

УДК 576.52:57.085.23:616-006.66

# Новый подход к противоопухолевой терапии: направленная доставка HSP70 к поверхности раковых клеток с помощью супрамолекулярных конструкций на основе пары барстар:барназа

А. М. Сапожников\*, А. В. Клинова, О. А. Шустова, М. В. Гречихина, М. С. Киячус,  
О. А. Стремовский, Е. И. Коваленко, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: amsap@ibch.ru

Поступила в редакцию 20.06.2018

Принята к печати 25.08.2018

**РЕФЕРАТ** Одним из принципиальных отличий многих типов опухолевых клеток от клеток нормальных тканей является транслокация на поверхность плазматической мембраны ряда внутриклеточных протеинов, в частности белка теплового шока 70 кДа (HSP70). Продемонстрировано, что такая необычная поверхностная локализация HSP70 распознается цитотоксическими эффекторами иммунной системы и приводит к усилению их цитолитического действия на данные клетки-мишени. Механизмы этого взаимодействия до конца не раскрыты, однако феномен поверхностной локализации HSP70 на раковых клетках может быть использован для разработки новых подходов к противоопухолевой иммунотерапии. В то же время известно, что присутствие HSP70 на клеточной поверхности не является универсальным признаком раковых клеток. Многие разновидности опухолевых тканей не экспрессируют мембрано-ассоциированные HSP70, что ограничивает потенциальные клинические возможности указанных подходов. В связи с этим в качестве одного из перспективных направлений противоопухолевой иммунотерапии можно рассматривать направленную доставку на поверхность раковых клеток экзогенных HSP70 с целью привлечения и активации цитотоксических эффекторов иммунной системы. Для осуществления адресной доставки HSP70 в опухолевые ткани можно использовать молекулярные конструкции, содержащие рекомбинантные мини-антитела к опухолеассоциированным антигенам, в частности, к HER2/neu-антигену и другим маркерам, высоко экспрессирующимся на поверхности широкого спектра раковых клеток. С целью оценки возможности и эффективности применения указанного подхода, в данном исследовании были созданы двухмодульные рекомбинантные конструкции, содержащие в первом модуле мини-антитела к HER2/neu-антигену, а во втором модуле – молекулу HSP70 или ее фрагмент. Избирательное взаимодействие белковых модулей обеспечивалось состыковочным звеном, образуемым входящей в состав молекулярной конструкции парой барназа:барстар – гетеродимером с уникально высокой константой взаимодействия. Результаты, полученные при тестировании указанных препаратов в моделях *in vitro*, продемонстрировали селективное связывание разработанных конструкций с опухолевыми клетками, экспрессирующими HER2/neu-антиген, и достоверное стимулирующее действие этих препаратов на цитотоксическую активность клеток-эффекторов иммунной системы по отношению к соответствующим клеткам-мишеням.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** барназа:барстар, белок теплового шока 70 кДа, иммунотерапия рака, мини-антитела, НК-клетки, направленная доставка, HER2/neu-антиген.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** HSP70 – белок теплового шока 70 кДа; Hsp70 – индуцируемая форма HSP70 человека; Hsp70/16 – С-концевой фрагмент Hsp70 с молекулярной массой 16 кДа; 4D5 scFv – анти-HER2/neu мини-антитела.

**ВВЕДЕНИЕ**

Поиск новых подходов к иммунотерапии рака, несмотря на огромное число исследований в этой области, по-прежнему остается актуальной задачей [1–3]. Хорошо известно, что одна из причин появления и развития в организме злокачественных новообразований связана с отсутствием на поверхности опухолевых клеток антигенов, активирующих цитотоксические эффекторы системы иммунологического надзора, ответственные за элиминацию трансформированных клеток. В связи с этим одним из перспективных подходов к противоопухолевой иммунотерапии является направленная модификация поверхности опухолевых клеток молекулярными структурами, распознающимися клетками-киллерами и индуцирующими их цитолитическую реакцию. В последние годы было показано, что к числу таких структур относятся белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) с молекулярной массой 70 кДа (HSP70).

Семейство белков теплового шока включает в себя широкий спектр высококонсервативных внутриклеточных протеинов, характеризующихся как гетерогенностью физико-химических свойств, так и разнообразием функций. HSP экспрессируются в клетках всех типов, причем уровень этой экспрессии увеличивается во много раз под действием различных повреждающих агентов. Увеличение внутриклеточного содержания HSP является универсальной защитной реакцией клеток, связанной с уникальной способностью данных белков предотвращать индуцированную стрессом агрегацию внутриклеточных протеинов, их денатурацию, обеспечивать репарацию частично поврежденных протеинов или их корректную утилизацию в случае необратимых повреждений. Перечисленные функции, а также участие в процессах фолдинга вновь синтезируемых полипептидов и транспорта внутриклеточных протеинов относят к так называемым «шаперонным» свойствам конститутивного пула HSP, экспрессирующегося в клетках в нормальных физиологических условиях, в отсутствие стресса [4, 5]. Однако локализация HSP не ограничивается внутриклеточным пространством. В большой серии работ было зарегистрировано присутствие этих протеинов на клеточной поверхности. Так, поверхностные HSP обнаружены на плазматической мембране нормальных [6, 7] и опухолевых клеток [8–14], вирус-инфицированных лимфоцитов [15] и Т-клеток, погибающих по программе апоптоза [16–18]. В этих работах было показано, что на клеточной поверхности экспрессируются HSP с различной молекулярной массой, однако наиболее типичны для поверхностной локализации HSP с молекулярной массой 70 кДа (HSP70). Феномен необыч-

ной поверхностной экспрессии HSP описан не только для клеток, культивируемых *in vitro*, но и для клеток различных тканей, полученных от пациентов [12, 14].

Функции HSP, экспонированных на клеточной поверхности, практически не изучены. Вместе с тем было высказано обоснованное предположение об иммунологической значимости этих поверхностных протеинов, заключающееся в том, что их появление на плазматической мембране может служить сигналом для иммунной системы, активирующей цитотоксические эффекторы и обеспечивающей элиминацию инфицированных, трансформированных и поврежденных клеток [19]. Это обстоятельство позволяет рассматривать HSP как поверхностные маркеры, вовлеченные в систему иммунологического надзора. Действительно, в настоящее время хорошо известно, что различные субпопуляции Т-лимфоцитов и NK-клеток способны распознавать высококонсервативные детерминанты различных HSP. В частности, мембранные HSP70 и Grp75 могут распознаваться  $\gamma\delta$ -Т-клетками нерестриктированно по молекулам главного комплекса гистосовместимости [20], а индуцируемая форма HSP70 – Hsp70 нерестриктированно распознается NK-клетками [21, 22]. Поверхностные HSP опухолевых клеток привлекают NK-клетки, количество которых в опухолях, экспрессирующих эти протеины на своей поверхности, может увеличиваться в 500 раз [23]. Литературные данные свидетельствуют о МНС класса I-нерестриктированном распознавании *in vitro* Hsp70 человеческими NK-клетками на поверхности клеток эритролейкемической линии K562 и человеческой саркомы, подвергнутых тепловому шоку [24]. Вместе с тем показано, что поверхностные HSP70 вызывают выраженный гуморальный и клеточный ответ системы адаптивного иммунитета. В ряде работ было продемонстрировано, что HSP70 можно отнести к опухолеассоциированным антигенам, распознаваемым различными типами Т-лимфоцитов, например CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> [25],  $\alpha\beta$ - и  $\gamma\delta$ -лимфоцитами [26, 27], а также естественными киллерами (NK-клетками) [10, 11, 21]. Зарегистрированное в этих работах распознавание как конститутивной, так и индуцируемой форм HSP70, МНС-рестриктированными и нерестриктированными Т-лимфоцитами свидетельствует о важной роли поверхностных HSP70 в противоопухолевых иммунных реакциях. Основываясь на этом, была предложена модель иммунологического надзора, в которой указанные лимфоциты обеспечивают первую линию защиты от инфекционных агентов, несущих на своей поверхности HSP, защиты от вирус-инфицированных и трансформированных клеток, а также от поврежденных аутологических клеток. Пул лимфоцитов, распознающих консервативные HSP,

возможно, индуцируется в онтогенезе во время развития естественной микрофлоры кожи и кишечника. Периодическая реактивация таких лимфоцитов может быть обусловлена обычными вирусными и бактериальными инфекциями, равно как и различными стрессирующими стимулами [19].

Применение HSP70 для противоопухолевой терапии давно привлекает внимание исследователей, использующих разнообразные подходы к данной проблеме [28–32]. Однако большинство этих подходов основаны на способности HSP70 образовывать прочные комплексы с опухолеспецифичными пептидами, а не на прямом распознавании цитотоксическими эффекторами иммунной системы мембрано-ассоциированных HSP70. Возможно, это связано с тем, что экспрессия этих протеинов на раковых клетках *in vivo* наблюдается не во всех типах опухолевых тканей. Данное обстоятельство служит основанием для предположения, что индукция транслокации HSP70 на поверхность опухолевых клеток или направленная доставка в злокачественные новообразования таких молекул с целью привлечения и активации цитотоксических эффекторов иммунной системы является новым перспективным направлением для противоопухолевой иммунотерапии [33].

В недавних исследованиях ряда авторов и в наших предварительных экспериментах было установлено, что активирующим влиянием на натуральные киллеры обладают не только полноразмерные молекулы HSP70, но и синтетические аналоги некоторых фрагментов HSP70. В частности, внесение синтетических фрагментов HSP70 в культуру NK-клеток человека, как и в опытах с рекомбинантным HSP70, существенно стимулирует продукцию клетками-киллерами интерферона гамма [34, 35]. Таким образом, молекулы HSP70 и фрагменты этого протеина можно рассматривать как перспективные структуры для биоинженерного создания молекулярных конструкций, предназначенных для направленной модификации поверхности опухолевых клеток с целью усиления противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа. Адресная доставка подобных «цитолитических маркеров» может осуществляться с помощью включения в разрабатываемые рекомбинантные конструкции модуля рекомбинантных мини-антител (не вызывающих прямой цитотоксической реакции иммунной системы) к опухолеспецифическим антигенам, в частности, антител к HER2/neu-антигену (p185<sup>HER2</sup>) и другим раковым маркерам, экспрессирующимся на поверхности широкого спектра злокачественных новообразований.

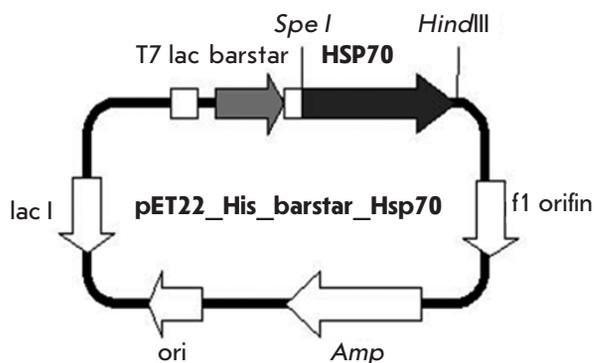
Данное исследование было направлено на разработку способа адресной HER-2/neu направленной доставки HSP70 или фрагмента этой молекулы

к поверхности опухолевых клеток с помощью двухмодульной конструкции с использованием пары барназа:барстар в качестве состыковочного звена белковых модулей. В указанной конструкции функция первого модуля, имеющего в своем составе высокоспецифичное противораковое мини-антитело и барназу, заключается в прицельном связывании с поверхностью раковых клеток. В свою очередь, экспонированная на опухолевых клетках в результате этого взаимодействия барназа служит сайтом селективного связывания с клетками-мишенями второго модуля, составленного из барстара и HSP70 (или его фрагмента). Избирательное взаимодействие первого и второго модулей в разрабатываемом подходе обеспечивается уникально высокой константой связывания барстара с барназой; этот белковый гетеродимер образует комплекс с  $K_d \sim 10^{-14}$  М, сравнимый только со стрептавидин-биотиновой системой ( $K_d \sim 10^{-15}$  М). В ходе наших предыдущих исследований была доказана перспективность применения комплекса барназа:барстар для адресной доставки различных препаратов к раковым клеткам [36–39].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Принципы создания двухмодульных молекулярных конструкций для адресной доставки HSP70 к опухолевым клеткам

Для создания надмолекулярного комплекса, содержащего белок HSP70 и адресующее мини-антитело, с помощью модуля барназа:барстар необходимо было присоединить HSP70 к одному из компонентов модуля – барстару. Из экспериментальных данных [10] известно, что за стимуляцию цитотоксической и пролиферативной активности NK-клеток отвечает С-концевой домен HSP70. Поэтому в конструируемом рекомбинантном белке необходимо было оставить С-конец HSP70 свободным и доступным для взаимодействия с естественными киллерами, а барстар присоединять к N-концу с помощью гибкого линкерного пептида, обеспечивающего свободу вращения функциональных доменов в целевом рекомбинантном белке. На основе этих теоретических предпосылок была сконструирована плазмида, кодирующая целевой рекомбинантный белок His<sub>6</sub>-барстар-HSP70, представляющий собой белок HSP70 (индуцируемая форма HSP70 человека – Hsp70), соединенный N-концом с барстаром через шарнирный пептид иммуноглобулина IgG3 человека (ThrProLeuGlyAspThrThrHisThrSerGly) и содержащий гексагистиридиновый хвост на N-конце (рис. 1). Аналогичные процедуры были проведены для получения второй разновидности эффекторного модуля, содержащего в своем составе не полноразмерную



**Рис. 1.** Схема плазмиды pET22\_His\_barstar\_Hsp70, кодирующей второй модуль молекулярной конструкции, содержащий эффекторный белок Hsp70. T7 lac – ранний промотор РНК-полимеразы фага T7, HSP70 – ген *Hsp70*, Amp – ген устойчивости к антибиотикам ампициллину

молекулу Hsp70, а ее С-концевой фрагмент с молекулярной массой 16 кДа – His<sub>6</sub>-барстар-Hsp70/16. В качестве первого, направляющего, модуля с адресными анти-HER2/neu мини-антителами в работе использовалась созданная ранее конструкция 4D5 scFv-дибарназа [36].

#### Культуры опухолевых клеток-мишеней

В качестве клеток-мишеней, обрабатываемых разработанными конструкциями, были выбраны клетки аденокарциномы яичника SKOV3 и клетки карциномы молочной железы человека BT 474, сверхэкспрессирующие HER-2/neu-антиген. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Nunk, США) и в культуральных флаконах (25 см<sup>2</sup>, Costar, США) в питательной среде RPMI 1640 (Flow Laboratories, Великобритания), содержащей 10% фетальной сыворотки теленка (FCS), 50 мкг/мл стрептомицина («Синтез», Россия) и 50 мкг/мл пенициллина («Биосинтез», Россия) в 5% CO<sub>2</sub> при +37°C. Адгезионные клетки, прикрепляющиеся к подложке флаконов для культивирования, снимали с подложки раствором Версена. В качестве контроля использовали клетки линии HEK-293 – клетки эмбриональной почки, культивируемые в таких же условиях.

Проверку уровня экспрессии опухолеспецифического антигена HER-2/neu на поверхности культивируемых клеточных линий проводили с помощью флуоресцентной микроскопии и ранее созданных нами рекомбинантных конструкций для визуализации раковых клеток, экспрессирующих антиген HER-2/neu (анти-HER2/neu-мини-антитело-барстар • GFP – барназа) [36, 37]. В результате было продемонстриро-

вано, что образцы используемых клеточных культур характеризуются необходимым высоким уровнем экспрессии поверхностного антигена HER-2/neu (данные не приведены).

#### Обработка клеток-мишеней тестируемыми конструкциями

Доставку Hsp70 и его фрагмента Hsp70/16 к опухолевым клеткам осуществляли в составе рекомбинантных белков барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16. Первым этапом адресной доставки являлось связывание анти-HER2/neu-мини-антитела (белок 4D5 scFv), входящего в состав первого модуля разработанного надмолекулярного комплекса, с соответствующим опухолеспецифическим антигеном на клеточной поверхности (20 мкг/мл, 60 мин). Затем за счет взаимодействия барназа-барстар рекомбинантные белки барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16 также прочно адсорбировались на клеточной мембране (50 мкг/мл, 60 мин).

#### Оценка эффективности связывания разработанных конструкций с клетками-мишенями

Для оценки эффективности адресной доставки белка теплового шока на поверхность клеток-мишеней применяли метод проточной цитофлуориметрии. Окрашивание образцов клеток, провзаимодействовавших с первым и вторым модулями разработанного надмолекулярного комплекса, проводили по стандартной методике [14]. В работе использовали антитела BRM22 к С-концу HSP70 и вторые антитела – anti-mouse IgG-FITC (Sigma, США). Измерения проводили на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). В каждом образце анализировали не менее 10000 клеток. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы WinMDI для обработки гистограмм, полученных во время цитофлуориметрического анализа.

В опытах по визуализации адресной доставки Hsp70 и его фрагмента Hsp70/16 на поверхность опухолевых клеток-мишеней была использована лазерная конфокальная микроскопия. В этих экспериментах клетки-мишени, последовательно обработанные первым и вторым модулями разработанных конструкций, окрашивали по стандартной методике анти-HSP70-антителами и вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом AF488 (Molecular Probes, США). Полученный после центрифугирования осадок этих клеток помещали на предметное стекло с последующим нанесением специальной полимеризующейся гелеобразной среды Mowiol, сохраняющей морфологию клеток и предохраняю-

щей флуорохром от выгорания (Biomed, США), накрывали покровным стеклом и оставляли в темноте до микроскопического анализа. Фотографирование клеток проводили на конфокальном микроскопе ECLIPSE TE2000-E (Nikon, Япония).

**Оценка влияния обработки опухолевых клеток разработанными конструкциями на цитотоксическую активность НК-клеток по отношению к этим клеткам-мишеням**

В серии экспериментов *in vitro*, направленных на анализ противоопухолевого эффекта разработанных конструкций, в качестве цитотоксических клеток-эффекторов использовали НК-клетки, выделенные из периферической крови человека. Для изоляции НК-клеток из фракции мононуклеаров, полученной с помощью седиментации донорской крови на градиенте плотности, использовали метод магнитной сепарации с применением набора для выделения НК-клеток (MACS NK cell isolation kit II, Miltenyi Biotec, Германия). Оценку уровня цитотоксичности, опосредованной НК-клетками, проводили с помощью нерадиоактивной тест-системы CytoTox96 (Promega, США), основанной на количественном определении выхода лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток-мишеней, обусловленного цитолитическим действием естественных киллеров на опухолевые клетки. Эксперименты проводили в соответствии с протоколом компании-производителя тест-системы. Каждую экспериментальную точку повторяли в трех репликах. НК-клетки вносили в лунки в соотношении 7:1 к клеткам-мишеням. В качестве мишеней использовали клетки линии BT 474, внесенные в лунки за 4 ч до эксперимента с последующей их обработкой тестируемыми рекомбинантными конструкциями. На каждом этапе описываемой процедуры после внесения в лунки компонентов надмолекулярного комплекса и последующей инкубации клеток-мишеней в их присутствии (30 мин при 4°C) клетки осаждали на центрифуге с последующим удалением супернатанта и отмывкой лунок от несвязавшихся рекомбинантных протеинов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Проведенный цитофлуориметрический анализ продемонстрировал эффективность использования разработанных конструкций для доставки Hsp70 и Hsp70/16 на поверхность опухолевых клеток-мишеней. В опытах, проведенных с линиями клеток BT 474 и SKOV3, были получены аналогичные данные, характеризующие связывание Hsp70 и Hsp70/16 с клеточной поверхностью. Поэтому ниже представлены результаты взаимодействия разработанных конструкций с клеточной линией BT 474.

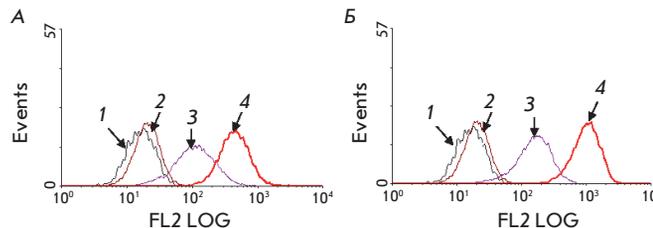


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ связывания комплекса 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70 (А) и 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70/16 (Б) с поверхностью клеток BT 474. Клетки инкубировали с компонентами конструкций, затем образцы окрашивали по стандартной методике первыми (BRM22) и вторыми антителами, меченными флуорохромом FITC. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – количество событий. 1 – контроль: аутофлуоресценция; 2 – контроль: 4D5 scFv-дибарназа; 3 – контроль: барстар-Hsp70 (А) или барстар-Hsp70/16 (Б); 4 – 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70 (А) или барстар-Hsp70/16 (Б)

Было продемонстрировано, что компоненты надмолекулярной структуры 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70(Hsp70/16) эффективно связываются с поверхностью клеток: 4D5 scFv-дибарназа с антигеном p185<sup>HER2</sup>, а затем барстар-Hsp70(Hsp70/16) взаимодействует с 4D5 scFv-дибарназой (рис. 2). Кроме этого, наши данные свидетельствуют о способности белков барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16 самостоятельно взаимодействовать с клеточной мембраной, что приводит к смещению пиков на гистограммах соответствующих контрольных образцов в область повышенного уровня флуоресценции. По литературным данным, некоторые типы опухолевых клеток способны адсорбировать на своей поверхности экзогенные HSP70 [15, 16].

Клетки линии BT 474 экспрессируют антиген p185<sup>HER2</sup>, к которому направлено мини-антитело первого модуля. В качестве контроля на неспецифическое связывание 4D5 scFv-дибарназы с поверхностью клеток использовали линию эмбриональных клеток почки HEK-293. Результаты цитофлуориметрического анализа показали отсутствие неспецифического связывания с клеточной мембраной как первого модуля (4D5 scFv-дибарназа), так и второго (барстар-Hsp70(Hsp70/16)) (данные не приведены).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование системы барназа – барстар обеспечивает высокоспецифичную и эффективную доставку конструкций, содержащих Hsp70 или его С-концевой фрагмент, на поверх-

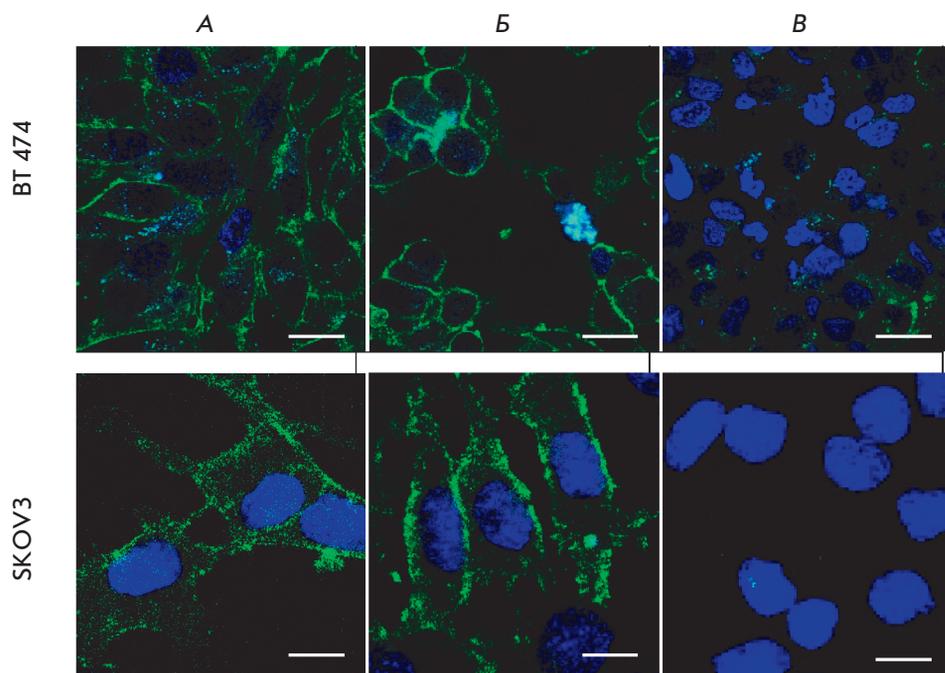


Рис. 3. Визуализация комплекса 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70 (А) и 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70/16 (Б) на поверхности клеток BT 474 (верхний ряд) и SKOV3 (нижний ряд). Клетки последовательно инкубировали с компонентами комплексов, затем образцы окрашивали антителами по стандартной методике. Первые антитела – BRM22 к С-домену HSP70, вторые – антитела, меченные флуорохромом Alexa Fluor 488. Ядра клеток окрашены DAPI. В – контроль: клетки окрашены вторыми антителами. Размер масштабной шкалы – 10 мкм

ность опухолевых клеток, экспрессирующих маркер HER2/neu.

С целью визуализации эффективности использования разработанных конструкций для адресной доставки Hsp70 и фрагмента этой молекулы Hsp70/16 на поверхность клеток BT 474 и SKOV3 была использована лазерная конфокальная микроскопия. Клетки-мишени, последовательно обработанные первым и вторым модулями разработанных конструкций, окрашивали по стандартной методике анти-HSP70-антителами и вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом AF488. Уровень флуоресцентного окрашивания клеток анализировали на конфокальном микроскопе ECLIPSE TE2000-E. Полученные результаты подтвердили присутствие Hsp70 и Hsp70/16 на поверхности обработанных клеток-мишеней (рис. 3).

Влияние разработанных конструкций на активацию цитотоксических эффекторов иммунной системы проводили в *in vitro* модели взаимодействия НК-клеток с опухолевыми клетками-мишенями. В качестве мишеней использовали клетки линии BT 474. Оценка взаимодействия клеток-эффекторов с клетками-мишенями в этой модели показала, что адресная доставка как молекул Hsp70, так и Hsp70/16 к поверхности опухолевых клеток значительно увеличивает противоопухолевый цитолитический эффект НК-клеток. В наших экспериментах адресная доставка к клеткам линии BT 474 полноразмерной молекулы Hsp70 приводила к усилению цитолитического действия НК-клеток

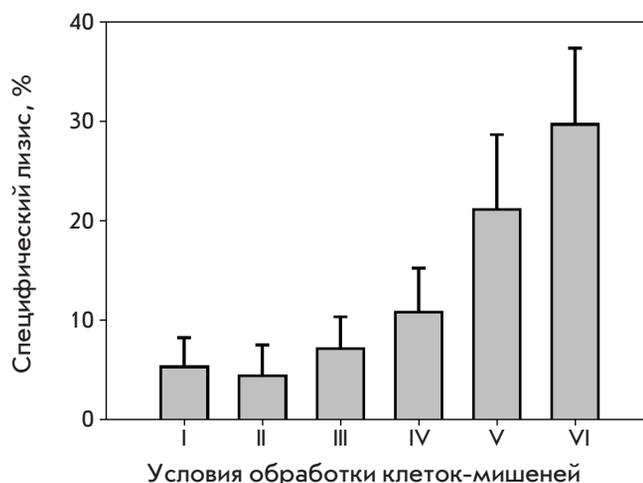


Рис. 4. Сравнение влияния обработки клеток-мишеней рекомбинантными конструкциями, содержащими Hsp70 и Hsp70/16, на цитолитическую активность НК-клеток. Условия обработки: I – контроль (без обработки); II – 4D5 scFv-дибарназа; III – барстар-Hsp70/16; IV – барстар-Hsp70; V – 4D5 scFv-дибарназа + барстар-Hsp70/16; VI – 4D5 scFv-дибарназа + барстар-Hsp70

более чем в 5 раз, а доставка Hsp70/16 – С-концевого фрагмента этой молекулы – более чем в 4 раза. Обработка клеток-мишеней отдельными составляющими разработанного надмолекулярного комплекса («нацеливающий» модуль – 4D5 scFv-барназа и «эф-

факторные» модули – барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16) не оказывала существенного влияния на цитолитическое действие НК-клеток. Полученные результаты представлены на рис. 4.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование продемонстрировало эффективность разработанной нами двухмодульной молекулярной конструкции для адресной доставки к опухолевым клеткам-мишеням белка теплового шока Hsp70 и его С-концевого фрагмента – молекул, активирующих цитотоксические эффекторы иммун-

ной системы. Предлагаемый подход может стать основой для создания новых препаратов для противоопухолевой иммунотерапии. ●

*Работа поддержана грантом РФФ № 14-24-00106 (конструирование генов и получение рекомбинантных белков) и программой Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (исследование цитотоксической активности клеток-эффекторов иммунной системы).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shilova O.N., Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. // J. Control Release. 2018. V. 286. P. 125–136. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.030.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Russian Chemical Reviews. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
- Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // Biochemistry (Moscow). 2012. V. 77. № 3. P. 227–245.
- Craig E.A., Weissman J.S., Horwich A.L. // Cell. 1994. V. 78. P. 365–372.
- Hartl F.U. // Nature. 1996. V. 381. P. 571–580.
- Erkeller-Yeksel F.M., Isenberg D.A., Dhillon V.B., Latchman D.S., Lydyard P.M. // J. Autoimmun. 1992. V. 5. P. 803–814.
- Ishiyama T., Koike M., Akimoto Y., Fukuchi K., Watanabe K., Yoshida M., Wakabayashi Y., Tsuruoka N. // Clin. Exp. Immunol. 1996. V. 106. P. 351–356.
- Ferrarini M., Heltai S., Zocchi M.R., Rugarli C. // Int. J. Cancer. 1992. V. 51. P. 613–619.
- Altmeyer A., Maki R.G., Feldweg A.M., Heike M., Protopopov V.P., Masur S.K., Srivastava P.K. // Int. J. Cancer. 1996. V. 69. P. 340–349.
- Multhoff G., Hightower L.E. // Cell Stress Chaperones. 1996. V. 1. P. 167–176.
- Multhoff G., Botzler C., Jennen L., Schmidt J., Ellwart J., Issels R. // J. Immunol. 1997. V. 158. P. 4341–4350.
- Rogias J., Wallen E.S., Loening S.A., Moseley P.L. // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 451. P. 225–229.
- Sapozhnikov A.M., Ponomarev E.D., Tarasenko T.N., Telford W.G. // Cell Prolif. 1999. V. 32. P. 363–378.
- Hantschel M., Pfister K., Jordan A., Scholz R., Andreesen R., Schmitz G., Schmetzer H., Hiddenman W., Multhoff G. // Cell Stress Chaperones. 2000. V. 5. P. 438–442.
- Di Cesare S., Poccia F., Mastino A., Colizzi V. // Immunology. 1992. V. 76. P. 341–343.
- Poccia F., Piselli P., Vendetti S., Bach S., Amendola A., Placido R., Colizzi V. // Immunology. 1996. V. 88. P. 6–12.
- Sapozhnikov A.M., Gusarova G.A., Ponomarev E.D., Telford W.G. // Cell Proliferation. 2002. V. 35. P. 193–206.
- Tórk Z., Horváth I., Goloubinoff P., Kovács E., Glatz A., Balogh G., Vigh L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2192–2197.
- Multhoff G., Botzler C., Issels R. // Biol. Chem. 1998. V. 379. P. 295–300.
- Breloer M., Fleischer B., Bonin A. // J. Immunol. 1999. V. 162. P. 3141–3147.
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Eissner G., Issels R. // Blood. 1995. V. 86. P. 1374–1382.
- Ponomarev E.D., Tarasenko T.N., Sapozhnikov A.M. // Immunol. Lett. 2000. V. 74. P. 133–139.
- Hightower L.E., Hendershot L.M. // Cell Stress Chaperones. 1997. V. 2. P. 1–11.
- Multhoff G. // Int. J. Hyperthermia. 1997. V. 13. P. 39–48.
- Tamura Y., Tsuboi N., Sato N., Kikuchi K. // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 5516–5524.
- Menoret A., Patry Y., Burg C., Le Pendu J. // J. Immunol. 1995. V. 155. P. 740–747.
- Wei Y-g., Zhao X., Karuya Y., Fukata H., Teshigawara K., Uchida A. // Cancer Res. 1996. V. 56. P. 1104–1110.
- Srivastava P.K., Amato R.J. // Vaccine. 2001. V. 19. P. 2590–2597.
- Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., Shatalov Y.V., Romanova E.A., Korobko E.V., Demin A.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Khaidukov S.V., Kiselev S.L., Gabibov A.G., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 2117–2124.
- Shevtsov M.A., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Bychkova N.V., Aksenov N.D., Abkin S.V., Margulis B.A., Guzhova I.V. // Oncotarget. 2014. V. 5. P. 3101–3114.
- Yuan J., Kashiwagi S., Reeves P., Nezivar J., Yang Y., Arrifin N.H., Nguyen M., Jean-Mary G., Tong X., Uppal P., et al. // J. Hematol. and Oncol. 2014. V. 7. P. 15.
- Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Sheludchenkov A.A., Romanova E.A., Dukhanina E.A., Tonevitsky A.G., Gnuchev N.V., Gabibov A.G., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 21724–21731.
- Guzhova I.V., Margulis B.A. // Hum. Vaccin. Immunother. 2016. V. 12. P. 2529–2535.
- Kovalenko E.I., Vlaskin P.A., Kanevskii L.M., Strel'nikova Y.I., Sapozhnikov A.M. // Dokl. Biol. Sci. 2006. V. 406. P. 4–6.
- Multhoff G., Pfister K., Gehrmann M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W. // Cell Stress Chaperones. 2001. V. 6. P. 337–344.
- Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // Nature Biotechnology. 2003. V. 21. P. 1486–1492.
- Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447. doi: 10.1021/acsami.8b01627
- Martsev S.P., Chumanovich A.A., Vlasov A.P., Dubnovitsky A.P., Tsybovsky Y.I., Kravchuk Z.I., Cozzi A., Arosio P., Deyev S.M. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 27. P. 8047–8057.
- Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M., Artemyev M.V., Baranov A.V. // Nanomedicine. 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.