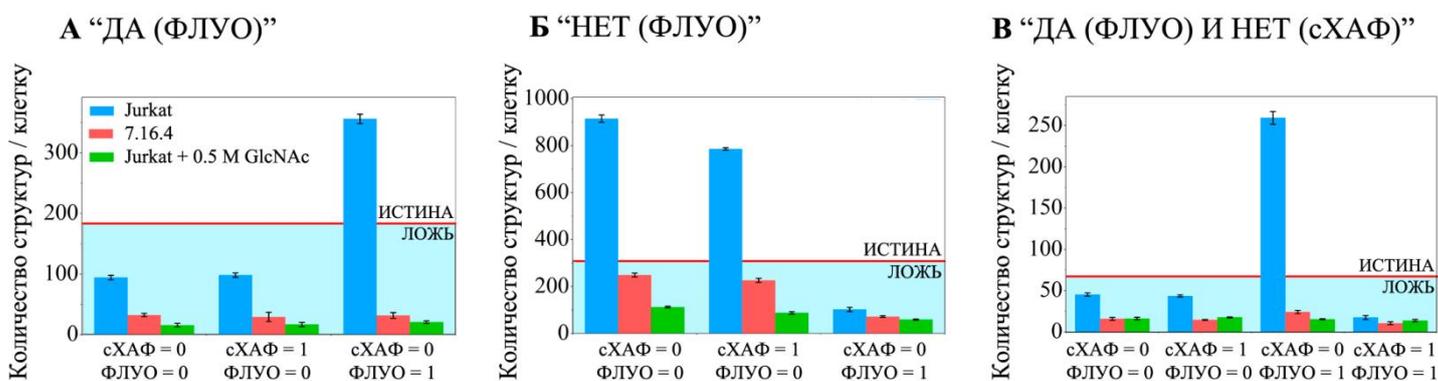


Рис. 11. Адресная доставка наночастиц к клеткам как результат выполнения логических функций. Представлено количество структур, связавшихся с клетками (определённое методом MPQ-цитометрии), в зависимости от различных комбинаций входных сигналов (ФЛУО и сХАФ) для унарных функций: “ДА (ФЛУО)” (А) и “НЕТ (ФЛУО)” (Б) и бинарной функции “ДА (ФЛУО) И НЕТ (сХАФ)” (В). В качестве клеток-мишеней были выбраны Jurkat в отсутствие (голубые столбцы) и в присутствии блокирующего моносахарида GlcNAc (зелёные столбцы) и 7.16.4 (красные столбцы). Для каждой операции порог “ИСТИНА-ЛОЖЬ” задан как среднее геометрическое между максимальным и минимальным выходным сигналом для клеток Jurkat. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

5. Контролируемое мечение клеток *in vivo* на основе биокомпьютерного анализа входных сигналов

На сегодняшний день предложен ряд подходов к конструированию наноагентов, имплементирующих любые логические операции, которые, на основе анализа нескольких биохимических входных сигналов, могут, например, высвобождать токсин и адресно воздействовать на клетки *in vitro*. Ранее было продемонстрировано, что нанороботы на основе ДНК могут быть использованы для адресной доставки к гемоглобину (клетки гемолимфы, аналогичные лейкоцитам человека) таракана *Blaberus discoidalis in vivo*. Данная модель *in vivo* была использована ввиду низкой системной нуклеазной активности и хорошей химической совместимости со структурами ДНК, однако до сих пор оставалось неясно, могут ли биокомпьютерные комплексы использоваться для молекулярных вычислений в более сложном организме, а именно, в млекопитающем.

Для демонстрации применимости описанного выше разработанного подхода к созданию и использованию автономных биокомпьютерных систем *in vivo*, мы реализовали адресную доставку биокомпьютерных структур, вводимых внутривенно, к CD4+ клеткам крови лабораторных мышей на основе логического анализа молекулярных входных сигналов, присутствующих в кровотоке животных.

Для нацеливания на CD4+ клетки в качестве коровых частиц использовали магнитные наночастицы Estapor 227 нм, магнетизм которых позволяет отслеживать поведение наночастиц *in vivo* по наличию сигнала внешней магнитной индукции в кровотоке животных, а модификация флуоресцентной меткой (в данном случае, ФИТЦ) позволяет оценивать интенсивность связывания частиц с клетками. В качестве модельного рецептора-медиатора взаимодействия использовали антитело анти-CD4 IgG (клон GK1.5), специфично связывающее мышиный CD4. В качестве входных сигналов выступали низкомолекулярные соединения: антибиотик – сукцинат хлорамфеникола (сХАФ) и витамин B9 – фолиевая кислота (ФК). Интерфейсом, который подвергся дезинтеграции, под воздействием входных сигналов, служили взаимодействия “антиген:антитело”, а именно анти-ХАФ IgG:сХАФ и анти-ФК IgG:ФК.

Были реализованы три логические функции *in vivo*: две унарные: НЕТ (сХАФ), ДА (сХАФ) и, в качестве примера бинарной функции: ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ). Для этого коровые наночастицы Estapor 227 нм конъюгировали с белками и инкубировали с нацеливающими антителами (анти-CD4 IgG или Rat IgG для контрольных экспериментов) и блокирующими антителами следующим образом:

1) для функции **НЕТ (сХАФ)**: наночастицы Estapor конъюгировали с анти-ХАФ IgG и БСА-ФИТЦ (**Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ)**). Далее полученные структуры инкубировали с анти-CD4 IgG-ХАФ (или Rat IgG-ХАФ для контрольных экспериментов). Таким образом, структуры связываются с CD4 на поверхности клеток в том и только в том случае, когда в окружении отсутствует сХАФ (сХАФ = 0, связывание есть: выход = 1; но при наличии сХАФ, т.е. когда сХАФ = 1, связывание

предотвращается элюцией анти-CD4 IgG-ХАФ или Rat IgG-ХАФ с поверхности структур, т.е. выход = 0).

2) для функции **ДА (сХАФ)**: наночастицы Estapor конъюгировали с анти-Rat IgG и БСА-ФИТЦ (**Estapor-(анти-Rat IgG&БСА-ФИТЦ)**). Далее полученные структуры инкубировали с нацеливающими антителами анти-CD4 IgG-ХАФ (или Rat IgG-ХАФ для контрольных экспериментов) и с блокирующими антителами анти-ХАФ IgG, которые стерически блокируют взаимодействие нацеливающих антител с CD4. Таким образом, структуры связываются с CD4 на поверхности клеток в том и только в том случае, когда в окружении присутствует сХАФ (сХАФ = 1, происходит элюция анти-ХАФ IgG, что разрешает связывание с CD4, т.е. выход = 1; но при отсутствии сХАФ, т.е. когда сХАФ = 0, связывание заблокировано стерически, т.е. выход = 0).

3) для бинарной функции **ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)**: наночастицы Estapor конъюгировали с анти-ХАФ IgG и БСА-ФИТЦ-ФК (**Estapor-(анти-ХАФ IgG&БСА-ФИТЦ-ФК)**). Далее полученные структуры последовательно инкубировали с нацеливающими антителами анти-CD4 IgG-ХАФ (или Rat IgG-ХАФ для контрольных экспериментов) и с блокирующими антителами анти-ФК IgG, которые стерически блокируют взаимодействие нацеливающих антител с CD4. Таким образом, структуры связываются с CD4 на поверхности клеток в том и только в том случае, когда в окружении присутствует только ФК, элюирующая анти-ФК IgG (ФК = 1, сХАФ = 0 – связывание разрешено), при наличии сХАФ (вне зависимости от наличия ФК) связывание предотвращается элюцией нацеливающих антител с поверхности частицы (ФК = 0, сХАФ = 1 или ФК = 1, сХАФ = 1 – выход = 0).

На основании данных флуоресцентной спектроскопии было продемонстрировано, что инкубация конъюгатов как с нацеливающими, так и с блокирующими антителами практически не влияет на интенсивность флуоресценции комплексов в тестируемых условиях. Более того, согласно данным флуоресцентной микроскопии, конъюгаты после инкубации с нацеливающими и с блокирующими антителами сохраняли монодисперсность и не агрегировали. Следовательно, интенсивность флуоресценции клеток, меченных данными биокомпьютерными структурами (оцененная, например, методом проточной цитофлуориметрии), может быть использована для количественной оценки эффективности доставки данных структур к клеткам.

Полученные структуры, имплементирующие логические функции НЕТ (сХАФ), ДА (сХАФ), ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ), вводили мышам линии Balb/c. Перед инъекцией биокомпьютерных структур мышей анестезировали и вводили им растворы сукцината хлорамфеникола или фолиевой кислоты (либо эквимольную смесь сХАФ и ФК) согласно реализуемым логическим функциям. Входной сигнал = 0 означает, что инъекция молекулярных входов не производилась, входной сигнал = 1 означает, что инъекция молекулярных входов производилась перед инъекцией биокомпьютерных структур. Забор крови для анализа проточной цитофлуориметрией осуществляли через 8 мин из ретроорбитального синуса, противоположного тому, куда инъецировали биокомпьютерные структуры.

Эффективность доставки биокомпьютерных структур к CD4+ клеткам крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Образцы крови после инъекции биокомпьютерных структур инкубировали с анти-CD4 IgG, меченными PerCP/Cy5.5 (клон RM4-4), лизировали эритроциты и анализировали проточной цитофлуориметрией. Клон RM4-4 не конкурирует с клоном GK1.5 и, таким образом, позволяет точно идентифицировать популяцию CD4+ клеток крови, меченных биокомпьютерными структурами. Эффективность доставки биокомпьютерных структур к CD4+ клеткам крови оценивали по медиане интенсивности флуоресценции популяции клеток, выделенной по окрашиванию антителами анти-CD4 IgG-PerCP/Cy5.5 (RM4-4), в канале, соответствующем флуоресценции ФИТЦ. Инъекцию биокомпьютерных структур проводили в ретроорбитальный синус. Эффективность инъекции и динамику выведения биокомпьютерных структур из кровотока животных оценивали методом MRQ, помещая хвост мыши в измерительную зону MRQ-регистратора (рис. 12А). Детектируемый магнитный сигнал в хвосте мыши представлен как процент от максимально достигнутого при данной инъекции (рис. 12Б).

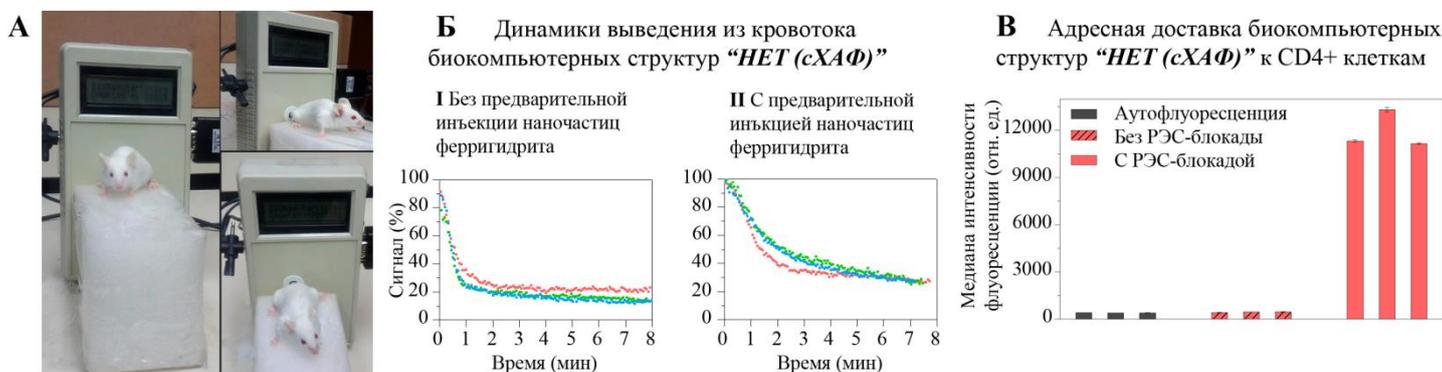
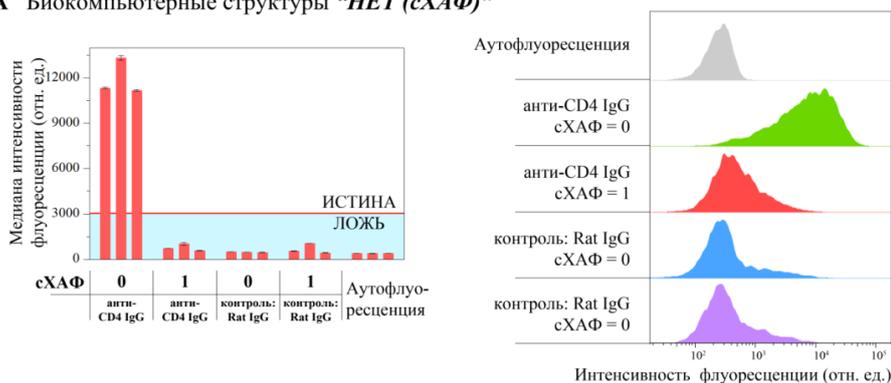


Рис. 12. Применение РЭС-блокады для адресной доставки наночастиц к клеткам как результата выполнения логических операций. **А)** Исследование динамики циркуляции наночастиц в кровотоке мышей с использованием MRQ-регистратора. **Б)** MRQ-динамики циркуляции биокомпьютерных структур НЕТ (сХАФ) в кровотоке без РЭС-блокады и с предварительной инъекцией наночастиц ферригидрата, вызывающих РЭС-блокаду. **В)** *In vivo* доставка биокомпьютерных структур НЕТ (сХАФ) в отсутствие молекулярных входов к CD4+ клеткам без РЭС-блокады и с предварительной инъекцией наночастиц ферригидрата.

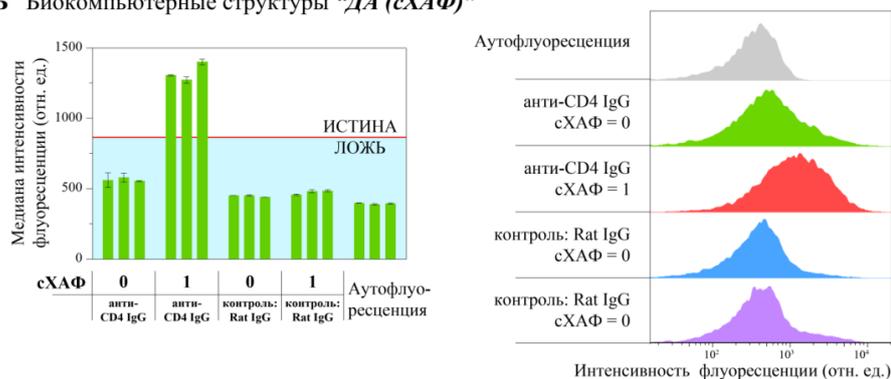
Ввиду быстрого выведения биокомпьютерных структур из кровотока (рис. 12Б, Г), мечение CD4+ клеток было крайне неэффективным (рис. 12В красные заштрихованные столбцы), практически не отличимым от аутофлуоресценции клеток в канале флуоресценции, соответствующем флуоресценции ФИТЦ. Для достижения эффективного мечения CD4+ клеток крови, мы использовали блокаду ретикулоэндотелиальной системы (РЭС-блокаду), а именно проводили инъекцию наночастиц ферригидрата в дозировке 250 мг/кг за 30 минут до инъекции биокомпьютерных структур для насыщения макрофагов РЭС. Как видно из данных, представленных на рис. 12Б, время циркуляции структур значительно увеличивалось и эффективность доставки к CD4+ клеткам структур НЕТ (сХАФ) *in vivo* возрастала в 27.5 раз (рис. 12В красные столбцы).

На **рис. 13** представлены данные по эффективности мечения биокomпьютерными структурами CD4+ клеток *in vivo* для трёх реализуемых логических функций. Показано, что обе унарные функции демонстрируют ожидаемое поведение и выходной сигнал превышает порог “Истина-Ложь” только в присутствии в крови входного сигнала, соответствующего истинному значению выходного сигнала. Вне зависимости от входного сигнала, контрольные агенты, содержащие контрольное антитело Rat IgG (а не анти-CD4 IgG), демонстрируют связывание с CD4+ популяцией существенно ниже порогового значения, сравнимое с аутофлуоресценцией клеток (т.е. результат = Ложь). Бинарная функция также демонстрирует ожидаемое поведение: выходной сигнал выше порогового значения в присутствии только ФК в образце и в отсутствие сХАФ, во всех других случаях сигнал незначительно отличается от аутофлуоресценции.

А Биокomпьютерные структуры “НЕТ (сХАФ)”



Б Биокomпьютерные структуры “ДА (сХАФ)”



В Биокomпьютерные структуры “ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)”

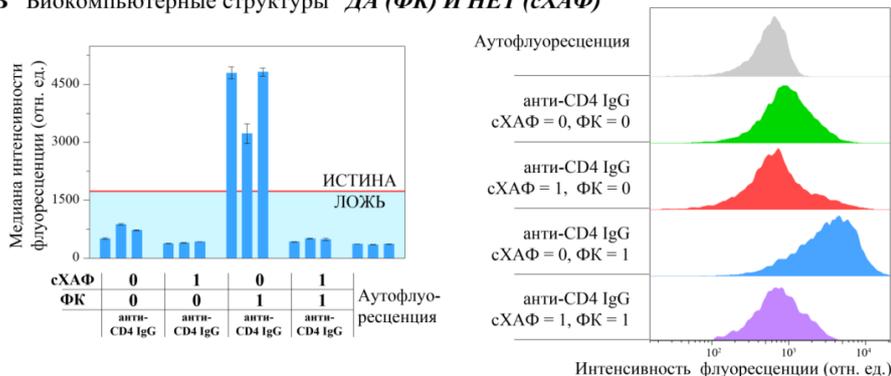


Рис. 13. *In vivo* доставка к CD4+ клеткам крови мыши ФИТЦ-меченых биокomпьютерных структур, имплементирующих логические функции “**НЕТ (сХАФ)**” – А, “**ДА (сХАФ)**” – Б, и “**ДА (ФК) И НЕТ (сХАФ)**” – В. Последовательно проводили инъекции в кровотоки молекулярных входных сигналов (сХАФ, ФК; 0 – отсутствие, 1 – наличие инъекции) и биокomпьютерных структур. Слева: медианы интенсивности флуоресценции CD4+ популяции клеток крови (в канале, соответствующем флуоресценции ФИТЦ). Порог “Истина-Ложь” проведён как среднее геометрическое между минимальным и максимальным выходным сигналом. Справа: нормализованные гистограммы, соответствующие интенсивности флуоресценции CD4+ клеток в канале, соответствующем ФИТЦ.

ВЫВОДЫ

1. Синтезированы и охарактеризованы адресные наночастицы оксида железа, с высокой специфичностью связывающие рецептор HER2/neu на поверхности клеток-мишеней. Показана высокая селективность (130:1) мечения клеток-мишеней полученными адресными наночастицами по сравнению с клетками, не несущими маркера HER2/neu.
2. На примере полученных адресных наночастиц оксида железа разработан новый метод МРQ-цитометрии для количественной детекции взаимодействия наночастиц с клетками эукариот, позволяющий с высокой чувствительностью (0.33 нг или $6.5 \cdot 10^{-18}$ моль частиц в объеме 30 мкл) детектировать наночастицы в оптически непрозрачных средах вне зависимости от факторов, влияющих на оптические свойства образца. Показано, что метод МРQ-цитометрии вместе с полученными адресными частицами может быть использован для высокочувствительной селективной детекции клеток-мишеней в составе сложной смеси, а также для количественной оценки уровня экспрессии мембраноассоциированных антигенов.
3. Созданы конъюгаты и надмолекулярные конструкции на основе наночастиц магнетита, рекомбинантных мини-антител 4D5scFv и модуля барназа:барстар. Продемонстрирована селективность мечения клеток-мишеней и количественный анализ экспрессии онкомаркера HER2/neu на их поверхности полученными конструкциями.
4. Разработана эффективная система селективного мечения опухолевых клеток с различным профилем гликозилирования поверхностных белков с помощью магнитных частиц, модифицированных лектинами.
5. Продемонстрировано специфичное взаимодействие конъюгатов магнитных частиц, модифицированных лектинами, с эукариотическими клетками в культуре. Показано, что конъюгаты магнитных частиц с агглютинином зародыша пшеницы могут быть использованы для идентификации клеточных линий. Показана обратимость взаимодействия данных конъюгатов с клетками эукариот в присутствии конкурирующего моносахарида.
6. Впервые получены и охарактеризованы биокомпьютерные комплексы на основе наночастиц и белкового интерфейса, подвергающегося дезинтеграции под воздействием молекулярных входных сигналов, которые позволяют реализовать полный набор булевых функций. Продемонстрирована способность полученных биокомпьютерных комплексов избирательно связываться с клетками-мишенями *in vitro* в результате логических вычислений под воздействием низкомолекулярных соединений как входных сигналов.
7. Впервые показано выполнение унарных и бинарных логических операций биокомпьютерными комплексами на основе наночастиц и белкового интерфейса *ex vivo* в цельной крови и *in vivo* в млекопитающем под воздействием растворимых низкомолекулярных соединений, циркулирующих в крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. V.O. Shipunova, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, S.M. Deyev. MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions// *Nanoscale*. 2016. V. 8, pp. 12764-12772.
2. M.P. Nikitin, V.O. Shipunova, S.M. Deyev, P I. Nikitin. Biocomputing based on particle disassembly// *Nature Nanotechnology*. 2014. V. 9, pp. 716–722.
3. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, С.М. Деев, Р.В. Петров. Комплексное исследование взаимодействия “лектин–гликопротеин” с целью разработки эффективных тераностических наноагентов// *Доклады Академии Наук*. 2015. Т. 464, с. 501-504.
4. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, А.А. Лизунова, М.А. Ермакова, С.М. Деев, Р.В. Петров. Магнитные наночастицы с полиэтиленминовой оболочкой для модификации клеток// *Доклады Академии Наук*. 2013. Т. 452, с. 333-335.

Тезисы докладов на конференциях:

1. V.O. Shipunova, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, S.M. Deyev. Lectin-based Nanoagents for Specific Cell Labelling and Optical Visualization. Тезисы докладов конференции Laser Optics-2016, г. Санкт-Петербург, 2016 (*индексированы в Scopus и Web of Science*).
2. V.O. Shipunova, M.P. Nikitin, K.E. Mironova, P.I. Nikitin, S.M. Deyev. Complexes of Magnetic Nanoparticles and scFv Antibodies for Targeting and Visualizing Cancer Cells. Тезисы докладов конференции IEEE Nano2015 conference, Рим, 2015 (*индексированы в РИНЦ, Scopus и Web of Science*).
3. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Биокomпьютеринговые структуры на основе наночастиц для селективного мечения клеток *in vitro* и *in vivo*. Тезисы докладов XXVIII Зимней молодёжной научной школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2016 (*индексированы в РИНЦ*).
4. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Гибридные конструкции на основе магнитных частиц для контролируемой доставки к клеткам *in vitro* и *in vivo*. Тезисы докладов XXVII Зимней молодёжной научной школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2015 (*индексированы в РИНЦ*).
5. Н.А. Нешетаева, М.П. Никитин, В.О. Шипунова, П.И. Никитин, С.М. Деев. Гибридные конструкции на основе магнитных наночастиц, выполняющие логические операции, для селективного мечения клеток. Тезисы докладов XXVIII Зимней молодёжной научной школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2016 (*индексированы в РИНЦ*).
6. В.О. Шипунова, Т.А. Здобнова, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Изучение взаимодействия модифицированных лектинами наночастиц с клетками эукариот с целью

разработки эффективных тераностических наноагентов. Тезисы докладов 58-й научной конференции МФТИ, Москва-Долгопрудный-Жуковский, 2015.

7. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Многофункциональные надмолекулярные комплексы на основе магнитных частиц для контролируемого воздействия на опухолевые клетки. Тезисы докладов 19 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых, Пушино, 2015.

8. V.O. Shipunova, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, S.M. Deyev. Magnetic nanoparticles for imaging and quantitative analysis of the oncomarker HER2/neu expression on the cell surface. Book of abstracts of 10th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, Дрезден, 2014.

9. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, С.В. Лукаш, С.М. Деев. Магнитные наночастицы, оснащённые адресными элементами, для доставки в клетки-мишени. Тезисы докладов XXV Зимней молодёжной научной школы “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”, Москва, 2013.

10. В.О. Шипунова, М.П. Никитин, С.В. Лукаш, К.Е. Миронова, П.И. Никитин, С.М. Деев. Магнитные наночастицы для визуализации и количественного анализа экспрессии онкомаркёра HER2/neu на поверхности опухолевых клеток. Тезисы докладов 17 Международной Пушинской школы-конференции молодых учёных, Пушино, 2013.

11. В.О. Шипунова, К.Е. Миронова, П.И. Никитин, С.М. Деев. Биоконъюгаты магнитных наночастиц для адресной доставки к опухолевым клеткам. Тезисы докладов X конференции “Нанотехнологии в онкологии”, Москва, 2012.

12. V.O. Shipunova, M.P. Nikitin, T.A. Zdobnova, O.A. Stremovskiy, S.M. Deyev. Supramolecular Nanostructures for Targeted Delivery Based on Anticancer Humanized Antibodies. Abstracts of RusNanoTech participants and international competition of scientific papers in nanotechnology for young researches, Москва, 2011.