

# Итоговый научный отчет о выполнении Проекта РФФИ 17-34-80105 мол\_эв\_а.

В ходе реализации данного Проекта были достигнуты следующие научные результаты.

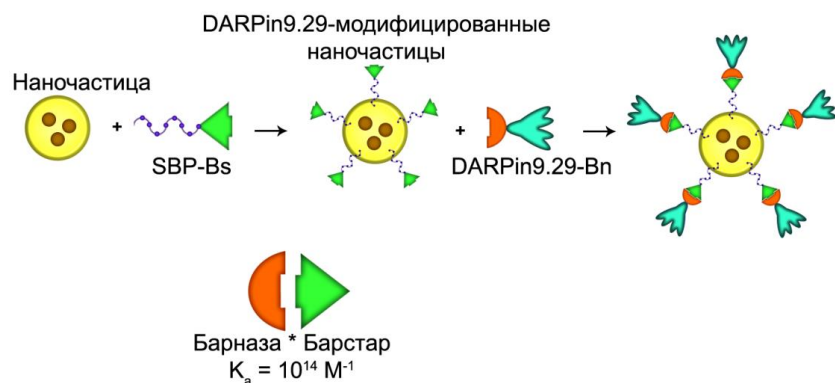
## 1. Разработка нового метода биомодификации наночастиц на основе полипептидных молекул, связывающих поверхность наночастиц и белкового модуля «барназа\*барстар», придающего универсальность данной системе.

Основной задачей данного Проекта являлась разработка методов синтеза и эффективной биомодификации наноструктур различной природы для задач терапии и диагностики онкозаболеваний.

Многофункциональные структуры на основе наночастиц являются уникальными средствами в разработке активно развивающегося направления современной биомедицины, получившей название «тераностика», обозначающего объединение терапевтических и диагностических функций в одном препарате. Для придания наночастицам определенных терапевтических и диагностических свойств их поверхность часто необходимо модифицировать различными молекулами, такими как антитела, ферменты, флуоресцентные белки и другими, для чего необходима разработка эффективных методов поверхностной модификации наноструктур.

Нами был разработан новый универсальный метод биомодификации наноструктур различной природы, заключающийся в использовании пептидов, связывающих твёрдую фазу, и белкового модуля «барназа\*барстар».

Данный метод включает в себя нековалентную модификацию поверхности наночастиц пептидом, связывающим SiO<sub>2</sub>-поверхность наночастиц (VKTQATSREEPPRLPSKHRPG)<sub>4</sub>VKTQTAS (silica binding peptide, SBP), генно-инженерно слитого с барстаром (SBP-Bs). Модификация наночастиц нацеливающими молекулами для задач направленной доставки к клеткам осуществляется посредством самосборки высокоаффинной белковой пары – барназы и барстара на поверхности наночастиц, как представлено на рисунке 1.



**Рисунок 1.** Схема универсальной биомодификации наночастиц на основе пептидов, связывающих твёрдую фазу и белкового модуля «барназа\*барстар».

Барназа и барстар – небольшие белки (12 и 10 кДа) бактериального происхождения, не представленные в млекопитающих, обладающие высокой аффинностью ( $K = 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ) и быстрой кинетикой связывания. Таким образом, данные белки являются эффективными молекулами для самосборки наночастиц различной природы.

Эффективность предложенного метода была продемонстрирована получением флуоресцентных и магнитных наночастиц, модифицированных дарпином **DARPin9.29**, распознающим онкомаркер HER2/neu и адресной доставкой данных наночастиц к раковым клеткам со сверхэкспрессией HER2/neu.

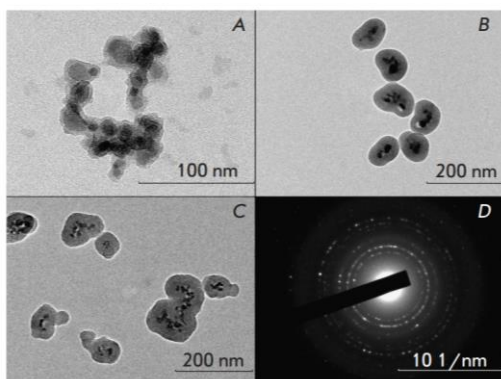
Дарпины – относительно новый класс распознающих молекул неиммуноглобулиновой природы, обладающих целым рядом преимуществ по сравнению с полноразмерными антителами: 1) это белки малого размера, что значительно упрощает различные биохимические манипуляции, 2) отсутствие цистеинов в структуре приводит к устойчивости к агрегации, правильному фолдингу, высокому уровню экспрессии в бактериальных продуцентах, 3) высокая термодинамическая стабильность позволяет их использовать в различных условиях, 4) высокая аффинность к рецепторам (до  $10^{-9}$  M).

## 2. Получение белков слияния, содержащих компоненты системы молекулярных адапторов – барназы и барстара, а также распознающих молекул для адресной доставки к раковым клеткам и полипептидных компонентов, связывающих поверхность наночастиц.

Для реализации данного подхода нами были получены и охарактеризованы белки слияния SiO<sub>2</sub>-связывающего полипептида и барстара (**SBP-Bs**), а также **DARPin9.29** и барназы (**DARPin9.29-Bn**). В обоих белках функциональные модули связаны гибким пептидным линкером для сохранения функциональной активности, устойчивым к действию протез. Методом кислотно-нерастворимого остатка РНК было установлено, что полученный белок слияния **DARPin9.29** и барназы, **DARPin9.29-Bn**, обладает 70% ферментативной активностью (а именно, способностью проявлять РНКазную активность) по сравнению с немодифицированной барназой дикого типа.

## 3. Синтез и характеристика магнитных наночастиц с SiO<sub>2</sub>-поверхностью для поверхностной модификации биомолекулами.

Нами был разработан метод синтеза ряда магнитных и магнитно-флуоресцентных наночастиц типа ядро/оболочка состава Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> (silica magnetic nanoparticles, **SMNP**) с различными размерами по модифицированному методу Штобера с промежуточной стабилизацией наночастиц магнетита цитрат-анионом или карбоксиметилдекстраном. Наночастицы магнетита получали методом копреципитации солей железа FeCl<sub>2</sub> и FeCl<sub>3</sub> в щелочных условиях. Нами были исследованы влияние на размер и дзета-потенциал наночастиц таких параметров, как тип растворителя (метанол/этанол), соотношение концентраций [H<sub>2</sub>O]/[TEOS] и pH реакции. Данные наночастицы анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии, методами динамического и электрофоретического рассеяния света. Был получен спектр наночастиц размером от 10 до 600 нм и с дзета-потенциалом от –60 мВ до +10 мВ. Для дальнейшей работы использовали наночастицы **SMNP** размером  $78 \pm 19$  нм (см. рисунок 2).



**Рисунок 2.** (А-С) Электронные микрофотографии, демонстрирующие строение наночастиц типа ядро/оболочка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> (**SMNP**). (D) Картина микроэлектронной дифракции **SMNP**.

Далее исследовали цитотоксичность синтезированных магнитных наночастиц **SMNP** методом стандартного МТТ-теста на клеточных линиях различного происхождения, а именно ВТ-474 (карцинома протоков молочной железы человека), SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека), НЕК 293Т (линия эмбриональных почек человека), и СНО (клетки яичника китайского хомяка). Нами было установлено, что IC50 для данных для данных клеточных линий SMNP составляет 63–125 мкг/мл, что сравнимо с рядом наночастиц, используемых *in vivo* и является вполне приемлемым.

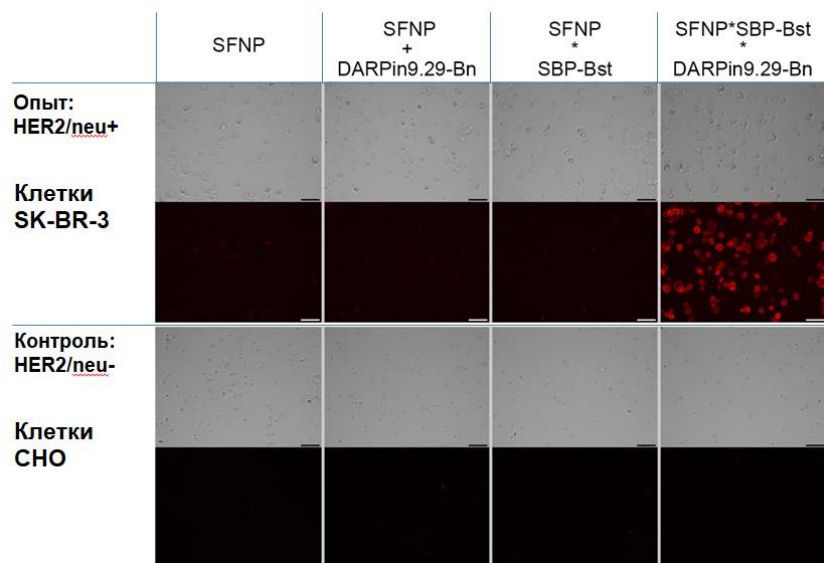
#### 4. Исследование эффективности модификации полученными белковыми компонентами наночастиц различной природы (а именно, магнитных и флуоресцентных).

Далее методом самосборки, представленном на рисунке 1, мы получали HER2/neu-распознающие наночастицы различной природы. С этой целью мы использовали коммерчески доступные 30 нм SiO<sub>2</sub>-покрытые флуоресцентные наночастицы, далее обозначенные как **SFNP** (Sicastar®-redF 30 nm, Micromod, Germany), а также синтезированные нами 80 нм магнитные наночастицы **SMNP**.

Данные наночастицы инкубировали с пептидом, связывающим твердую фазу, слитым с барстаром – **SBP-Bs**, затем с **DARPin9.29**, слитым с барназой – **DARPin9.29-Bn** с отмывкой от несвязавшихся компонентов на всех этапах. Таким образом, получали конструкции **SFNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn** и **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn**.

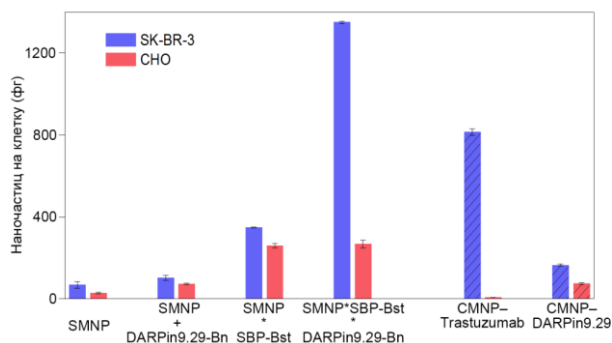
Такие конструкции использовали для адресной доставки к HER2/neu-сверхэкспрессирующим клеткам аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3. В качестве контрольной клеточной линии использовали СНО, клетки яичника китайского хомяка, не экспрессирующие HER2/neu.

Методом флуоресцентной микроскопии была продемонстрирована специфичность взаимодействия флуоресцентных наноструктур **SFNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn** с клетками SKBR-3 как по сравнению с контрольной клеточной линией СНО, так и по сравнению с немодифицированными наночастицами (см. рисунок 3).



**Рисунок 3.** Мечение HER2/neu-сверхэкспрессирующих клеток SK-BR-3 флуоресцентными наноструктурами **SFNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn**. Верхние панели – изображения в проходящем свете, нижние панели – изображения, полученные при возбуждении флуоресценции при 545/30 нм и эмиссии 610/75 нм. Шкалы 75 мкм.

Разработанным нами ранее методом MPQ-цитометрии была продемонстрирована специфичность взаимодействия магнитных наноструктур **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn** с клетками SK-BR-3 как по сравнению с контрольной клеточной линией CHO, так и по сравнению с немодифицированными наночастицами (см. **рисунок 4**).



**Рисунок 4.** Количество структур на основе магнитных наночастиц SMNP, связывшихся с клетками SK-BR-3 и CHO, определенное методом MPQ-цитометрии. Только структуры **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn** демонстрируют специфичное взаимодействие с HER2/neu сверхэкспрессирующими клетками SK-BR-3. Эффективность адресной доставки таких структур к клеткам SK-BR-3 сравнивали с наночастицами CMNP, модифицированными анти-HER2/neu молекулами (Trastuzumab и DARPin9.29) при помощи карбодиимидного метода конъюгации.

## 5. Сравнительный анализ эффективности стандартной химической конъюгации наночастиц с направляющими молекулами и разработанного метода биомодификации.

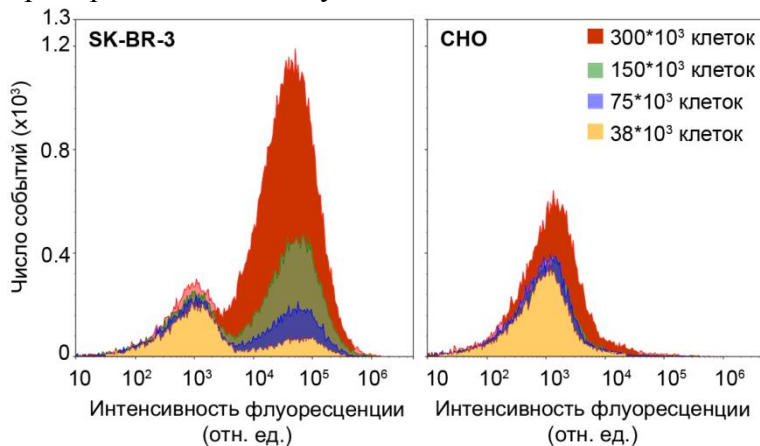
Для того, чтобы продемонстрировать эффективность разработанного метода биомодификации наночастиц по сравнению со стандартным карбодиимидным методом конъюгации (при использовании EDC и sulfo-NHS в качестве кросс-сшивающих реагентов), мы использовали синтезированные нами ранее наночастицы магнетита **CMNP**, покрытые полимером с карбокси-группами, доступными для конъюгации. Данные частицы конъюгировали как с полноразмерным анти-HER2/neu антителом, так и с **DARPin9.29**. Нами было показано, что если при конъюгации довольно большого белка (150 кДа) методы сравнимы по эффективности, то при модификации наночастиц небольшим белком дарпином (16 кДа), разработанный метод значительно превосходит карбодиимидный, как по эффективности мечения, так и по его специфичности (см. **рисунок 4**).

Более того у данного подхода, имеется другие существенные преимущества по сравнению со стандартными методами, такие как 1) ориентированное присоединение молекул, 2) сохранение коллоидной стабильности частиц на всех этапах модификации, 3) модификация занимает несколько минут, 4) возможность легко варьировать компоненты для модификации простым смешиванием. Данный подход нацелен на использование в разработке новых методов диагностики онкомаркеров, в том числе, HER2/neu. HER2/neu – широко известный в клинической практике онкомаркер, который сверхэкспрессируется приблизительно в 20-30% случаев рака молочной железы человека. Однако в норме он представлен на большинстве тканей человека и необходимы точные количественные методы его диагностики. Данная необходимость возникает в связи с тем, что наиболее часто используемые методы, например, иммуногистохимия – дают лишь качественный результат по шкале от 0 до 3+. При этом, если результат 3+ рассматривается как положительный, пациент с результатом 2+ может быть направлен на дополнительную, гораздо более дорогостоящую диагностику. Таким образом, необходимы точные методы экспресс-диагностики данного онкомаркера как *in vitro* (что также может использоваться в различных

фундаментальных исследованиях), так и *ex vivo* – для задач интраоперационной диагностики, контроля эффективности проводимой терапии и корректировки методов лечения.

## 6. Исследование эффективности предложенного подхода к созданию наночастиц для задач диагностики в сложных биологических жидкостях.

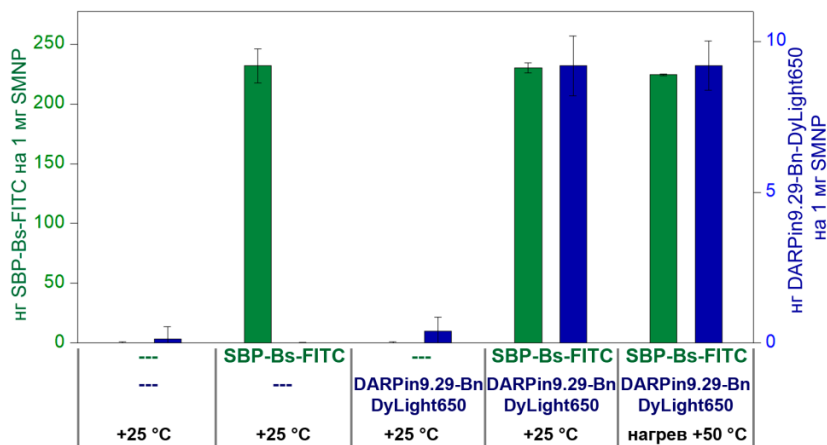
С целью исследования эффективности разработанной технологии для задач диагностики HER2/neu, мы продемонстрировали специфичность взаимодействия собранных конструкций в составе сложной биологической жидкости, а именно, цельной крови. Для этого цельную кровь мыши с гепарином в разном соотношении смешивали с клетками, сверхэкспрессирующими HER2/neu (SK-BR-3), а также с контрольными клетками CHO инкубировали с собранными анти-HER2/neu наноструктурами **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn**. После отмывки от несвязавшихся компонентов образцы крови подвергали лизису и анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Данные проточной цитофлуориметрии, представленные на **рисунке 5**, демонстрируют специфичность взаимодействия структур **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn** с HER2/neu клетками в крови: второй пик появляется только на гистограммах интенсивности флуоресценции образцов крови только с SKBR-3 клетками и высота второго пика пропорциональна числу добавленных SKBR-3 клеток.



**Рисунок 5.** Данные проточной цитометрии, свидетельствующие о сохранении специфичности окрашивания структурами **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn** HER2/neu положительных клеток в составе цельной крови. Гистограммы соответствуют образцам крови, смешанным с SKBR-3 (слева) либо CHO (справа) клетками, и меченым **SMNP\*SBP-Bs\*DARPin9.29-Bn**. Возбуждение – 561 нм, эмиссия 615/20 нм.

## 7. Оценка количества белковых компонентов, связанных с наночастицами.

Для того чтобы измерить количество белковых компонентов (**SBP-Bs** и **DARPin9.29-Bn**, присоединяемых к магнитным наночастицам **SMNP**, данные белковые молекулы метили флуоресцентно флуоресцеинизотиоцианатом (**SBP-Bs-FITC**) и красителем DyLight650 (**DARPin9.29-Bn-DyLight650**). Данные, полученные при обработке спектров флуоресценции и эмиссии флуоресцентно меченых белков, показали, что максимумы поглощения и испускания флуоресценции соответствуют 492/516 нм для **SBP-Bs-FITC** и 657/672 нм для **DARPin9.29-Bn-DyLight650**. Далее наночастицы **SMNP** последовательно инкубировали с **SBP-Bs-FITC** и **DARPin9.29-Bn-DyLight650** и измеряли интенсивность флуоресценции на соответствующих длинах волн. С использованием калибровочных прямых удалось установить, что с 1 мг **SMNP** связывается 230 нг белка **SBP-Bs-FITC** и 9 нг белка **DARPin9.29-Bn-DyLight650**. На **рисунке 6** представлено количество белков, связавшихся с частицами **SMNP** с соответствующими контролями связывания (в отсутствии одного или двух белков).



**Рисунок 6.** Столбчатые гистограммы, соответствующие количеству белков **SBP-Bs-FITC** (зелёный цвет) и **DARPin9.29-Bn-DyLight650** (синий цвет), связавшихся с 1 мг магнитных наночастиц **SMNP**. В качестве контролей использовали образцы, приготовленные без добавления одного или двух белковых компонентов.

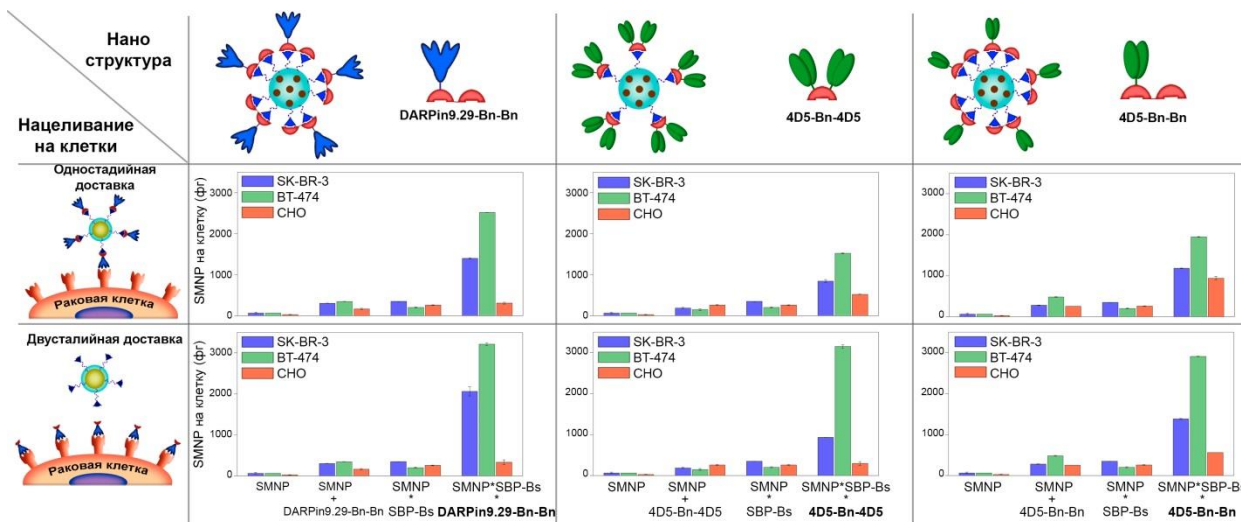
### 8. Исследование стабильности собранных конструкций на основе наночастиц при тепловом воздействии.

С точки зрения биологических применений разрабатываемых наноконструкций (таких, как например, гипертермия опухолей, когда нагрев тканей достигает 41-47 °С вследствие процессов релаксации магнитных моментов частиц), необходимо исследование термостабильности таких конструкций. В связи с этим, мы исследовали стабильность собранных конструкций **SMNP\*SBP-Bs-FITC\*DARPin9.29-Bn-DyLight650** при нагревании до 50 °С в течение одного часа и показали, что количество флуоресцентно меченных белков **SBP-Bs-FITC** и **DARPin9.29-Bn-DyLight650** на поверхности наночастиц сохраняется по сравнению с инкубацией на комнатной температуре (см. рисунок 6).

### 9. Исследование универсальности разработанного подхода для биомодификации наночастиц для задач адресной доставки.

С целью продемонстрировать универсальность разработанной технологии модификации наночастиц на основе полипептидов, связывающих твердую фазу и взаимодействия «барназа\*барстар», с точки зрения как нацеливающих молекул, так и стратегий доставки, мы реализовали ряд систем доставки, схематично представленных на **рисунке 7**.

Так, в частности, мы использовали: 1) различные направляющие молекулы, содержащие в своем составе барназу, а именно: **DARPin9.29**, слитый с двумя молекулами барназы (**DARPin9.29-Bn-Bn**), мини-антитело scFv 4D5 слитое с двумя молекулами барназы (**4D5-Bn-Bn**), барназу, слитую с двумя молекулами scFv 4D5 (**4D5-Bn-4D5**), 2) различные HER2/neu+ клеточные линии, а именно SKBR-3 и BT-474, 3) различные методы доставки, а именно – преинкубация с компонентом, содержащим барназу и последующая доставка наночастицы с барстаром, либо одностадийная доставка сформированного комплекса наночастиц. Данные, представленные на **рисунке 7**, свидетельствуют об успешной реализации всех 12 вариантов адресной доставки магнитных наночастиц к клеткам, а именно о специфичном взаимодействии собранных структур с HER2/neu положительными клетками.

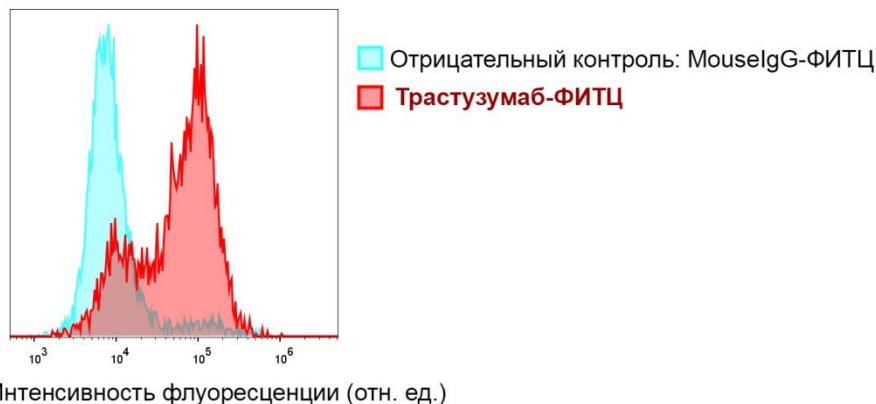


**Рисунок 7.** Универсальность разработанного метода модификации наночастиц. Адресная доставка к HER2/neu положительным клеткам была реализована одностадийно (верхняя панель) и двустадийно (нижняя панель). Связывание с HER2/neu было реализовано посредством следующих молекул: **DARPin9.29-Bn-Bn**, **4D5-Bn-4D5**, **4D5-Bn-Bn**. На столбчатых гистограммах представлено количество наночастиц и комплексов на их основе, связанных с клетками SK-BR-3 (HER2/neu+), BT474 (HER2/neu+), и CHO (HER2/neu-).

## 10. Модельная система для тестирования разработанных конструкций *in vivo*.

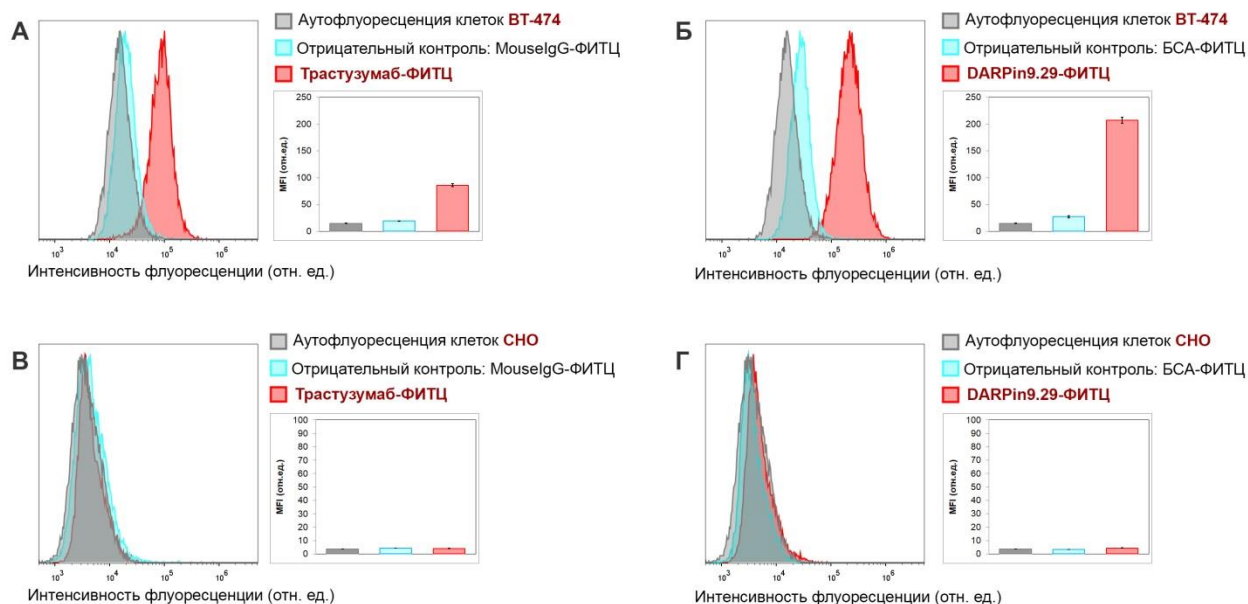
Для того, чтобы оценить эффективность разработанных методов синтеза и модификации наночастиц для *in vivo* диагностики и терапии HER2/neu-положительных опухолей, необходимо было разработать модельную систему для тестирования таких конструкций *in vivo*. С этой целью иммунодефицитным мышам BALB/c Nude (самки, 6 недель) перевивали клетки линий, сверхэкспрессирующих рецептор HER2/neu, а именно SKBR-3, SKOV-3, SKOV-3-lip, BT474 в количестве 1, 5, 10 млн в 100 мкл PBS подкожно и регистрировали динамику роста опухолей. Из выбранных клеточных линий только клетки линии BT474 (в количестве 5 млн на 1 мыш) демонстрировали 100% приживаемость и одинаковую динамику роста (достижение 100 мм<sup>3</sup> на 14 день роста).

Далее, мы исследовали стабильность экспрессии HER2/neu на поверхности опухолевых клеток после их перевивки животным. С этой целью опухоль дезагрегировали до единичных клеток при помощи ферментов (иссеченную скальпелем опухоль инкубировали в 1 мл RPMI-1650 в присутствии 1 г/л коллагеназы тип 1 и 1 г/л коллагеназы тип 4 в течение 4 часов при 37 °C). Полученную клеточную суспензию трижды промывали PBS и инкубировали с анти-HER2/neu антителами, мечеными ФИТЦ (в качестве контроля специфичности связывания использовали мышинные поликлональные антитела, меченые ФИТЦ). Для выделения субпопуляции опухолевых клеток человека среди клеток мыши использовали моноклональные антитела на молекулы клеточной адгезии человека ICAM2, конъюгированные с красителем DyLight-650. Окрашенные образцы исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки, положительные по окрашиванию в канале флуоресценции, соответствующем DyLight-650, анализировали в канале флуоресценции, соответствующем ФИТЦ. Данные, представленные на **рисунке 8**, свидетельствуют о сохранении экспрессии HER2/neu на поверхности клеток после их перевивки лабораторным животным.



**Рисунок 8.** Нормализованные гистограммы, полученные методом проточной цитофлуориметрии, демонстрирующие специфичное окрашивание анти-HER2/neu антителом (Трастузумаб-ФИТЦ) клеток, полученных путем дезагрегации опухоли мыши.

С целью более подробной характеристики клеток BT474 после перевивки животным, клетки опухоли, дезагрегированные раствором коллагеназы, выводили в культуру и культивировали в течение 2 недель. После этого клетки окрашивали Трастузумаб-ФИТЦ, а также DARPIn9.29-ФИТЦ и исследовали эффективность окрашивания по сравнению как с окрашиванием контрольными белками (поликлональными мышиными антителами MouseIgG-ФИТЦ и БСА-ФИТЦ), так и по сравнению с клеточной линией CHO, не экспрессирующей ни один из рецепторов семейства EGFR. Данные, представленные на **рисунке 9**, свидетельствуют об эффективном окрашивании клеток BT474 HER2/neu-нацеленными молекулами (Трастузумаб-ФИТЦ и DARPIn9.29-ФИТЦ) и отсутствии неспецифического мечения клеток CHO, а также отсутствии неспецифического мечения контрольными белками.



**Рисунок 9.** Нормализованные гистограммы, полученные методом проточной цитофлуориметрии, демонстрирующие специфичное окрашивание клеток BT474, полученных путем культивирования дезагрегированной опухоли, А) анти-HER2/neu антителом (Трастузумаб-ФИТЦ) и Б) DARPIn9.29-ФИТЦ.



Гистограммы, представленные на В) и Г) демонстрируют отсутствие неспецифического связывания с контрольной клеточной линией СНО.

Полученные данные свидетельствуют об успешном выборе клеточной линии BT474 для перевивки иммунодефицитным животным для дальнейшей оценки эффективности разработанных методов синтеза и модификации наночастиц для *in vivo* диагностики и терапии HER2/neu-положительных опухолей.

#### **Итоги выполнения работы по Проекту РФФИ 17-34-80105 мол\_эв\_а:**

1. Синтезированы и охарактеризованы различными физико-химическими методами наночастицы с различными покрытиями для поверхностной модификации биомолекулами как стандартными методами биохимической конъюгации, так и новыми разрабатываемыми в Проекте подходами.
2. Получены белки слияния, содержащие компоненты системы молекулярных адапторов – барназы и барстара, а также распознающих молекул для адресной доставки к раковым клеткам и пептидных компонент, связывающих поверхность наночастиц.
3. Исследована эффективность модификации полученными белковыми компонентами наночастиц различной природы (а именно, магнитных и флуоресцентных).
4. Проведён сравнительный анализ эффективности стандартной химической конъюгации наночастиц с направляющими молекулами и методов на основе предлагаемых в Проекте подходов.
5. Реализована адресная доставка биофункционализированных наночастиц различной природы к клеткам с определённым профилем экспрессии онкомаркера HER2/neu.
6. Проведено исследование эффективности разработанного метода для создания наночастиц для задач диагностики в сложных биологических жидкостях, в частности, в цельной крови.
7. Успешно разработана и охарактеризована модельная система для тестирования созданных наноконструкций *in vivo*, в частности, для исследования HER2/neu-положительных опухолей в иммунодефицитных мышах.
8. Продемонстрирована универсальность разработанного метода для модификации наноструктур для тераностики с точки зрения 1) различной природы наноструктур, 2) различных направляющих молекул, 3) различных стратегий доставки.

Ожидаемые научные результаты по Проекту достигнуты полностью.