

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РАН

на правах рукописи

Здобнова Татьяна Александровна

**КОМПЛЕКСЫ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ И
РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ
ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2011

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Научный руководитель: член-корреспондент РАН, профессор, доктор биологических наук **Деев Сергей Михайлович**

Официальные оппоненты: профессор, доктор химических наук, **Дзантиев Борис Борисович**, Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

профессор, доктор химических наук, **Надточено Виктор Андреевич**, Учреждение Российской академии наук Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

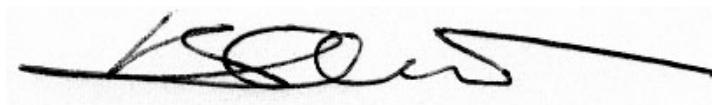
Ведущая организация: Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Защита состоится **9 ноября 2011 г.** в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан 6 октября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В современной онкологии большое внимание уделяется поиску новых подходов к диагностике и терапии злокачественных новообразований, в том числе решению таких актуальных задач, как выявление конкретного молекулярного профиля опухоли для подбора индивидуального лечения, высокочувствительная детекция солидных опухолей в глубине тканей, определение точных границ опухоли при ее удалении и др. Создание современных приборов с высоким пространственным разрешением для получения изображений органов и тканей, а также навигационных систем для контроля при хирургическом вмешательстве ставит задачи разработки новых соединений для высокоэффективной неинвазивной и специфичной визуализации новообразований с применением такой аппаратуры.

Среди современных методов визуализации маркеров и получения изображений биологических объектов широкое распространение получила флуоресцентная диагностика, успешно использующая в качестве флуорофоров органические красители и флуоресцентные белки. Относительно новым и перспективным источником излучения являются флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, так называемые квантовые точки. Их применяют как контрастирующие агенты для неспецифической визуализации биологических объектов, а также в виде конъюгатов с направляющими молекулами для селективного мечения молекулярных мишеней. Разработка флуоресцентных соединений, специфичных к опухолевым клеткам, на основе этих наночастиц с уникальными физико-химическими и фотолюминесцентными свойствами представляется актуальной задачей, позволяющей существенно расширить возможности традиционных методов флуоресцентной диагностики как *in vitro*, так и *in vivo*.

Одним из методов обеспечения избирательности и эффективности соединений для визуализации опухолевых клеток является нацеливание этих соединений на клетки-мишени с помощью специфичных к опухолевым маркерам антител. Поверхностные маркеры HER1 и HER2/neu - белки хорошо изученного семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека - играют важную роль в нормальном развитии и дифференцировке клеток, а гиперэкспрессия их генов характерна для целого ряда распространенных опухолей молочной железы, простаты, легких, яичников и др. и, как правило, ассоциирована со злокачественностью и плохим прогнозом для пациента. Указанные рецепторы являются мишенями противоопухолевых антител, разрешенных к терапевтическому применению, и их выявление в опухолевой ткани является

важным диагностическим и прогностическим признаком, позволяющим скорректировать лечение и правильно подобрать терапевтические агенты. Кроме того, высокая изменчивость раковых клеток, часто приводящая к неэффективности лечения анти-HER1 и анти-HER2/neu антителами, делает актуальными дальнейшие фундаментальные исследования молекулярных процессов, которые возникают в опухоли в ответ на действие терапевтических агентов, в том числе, с применением в качестве инструмента исследований полученных соединений на основе квантовых точек.

Разработка подходов к конструированию флуоресцентных соединений на основе квантовых точек и противоопухолевых антител является актуальной проблемой, решение которой позволит получить ряд новых соединений, перспективных для фундаментальных исследований и диагностики социально значимых опухолевых заболеваний, а также позволит создать методическую основу для конструирования аналогичных наночастиц с другими фотолюминесцентными и иммунологическими характеристиками.

Цель работы - разработка соединений на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек), оснащенных противоопухолевыми антителами для специфической флуоресцентной визуализации новообразований

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие **задачи**:

- Разработать и оптимизировать методы получения визуализирующих модулей на основе квантовых точек и направляющих модулей на основе антител формата scFv для создания противоопухолевых флуоресцентных комплексов. Оценить сохранение функциональности составных частей этих модулей.
- Получить комплексы на основе квантовых точек и антител формата scFv, специфичных к клинически значимым онкомаркерам HER1 и HER2/neu.
- Исследовать связывание полученных флуоресцентных комплексов с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими онкомаркеры HER1 и HER2/neu, в культуре *in vitro*.
- Исследовать возможность прижизненной визуализации опухолей в организме с помощью полученных конструкций.

Научная новизна

Впервые получены комплексы квантовых точек с противоопухолевыми антителами 425scFv и 4D5scFv, специфичными к клинически значимым онкомаркерам HER1 и HER2/neu, соответственно. Впервые разработан подход к связыванию квантовых точек с направляющими молекулами с использованием системы молекулярных адапторов барназа-барстар. Впервые с использованием этой системы получены комплексы квантовых точек, предназначенные для самосборки сложных конструкций, включающих наночастицы другой природы. Впервые осуществлена направленная доставка комплексов квантовых точек с антителами 4D5scFv к опухоли после внутривенного введения в организм лабораторных животных и изучено их распределение по органам и тканям. Впервые с использованием квантовых точек, оснащенных антителами scFv, получены прижизненные изображения опухоли модельного животного методом флуоресцентной проекционной визуализации.

Практическая значимость работы

Полученные в работе флуоресцентные комплексы на основе квантовых точек и рекомбинантных антител могут быть использованы для визуализации опухолевых клеток *in vitro*, гиперэкспрессирующих онкомаркеры HER1 и HER2/neu, при диагностике опухолевых заболеваний. Эти же конструкции могут быть использованы в фундаментальных исследованиях в качестве флуоресцентных меток для длительных наблюдений за молекулярными процессами в реальном времени и для получения изображений новообразований *in vivo* в глубине тканей модельных животных. Разработанный простой и универсальный метод конъюгации квантовых точек с применением системы молекулярных адапторов барназа-барстар может быть широко использован для получения комплексов квантовых точек и других нанокристаллов с биологически активными молекулами, а также с микро- и наночастицами различной природы.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих конференциях: XI Всероссийский научный Форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 2007 г.; международный симпозиум «Topical Problems of Biophotonics», 2007 и 2009 гг.; V Съезд Российского фотобиологического общества, 2008 г.; Международная весенняя школа-конференция "Biophysics & Bioelectrochemistry for Medicine", 2009 г.; международный симпозиум "BIOS'2009" и "BIOS'2010"; 2-й Международный форум по нанотехнологиям, 2009 г.; конференция с международным участием «Нанотехнологии в онкологии-2009»; международная научная Конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-

летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, 2009 г.; Европейская Конференция по биомедицинской оптике (ЕСВО), 2009 г.

Публикации. По материалам работы опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 128 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 180 ссылок. Диссертация содержит 41 рисунок и 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основными проблемами при разработке современных методов флуоресцентной визуализации опухолей остаются, во-первых, специфичность мечения, во-вторых, выбор флуоресцентных красителей, обеспечивающих высокую чувствительность, фотостабильность и определенный спектр излучения, оптимальный для каждого конкретного приложения. Для решения этих проблем контрастирующие агенты, как правило, конструируют из двух частей, или модулей: визуализирующего, обеспечивающего детекцию, и направляющего, обеспечивающего избирательное связывание с определенным типом клеток. Этот же подход был использован в настоящей работе.

Для создания противоопухолевых флуоресцентных контрастирующих агентов в качестве визуализирующего модуля были выбраны флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, известные также как квантовые точки (КТ). Своеобразные физико-химические и оптические свойства этих частиц, такие как исключительная яркость и высокий квантовый выход, широкий спектр возбуждения и узкие спектры флуоресценции с возможностью получения широкого диапазона цветов (от УФ до ИК), позволяют существенно расширить возможности традиционных методов флуоресцентной диагностики как *in vitro*, так и *in vivo*. Важными преимуществами КТ перед другими флуоресцентными красителями являются их уникальная фотостабильность, а также возможность многоцветного мечения и детекции КТ, излучающих в дальней инфракрасной области, на глубине тканей.

Для обеспечения специфичности визуализации опухоли в качестве направляющего модуля были использованы антитела формата scFv, узнающие онкомаркеры, гиперэкспрессирующиеся на поверхности опухолевых клеток. Антитела такого формата представляют собой единый полипептид, в котором переменные (узнающие) домены легких и тяжелых цепей иммуноглобулина

соединены при помощи пептидного линкера. Эти небольшие молекулы удобны в качестве направляющего модуля, так как легко нарабатываются в бактериальных продуцентах, высокостабильны, сохраняют специфичность узнавания, присущую полноразмерному антителу, но лишены эффектов, обусловленных наличием константных доменов, нежелательных при использовании конструируемых соединений *in vivo*.

В качестве модельных антител были выбраны противоопухолевые антитела 4D5scFv и 4D5scFv, специфически связывающиеся с онкомаркерами HER1 и HER2/neu, соответственно. Эти онкомаркеры принадлежат к трансмембранным белкам семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека, гиперэкспрессирующимся на поверхности многих опухолевых клеток, и имеют важное диагностическое и прогностическое значение. Ранее указанные антитела были успешно использованы в нашей лаборатории для доставки к опухолевым клеткам флуоресцентных белков и терапевтических агентов.

1. Разработка методов связывания водорастворимых КТ с направляющими антителами

Для создания конъюгатов нанокристаллов с биологическими молекулами были выбраны водорастворимые КТ двух типов, различающихся солюбилизирующим покрытием: 1) КТ, покрытые полимером с карбоксильными группами на поверхности, с максимумами флуоресценции 565, 605 и 705 нм (QD₅₆₅, QD₆₀₅ и QD₇₀₅, соответственно) (Invitrogen) и 2) CdSe/CdS нанокристаллы, модифицированные меркаптоуксусной кислотой (МУК), флуоресцирующие в красной области спектра (QD_{МАА}, любезно предоставлены С. Г. Дорофеевым, МГУ).

Для связывания КТ с направляющими антителами был использован традиционный метод прямой конъюгации, а также разработанный нами подход с применением системы молекулярных адапторов барназа-барстар (*рис. 1А*).

1.1. Прямая конъюгация КТ с направляющими антителами

Прямую конъюгацию КТ с анти-HER2/neu-антителами формата scFv (4D5scFv) осуществляли с использованием гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDAC) в качестве сшивающего реагента с образованием ковалентной связи между карбоксильными группами на поверхности КТ и аминокислотными группами боковых цепей белков. Несвязавшийся белок отделяли с помощью гель-фильтрации. В ходе работы были подобраны оптимальные соотношения КТ:белок в конъюгационной смеси 1:100 для КТ, покрытых полимером, и 1:50 для QD_{МАА}.

Было показано, что полученные конъюгаты 4D5scFv с покрытыми полимерной оболочкой КТ стабильны в течение длительного времени.

Присоединение антител 4D5scFv в данном случае не влияет на спектр возбуждения, эмиссии и квантовый выход флуоресценции КТ.

Конъюгаты КТ, модифицированных МУК, полученные при попытке непосредственного связывания с 4D5scFv, в отличие от КТ, покрытых полимером, оказались неустойчивы в водных растворах и подвержены агрегированию уже через сутки после конъюгации. При этом необходимо отметить, что QD_{МАА} исходно характеризовались низким квантовым выходом и недостаточной стабильностью, что, возможно, объясняется динамическим характером связи молекул МУК с поверхностью нанокристалла (связей S-S и/или Cd-S). Конъюгация этих КТ с молекулой антитела не приводила к стабилизации нанокристаллов.

1.2. Связывание КТ с направляющими антителами через систему барназа-барстар

Для стабилизации водорастворимых КТ и оптимизации метода их связывания с направляющими антителами был разработан подход с использованием системы молекулярных адапторов барназа-барстар (BBS, *англ.* barnase-barstar system), ранее разработанной в нашей лаборатории и хорошо зарекомендовавшей себя при конструировании мультимерных белков.

Бактериальная рибонуклеаза барназа (Bn, *англ.* barnase) из *Bacillus amyloliquefaciens* и ее природный ингибитор барстар (Bs, *англ.* barstar) являются белками небольшого размера (12 и 10 кДа, соответственно) и обладают уникально высоким средством друг к другу ($K_d \sim 10^{-14}$ М), сравнимым только с аналогичной характеристикой широко известной пары стрептавидин-биотин. Кроме того, барназа и барстар не обладают склонностью к гомодимеризации. Благодаря такому высокому средству, а также возможности получать гетеродимерные соединения, белковая пара барназа-барстар идеально подходит в качестве связывающей основы для создания целевых флуоресцентных комплексов. Для реализации этого подхода необходимо было получить набор визуализирующих модулей, представляющих собой КТ, соединенные с одним из белков BBS (с барстаром или барназой), и набор направляющих модулей, представляющих собой противоопухолевые антитела, соединенные с белком-партнером (соответственно, с барназой или барстаром) (*рис. 1А*).

В лаборатории ранее были сконструированы рекомбинантные белки, состоящие из антитела 425scFv (специфичного к HER1) или 4D5scFv (специфичного к HER2/neu), слитого с белками BBS в разных сочетаниях.

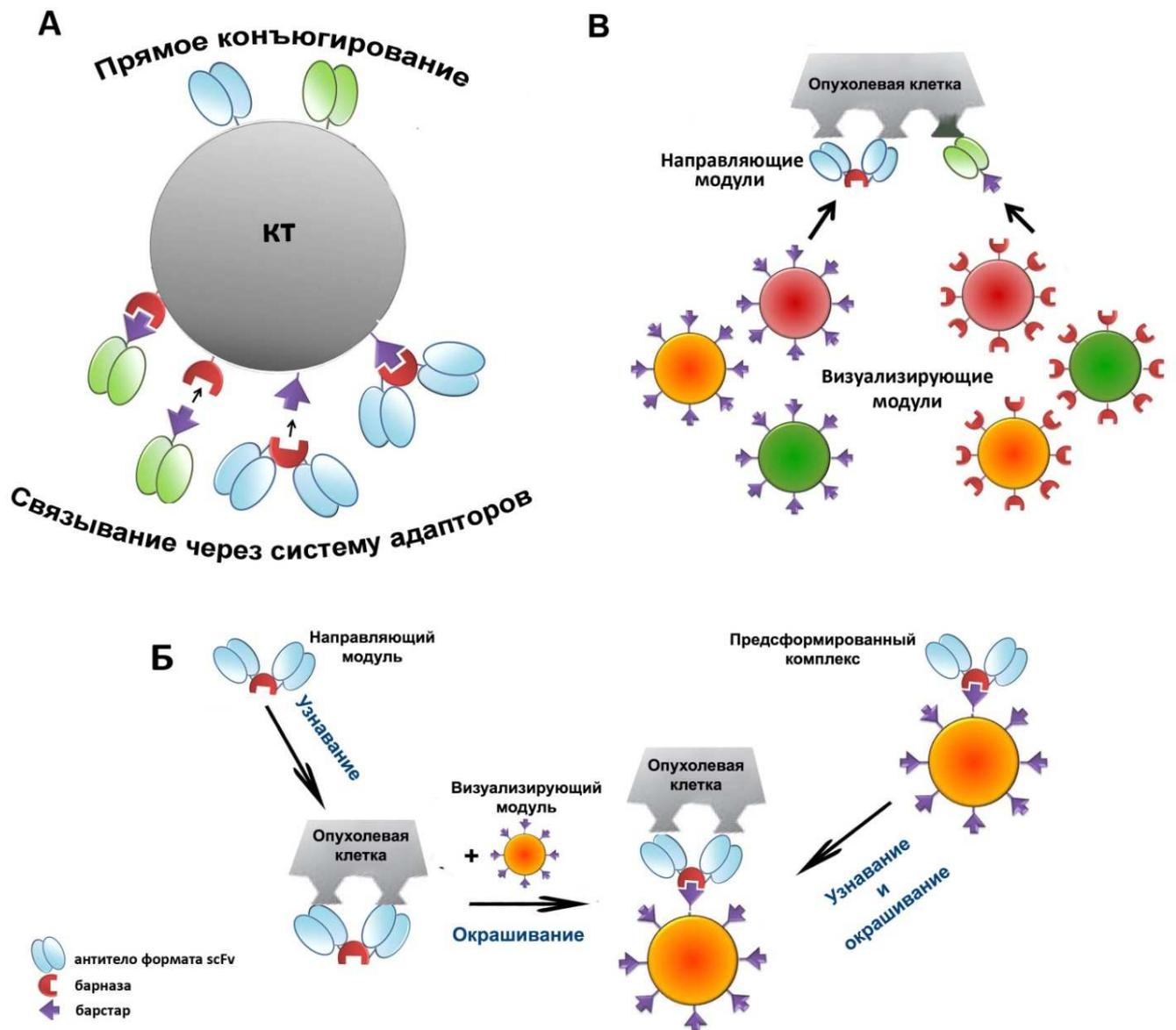


Рис. 1. Схема получения флуоресцентных конструкций на основе КТ и антител 425scFv (зеленое) и 4D5scFv (голубое), предназначенных для визуализации опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркеры HER1 и HER2/neu, соответственно. **А** – методы связывания КТ и антител: путем прямого конъюгирования (сверху) и через систему молекулярных адапторов барназа-барстар (снизу). **Б** - методы мечения клеток: в одну стадию с использованием предсформированных комплексов (справа) или в две стадии с нацеливанием визуализирующего модуля на опухолевую клетку путем предварительного связывания с мишенью направляющего антитела и последующим окрашиванием (слева). **В** - молекулярный конструктор на основе системы молекулярных адапторов барназа-барстар для получения набора направленных флуоресцентных комплексов КТ с заранее заданными свойствами - специфичностью и спектром флуоресценции.

Из полученных белков для направленной доставки КТ к опухолевым клеткам были выбраны два рекомбинантных белка, дававшие наибольший выход при бактериальной экспрессии: моновалентное антитело 425scFv, слитое с барстаром (425scFv-Bs), и дивалентное антитело 4D5scFv, слитое с одной молекулой барназы (4D5scFv-Bn-4D5scFv). Было показано, что в обоих полученных рекомбинантных белках антитела сохраняют свою высокую специфичность и эффективность

взаимодействия с соответствующими антигенами, а барназа и барстар – способность связываться друг с другом. Необходимо отметить, что барназа и барстар сильно отличаются по значению изоэлектрической точки (pI 9.8 и 4.6, соответственно). В выбранных конструкциях заряды направляющего антитела и соединенного с ним белка BBS близки друг к другу, чем, вероятно, определяется их достаточный выход при выделении и стабильность. Более того, барназа в составе рекомбинантных белков выполняет, как было показано ранее, роль внутримолекулярного шаперона, что также способствует правильному фолдингу и устойчивости белка.

Для связывания с направляющими модулями 425scFv-Bs и 4D5scFv-Bn-4D5scFv КТ предварительно конъюгировали с барназой (QD-Bn) или барстаром (QD-Bs), соответственно (рис. 1). Конъюгацию КТ, покрытых полимерной оболочкой или модифицированных МУК, с белками BBS проводили с использованием EDAC аналогично прямой конъюгации КТ с антителами (см. раздел 1.1). Оптимальное соотношение КТ:белок в конъюгационной смеси составило 1:200 как для барназы, так и для барстара.

Установлено, что полученные конъюгаты всех КТ, покрытых полимерной оболочкой, стабильны в течение длительного времени. Присоединение белков BBS к поверхности таких КТ, так же как и присоединение антител, не влияет на их спектральные характеристики (показано на примере QD₆₀₅, QD₅₆₅ и их конъюгатов QD₆₀₅-Bs и QD₅₆₅-Bn, рис. 2А).

Показано также, что конъюгация QD_{МАА} с барстаром стабилизирует эти изначально склонные к агрегации в водных растворах частицы и увеличивает квантовый выход их флуоресценции (рис. 2Б). Стабилизацию нанокристаллов и увеличение квантового выхода флуоресценции после формирования конъюгатов с барстаром можно объяснить дополнительной пассивацией благодаря

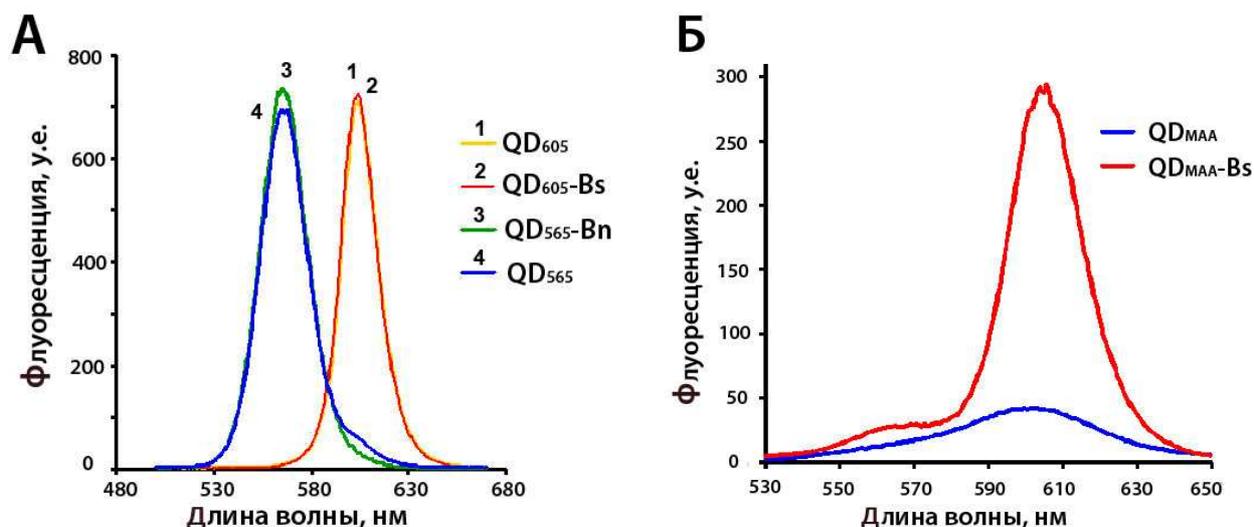


Рис. 2. Спектры флуоресценции КТ и их конъюгатов с белками BBS. Приведены спектры КТ, модифицированных МУК (А) и КТ, покрытых полимерной оболочкой (Б).

взаимодействию SH-группы этого белка непосредственно с поверхностью КТ.

Таким образом, использование BBS позволило не только получить устойчивые комплексы QD_{МАА} с антителами (см. ниже), но и стабилизировать сами нанокристаллы.

Определение рибонуклеазной активности барназы и ее ингибирования барстаром показало, что эти белки в составе конъюгатов с КТ обоих типов сохраняют свою активность и способность связываться друг с другом (рис. 3), то есть могут выполнять конструкционную роль при сборке целевых комплексов КТ.

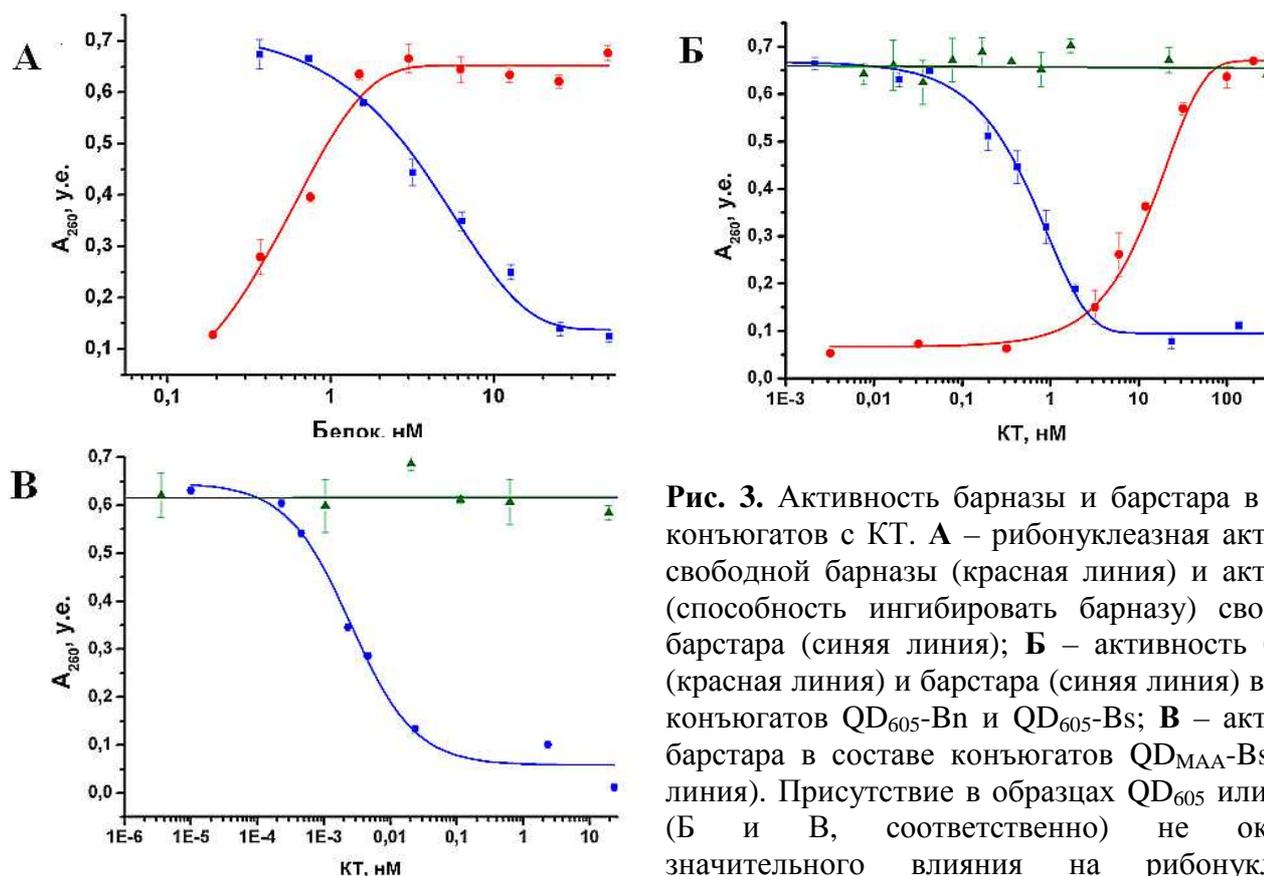


Рис. 3. Активность барназы и барстара в составе конъюгатов с КТ. **А** – рибонуклеазная активность свободной барназы (красная линия) и активность (способность ингибировать барназу) свободного барстара (синяя линия); **Б** – активность барназы (красная линия) и барстара (синяя линия) в составе конъюгатов QD₆₀₅-Bn и QD₆₀₅-Bs; **В** – активность барстара в составе конъюгатов QD_{МАА}-Bs (синяя линия). Присутствие в образцах QD₆₀₅ или QD_{МАА} (Б и В, соответственно) не оказывает значительного влияния на рибонуклеазную активность барназы (зеленая линия).

2. Получение флуоресцентных комплексов водорастворимых КТ с рекомбинантными противоопухолевыми антителами

Флуоресцентные комплексы для визуализации опухолевых клеток получали путем самосборки визуализирующего и направляющего модулей за счет взаимодействия барназы и барстара в их составе. Для этого конъюгаты КТ с белками BBS смешивали с соответствующими направляющими модулями в молярном соотношении 1:20 и отделяли избыток антител ультрафильтрацией на мембране Microcon YM-100. Комбинирование двух направляющих модулей 4D5scFv-Bn-4D5scFv (специфичен к HER2/neu) и 425scFv-Bs (специфичен к HER1) с описанными выше соответствующими визуализирующими модулями,

флуоресцирующими в красной и зеленой областях спектра, позволило реализовать идею молекулярного конструктора, разрабатываемую в нашей лаборатории, в применении к КТ (*рис. 1В*). В результате был получен целый ряд флуоресцентных комплексов с различной специфичностью по отношению к опухолевым клеткам и с различными спектральными характеристиками (*таблица*).

Таблица. Полученные в работе флуоресцентные конструкции на основе КТ и противораковых антител формата scFv.

№	Состав конструкций		Тип поверхностного покрытия КТ	Способ связывания модулей	Специфичность антитела	Окрашивание клеток**		
	Направляющий модуль	Визуализирующий модуль *				SKBR-3 и SKOV-3	A431	CHO
1	4D5scFv	QD ₆₀₅	полимер	Прямая конъюгация	HER2/neu	+	+	+
2	4D5scFv	QD _{МАА}	МАА	Прямая конъюгация	HER2/neu	+	+	+
3	4D5scFv-Bn-4D5scFv	QD ₆₀₅ -Bs	полимер	BBS	HER2/neu	+	-	-
4		QD ₅₆₅ -Bs	полимер	BBS	HER2/neu	+	-	-
5		QD ₇₀₅ -Bs	полимер	BBS	HER2/neu	+	-	-
6		QD _{МАА} -Bs	МАА	BBS	HER2/neu	+	-	-
7	425scFv-Bs	QD ₆₀₅ -Bn	полимер	BBS	HER1	-	+	-
8		QD ₅₆₅ -Bn	полимер	BBS	HER1	-	+	-

*- цвет названия КТ соответствует цвету их флуоресценции. **- цвет названия клеточных линий соответствует цвету названия гиперэкспрессирующегося в них специфического онкомаркера.

3. Изучение взаимодействия флуоресцентных комплексов на основе КТ с опухолевыми клетками *in vitro*

Для изучения взаимодействия с опухолевыми клетками *in vitro* были выбраны флуоресцентные комплексы на основе КТ, приведенные в таблице (№ 1-4, 6-8)

На начальных этапах работы было обнаружено, что используемые в работе водорастворимые КТ обоих типов проявляют высокий уровень неспецифического связывания с мембраной эукариотических клеток различного происхождения, в том числе опухолевых клеток человека SKBR-3 и SKOV-3, гиперэкспрессирующих маркер HER2/neu, и A431, гиперэкспрессирующих маркер HER1 (показано на примере SKOV-3 с QD_{МАА} и A431 с QD₆₀₅ на *рис. 4А, 4Д*). К сожалению, прямая конъюгация КТ с направляющими антителами не привела к значительному увеличению специфичности связывания. Так, например, было показано, что конъюгаты QD₆₀₅-4D5scFv одинаково окрашивают как HER2/neu-

положительные клетки SKOV-3, так и контрольные HER2/neu-отрицательные клетки CHO (рис. 5). Таким образом, для визуализации опухолевых клеток необходимо было не только обеспечить специфическое связывание КТ с определенными маркерами, но и значительно уменьшить их неспецифическое связывание с клетками.

Нами было обнаружено, что конъюгация КТ с компонентами BBS - барназой и барстаром - позволяет значительно уменьшить неспецифическое связывание КТ с клетками. Так, например, после инкубации клеток SKOV-3 с конъюгатом QD_{МАА}-Bs или клеток A431 с QD₆₀₅-Bn характерная красная флуоресценция на поверхности клеток незначительна или полностью отсутствует (рис. 4Б, 4Д).

Окрашивание клеток комплексами, собранными на основе BBS, проводили в одну стадию с использованием предсформированных комплексов или в две стадии с нацеливанием визуализирующего модуля на опухолевую клетку путем предварительного связывания с мишенью направляющего антитела и последующим окрашиванием (рис. 1Б).

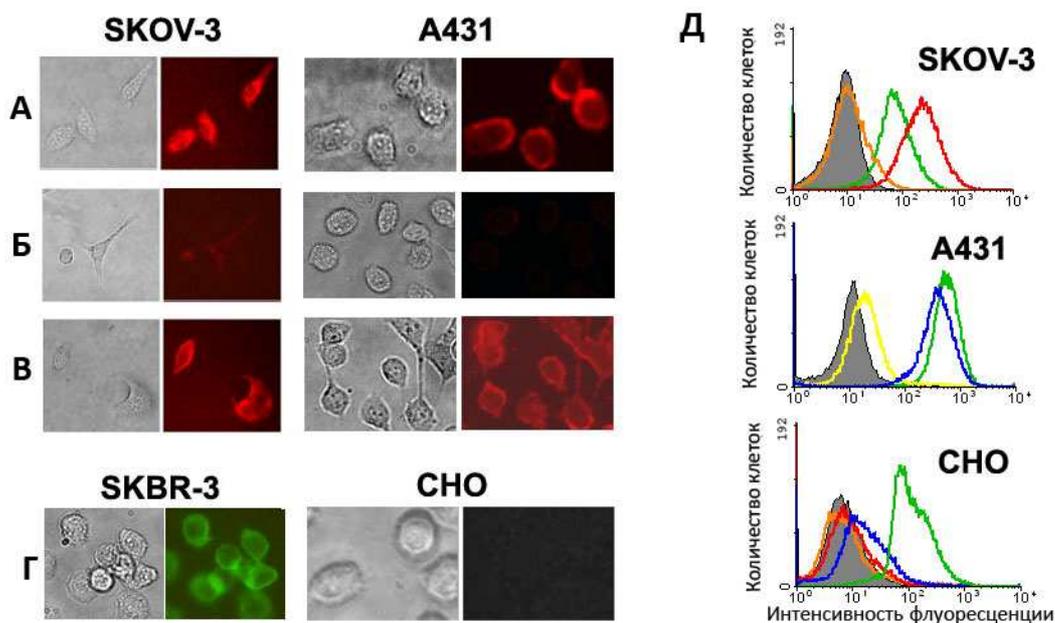


Рис.4. Взаимодействие полученных флуоресцентных комплексов на основе КТ с HER2/neu-гиперэкспрессирующими (SKOV-3, SKBR-3), HER1-гиперэкспрессирующими (A431) и контрольными HER1- и HER2/neu-отрицательными (CHO) клетками в культуре. **А** - неспецифическое окрашивание клеток SKOV-3 неконъюгированными QD_{МАА} и клеток A431 неконъюгированными QD₆₀₅. **Б** - уменьшение неспецифического связывания в результате конъюгации QD_{МАА} с барстаром (на клетках SKOV-3) и QD₆₀₅ с барназой (на клетках A431). **В** - специфическое окрашивание клеток SKOV-3 конъюгатом QD_{МАА}-Bs и клеток A431 конъюгатом QD₆₀₅-Bn в две стадии после предварительной инкубации клеток с направляющими молекулами 4D5scFv-Bn-4D5scFv и 425scFv-Bs, соответственно. **Г** – специфическое окрашивание клеток SKBR-3 в одну стадию предсформированным комплексом 4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₅₆₅-Bs и отсутствие окрашивания этим же комплексом контрольных клеток CHO. Для каждого варианта окрашивания приведены изображения клеток в видимом свете и их флуоресценция. Д – результаты проточной цитофлуориметрии клеток SKOV-3, A431 и CHO, инкубированных с QD₆₀₅ (зеленая линия), QD₆₀₅-Bn (желтая линия), QD₆₀₅-Bs (оранжевая линия), 4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₆₀₅-Bs (красная линия) и 425scFv-Bs/QD₆₀₅-Bn (синяя линия).

Для окрашивания в одну стадию конъюгаты КТ с барназой или барстаром предварительно смешивали для образования комплекса с соответствующими направляющими белками и затем использовали для мечения клеток. Было показано, что в отличие от прямых конъюгатов КТ с антителами (таблица, № 1-2) комплексы КТ обоих типов с направляющими антителами, предварительно собранные на основе BBS (таблица, № 3-8), позволяют эффективно и специфично окрашивать клетки, гиперэкспрессирующие соответствующие онкомаркеры (показано на примере комплекса 4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₅₆₅-Bn, *рис. 4Г, 4Д*).

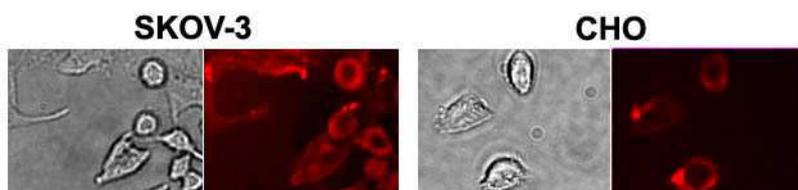


Рис. 5. Неспецифическое окрашивание HER2/neu-положительных (SKOV-3) и HER2/neu-отрицательных (CHO) клеток прямыми конъюгатами QD₆₀₅-4D5scFv. Даны изображения клеток в видимом свете (слева) и их флуоресценция (справа).

Более удобным в экспериментальном отношении оказалось мечение опухолевых клеток в две стадии, не требующее предварительного формирования комплекса с точным соотношением компонентов. Для предварительного и высокоспецифичного нацеливания флуорофора на целевые опухолевые маркеры модельные клетки обрабатывали направляющим модулем 4D5scFv-Bn-4D5scFv (для нацеливания на маркер HER2/neu) или 425scFv-Bs (для нацеливания на HER1). После отмывки клеток от несвязавшегося направляющего белка добавляли исследуемый визуализирующий модуль (QD-Bs или QD-Bn, соответственно).

Было показано, что QD_{MAA}-Bs, QD₆₀₅-Bs, QD₇₀₅-Bs и QD₅₆₅-Bs эффективно и специфично окрашивают клетки, гиперэкспрессирующие онкомаркеры HER2/neu, после предварительной обработки направляющим белком 4D5scFv-Bn-4D5scFv (показано на примере QD_{MAA} и клеток SKOV-3, *рис. 4В*). Аналогично, QD₆₀₅-Bn и QD₅₆₅-Bn позволяют визуализировать HER1-положительные клетки A431, предварительно обработанные направляющим модулем 425scFv-Bs (показано на примере QD₆₀₅, *рис. 4В*).

В качестве отрицательного контроля использовали клетки яичника китайского хомячка CHO, не несущие рецепторов HER1 и HER2/neu. Как видно на *рис. 4 Г и 4Д*, клетки CHO не окрашиваются ни КТ, оснащенными антителами 4D5scFv, ни КТ с антителами 425scFv, что свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания полученных конструкций.

Таким образом, изучение взаимодействия сконструированных комплексов на основе КТ и направляющих противоопухолевых антител scFv с опухолевыми клетками в культуре показало, что использование BBS для связывания КТ с направляющими антителами позволяет: 1) уменьшить уровень неспецифического

связывания с мембраной клеток, 2) дает возможность окрашивания в две стадии и 3) позволяет реализовать возможности «молекулярного конструктора», т. е. легко менять направленность флуоресцентного комплекса или цвет используемого флуорофора в зависимости от задач исследования.

4. Цитотоксичность КТ

Содержание в составе КТ тяжелых металлов ставит вопрос о возможной токсичности этих нанокристаллов для живых организмов. Кроме того, КТ могут быть потенциально опасны как частицы нанометровых размеров. Токсичность и безопасность применения КТ для исследования живых систем до сих пор недостаточно изучены и имеющиеся литературные данные по этому вопросу весьма противоречивы. Поэтому для оценки биосовместимости получаемых флуоресцентных комплексов и отбора наиболее подходящих из них для применения *in vivo* были проведены *in vitro* исследования токсичности используемых в работе КТ и их конъюгатов.

Анализ выживаемости опухолевых клеток в культуре методом МТТ после обработки квантовыми точками и их конъюгатами показал, что цитотоксичность QD_{МАА} коррелирует с их концентрацией – число живых клеток уменьшается с увеличением концентрации КТ (рис. 6А). При инкубации клеток с КТ в концентрации, оптимальной для визуализации онкомаркеров (20 нМ), выживает более 70% клеток. Конъюгация этих КТ с барстаром не вносит значительных изменений в жизнеспособность клеток. В отличие от КТ, модифицированных МУК, КТ, покрытые полимерной оболочкой, не оказывают заметного цитотоксического действия, независимо от концентрации и групп, локализованных на поверхности частиц. Даже в концентрациях, на несколько порядков превышающих концентрации, необходимые для окрашивания клеток, QD₇₀₅ и КТ с таким же спектром флуоресценции, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ), значительной цитотоксичности не показали (рис. 6Б). Аналогичные результаты были получены для QD₆₀₅, QD₅₆₅.

Таким образом, QD_{МАА} и их конъюгаты могут быть использованы в экспериментах *in vitro* (иммуногистохимия, флуоресцентная визуализация клеток в культуре и др.), однако их применение на уровне целого организма вызывает сомнение. Более перспективными для использования в экспериментах *in vivo* представляются КТ, покрытые полимером, которые, по нашим данным, не вызывают значительного изменения в жизнеспособности клеток.

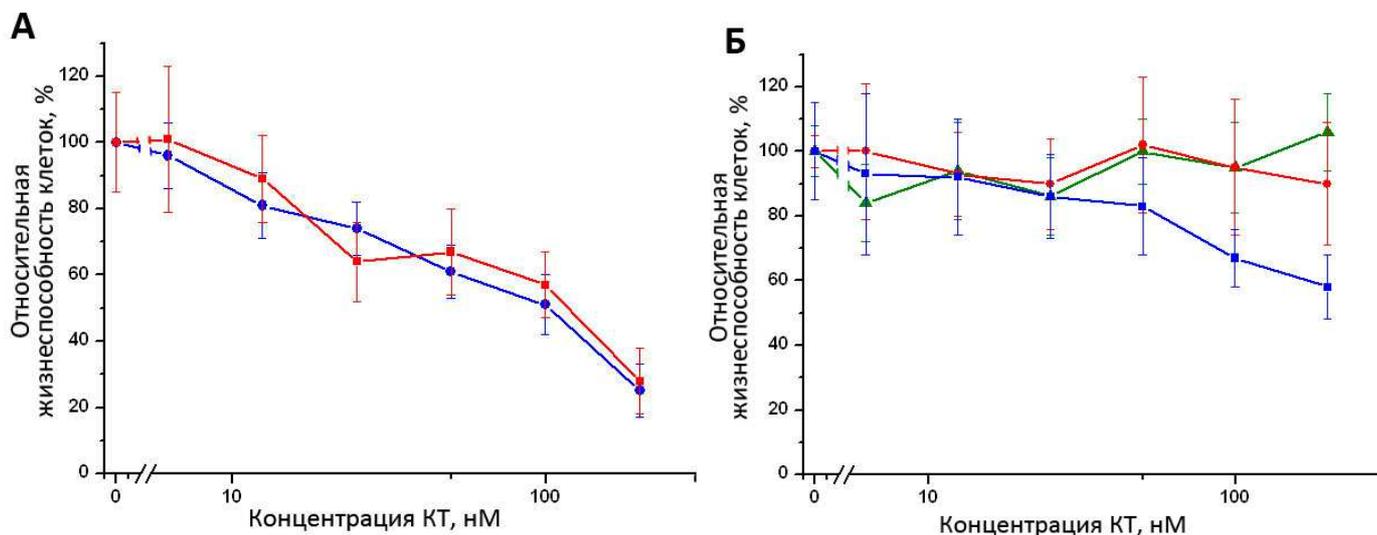


Рис. 6. Относительная жизнеспособность клеток SKBR-3 после инкубации в присутствии QD_{МАА} (А) и QD₇₀₅ (Б) в различных концентрациях. Неконъюгированные КТ обозначены красной, конъюгаты с барстаром – синей, КТ, покрытые ПЭГ, - зеленой линией.

5. Визуализация опухолей *in vivo* с помощью сконструированных флуоресцентных комплексов

Для исследования возможности *in vivo* визуализации опухолей с помощью КТ непосредственно в организме были выбраны КТ, покрытые полимерной оболочкой, обладающие наименьшей токсичностью, с максимумом флуоресценции в ближней ИК-области (QD₇₀₅), лежащим в «окне прозрачности» биоткани. Было проведено сравнительное изучение возможностей прижизненной визуализации опухолей с использованием биоинертных КТ, покрытых ПЭГ, (QD_{705p}) и полученного в работе комплекса КТ с направляющими антителами (4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₇₀₅-Bs).

Для получения изображений *in vivo* были использованы иммунодефицитные мыши линии BALB/c-Nude (самки, 20-25 г) с привитыми подкожно опухолями молочной железы человека. Клетки линии SKBR-3 в количестве 10 млн. клеток/животное вводили подкожно под лопатку мыши. Через 1,5-2 недели в месте введения формировалась солидная опухоль. При этом, как было показано в результате гистохимических исследований, клетки новообразованной опухоли сохраняли гиперэкспрессию онкомаркера HER2/neu на поверхности клеточной мембраны.

Для проведения исследования были сформированы две группы животных с привитыми опухолями диаметром около 0.5 см. Мышам первой группы в хвостовую вену вводили направленный флуоресцентный комплекс 4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₇₀₅-Bs в количестве 0.14 нмоль/животное в 100 мкл PBS. Мышам второй группы вводили QD_{705p} в том же количестве. КТ возбуждали лазером на длине волны 635 нм. Прижизненные флуоресцентные проекционные изображения получали через 20 мин после введения и далее каждый час на

флуоресцентном диффузионном томографе ФДТ-2М, разработанном в ИПФ РАН (г. Н. Новгород). Для количественной оценки полученных результатов использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, США). Для изучения тканевого распределения КТ проводили исследование органов животных из обеих групп через 1, 3, 6, 9 и 21 ч методом конфокальной микроскопии *post mortem*.

После внутривенного введения как направленного комплекса, так и биоинертных КТ уже через 10 мин происходит их накопление в опухолевой ткани. Область опухоли отчетливо различима на фоне более темных нормальных тканей в течение 9 ч, затем уровень сигнала постепенно снижается. Через 21 ч интенсивность сигнала в опухолевой и нормальной ткани в обоих случаях сравнивается, превышая при этом исходный уровень сигнала примерно в 1.5 раза (показано на примере направленного комплекса, *рис. 7А*). Таким образом, динамика накопления в опухоли биоинертных КТ, «пассивно» задерживающихся в опухолевой ткани за счет своего размера, и направленного комплекса, «активно» связывающегося со специфическими рецепторами на поверхности опухолевых клеток, сходна. Однако после введения направленного комплекса, уровень флуоресцентного сигнала в опухоли на протяжении всего времени эксперимента был в 1.5-2 раза выше, чем после введения биоинертных КТ (*рис. 7Б*), наибольшая разница наблюдалась через 3 ч (*рис. 7Б, 7В*). Таким образом, для визуализации опухолей на уровне целого организма можно успешно использовать как биоинертные КТ, так и направленные комплексы. Однако оснащение КТ направляющими антителами позволило получить более контрастное и яркое изображение.

Результаты конфокальной микроскопии органов животных показали, что как ненаправленные биоинертные КТ, так и комплекс с антителом уже спустя час после введения в хвостовую вену накапливаются в печени, селезенке и лимфатических узлах, что, вероятно, связано с их активным поглощением клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). В течение последующих часов их количество постепенно уменьшается, и через 21 ч в тканях наблюдаются лишь одиночные частицы. При этом уровень накопления биоинертных КТ в органах РЭС несколько ниже, чем комплекса КТ с антителами. Было показано также наличие значительного количества направленного комплекса в тканях сердца с максимальным флуоресцентным сигналом через 6 ч после введения. К 21 ч после введения флуоресцентный сигнал в тканях сердца заметно снижается.

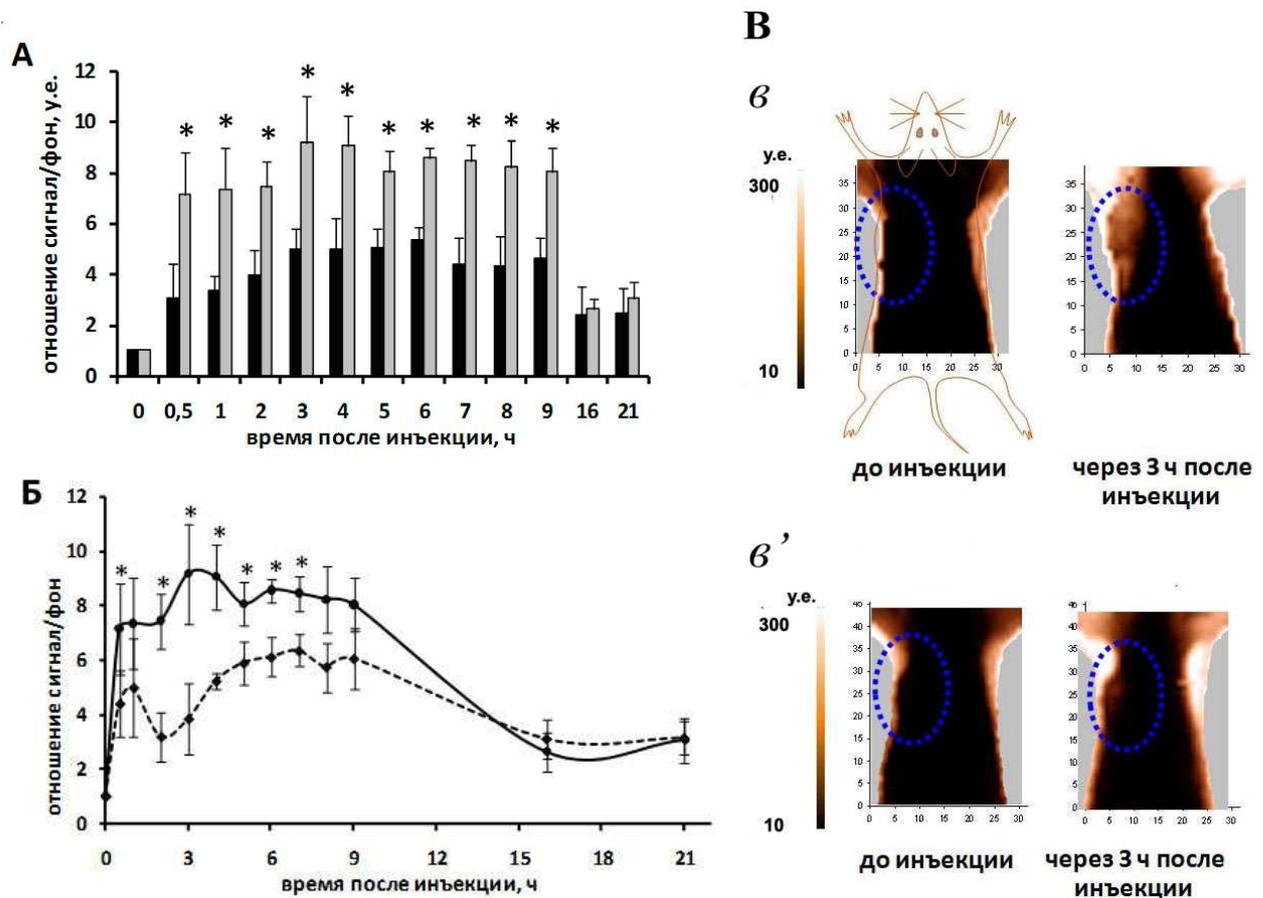


Рис. 7. Прижизненная флуоресцентная проекционная визуализация опухолей молочной железы человека, привитых мышам BALB/c-Nude после введения направленного комплекса 4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₇₀₅-Bs и биоинертных КТ. **А** - уровень флуоресцентного сигнала в опухолевой (серые столбики) и нормальной (черные столбики) ткани после введения направленного комплекса. **Б** - уровень флуоресцентного сигнала в опухолевой ткани после введения направленного комплекса (сплошная линия) и биоинертных КТ (пунктирная линия). **В** - визуализация опухолей через 3 ч после введения направленного комплекса (**в**) и биоинертных КТ (**в'**); область опухоли выделена синим пунктиром. Данные представлены как значение \pm стандартное отклонение (SD). Достоверность статистических различий оценивали с помощью t-теста Стьюдента ($n=3-4$). Значения с $P<0.05$ (обозначены “*”) считали достоверно различимыми.

При этом флуоресцентный сигнал в мышцах, коже и кишечнике отсутствовал или был незначительным (рис. 8). Эти факты коррелируют с литературными данными о повышенной экспрессии рецептора erbB2 в тканях сердца. Возможно, используемое нами гуманизированное антитело 4D5scFv способно связываться с мышинным рецептором erbB2, обладающим высокой гомологией с человеческим рецептором HER2/neu.

За время наблюдения (в течение 21 ч после введения КТ в организм) у подопытных животных не было замечено никаких признаков острой токсичности. До сих пор не до конца изученным остается вопрос выведения КТ из организма. Известно, что наночастицы могут выводиться из организма двумя путями: через почки при гидродинамическом диаметре частиц ниже порога почечной фильтрации, то есть менее 5.5 нм, или через печень. Результаты конфокальной

микроскопии показали присутствие направленного комплекса КТ и биоинертных КТ как в печени, так и в почках подопытных животных (*рис. 8*), что противоречит имеющимся литературным данным, поскольку физический диаметр используемых в работе QD₇₀₅ составляет около 10 нм, то есть выше порога почечной фильтрации. Основываясь на наших методах (обнаружение КТ только по флуоресцентному сигналу, время наблюдения – 21 ч), без проведения дополнительных исследований трудно сказать, являются ли приведенные данные артефактом или свидетельствуют о каких-то еще не изученных механизмах взаимодействия наночастиц с живым организмом.

Таким образом, было показано, что флуоресцентные характеристики использованных QD₇₀₅ позволяют применять их в качестве флуорофоров для прижизненной проекционной визуализации опухолей с хорошим контрастом. Присоединение направляющих антител к флуоресцентным частицам дает возможность получать более яркое и долговременное окрашивание, чем при мечении биоинертными КТ, и, кроме того, позволяет выявлять опухоли, экспрессирующие определенные антигены. Полученные в работе комплексы на основе QD₇₀₅ являются перспективными флуоресцентными агентами для исследований *in vivo* на модельных животных. Для того, чтобы можно было говорить о клиническом применении КТ, необходимы как длительные исследования последствий введения КТ в организм, так и тщательное изучение процессов выведения их из организма.

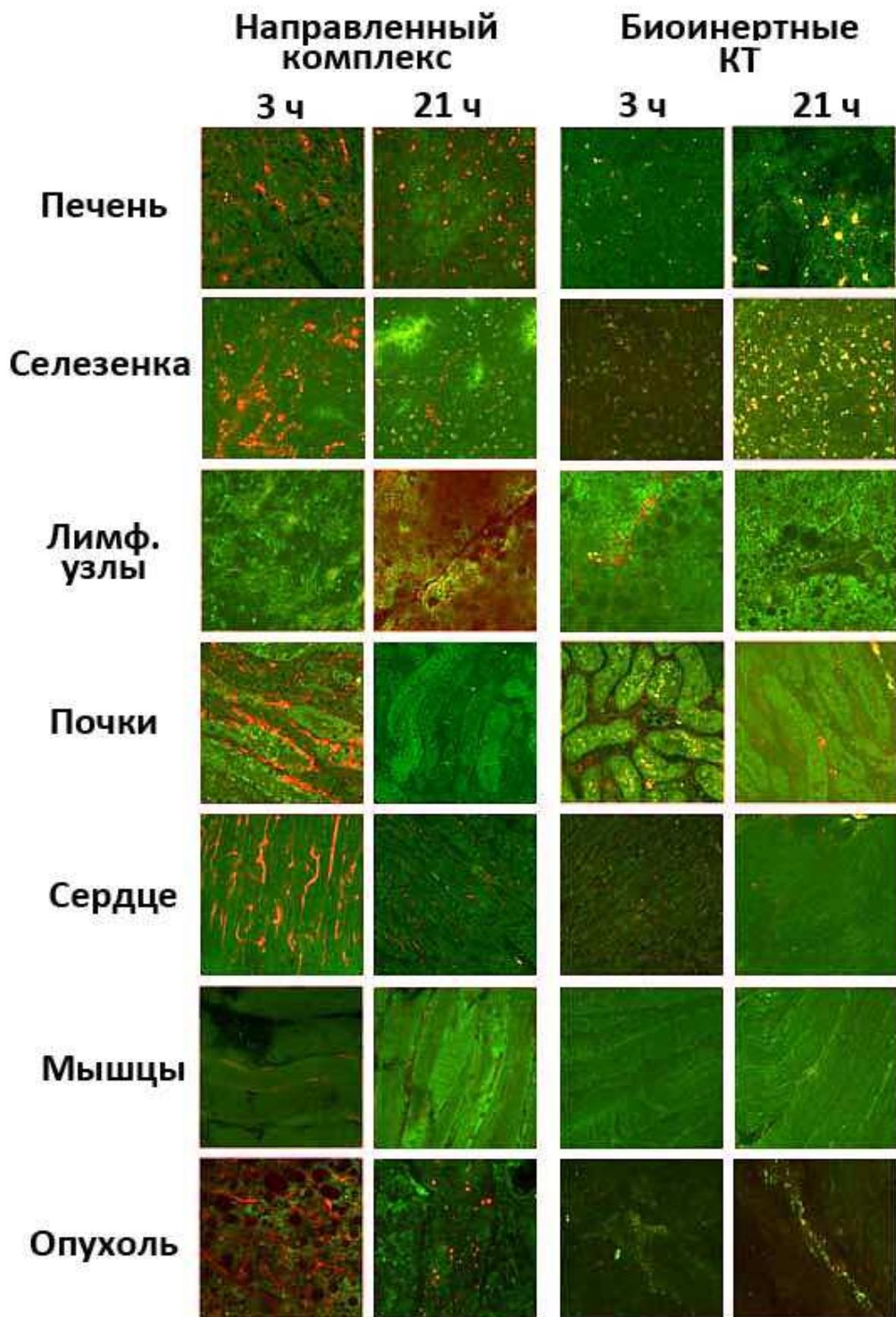


Рис. 8. Конфокальная микроскопия тканей мыши и привитой HER2/neu-положительной опухоли человека через 3 и 21 ч после внутривенного введения направленного комплекса 4D5scFv-Bn-4D5scFv/QD₇₀₅-Bs и биоинертных КТ QD₇₀₅p. Красное свечение КТ видно на фоне зеленой аутофлуоресценции тканей.

6. Преимущества системы молекулярных адапторов барназа-барстар при создании флуоресцентных комплексов на основе КТ для специфической визуализации опухолей.

Результаты исследований флуоресцентных комплексов на основе КТ и противоопухолевых антител, изложенные выше (разделы 1-5), показали, что оптимальным методом их получения является сборка визуализирующих и направляющих модулей с помощью системы молекулярных адапторов.

В нашей работе для этой цели разработан подход, основанный на высокоафинном взаимодействии двух белков – барназы и барстара. Аналогом пары барназа-барстар является широко применяемая в биологических исследованиях стрептавидин-биотиновая система, существенными недостатками которой для целей настоящей работы являются небелковая природа биотина и его высокое содержание в организме млекопитающих, высокая иммуногенность стрептавидина и его склонность к образованию тетрамеров.

Для оснащения КТ направляющими противоопухолевыми антителами в работе были использованы направляющие модули, ранее созданные в лаборатории на основе системы белковых адапторов барназа-барстар. Как было показано ранее, эта система обеспечивает следующие преимущества при создании направляющих модулей с антителами формата scFv: (1) барназа и барстар не образуют гомодимеров, что позволяет получать сложные надмолекулярные комплексы с точным составом; (2) оба компонента системы генетически кодируемы, что позволяет создавать целевые направляющие модули, кодируемые одним геном, экспрессирующиеся в бактериальных продуцентах и не требующие дальнейших модификаций; (3) барназа и барстар противоположно заряжены, что дает возможность выбора адапторного белка, подходящего по заряду, для каждого конкретного антитела и тем самым позволяет избегать проблем при выделении, связанных с «налипанием» друг на друга доменов генно-инженерного белка; (4) барназа в составе рекомбинантных белков выполняет роль внутримолекулярного шаперона, обеспечивая их правильный фолдинг; (5) оба белка BBS бактериального происхождения и не синтезируются в организме млекопитающих, что способствует уменьшению неспецифического фона при использовании *in vivo*; (6) оба белка BBS обладают низкой иммуногенностью.

В процессе работы были выявлены дополнительные преимущества BBS как системы для связывания КТ с направляющими агентами: (1) связывание КТ с небольшими белками барназой и барстаром значительно уменьшает неспецифическое налипание КТ с активированной поверхностью на мембрану клеток; (2) использование BBS позволяет проводить окрашивание клеток как в одну, так и в две стадии. Кроме того, конъюгация КТ, модифицированных МУК, с барстаром способствует стабилизации этих частиц, изначально склонных к агрегации в водных растворах, и увеличивает квантовый выход их флуоресценции

Полученный в работе набор визуализирующих модулей на основе КТ и белков BBS можно комбинировать с направляющими модулями на основе белков BBS и антител scFv (или других направляющих агентов), создавая комплексы с заранее заданными комбинациями спектральных свойств и специфичности и реализуя таким образом разрабатываемую в нашей лаборатории идею молекулярного конструктора (рис. 1Б). Это дает возможность с помощью одного и того же визуализирующего модуля детектировать различные мишени, а также подбирать спектр флуоресценции визуализирующих модулей в зависимости от задач исследования. Разработанный подход к получению комплексов флуоресцентных наночастиц с антителами с помощью системы молекулярных адапторов BBS является универсальным. Он может быть использован как для получения аналогичных конструкций на основе КТ и антител формата scFv (с другими спектральными характеристиками или другой специфичности), так и для создания соединений с молекулами или наночастицами другой природы, что было продемонстрировано на двух примерах.

Так, совместно с сотрудниками лаборатории на основе BBS сконструированы самособирающиеся мультимодальные конструкции, включающие КТ, магнитные частицы и антитела к онкомаркеру HER2/neu. Полученные флуоресцентно-магнитные наночастицы способны эффективно и избирательно связываться с соответствующими опухолевыми клетками. В результате флуоресцентно-меченные опухолевые клетки приобретают свойство магнитоуправляемости. Другой пример: совместно с лабораторией «Полимеры для биологии» (ИБХ РАН) с помощью BBS нами были получены комплексы сополимерных акролеин-стирольных флуоресцентных частиц диаметром 200 нм, наполненных КТ, с антителами 4D5scFv. Полученные таким образом полимерные частицы успешно и специфично окрашивают клетки, гиперэкспрессирующие онкомаркер HER2/neu. Подобные частицы обладают гораздо большей коллоидной стабильностью в водных растворах, чем свободные КТ, исключительной яркостью и возможностью синтеза с заданными активными группами на поверхности. Они могут быть использованы в исследованиях, не имеющих ограничений по размеру используемого флуорофора (например, проточная цитометрия, иммуногистохимия).

ВЫВОДЫ

1. Разработан универсальный подход к связыванию флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек, КТ) с антителами формата scFv на основе системы молекулярных адапторов барназа-барстар. Показано, что конъюгация КТ с барназой или барстаром не влияет на их физико-химические свойства, а в ряде случаев значительно повышает стабильность и квантовый выход.

2. На основе системы барназа-барстар созданы флуоресцентные комплексы водорастворимых КТ с рекомбинантными противоопухолевыми антителами 4D5scFv и 425scFv, специфичными к онкомаркерам HER2/neu и HER1, соответственно.

3. Показано эффективное и специфическое окрашивание полученными флуоресцентными комплексами клеток карциномы яичника человека SKOV-3 и аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3 (гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu), а также клеток эпидермоидной карциномы человека A431 (гиперэкспрессирующих HER1). Установлено, что конъюгация с барстаром позволяет значительно уменьшить неспецифическое связывание КТ с поверхностью клеток.

4. С помощью комплексов КТ с антителами 4D5scFv методом флуоресцентной проекционной визуализации получены прижизненные изображения аденокарциномы молочной железы человека, привитой иммунодефицитным мышам. Показано, что такое специфическое мечение опухоли позволяет получить более контрастное изображение, а также увеличить интенсивность и длительность сигнала в 1.5-2 раза по сравнению с использованием биоинертных КТ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Zlomanov V.P., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., Deyev S.M. Fluorescent immunolabeling of cancer cells by quantum dots and antibody scFv fragment // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. № 2. 021004.
2. Плескова С.Н., Балалаева И.В., Гущина Ю.Ю., Сергеева Е.А., Здобнова Т.А., Деев С.М., Турчин И.В. Различия в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в реакциях с квантовыми точками // Морфология. 2009. Т. 135. №3. С. 47-49.
3. Здобнова Т.А., Дорофеев С.Г., Тананаев П.Н., Зломанов В.П., Стрёмовский О.А., Лебедеико Е.Н., Балалаева И.В., Деев С. М., Петров Р.В. Специфическая визуализация клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 биоконъюгатами квантовых точек // Доклады Академии Наук. 2010. Т. 430. №5. С. 705-708.
4. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5827-5832.
5. Здобнова Т. А., Лебедеико Е. Н., Деев С.М. Квантовые точки для молекулярной диагностики опухолей // Acta Naturae. 2011. Т. 3. № 1(8). С. 32-52.
6. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Brilkina A.A., Krutova I.M., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Vodeneev V.V., Turchin I.V., Deyev S.M. Whole-body imaging of HER2/neu-overexpressing tumors using scFv-antibody conjugated quantum dots // SPIE. 2010. V. 7575. P. 757510.
7. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifulina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Deyev S.M. Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays // Nanomedicine. 2011. V. 6. № 2. P. 195-209.
8. Генералова А. Н., Зубов В. П., Мочалов К.Е., Здобнова Т. А., Сизова С. В., Деев С. М., Петров Р.В. Биоаналитические флуоресцентные реагенты на основе полиакролеин-содержащих частиц, наполненных полупроводниковыми CdSe/ZnS нанокристаллами // Доклады Академии Наук. 2011. Т. 439. № 1. С. 1–4.

Тезисы докладов на конференциях

1. Здобнова Т.А., Баландин Т.Г., Эдельвейс Э.Ф., Дорофеев С. Г., Васильев Р.Б., Деев С.М. Визуализация раковых клеток с помощью флуоресцентных полупроводниковых квантокристаллов и анти-HER2/neu мини-антител: Материалы XI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». Медицинская иммунология, 2007. Т. 9. №2-3, С. 274.
2. Zdobnova T.A., Balandin T.G., Edelveys E.F, Dorofeev S.G., Vasiliev R.B., Balalaeva I.V. and Deyev S.M. Immunofluorescent labeling of cancer marker HER2 with semiconductor quantum dots: Proceedings of International Symposium on "Topical Problems of Biophotonics". 2007. Nizhny Novgorod-Moscow-Nizhny Novgorod. P.184.
3. Здобнова Т., Эдельвейс Э., Дорофеев С., Васильев Р., Зломанов В., Деев С. Флуоресцентные комплексы направленного действия – конъюгаты полупроводниковых нанокристаллов и противораковых мини-антител // Сборник тезисов V Съезда Российского фотобиологического общества. М.: НИИ-Природа, 2008.С. 215.
4. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. Quantum dot-antibody complex based on barnase-barstar module for specific labeling of cancer cells // Abstracts of International Spring School "Biophysics & Bioelectrochemistry for Medicine", Cismădioara, Romania. 2009. P. 22.
5. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Brilkina A.A., Shirmanova M.V., Edelweiss E.F., Stremovsky O.A., Krutova I.M., Turchin I.V., Deyev S.M. Whole-body imaging of small animal tumors with specific quantum dot labeling // International Symposium BIOS: Biomedical Optics, San Jose, California, USA. 2009.
6. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. Bioconjugated quantum dots for in vitro and in vivo cancer cells imaging // Сборник тезисов конкурса молодых ученых в рамках 2-го Международного форума по нанотехнологиям. Москва. 2009. С. 81-82.
7. Здобнова Т.А, Стремовский О.А., Балалаева И.В., Деев С.М. Биоконъюгаты квантовых точек для специфической визуализации опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов конференции «Нанотехнологии в онкологии», Москва. 2009. С. 42-43.
8. Здобнова Т.А., Балалаева И.В., Деев С. М. Биоконъюгаты квантовых точек для специфической визуализации опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* // Сборник тезисов конференции «Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная

75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (28 сентября-1 октября 2009)», Москва. 2009. С. 81-84.

9. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Brilkina A.A., Shirmanova M.V., Krutova I.V., Stremovsky O.A., Lebedenko E.N., Vodeneev V.A., Turchin I.V., Deyev S.M. Conjugated quantum dots for *in vivo* targeting and whole-body imaging of small animal tumors // European Conferences on Biomedical Optics (ECBO), Munich, Germany. 2009. P. 24.

Автор выражает благодарность И. В. Балалаевой за предоставленную возможность выполнения части экспериментальной работы в лаборатории клеточных технологий Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского; В. А. Олейникову, В. П. Зубову, А. Н. Генераловой и С. Г. Дорофееву за сотрудничество; О. А. Стрёмовскому, М. П. Никитину и Е. Н. Лебедеенко за помощь в проведении исследования и в обсуждении результатов работы; а также А. М. Сергееву за поддержку.