

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

**2018 г.**

Настоящий проект является продолжением успешно завершеного в 2016 году проекта с тем же названием и представляет собой многопрофильное исследование на стыке молекулярной иммунологии, биохимии, белковой химии и физико-химии наноструктур по созданию нового поколения соединений для высокоточной диагностики и эффективной терапии рака. Основу создаваемых противоопухолевых соединений составляют адресные мультифункциональные рекомбинантные белки с различными механизмами действия, а также наночастицы, позволяющие применить разного рода физическое воздействие на опухолевую клетку (облучение, магнитное поле, нагрев). В 2018 году была продолжена работа по созданию гибридных адресных наноструктур для тераностики рака, а также исследование механизмов действия и цитотоксического (*in vitro*) и терапевтического (*in vivo*) эффекта создаваемых бифункциональных адресных токсинов. Особое внимание при продолжении проекта в 2018 году уделено оптимизации физиологических характеристик создаваемых конструкций с целью увеличения времени их циркуляции в кровяном русле, минимизации нежелательного накопления в почках, печени и других органах, а также разработке новых методов неинвазивного мониторинга циркуляции, накопления (выведения) наноагентов в организме животного. Такой комплексный подход в полной мере отвечает современным представлениям о необходимости интегрального воздействия на опухоли с учетом их молекулярного профиля и индивидуальных особенностей каждого онкологического пациента.

В ходе выполнения проекта в 2018 г. коллективом были получены следующие основные результаты:

Разработан метод получения малых (80-90 нм в диаметре) моноламеллярных протеолипосом, содержащих большие количества (до 2 тысяч молекул белка на липосому) токсина PE40. Разработана методика функционализации поверхности протеолипосом адресным модулем DARPin. В опытах *in vitro* показано, что дарпинизированные протеолипосомы, нагруженные PE40, обладают высокой и селективной токсичностью по отношению к HER2-положительным раковым клеткам человека и индуцируют их апоптоз [Deyev et al., Eur. J. Pharm. Biopharm., 2018; Kiseleva et al., Tumor Biology journal, 2018].

Разработана методика синтеза золотых наностержней, позволяющая получать частицы с заданным максимумом поглощения, и показано, что конъюгация наностержней с адресным модулем DARPin не влияет на спектральные характеристики частицы. Изучена фототермическая цитотоксичность конъюгатов наностержней GNRs с адресным модулем DARPin в фотодинамической терапии *in vitro* в отношении HER2-положительных клеток человека. Установлено, что наиболее перспективным агентом для опытов *in vivo* являются адресные наностержни GNR-DARPin с максимумом поглощения при 805 нм.

Для экспериментов по фармако-кинетики и биораспределению наночастиц синтезированы наночастицы магнетита с различными вариантами покрытия (декстран, карбоксиметилдекстран, их смесь в соотношении 1:1, низкомолекулярный цитрат-анион, полимер молочно-гликолевых кислот, глюкуроновая кислота). Дegrадация синтезированных частиц, время их циркуляции в кровотоке и биораспределение изучены *in vivo* на мышах.

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

Изучено влияние вводимой дозы наночастиц магнетита на время их выведения из кровотока; обнаружено замедление поглощения частиц макрофагами при дозах свыше 600 мкг на мышь весом 20-22 г. Изучено влияние размера, поверхностного заряда и состава покрытия наночастиц магнетита на время их циркуляции в кровотоке. Показано увеличение времени циркуляции наночастиц магнетита в кровотоке при уменьшении их размера, а также более продолжительное время циркуляции отрицательно заряженных наночастиц по сравнению с положительно заряженными. Установлено, что время циркуляции наночастиц магнетита в кровотоке уменьшается в ряду наночастиц со следующими полимерными покрытиями: глюкуроновая кислота > карбоксиметилдекстран > полистеринсульфонат > полиэтиленгликоль-фосфат; полиакриловая кислота [Зелепукин и др. XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва 12-15 февраля 2018 г. Доклад].

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

Для разработки методов генной терапии изучены полученные на предыдущем этапе генно-инженерные конструкции, направляющие экспрессию адресных белковых токсинов в клетках млекопитающих под контролем опухолеспецифичных промоторов. На панели опухолевых клеток млекопитающих с различным уровнем онкомаркера HER2 определена цитотоксичность конструкций, кодирующих адресный анти-HER2-токсин DARPIn9.29-PE40 под контролем опухолеспецифичных промоторов сурвивина (плазмида pCAG-ETA) и теломеразы (плазмида pTERT-ETA). Показано, что в отличие от неселективной и крайне высокой цитотоксичности плазмиды pCAG-ETA цитотоксичность плазмиды pTERT-ETA зависит от условий трансфекции и уровня активности TERT-промотора в конкретной линии опухолевых клеток. Выживаемость клеток с низким уровнем активности TERT-промотора (линия HEK293) вдвое выше выживаемости клеток с высоким уровнем активности TERT-промотора (линия 3T3). Показано, что опухолевые клетки, трансфицированные как плазмидой pCAG-ETA, так и pTERT-ETA, не проявляют какого-либо обнаруживаемого «эффекта свидетеля» (bystander effect) *in vitro*. Исследование опухолесупрессивной активности плазмиды pCAG-ETA на модели карциномы молочной железы у мышей (клетки

D2F2/E2) *in vivo* показало, что трехкратные внутриопухолевые инъекции комплекса сконструированной плазмиды (pTERT-ETA или pCAG-ETA) с полиэтиленимином привели к значительному замедлению роста опухоли (в ~2 раза при 6-недельном сроке наблюдения), тогда как однократной инъекции комплекса плазмиды с полиэтиленимином не достаточно для оказания терапевтического действия.

В 2018 году было также продолжено исследование адресных токсинов, полученных ранее в рамках данного проекта на основе полипептидов, специфичных к разным эпитопам опухолевого маркера HER2 (миниантитела и инновационные полипептиды DARPin), и токсичных белков с разным механизмом действия (различные варианты фрагмента PE40 псевдомонадного токсина А; белковый фотосенсибилизатор miniSOG). Сравнительное исследование общей токсичности DARPin-LoPE и его исходного варианта DARPin-PE40 на здоровых иммунокомпетентных мышах показало значительно меньшую общую токсичность и низкую иммуногенность адресного токсина DARPin-LoPE по сравнению с DARPin-PE40 [Шилова и др., доклад на XXX Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2018]. Благодаря очень высокой селективной цитотоксичности в отношении HER2-положительных опухолевых клеток человека, а также низкой общей токсичности и иммуногенности, адресный токсин нового состава DARPin-LoPE представляет значительный интерес для дальнейшего изучения *in vivo* в качестве тераностического агента для терапии HER2-положительных опухолей. Выяснен механизм угасания флуоресценции адресных фототоксинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG при связывании с HER2-положительными клетками и последующей интернализации, показано, что значимый вклад в изменение флуоресцентных свойств вносит не деградация белка, а экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки, в том числе, цитохромом с [Кузичкина и др., ДАН, 2018; Кузичкина и др., Acta naturae, 2018].

Важным моментом таргетной терапии является идентификация опухолевого маркера – мишени терапевтического воздействия. Для радионуклидной визуализации онкомаркера HER2 проведено сравнительное исследование адресного полипептида DARPin2.29, меченного радиоактивным изотопом иод-125 и аквакарбонильным комплексом технеция-99m. Установлено, что радиоактивный иод-125 является предпочтительной меткой для адресного пептида DARPin9\_29, поскольку обеспечивает более высокое соотношение опухоль:органы по сравнению с технецием-99m и не вызывает высокого неспецифического накопления радионуклида в органах [Vorobyeva et al., Contrast Media Mol. Imaging. 2018]. Намечен новый подход к противоопухолевой терапии путем направленной доставки белка HSP70 и его С-концевого фрагмента HSP70/16 на поверхность опухолевых клеток с помощью супрамолекулярных конструкций на основе пары барназа:барстар и противоопухолевого миниантитела [Сапожников и др., Acta naturae, 2018].

Задачи проекта на 2018 год полностью выполнены. Результаты работы в 2018 году представлены на сайте ИБХ РАН <http://www.ibch.ru/structure/groups/molimmunol>