

УДК 577.336; 577.112.7

Специфическая визуализация опухолевых клеток с помощью антистоксовых нанофосфоров

Е. А. Гребеник^{1*}, А. Н. Генералова¹, А. В. Нечаев², Е. В. Хайдуков³, К. Е. Миронова¹,
О. А. Стрёмовский¹, Е. Н. Лебеденко¹, А. В. Звягин^{1,4,5}, С. М. Деев^{1,4}

¹Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, 119571, Москва, просп. Вернадского, 86

³Институт лазерных и информационных технологий РАН, 142190, Троицк, ул. Пионерская, 2

⁴Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

⁵Department of Physics and Astronomy, Macquarie University, NSW 2109, Australia

*E-mail: kattya.ivukina@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.10.2014

РЕФЕРАТ Актуальным направлением в современной медицинской диагностике является создание нацеленных на патологические мишени конструкций на основе фотолюминесцентных наночастиц, обладающих высокой фото- и химической стабильностью, а также спектрами поглощения и испускания фотолюминесценции в области «окна прозрачности» биоткани. В работе получена двухкомпонентная конструкция на основе антистоксовых нанофосфоров (НАФ) и противоопухолевых мини-антител 4D5scFv для селективного мечения клеток, гиперэкспрессирующих опухолевый маркер HER2, характерный для целого ряда метастазирующих опухолей человека. Высокоаффинная белковая пара барстар : барназа (Bs : Vn), обладающая чрезвычайной устойчивостью в широком диапазоне рН и температур, использована в качестве молекулярного адаптера, обеспечивающего самосборку двухкомпонентной конструкции. На клетках аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих HER2, показана высокая избирательность связывания полученной двухкомпонентной конструкции 4D5scFv-Vn : Bs-НАФ с опухолевыми клетками. Предложенный подход позволяет получать аналогичные конструкции для визуализации различных специфических маркеров в патогенных тканях, в том числе в злокачественных новообразованиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антистоксовые нанофосфоры, визуализация биомаркеров, противоопухолевые антитела, самосборка, HER2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека; PBS – фосфатно-солевой буфер; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент антител; sulfo-NHS – N-гидроксисульфосукцинимид; Vn – барназа; Bs – барстар; BSA – бычий сывороточный альбумин; НАФ – антистоксовые нанофосфоры; ПААГ – полиакриламидный гель; ПМАО – чередующийся сополимер малеинового ангидрида с 1-октадеценом; ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Использование модульных конструкций на основе белков суперсемейства иммуноглобулинов для направленной доставки лекарственных средств и диагностики является современным направлением молекулярной медицины, получившим название тераностика [1–3]. При этом особый интерес вызывает проблема создания направленных конструкций на основе фотолюминесцентных наночастиц, оснащенных нацеливающими модулями, которые обеспе-

чивают их доставку к клеткам-мишеням [4]. Такой подход позволяет разрабатывать принципиально новые высокоэффективные подходы для персонализированной оптической диагностики. Накапливаясь в клетках-мишенях, подобные конструкции могут выявлять их на фоне здоровых тканей за счет фотолюминесцентного ответа на возбуждение светом определенных длин волн. В частности, использование фотолюминесцентных конструкций, способных прицельно связываться с соответствующим клеточным

онкомаркером, обеспечивает наиболее чувствительную и неинвазивную раннюю диагностику онкологических заболеваний.

Клеточные онкомаркеры, такие, как HER2 – белок семейства рецепторов эпидермального фактора роста человека, представлены в большом количестве в опухолевой ткани, где служат эффективными мишенями для выявления и терапии рака. HER2 гиперэкспрессирован во многих опухолях, включая опухоли яичников, шейки матки, мочевого пузыря, прямой кишки, желудка, пищевода и молочной железы, а уровень его экспрессии часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом и повышенной устойчивостью к химиотерапии [5]. Следовательно, создание HER2-направленных фотолюминесцентных конструкций представляет собой один из многообещающих подходов к ранней молекулярной диагностике рака. Направленная доставка обусловлена использованием входящего в состав конструкции нацеливающего модуля белковой природы. В качестве модуля, нацеленного на HER2, применяют полноразмерное гуманизованное моноклональное антитело 4D5, которое широко используется в клинической практике под коммерческим названием Herceptin® [6]. Антитело присоединяют к наночастице с помощью различных сшивающих реагентов или простой физической сорбции. В данной работе в качестве нацеливающего модуля использовали генно-инженерный фрагмент этого антитела, 4D5scFv, представляющий собой единую полипептидную цепь, в которой переменные домены легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина соединены коротким гибким линкером, а константные домены отсутствуют [7]. В качестве нацеливающего модуля фрагмент 4D5scFv привлекает особое внимание, поскольку способен так же эффективно узнавать HER2 [8–10], но, в отличие от полноразмерных антител, не обуславливает взаимодействий с рецепторами клеток иммунной системы и белками системы комплемента [11].

Для создания направленных конструкций авторами данной работы предложен принцип самосборки через систему белковых адаптеров барстар : барназа (Bs : Bn), которая позволяет комбинировать отдельные модули с разной функциональностью и создавать конструкции с заранее заданным набором свойств [12–15]. Бактериальная рибонуклеаза Bn и ее природный ингибитор Bs образуют высокопрочный комплекс с константой диссоциации $\sim 10^{-14}$ М [16] и высокой индивидуальной стабильностью в широком диапазоне pH и температур [17]. Кроме того, эти белки отличаются биотехнологичностью, и их применение позволяет улучшить свойства направленных конструкций. Например, Bn в составе генетически кодируемых белков слияния в ряде случаев играет

роль внутримолекулярного шаперона, обеспечивая правильное сворачивание составляющих доменов, включающих нацеливающие модули [18].

Антистоксовые нанофосфоры (НАФ) – это неорганические фотолюминесцентные наночастицы, фотолюминесценция которых происходит за счет ап-конверсии – процесса конвертирования нескольких фотонов с более низкой энергией (большей длиной волны) в один фотон с более высокой энергией (меньшей длиной волны). НАФ являются высокоэффективными контрастирующими агентами с уникальными фотолюминесцентными свойствами, они обладают целым рядом преимуществ по сравнению с флуоресцентными белками и органическими красителями, традиционно используемыми для оптической диагностики. К ним относятся исключительная устойчивость к фото- и химической деградации, возбуждение длинами волн (обычно 980 нм), попадающими в «окно прозрачности» биоткани, и продолжительная фотолюминесценция со сдвигом в коротковолновую область, в том числе в видимом и дальнем красном свете [19]. Кроме того, благодаря долгой фотолюминесценции существует возможность отложенной регистрации сигнала, которая позволяет практически полностью исключить автофлуоресценцию ткани и добиться значительного увеличения контрастности изображения на уровне отдельной наночастицы в условиях биологического окружения.

Направленные конструкции на основе НАФ были использованы в ряде работ, посвященных визуализации клеточных и тканевых структур [20], включая раковые клетки с повышенной экспрессией HER2. Описано нацеливание НАФ на HER2 за счет присоединенных к ним полноразмерных антител [21, 22]. В данной работе мы представляем новый подход к созданию направленных конструкций на основе НАФ и одноцепочечных мини-антител 4D5scFv, специфичных к онкомаркеру HER, путем самосборки через систему молекулярных адаптеров Bs : Bn.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез НАФ

Гидрофобные НАФ в форме кристаллов NaYF_4 , легированных ионами Yb^{3+} и Er^{3+} и имеющих на поверхности олеат-анион, были синтезированы по методу [23]. Кристаллы программируемого размера выращивали из раствора натриевых солей и олеиновой кислоты в бескислородной атмосфере. Смесь Y_2O_3 (0.78 ммоль), Yb_2O_3 (0.2 ммоль) и Er_2O_3 (0.02 ммоль) дефлегмировали в 70% трифторуксусной кислоте (20 мл) в течение 6 ч. Затем прозрачный раствор ох-

лаждали до комнатной температуры, растворитель выпаривали. Полученный осадок высушивали в вакууме 0.1 мм рт. ст. в течение 3 ч и тщательно растирали в агатовой ступке до гомогенного состояния. Этот порошок перемешивали с трифторацетатом Na (2 ммоль), олеиновой кислотой (6 мл) и 1-октадецином (6 мл) при 100°C под вакуумом в течение 30 мин.

Дегазированную и обезвоженную смесь постепенно нагревали до 290°C со скоростью 6°C/мин и выдерживали при этой температуре в течение 45 мин в атмосфере аргона. Затем температуру поднимали до 310°C в течение 70 мин. На следующем этапе раствор охлаждали, суспендировали в изопропанол (130 мл) и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин (центрифуга Z206A, Hermle, Германия). Полученные таким образом частицы промывали четырежды в абсолютном этаноле и высушивали. Затем частицы растворяли в хлороформе (10 мл), осаждали изопропанолом (50 мл) и дважды центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Целевой продукт высушивали при комнатной температуре.

Получение и характеристика белков

Рекомбинантный белок **4D5scFv-Vn**, состоящий из Vn и одноцепочечных мини-антител 4D5scFv, соединенных гибким пептидным линкером, получали как описано ранее [7] с небольшими модификациями. Клетки *Escherichia coli* штамма SB536 [F^- , WG1, $\Delta fhuA$ (ton Δ), $\Delta hhoAB$ (SacII), *shh*] трансформировали плазмидой pSD4D5VnHis5 с геном, кодирующим белок 4D5scFv-Vn под контролем *lac*-промотора, и геном Bs, конститутивный синтез которого защищает бактериальные клетки от цитотоксического действия Vn [24]. Трансформанты выращивали в питательном бульоне YTPS (1% дрожжевой экстракт, 1% триптон, 150 мМ NaCl, 40 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ KH_2PO_4 , 2 мМ $MgCl_2$, 0.1 г/л ампициллина, pH 7.5) при 37°C до достижения значения оптической плотности 0.6 при длине волны 560 нм; затем добавляли β -D-1-тиогалактопиранозид (1 мМ) для индукции *lac*-промотора и инкубировали в течение еще 5 ч. Полученную биомассу собирали центрифугированием (центрифуга Allegra 21R, Beckman Coulter, США) и разрушали ультразвуком во льду в лизирующем буфере 5 мМ Трис-HCl, 40 мМ K_2HPO_4 , 500 мМ NaCl, pH 8.2. Полученный экстракт осветляли центрифугированием и фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0.22 мкм и наносили на колонку HiTrap объемом 1 мл с аффинным сорбентом Ni-нитрилотриуксусной кислотой (Ni-NTA) (GE Healthcare Worldwide, США). Для освобождения целевого белка 4D5scFv-Vn от ингибитора Bs колонку промывали 8 М мочевиной с последующим рефолдингом 4D5scFv-Vn линейным градиентом мочевины

8–0 М. Целевой белок элюировали 225 мМ имидазолом, переводили в фосфатный буфер (20 мМ NaCl, 6.5 мМ NaH_2PO_4 , 41 мМ Na_2HPO_4 , pH 6.5) на обессоливающей колонке PD-10 (GE Healthcare Worldwide, США) и подвергали окончательной очистке на катионообменной колонке HiTrap SP-Sepharose Fast Flow объемом 1 мл (GE Healthcare Worldwide, США), элюцию проводили градиентом NaCl, фракции анализировали электрофорезом в 12.5% ПААГ. По данным электрофоретического анализа в 12.5 % ПААГ фракция целевого белка 4D5scFv-Vn элюировалась в 275 мМ NaCl.

Безцистеиновый мутантный вариант барстара **Bs (C40/82A)** получали из клеток *E. coli* штамма HB101 [$F^- \Delta(gpt-proA)62 leu B6 glnV44 ara-14 galK2 lacY1\Delta(mcrC-mrr) rpsL20$ (Str^r) *xyl-5 mtl-1 recA13*], несущего плазмиду pMT641 [7]. Бактериальную культуру выращивали в бульоне YTPS до стационарной фазы, клетки отделяли центрифугированием и суспендировали в холодном буфере для лизиса следующего состава: 0.05 М Трис-HCl, 0.1 М NaCl, 10 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, pH 8.0. Клетки разрушали ультразвуком во льду (30% насыщения $(NH_4)_2SO_4$), затем осаждали нуклеиновые кислоты полиэтиленимином. Из полученного клеточного экстракта осаждали белки, доводя концентрацию сульфата аммония до 70% насыщения. Осадок белков растворяли в буфере 0.1 М Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 10 мМ дитиотреит, pH 8.0 и фракционировали по размеру на колонке с Сефадексом G-100 SuperFine (C16/100), уравновешенной буфером 0.02 М Трис-HCl, 0.02 М NaCl, 2 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит, 0.05% Tween-20, pH 8.0. Окончательную очистку Bs проводили на анионообменной колонке HiTrap Q-Sepharose Fast Flow объемом 1 мл (GE Healthcare Worldwide, США), уравновешенной буфером 0.2 М Трис-HCl, 2 мМ дитиотреит, 10% глицерин, pH 8.0. Целевой белок элюировали градиентом NaCl, фракции анализировали электрофорезом в 17% ПААГ.

Рибонуклеазная активность рекомбинантного белка 4D5scFv-Vn

Рибонуклеазную активность рекомбинантного белка 4D5scFv-Vn определяли методом кислотонерастворимого осадка РНК [25]. 40 мкл раствора анализируемого белка с концентрацией от 30 до 0.015 нМ в буфере 0.125 М Трис-HCl, pH 8.5 смешивали с 160 мкл раствора дрожжевой РНК (2 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. РНКазную реакцию останавливали добавлением 6% $HClO_3$ (200 мкл), смесь выдерживали при +2°C в течение 15 мин. Непрореагировавшую РНК отделяли центрифугированием. По оптическому поглощению (OD_{260}) определяли концентрацию освобожденных нуклеотидов,

которая была прямо пропорциональна РНКазной активности исследуемого белка.

Для оценки связывания пары $B_s : B_n$ различные разведения B_s добавляли к раствору B_n в известной концентрации, РНКазную активность измеряли как описано выше. В последнем случае концентрация B_s была обратно пропорциональна OD_{260} .

Аффинность белка 4D5scFv-HER2/neu к рецептору HER2

Аффинность белка 4D5scFv-HER2/neu к рецептору HER2 оценивали с использованием поликлональных кроличьих античеловеческих антител IgG. На полистироловые 96-луночные планшеты с плоским дном наносили антиген p185HER2^{ECD} (рекомбинантный белок, представляющий собой внеклеточный домен рецептора HER2) в буфере 0.1 M Na_2CO_3 , 0.1 M $NaHCO_3$, pH 9.2 в количестве 8 и 16 нг/лунку. После адсорбции антигена в течение 1 ч планшеты промывали буфером PBS и блокировали ненасыщенные поверхностные участки связывания 5% раствором сухого молока (Tesco, Великобритания) в буфере PBS, pH 7.4. Раствор белка 4D5scFv- B_n в буфере PBS с 0.1% Tween-20 в различных концентрациях, начиная с 5 нМ, вносили в лунки и инкубировали в течение 1 ч на качалке, затем промывали. Для детекции иммобилизованного белка 4D5scFv- B_n планшеты обрабатывали поликлональными кроличьими античеловеческими антителами IgG, а затем козлиными антикроличьими антителами IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена, с промывками между стадиями. Для колориметрического измерения в лунки добавляли 0.04% 1,2-диаминобензена (Sigma-Aldrich, Германия) с 0.06% H_2O_2 в цитратном буфере (7.3 г/л лимонной кислоты, 11.86 г/л $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, pH 5). Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2 M H_2SO_4 и определяли OD_{450} на планшетном спектрофотометре (StatFax-2100, Awareness Technology, США). Константу аффинности K_a рассчитывали, как описано в работе [26], приняв во внимание моновалентность исследуемого мини-антитела, по следующей формуле:

$$K_a = (n - 1)/n[Ab]_t - [Ab]_f, \quad (1)$$

где $[Ab]_t$ и $[Ab]_f$ – суммарные концентрации мини-антитела в лунках со значениями OD_{450} и OD_{450} , обработанных антигеном в концентрации $[Ag]_t$ (8 нг) и $[Ag]_f$ (16 нг) соответственно, $n = [Ag]_t / [Ag]_f$. (2)

Получение биоконъюгатов НАФ

НАФ, синтезированные как описано выше, покрывали амфифильным чередующимся сополимером малеинового ангидрида с 1-октадецином (ПМАО,

Sigma-Aldrich, Германия) как описано в работе [27] с небольшими модификациями. Для создания вокруг частиц НАФ оболочки ПМАО и образования поперечных сшивок добавляли 1,6-диаминогексан (Serva, Германия). Чтобы присоединить биомолекулы к НАФ, поверхностные карбоксильные группы полученной оболочки ПМАО активировали в холодном буферном растворе избытком кросс-линкеров 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимид (sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, Германия) с дополнительной обработкой ультразвуком. Полученные наночастицы затем отмывали от непрореагировавших кросс-линкеров центрифугированием при 4°C, ресуспендировали в холодном растворе белка B_s и выдерживали в течение ночи для присоединения B_s . Несвязавшиеся молекулы B_s отмывали в ходе трех циклов центрифугирования/ресуспендирования. Полученные наночастицы хранили в PBS.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)

НАФ и НАФ-ПМАО растворяли в *n*-гексане и воде соответственно, озвучивали и наносили на медные сетки (300 меш) для ТЭМ, покрытые 0.3% раствором Pioloform® (Wacker Polymer Systems, Burghausen, Германия). Затем сетки высушивали при $t_{комн}$ в течение ночи в эксикаторе и микроскопировали на приборе Philips CM10 ТЕМ (Philips, Нидерланды). Для анализа фракционного состава НАФ использовали программу ImageJ.

ИК-спектроскопия

Свободный ПМАО тщательно растирали в ступке с KBr и прессовали в форме таблеток. НАФ, модифицированные ПМАО, высушивали с помощью концентратора Savant SpeedVac (Франция), затем растирали с KBr и прессовали в форме таблеток. ИК-спектры снимали на спектрофотометре Varian 3100 (США).

Определение спектров эмиссии НАФ-ПМАО

Порошок НАФ-ПМАО помещали в держатель для образцов и освещали лазером с длиной волны 978 нм посредством мультимодального оптического волокна. Сигнал излучения записывали в проходящем свете на калиброванном спектрофотометре (Ocean Optics, США), предварительно пропустив через эмиссионный фильтр с полосой пропускания до 842 нм (Semrock, США).

Мечение клеток

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 и клетки яичника китайского хомячка CHO-K1 (American Type Culture Collection, США)

культивировали в культуральной среде RPMI 1640 (HyClone, США) с добавлением L-глутамина и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США). Клетки рассеивали на 8-луночные предметные стекла в концентрации 3×10^4 клеток/мл и культивировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂), затем клетки инактивировали добавлением 1% формальдегида для предотвращения неспецифической интернализации. Для предотвращения неспецифического связывания частиц покровные стекла обрабатывали в течение 1 ч 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Bio-Rad, США) в буфере PBS. Затем для создания на поверхности клеток участков специфического связывания визуализирующего агента, Bs-НАФ, на стекла наносили раствор рекомбинантного белка 4D5scFv-Vn в буфере PBS с 0.1% BSA и 0.1% Tween-20 и инкубировали в течение 1 ч. Затем клетки промывали буфером PBS и обрабатывали коллоидным раствором Bs-НАФ (100 мкг/мл) в течение 20 мин. Этого времени было достаточно для завершения образования комплексов 4D5scFv-Vn : Bs-НАФ благодаря исключительно высокой константе аффинности пары Bs : Vn $\sim K_d 10^{-14}$ М.

Затем клетки промывали несколько раз от несвязавшегося Bs-НАФ, фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS и закрывали покровным стеклом. Для того чтобы доказать, что связывание НАФ не является результатом неспецифической адсорбции белка 4D5scFv-Vn на стеклах, использовали клетки СНО в качестве отрицательного контроля.

Фотолюминесцентная микроскопия клеток

Фотолюминесцентную микроскопию клеток проводили на инвертированном эпилюминесцентном микроскопе Olympus IX70 (Япония) с возбуждающим 978-нм диодным лазером (LD980-01CW, CXCH-Photonics, Китай). Для получения изображения клеток в видимом свете использовали сухой объектив $\times 50$, NA 0.45 (Olympus, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гидрофобные НАФ в форме кристаллов NaYF₄, легированных ионами Yb³⁺ и Er³⁺ и имеющих на поверхности олеат-анион, были синтезированы методом, описанным ранее [23]. С целью придания гидрофильности частицы в дальнейшем были покрыты молекулами чередующегося сополимера поли(малеинового ангидрида-1-октадецена) (ПМАО), связанными между собой с помощью 1,6-диаминогексана (Serva, Германия). При переводе частиц НАФ-ПМАО из органического растворителя в воду ангидридное кольцо раскрывается, образуя карбоксильные группы, экспонированные в раствор,

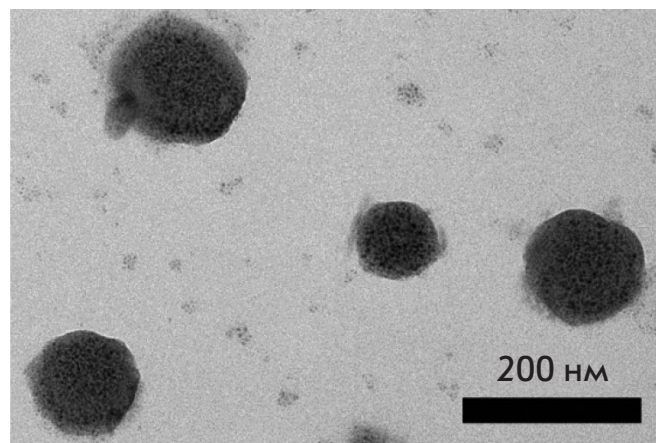
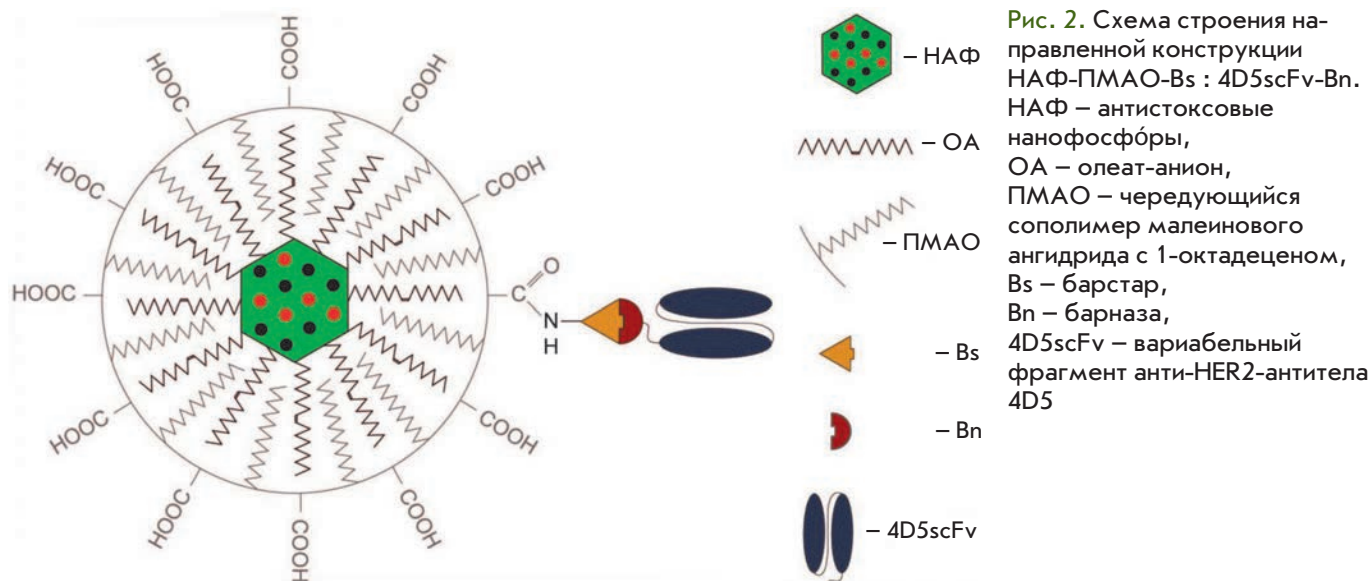


Рис. 1. Изображение НАФ-ПМАО, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа

что обеспечивает растворимость НАФ в воде [27]. Гидродинамический диаметр НАФ-ПМАО, измеренный методом динамического светорассеяния, составил 130 ± 20 нм. На рис. 1 приведено изображение наночастиц, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, с полимицеллярной структурой ПМАО на поверхности НАФ. По результатам измерений калиброванной интегрирующей сферой максимальная эффективность ап-конверсии наночастиц была достигнута при возбуждении лазером с плотностью мощности ~ 60 Вт/см² и составила 1.2%.

Оценка потенциала НАФ в качестве агентов для оптической визуализации клеток-мишеней была проведена *in vitro* с использованием клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих поверхностный онкомаркер HER2. С этой целью была создана направленная двухкомпонентная конструкция, включающая контрастирующий и нацеливающий модули, способные собираться посредством системы молекулярных адаптеров Bs : Vn, как изображено на рис. 2. Контрастирующий модуль был получен путем конъюгации мутантного Bs C40/82A с карбоксильными группами НАФ-ПМАО с использованием сшивающих реагентов 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида и N-гидроксисукцинимид. Полученные конъюгаты сохранили неагрегированное состояние и фотолюминесцентные характеристики. Нацеливающий модуль, способный с высокой эффективностью связываться с внешним доменом рецептора HER2 на поверхности опухолевых клеток, представлял собой рекомбинантный белок слияния 4D5scFv-Vn, описанный в работе [7]. В нем к C-концевой части одноцепочечного мини-антитела 4D5scFv через гибкий



пептидный линкер присоединена Bn, и доказано [7], что оба полипептида сохранили свои функциональные свойства – способность специфически распознавать рецептор HER2 (4D5scFv) и способность к высокоаффинному связыванию с Bs (Bn).

Высококонтрастная визуализация клеток SK-BR-3 с использованием описанной двухкомпонентной конструкции была осуществлена методом двухстадийной доставки. С целью распознавания рецептора HER2 клетки, выращенные на подложке и зафиксированные формальдегидом, были обработаны нацеливающим модулем 4D5scFv-Bn. Затем для визуализации к клеткам был добавлен контрастирующий модуль Bs-НАФ, который, связываясь с Bn, входящей в состав уже иммобилизованного на HER2 модуля 4D5scFv-Bn, обеспечивал оптическую детекцию. После инкубации избыток Bs-НАФ был удален путем тщательной отмывки клеток фосфатным буфером. В качестве отрицательного контроля были использованы клетки яичника китайского хомячка CHO, лишённые HER2. С помощью фотолюминесцентной микроскопии клеток SK-BR-3 и CHO, последовательно обработанных модулями 4D5scFv-Bn и Bs-НАФ, с возбуждением люминесценции на длине волны 978 нм (рис. 3) было показано, что полученная двухкомпонентная конструкция 4D5scFv-Bn : Bs-НАФ избирательно связывается с клетками SK-BR-3, гиперэкспрессирующими рецептор HER2, и не связывается с контрольными клетками CHO, лишёнными HER2. Общий сигнал люминесценции с поверхности опухолевых клеток SK-BR-3 в 10 раз превышал сигнал с поверхности контрольных клеток CHO.

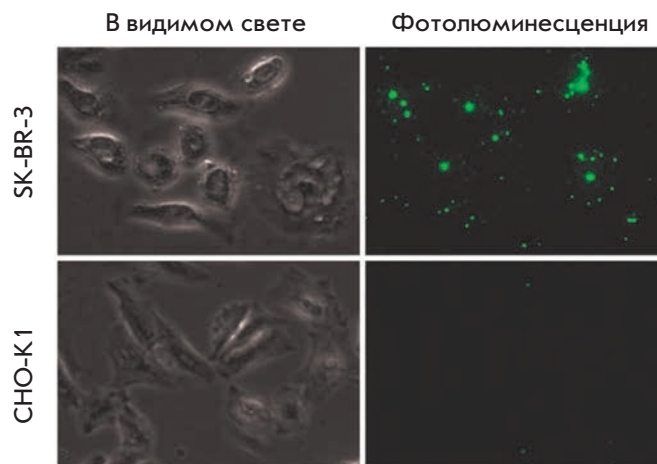


Рис. 3. Фотолюминесцентные изображения клеток SK-BR-3, гиперэкспрессирующими онкомаркер HER2, и клеток CHO (отрицательный контроль) после обработки НАФ-ПМАО-Bs и 4D5scFv-Bn

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные гибридные конструкции, состоящие из молекул нацеливающих биополимеров и неорганических фотолюминесцентных нанокристаллов, способны высокоспецифично визуализировать онкомаркер на опухолевых клетках. Такие наноконструкции могут служить перспективными носителями для направленной доставки самых различных цитотоксических и визуализирующих агентов, что создает принципиально новые возмож-

ности для высокоточной молекулярной диагностики и эффективной терапии опухолевых заболеваний. Важным преимуществом конструкций с использованием НАФ [28] является возможность их регистрации в глубине живой ткани, чем определяется их особенная перспективность для персонализированной оптической диагностики злокачественных новообразований. ●

Работа поддержана РФФ (грант 14-24-00106) – синтез биоконъюгатов с наночастицами и исследование их взаимодействия с раковыми клетками; программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Минобрнауки РФ (№ 14.578.21.0051, 14.Z50.31.0022) – получение и характеристика рекомбинантных белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // Nat. Nanotechnol. 2014. V. 9. P. 716–722. doi: 10.1038/nnano.2014.156.
- Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova F.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // PLOS One. 2011. V. 6. e20991.
- Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // Nanomedicine (London). 2011. V. 6. P. 195–209.
- Поляновский О.Л., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 3. С. 289–311.
- Nahta R., Esteve F.J. // Cancer Lett. 2006. V. 232. P. 123–138.
- Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // Nat. Biotechnol. 2003. V. 21. P. 1486–1492.
- Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., et al. // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. P. 021004.
- Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 9221–9225.
- Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Invest. New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 1. P. 32–50.
- Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.
- Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // PLOS One. 2012. V. 7. e48248.
- Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Gene. 2006. V. 366. P. 97–103.
- Sreenivasan V.K.A., Ivukina E.A., Deng W., Kelf T.A., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Veryugin B.V., Stremovskiy O.A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 65–68.
- Schreiber G., Fersht A.R. // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. № 5. P. 427–431.
- Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // ACS Nano. 2013. V. 7. № 2. P. 950–961.
- Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odincov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I., Deyev S.M. // Protein Engineering Design Selection. 2004. V. 17. P. 85–93.
- Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., et al. // J. Biomed. Opt. 2013. V. 18. P. 76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
- Xiong L., Chen Z., Tian Q., Cao T., Xu C., Li F. // Anal. Chem. 2009. V. 81. № 21. P. 8687–8694.
- Dou Q., Idris N.M., Zhang Y. // Biomaterials. 2013. V. 34. № 6. P. 1722–1731.
- Yi G., Peng Y., Gao Z. // Chem. Mater. 2011. V. 23. P. 2729–2734.
- Mai H., Zhang Y., Sun L., Yan C. // J. Phys. Chem. C. 2007. V. 111. P. 13721–13729.
- Yazynin S.A., Deyev S.M., Jucovic M., Hartley R.W. // Gene. 1996. V. 169. № 2. P. 131–132.
- Rushizky G.W., Greco A.E., Hartley R.W., Jr., Sober H.A. // Biochemistry. 1963. V. 2. № 4. P. 787–793.
- Zhan Q., Qian J., Liang H., Somesfalean G., Wang D., He S., Zhang Z., Andersson-Engels S. // ACS Nano. 2011. V. 5. № 5. P. 3744–3757.
- Pellegrino T., Manna L., Kudera S., Liedl T., Koktysh D., Rogach A.L., Keller S., Rädler J., Natile G., Parak W.J. // Nano Lett. 2004. V. 4. P. 703–707.
- Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 10. P. 5161–5214.