

**Основные результаты Комплексного проекта КОМФИ №17-00-00122 в 2018-2019 гг.
"Разработка комплекса новых технологий для тераностики онкологических заболеваний: мультифункциональные биосовместимые агенты, сверхчувствительные системы люминесцентной диагностики и биологические модели для прижизненного тестирования"**

Участники:

Проект №17-00-00118. Создание «карго»-платформы на основе легированных лантаноидами нанокристаллов для сверхчувствительных систем люминесцентной диагностики и терапии опухолей. Рук. Е.В. Хайдуков. **ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН** (Коллектив № 2)

Проект №17-00-00119. Развитие подхода для прижизненных исследований адресных противоопухолевых агентов на животных моделях с использованием флуоресцирующих опухолей человека. Рук. И.В. Балалаева. **ННГУ им. Н.И. Лобачевского** (Коллектив № 3)

Проект №17-00-00121. Новые подходы к адресной терапии злокачественных новообразований с использованием инновационного направляющего модуля неиммуноглобулиновой природы. Рук. Деев С.М. **ИБХ РАН** (Коллектив № 1)

Цель Комплексного проекта - разработка фундаментальных подходов к созданию комплекса новых технологий для высококонтрастной оптической диагностики и эффективной терапии онкологических заболеваний, которая включает три взаимодополняющих направления: 1) создание мультифункциональных тераностических соединений нового поколения на основе действующих агентов различной природы и инновационных адресных неиммуноглобулиновых модулей; 2) разработку сверхчувствительных систем люминесцентной диагностики и «карго»-платформы для терапии опухолей на основе неорганических нанокристаллов, легированных лантаноидами; 3) создание новой флуоресцентной животной модели опухолей человека для прижизненного тестирования конструируемых тераностических соединений.

Результаты:

1. Совместно коллективами №1 (ИБХ РАН) и №3 (ННГУ им. Н.И. Лобачевского) показано, что адресный токсин DARPin-LoPE25 эффективно подавляет рост HER2-положительных опухолей в ксенографтных моделях *in vivo* при курсовом введении (рисунок 1), при этом значительным преимуществом DARPin-LoPE25, определяющим его перспективность в качестве **терапевтического модуля**, является сниженная общая токсичность и иммуногенность по сравнению с его прототипом DARPin-PE40, а также менее долгосрочный эффект иммунного ответа на DARPin-LoPE25 в сравнении с DARPin-PE40.

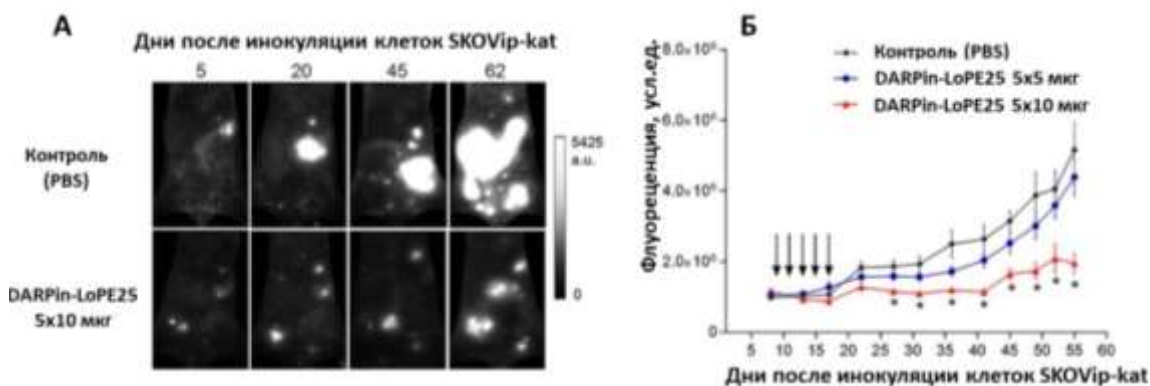


Рисунок 1. Противоопухолевое действие DARPin-LoPE25 на ксенографтной флуоресцентной модели SKOVip-kat у мышей. Показаны флуоресцентные 2D изображения брюшины контрольных мышей (PBS) и мышей, получивших курс инъекций DARPin-LoPE 5 × 10 мг (А). Приведен график динамики роста опухолей у мышей, получивших различные курсы DARPin-LoPE25 (Б).

2. Для прижизненного тестирования конструируемых тераностических соединений коллективом №3 (ННГУ им. Н.И. Лобачевского) получена моноклональная линия HER2-

положительной аденокарциномы молочной железы человека со стабильной экспрессией флуоресцентного белка Katushka, названная SKBR-kat.

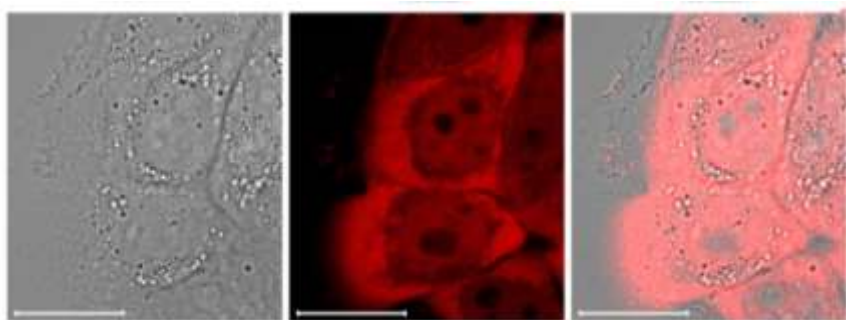


Рисунок 2. Моноклональная линия клеток SKBR-kat. Микроскопическое изображение клеток моноклональной линии SKBR-kat в проходящем свете (слева), при регистрации флуоресценции в красном канале (в середине) и при наложении проходящего и красного каналов. Размер линейки 20 мкм.

3. С использованием полученной линии SKBR-kat продемонстрирована возможность одновременной регистрации фотолуминесцентного сигнала от опухолевых клеток и введенных наноконструкций на основе нанофосфоров (НАФ-ПЭГ и НАФ-DARPin-LoPE) (рис. 3). Такой подход позволяет прецизионно локализовать расположение опухолевых узлов и проанализировать места аккумуляции/удержания наноконструкций. Антистоксовые нанофосфоры (НАФ) синтезированы коллективом № 2 (ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН), адресный белковый токсин DARPin-LoPE сконструирован и наработан коллективом №1 (ИБХ РАН). Для получения изображений на основе регистрации стоксовой и антистоксовой люминесценции использованы уникальные установки для имиджинга лабораторных животных, созданные при сотрудничестве коллективов Комплексного проекта № 2 (ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН) и №3 (ННГУ им. Н.И. Лобачевского).

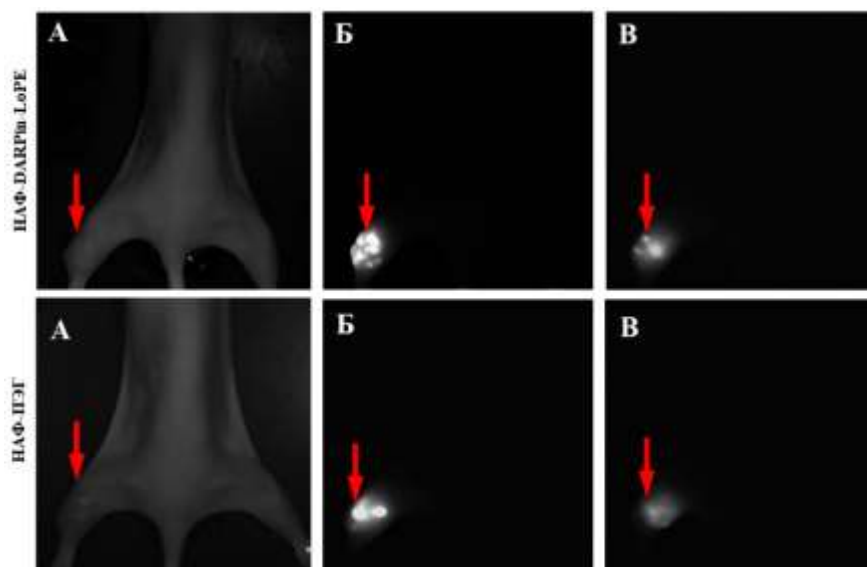


Рис. 3. Прижизненные изображения иммунодефицитной мыши (BALB/c Nude) с ксенографтной опухолью SKBR-kat через 24 ч после интратуморальной инъекции наноконструкций НАФ-ПЭГ и НАФ-DARPin-LoPE25. (А) фотографическое изображение; (Б) флуоресцентный сигнал белка TurboFP635 в диапазоне 610-700 нм при возбуждении на длине волны 594 нм; (В) люминесцентный сигнал НАФ в диапазоне 485-831 нм при возбуждении на длине волны 980 нм. Локализация опухоли отмечена стрелкой.

4. Для создания «карго»-платформы коллективом Комплексного проекта №2 (ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН) синтезированы наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ размером от 10 до 100 нм с использованием двухстадийного процесса синтеза, включающего в себя метод получения объемного кристаллического материала из расплава исходных компонентов и его направленной кристаллизации во фторирующей атмосфере с последующим механическим измельчением полученного объемного поли- или монокристаллического вещества в шаровой мельнице (рис.4). Массовый выход наночастиц составил ~10 граммов за синтез.

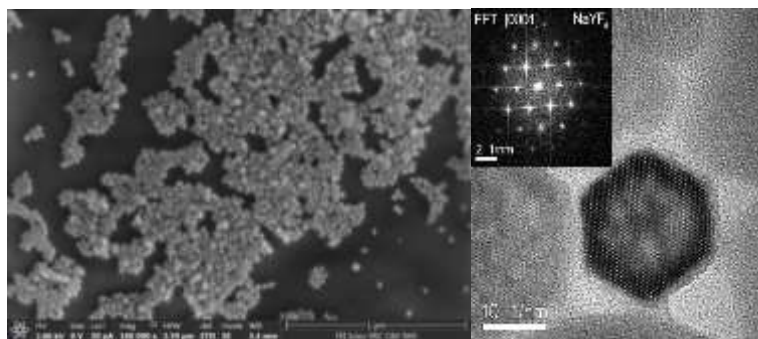


Рисунок 4. Наночастицы состава NaYF_4 , легированного ионами $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, полученные в результате высокоэнергетического «сухого» помола (при возбуждении лазерным излучением 975 нм визуализируется зеленая фотолюминесценция). Показаны: сканирующая электронная микроскопия синтезированных наночастиц (А) и ВРЭМ-изображение наночастицы гексагональной структуры, полученной в помоле (Б).

По результатам работы опубликованы следующие совместные статьи:

1. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. HER2-Specific Targeted Toxin DARPIn-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 2399.
2. Sokolova E., Kutova O., Grishina A., Pospelov A., Guryev E., Schulga A., Deyev S., Balalaeva I. Penetration Efficiency of Antitumor Agents in Ovarian Cancer Spheroids: The Case of Recombinant Targeted Toxin DARPIn-LoPE and the Chemotherapy Drug, Doxorubicin. *Pharmaceutics*. 2019. V. 11(5). pii: E219.
3. Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodeneev V.A., Kutova O.M., Lyubeshkin A.V., Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., Ingel F.I., Novik T.S., Deyev S.M., Ermilov S.A., Zvyagin A.V. Preclinical Study of Biofunctional Polymer Coated Upconversion Nanoparticles. *Toxicol Sci.* 2019. V. 170(1). P. 123-132.