

УДК 57.083

# Таргетинг внеклеточных везикул к дендритным клеткам и макрофагам

Л. А. Овчинникова<sup>1</sup>, И. Н. Филимонова<sup>1</sup>, М. Ю. Захарова<sup>1,2</sup>, Д. С. Балабашин<sup>1</sup>, Т. К. Алиев<sup>1,3</sup>, Я. А. Ломакин<sup>1\*</sup>, А. Г. Габибов<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 119049 Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: yasha.l@bk.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021

Принята к печати 12.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11478

**РЕФЕРАТ** Направленная доставка белковых терапевтических препаратов в клетки и ткани-мишени является фундаментальной задачей современной медицины. Повышение специфичности этого процесса повысит эффективность разрабатываемых лекарств. Один из перспективных инструментов доставки терапевтических белковых агентов – внеклеточные везикулы (ВВ), представляющие собой двухслойные липидные частицы. ВВ секретируются почти всеми типами клеток и обладают важными преимуществами: биосовместимостью, стабильностью и возможностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Сверхэкспрессия белка G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), как показано ранее, способствует образованию ВВ клеткой-продуцентом. Нами разработана система адресной доставки содержимого ВВ в антигенпрезентирующие клетки – макрофаги и дендритные клетки. Показано, что добавление рекомбинантного антитела ламы  $\alpha$ -CD206 к N-концу укороченной формы VSV-G повышает селективность доставки белковых препаратов ВВ преимущественно к макрофагам и дендритным клеткам. Полученные результаты подчеркивают выдающийся технологический и биомедицинский потенциал систем доставки с использованием ВВ для коррекции иммунного ответа у пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** внеклеточные везикулы, наноконтейнеры, антигенпрезентирующие клетки, направленная доставка, наноантитело, CD206, VSV-G.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АПК – антигенпрезентирующие клетки; ВВ – внеклеточные везикулы; ДК – дендритные клетки; МФ – макрофаги; МНК – мононуклеарные клетки; ОБМ – основной белок миелина; РС – рассеянный склероз; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL – интерлейкин; VSV-G – гликопротеид G везикулярного вируса стоматита (vesicular stomatitis virus G).

## ВВЕДЕНИЕ

Стремительное развитие современной биомедицины предполагает создание терапевтических препаратов, обладающих высокой селективностью и низкой токсичностью. Появление таких препаратов требует не только разработки высокоактивных терапевтических компонентов, но и обеспечение их эффективной доставки к определенным органам, тканям и клеткам-мишеням [1, 2]. Существенный прогресс в области адресной доставки препаратов достигнут с помощью антитело-направленной терапии, дарпинов и использования наночастиц [3–6]. Использование внеклеточных везикул (ВВ) в качестве носителей белковых молекул имеет ряд таких преимуществ, как (1) природная биосовместимость клеточной мем-

браны и мембран ВВ, (2) способность ВВ проникать через гематоэнцефалический барьер, (3) возможность изменения белкового состава мембраны ВВ [7]. Модификация белкового профиля мембран ВВ позволяет осуществлять адресную доставку терапевтического содержимого ВВ внутрь желаемых клеточных мишеней [8, 9].

Предшественниками ВВ в области направленной доставки терапевтических препаратов и первыми наиболее подробно изученными носителями являются липосомы. Многие препараты, относящиеся к данной категории, успешно прошли клинические испытания и введены в клиническую практику [10–12]. Один из перспективных препаратов для лечения рассеянного склероза (РС) на основе липосом – Ксемус

[13–15], состоящий из маннозилированных липосом, нагруженных иммунодоминантными пептидами основного белка миелина (ОБМ). Терапевтические пептиды доставляются направленно в антигенпрезентирующие клетки (АПК) – дендритные клетки (ДК) и макрофаги (МФ) – за счет остатков маннозы на поверхности липосом. Предполагаемый механизм действия заключается в гиперпрезентации доставляемых фрагментов ОБМ в составе главного комплекса гистосовместимости класса II на поверхности АПК, что и вызывает иммуносупрессию и подавление аутоиммунного воспаления. Ксемус успешно прошел доклинические испытания и II стадию клинических испытаний. Предполагается проведение фазы III клинических испытаний для получения разрешения на применение на территории Российской Федерации. Однако при РС необходимо регулярное пожизненное поступление таких липосом в организм, что сопряжено с определенными экономическими трудностями и неудобством для пациентов. Более удобными носителями фрагментов ОБМ для длительной терапии пациентов с РС могут оказаться ВВ. Опираясь на существующие методы получения ВВ [16], можно создать генетически кодируемый препарат ВВ, нагруженных пептидами ОБМ. Использование аутологичных клеток человека в качестве клеток-продуцентов позволит совершить переход к персонализированной медицине и избежать необходимости в постоянных инъекциях, снижающих качество жизни [17].

В представленной работе описана система адресной доставки содержимого ВВ к АПК. По аналогии с препаратом Ксемус выбран поверхностный маркер ДК и МФ – CD206 (маннозный рецептор) [18]. Данный рецептор связывает гликоконъюгаты, оканчивающиеся остатками маннозы, фукозы или N-ацетил-D-глюкозамина, присутствующие в больших количествах на поверхности патогенных микроорганизмов [19]. Конформационные изменения, возникающие в рецепторе при взаимодействии с остатком маннозы, приводят к интернализации связанного патогена и его транспорту в лизосомы [20], что объясняет

ся высоким уровнем экспрессии данного рецептора на ДК и МФ – классических АПК иммунной системы человека. Нами разработана система наработки ВВ, несущих на своей поверхности наноантитело ламы, специфичное к CD206 человека и мыши. Эти везикулы имеют размер порядка 100–140 нм и несут экзосомальные маркеры [7]. Мы показали возможность доставки целевого белка в клетки-мишени при использовании таргетированных везикул, а также доставки целевого белка в ДК и МФ человека. Полученные данные позволяют использовать стратегию нацеливания генетически кодируемых везикул в АПК для разработки препаратов, направленных на коррекцию иммунного ответа у пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Плазмиды

Для получения конструкции pCMV-NanoLuc-Jun (Addgene ID: 167308) ген, кодирующий люциферазу NanoLuc, амплифицировали с праймеров For\_NanoLuc и Rev\_NanoLuc (таблица) и лигировали в вектор pCMV-Jun по сайтам рестрикции HindIII/KpnI. Последовательность, кодирующая укороченный VSV-G (pCMV-VSV-G\_truncated) (аминокислотная последовательность: EHPHIQDAASQLPDD-ESLFFGDTGLSKNPIELVEGWSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCLKLNHTKKRQIYTDIEMNRLGK), амплифицирована с полноразмерного VSV-G (AddgeneID: 138479) с праймеров For\_VSVG\_trunc и Rev\_VSVG\_trunc (таблица) и клонирована в вектор pCMV по сайтам BstBI/ClaI.

Ген, кодирующий наноантитело ламы  $\alpha$ -CD206 (клон 3.49) [21], синтезирован и клонирован на 5'-конец укороченного VSV-G в конструкцию pCMV-VSV-G\_truncated для эукариотической экспрессии и в вектор pET22 для прокариотической экспрессии. Для наработки рекомбинантного антитела ламы  $\alpha$ -CD206 в прокариотической системе экспрессии на C-конец белка был добавлен гистидиновый эпитоп

### Праймеры, использованные для создания конструкций

Праймер	Нуклеотидная последовательность
For_CD206	5'-TGGGGTGAATTGCTTCGGAAGTCAGGTTCAACTGCAGGAGTC-3'
Rev_CD206	5'-GAATGTGAGGATGTTTCAAGCTGCCTCCTCCTGAGC-3'
For_NanoLuc	5'-TCTGGTACCATGGTCTTCACACTCGAA-3'
Rev_NanoLuc	5'-GGGTGGTGGTGGTGGCAAGCTT-3'
For_VSVG_trunc	5'-GGGGTGAATTGCTTCGAACATCCTCACATTCAAG-3'
Rev_VSVG_trunc	5'-AGAGATGAACCGACTTGGAAAGGGCTCC-3'

для аффинной очистки и 3×FLAG-эпитоп для детекции вторичными антителами.

#### Клеточные линии

Клетки линии HEK293T культивировали в полной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США); клеточные линии Jurkat и DC2.4 культивировали в полной среде RPMI с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco).

Для получения популяций стимулированных ДК и МФ из периферической крови человека центрифугированием в градиенте фиколла выделяли мононуклеарные клетки (МНК). Полученные клетки инкубировали в полной среде RPMI с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота до тех пор, пока предшественники ДК и МФ не прикрепятся к пластику. После этого неприкрепившиеся клетки удаляли, к прикрепившимся добавляли IL-4 (50 нг/мл) и GM-CSF (100 нг/мл). Дифференцировку МНК в дендритные клетки проводили в течение 6 дней со сменой среды, содержащей свежую порцию цитокинов, каждые 2 дня.

Все клеточные линии культивировали при температуре 37°C и 8% CO<sub>2</sub>.

#### Продукция антитела ламы α-CD206-FLAG в прокариотической системе экспрессии

Рекомбинантное антитело ламы α-CD206 нарабатывали в прокариотической системе экспрессии – в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Ночную культуру клеток инокулировали в среду 2xYT в соотношении 1 : 100 и растили до OD<sub>600</sub> = 0.6. Экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогактопиранозидом. Культуру инкубировали при высокой аэрации (16 ч, 28°C). Затем центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl; 1 мМ PMSF) и добавляли лизоцим до конечной концентрации 0.2 мг/мл. Инкубировали при комнатной температуре до тех пор, пока раствор не станет вязким. Для дезинтеграции клеточной массы использовали ультразвук. Полученный раствор центрифугировали при 20000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость фильтровали через 0.45-мкм фильтр, затем наносили на колонку Ni-NTA (Qiagen). Для очистки от примесных белков через колонку пропускали буфер нанесения (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl), затем промывочный буфер с имидазолом (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl; 20 мМ имидазол). Элюировали буферным раствором (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl; 350 мМ имидазол).

#### Окрашивание ДК и МФ рекомбинантным антителом ламы α-CD206

Возможность использования рекомбинантного антитела ламы α-CD206 для адресной доставки белковых препаратов к АПК верифицировали на ДК и МФ из периферической крови человека. Для этого брали 500000 клеток, отмывали 2 раза в буфере PBS и ресуспендировали в 100 мкл раствора, содержащего 15–300 мкг/мл рекомбинантных антител ламы α-CD206-FLAG. Инкубировали в течение 1 ч при 4°C и постоянном деликатном перемешивании. После инкубации клетки отмывали 2 раза PBS и окрашивали вторичными антителами к эпитопу FLAG, конъюгированными с флуоресцентной меткой PE по протоколу производителя (BioLegend, США). Для контрольного окрашивания использовали антитело к маркеру CD206 человека, конъюгированное с флуоресцентной меткой PE (или α-human α-CD206-PE) (BioLegend). В качестве отрицательного контроля окрашивали клетки линии HEK293T и нестимулированные МНК.

#### Наработка и очистка внеклеточных везикул

ВВ нарабатывали в клетках линии HEK293T. С этой целью клетки при достижении 90% монослоя трансфицировали одновременно тремя конструкциями: pCMV-VSV-G (или pCMV-VSV-G\_truncated или pCMV-α-CD206\_VSV-G\_truncated), pCMV-EPN, pCMV-NanoLuc. Среду от клеток, содержащую ВВ, собирали через 48 ч и подвергали дифференциальному центрифугированию (300 g 10 мин; 1000 g 20 мин). Далее супернатант фильтровали через мембрану 0.4 мкм и концентрировали с использованием Amicon Ultra-0.5 100 кДа (Millipore, Ирландия). Для избавления от различных примесей концентрат несколько раз промывали буфером PBS. Концентрацию ВВ определяли с использованием набора SBQSA Protein Quantitation Kit (Invitrogen, США).

#### Инкубация внеклеточных везикул с клетками

ВВ, несущие репортерный белок люциферазу, выравнивали в соответствии с концентрацией белка в препарате, добавляли к 300000 клеток (Jurkat и DC2.4) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C и 8% CO<sub>2</sub>. В качестве контроля использовали свободную люциферазу NanoLuc-Jun, не загруженную в ВВ. После инкубации клетки промывали PBS при 300 g в течение 10 мин, затем инкубировали в буфере с протеиназой K (Invitrogen) в конечной концентрации 0.1 мг/мл при температуре 37°C в течение 15 мин. После инкубации клетки дважды отмывали в PBS. Содержание люциферазы в клетках анализировали с использованием набора NanoGlo Luciferase Assay System (Promega, США). На тест брали 30000 клеток и ресуспендировали их в 15 мкл PBS, затем к ним добавляли 15 мкл

лизирующего буфера, содержащего субстрат люциферазы. Сигнал детектировали на пласечном ридере VarioScan (Thermo Scientific, США) при 460 нм.

### Адресная доставка NanoLuc в ДК и МФ при помощи таргетированных ВВ

К гетерогенной популяции стимулированных ДК и МФ из периферической крови человека добавляли таргетированные ВВ (несущие на своей поверхности укороченный вариант VSV-G, слитый с антителом  $\alpha$ -CD206) в концентрации 5–20 мкг/мл. Инкубировали в течение 2 ч при 37°C и 8% CO<sub>2</sub>. Затем клетки аккуратно промывали по методике, описанной выше, ресуспендировали в полной среде ДМЕМ и инкубировали еще 16 ч в среде без везикул. Через 16 ч клетки окрашивали антителами к  $\alpha$ -CD206-PE человека (BioLegend). Проводили клеточный сортирование на приборе Sony SH800 (Германия). Выделяли две субпопуляции клеток – CD206<sup>+</sup> и CD206<sup>-</sup>. Из каждой субпопуляции брали по 30000 клеток на люциферазный тест.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Получение рекомбинантного антитела, специфичного к поверхностному маркеру дендритных клеток и макрофагов

Для таргетной доставки содержимого генетически кодируемых везикул внутрь АПК мы выбрали поверхностный маркер ДК и МФ (M2) – CD206 (макрофагальный маннозный рецептор) [18]. Нами подобрано кросс-реактивное наноантитело ламы Nb3.49 [21], взаимодействующее с маннозным рецептором человека и мыши. Эта кросс-реактивность чрезвычайно полезна при проведении доклинических испытаний таргетированных внеклеточных везикул на животной модели с возможностью дальнейшего использования этого антитела и при проведении клинических испытаний. Для проверки функциональности и специфичности данного антитела было создано рекомбинантное наноантитело  $\alpha$ -CD206-FLAG в прокариотической системе экспрессии на основе вектора pET22. Для детекции и аффинной очистки использовали гистидиновый эпитоп, для дополнительного увеличения чувствительности детекции на N-конец белка добавляли 3×FLAG-эпитоп.

Специфичность полученного наноантитела верифицирована на субпопуляции ДК человека. Для этого мононуклеарные клетки (МНК) из периферической крови человека культивировали в полной питательной среде в присутствии IL-4 и GM-CSF в течение недели с частичной заменой среды каждые 2 дня. При таких условиях в культуре лимфоцитов человека стимулируется дифференцировка ДК и МФ [22]. К полученной культуре ДК добавляли пре-

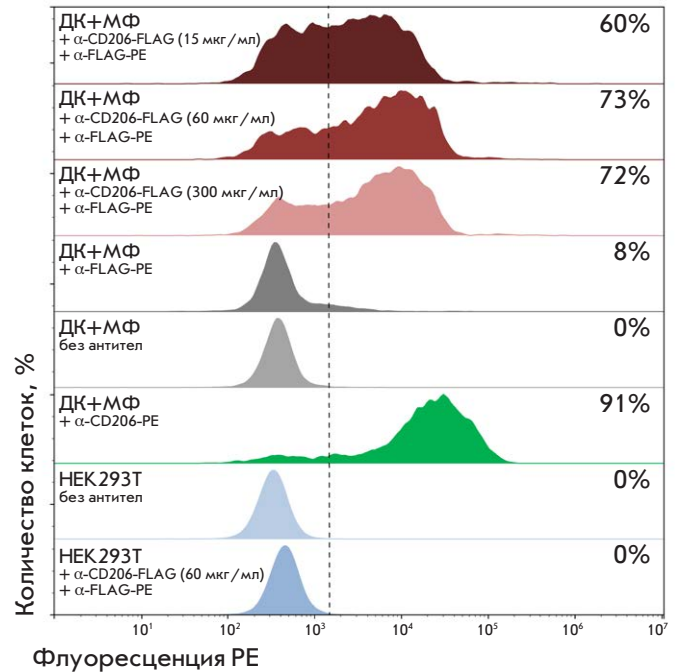


Рис. 1. Цитофлуорометрический анализ окрашивания ДК и МФ периферической крови человека при помощи рекомбинантных антител к поверхностному маркеру CD206. Дифференцировку ДК и МФ из МНК периферической крови человека стимулировали IL-4 и GM-CSF в течение 7 дней. На гистограммах отображен сигнал связывания клеток с рекомбинантным наноантителом  $\alpha$ -CD206-FLAG в различных концентрациях с последующей визуализацией сигнала флуоресцентными антителами  $\alpha$ -FLAG-PE (бордовый, красный, розовый) или с коммерчески доступным антителом  $\alpha$ -CD206-PE (зеленый). Неокрашенные клетки и окрашенные только вторичными антителами ( $\alpha$ -FLAG-PE) обозначены серым цветом. На нижней панели изображено контрольное связывание клеточной линии HEK293T с рекомбинантным наноантителом  $\alpha$ -CD206-FLAG (голубой). На оси X отложен сигнал флуоресценции, на оси Y – количество зарегистрированных событий. На каждой гистограмме показано количество клеток (%), связавшихся с анализируемыми антителами

парат очищенного рекомбинантного наноантитела  $\alpha$ -CD206-FLAG, после стадий инкубаций и отмывок добавляли вторичные антитела к FLAG-эпитопу, конъюгированные с флуоресцентной меткой PE (рис. 1). Окрашивание стимулированных МНК человека с использованием рекомбинантного наноантитела  $\alpha$ -CD206-FLAG позволило четко детектировать субпопуляцию ДК, сопоставимую с субпопуляцией, выделяемой при окрашивании коммерчески доступным флуоресцентным антителом  $\alpha$ -CD206-PE. Таким образом, мы подтвердили функциональность и специфичность  $\alpha$ -CD206-FLAG в формате на-

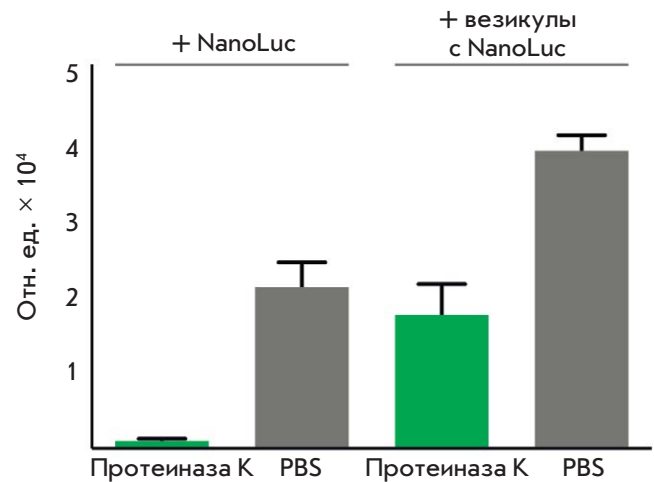
ноантитела ламы, что позволяет использовать его для дальнейшей адресной доставки белковых препаратов при помощи ВВ к АПК.

### Доставка содержимого внеклеточных везикул внутрь клеток

Оценка эффективности проникновения терапевтического препарата в клетки-мишени – необходимый этап в разработке носителей белковых препаратов. Наиболее удобно такую оценку можно проводить при использовании флуоресцентных белков или люциферазы в качестве доставляемого препарата. Существенный недостаток флуоресцентных белков – большая молекулярная масса и необходимость использования высокочувствительных методов детекции. В связи с этим, в качестве доставляемого препарата мы использовали люциферазу NanoLuc, обладающую хорошими спектральными характеристиками и небольшим размером (19 кДа).

Поверхность клеток-мишеней покрыта большим количеством мембранных белков, способных опосредовать неспецифичное взаимодействие растворимых белков с клетками-мишенями *in vitro*, искажая таким образом визуализацию реального распределения доставляемых ВВ между клетками. В своей работе мы минимизируем уровень неспецифического сигнала, опосредованного залипанием растворимой (не заключенной в везикулы) люциферазы, добавляя стадию инкубации клеток с протеиназой К. Внеклеточные везикулы, нагруженные люциферазой, и свободную люциферазу добавляли к клеткам-мишеням. После инкубации в течение 2 ч клетки отмывали от везикул и свободной люциферазы либо только фосфатно-солевым буфером, либо с дальнейшей инкубацией с протеиназой К. Как видно из рис. 2, инкубация клеток с протеиназой К позволяет снизить уровень неспецифического сигнала по сравнению с клетками, которые инкубировали в буфере без добавления протеиназы К. При этом сигнал, полученный от клеток, инкубированных с ВВ, более чем на порядок выше сигнала, полученного от клеток, инкубированных со свободной люциферазой. Использование протеиназы К на стадиях отмывки подтверждает, что доставляемая люцифераза проникает внутрь клеток, а не залипает на мембране. Таким образом, нам удалось обеспечить доставку люциферазы внутрь клеток с использованием внеклеточных везикул и оптимизировать условия детекции данного сигнала.

Основной компонент, определяющий способность внеклеточных везикул проникать внутрь клетки-мишени – вирусный гликопротеид VSV-G, который связывается с рецепторами липопротеинов низкой плотности, присутствующими в большом количе-



**Рис. 2.** Инкубация клеток-мишеней с внеклеточными везикулами, загруженными NanoLuc-люциферазой. Подобраны условия детекции сигнала доставляемых внутрь клеток ВВ, загруженных люциферазой. Неспецифичный сигнал от свободной люциферазы NanoLuc, залипающей на клетках, детектируется при использовании отмывок только с буфером PBS (серые столбцы), добавление стадии инкубации с протеиназой К (зеленые столбцы) позволяет в дальнейшем детектировать сигнал только от люциферазы, доставленной внутрь клеток. Для детекции NanoLuc, доставленного к клеткам, использовали люциферазный тест

стве на поверхности клеток млекопитающих [23]. Таким образом, используя полноразмерный VSV-G для доставки содержимого везикул внутрь клеток-мишеней, невозможно достичь высокой специфичности адресной доставки. В своей работе мы добились увеличения специфичности адресной доставки при использовании укороченного варианта VSV-G. В данном варианте VSV-G присутствует только стержневая часть белка [24], отвечающая за отпочковывание внеклеточных везикул от клетки-продуцента и освобождение содержимого везикулы внутри клетки-мишени. При этом становится возможным использование укороченной последовательности VSV-G, объединенной с рекомбинантным наноантителом, способным к высокоспецифическому взаимодействию с клеткой-мишенью, без потери функциональности получаемых внеклеточных везикул. Для проверки эффективности доставки препарата внутрь клеток мы использовали ВВ, загруженные люциферазой NanoLuc, несущие на своей поверхности различные варианты VSV-G: (1) полноразмерный VSV-G, (2) укороченный VSV-G, (3) укороченный VSV-G с экспонированным на поверхности наноантителом, специфически узнающим маркер дендритных клеток и макрофагов – CD206 (рис. 3).

Для проверки функционирования везикул, несущих различные варианты гликопротеида VSV-G, использовали линию дендритных клеток мыши DC2.4 и линию Jurkat (иммортализованные Т-клетки человека). Клетки инкубировали с различными вариантами везикул либо с раствором свободной люци-

феразы и отмывали в присутствии протеиназы К. Относительные значения интенсивности люминесценции, полученные с использованием люциферазного теста, приведены на рис. 4. В данном эксперименте значения, полученные при инкубации клеток с препаратом везикул, несущих полноразмерный VSV-G, приняты за 100%, так как именно в этом случае наблюдается максимальное взаимодействие везикул и клеток-мишеней. Использование укороченной формы VSV-G в 5–10 раз снижает эффективность доставки люциферазы в клетки-мишени. Это связано с тем, что нарушается функция распознавания рецептором липопротеинов низкой плотности. Подстановка наноантитела  $\alpha$ -CD206 к укороченному VSV-G позволила добиться существенного увеличения целевой доставки белка в клетки-мишени. При этом при использовании антитела  $\alpha$ -CD206 наблюдается более эффективная доставка белка к дендритным клеткам DC2.4, чем к клеткам Jurkat.

В дальнейшем внеклеточные везикулы планируется использовать для направленной доставки терапевтических препаратов в организме человека. Однако использование линейных клеточных линий не позволяет достоверно воспроизводить реальное распределение АПК и уровень экспрессии маркеров на клеточной поверхности. Для доказательства функциональности разработанных таргетированных внеклеточных везикул с укороченным VSV-G в условиях гетерогенной популяции клеток мы использовали МНК периферической крови человека, в которых стимулировали дифференцировку ДК

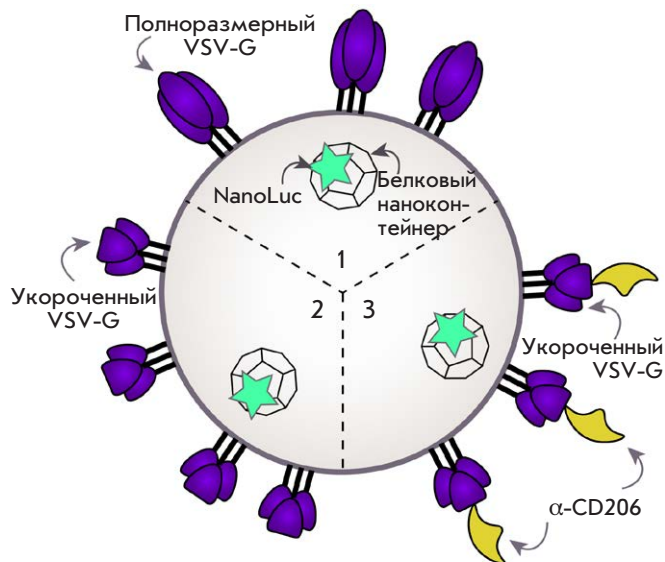


Рис. 3. Схематическое изображение генетически кодируемой везикулы с различными вариантами VSV-G на поверхности. 1 – полноразмерный VSV-G, 2 – укороченный VSV-G, 3 – укороченный VSV-G с экспонированным наноантителом  $\alpha$ -CD206

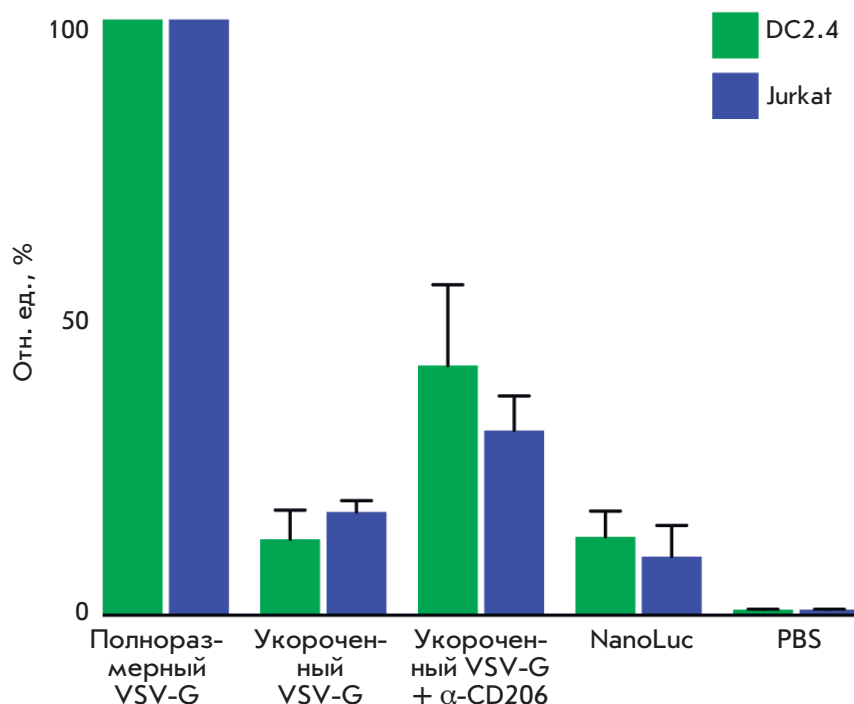


Рис. 4. Сравнение эффективности доставки целевого белка внутрь клеток-мишеней при использовании внеклеточных везикул, нагруженных люциферазой NanoLuc и несущих на своей поверхности различные варианты вирусного гликопротеида VSV-G. Анализ проводили на клеточных линиях DC2.4 (зеленые столбцы) и Jurkat (синие столбцы). Эффективность доставки при использовании внеклеточных везикул с полноразмерным VSV-G принята за 100% для каждой клеточной линии. В качестве контроля использовали свободную люциферазу NanoLuc, не нагруженную внутрь везикул (образец «NanoLuc»)

и МФ. Препарат таргетированных внеклеточных везикул, загруженных люциферазой, инкубировали с данной гетерогенной популяцией клеток, содержащей клетки CD206<sup>+</sup> и CD206<sup>-</sup>. Далее анализируемые клетки отмывали, окрашивали флуоресцентным антителом α-CD206-PE и разделяли на две субпопуляции – CD206<sup>+</sup> и CD206<sup>-</sup> с использованием проточной цитофлуорометрии. Содержание люциферазы, доставленной внутрь клеток-мишеней, определяли отдельно в субпопуляциях клеток CD206<sup>+</sup> и CD206<sup>-</sup>. Нам удалось достигнуть высокой специфичности доставки люциферазы преимущественно в клетки CD206<sup>+</sup> (рис. 5).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент одним из основных приоритетов разработок лекарственных препаратов является увеличение селективности доставки. В этом исследовании нами предложен усовершенствованный метод таргетной доставки терапевтических белковых препаратов, заключенных внутрь ВВ. Высокая биосовместимость и биоразлагаемость ВВ дает им огромное преимущество перед искусственными наночастицами. Добавление рекомбинантного антитела ламы α-CD206 к N-концу укороченной формы VSV-G позволяет повысить селективность доставки ВВ преимущественно к CD206<sup>+</sup> клеткам без значимого снижения уровня продукции данных ВВ. Функциональность разработанных конструкций подтверждена на линейных дендритных клетках DC2.4 мыши и на гетерогенных субпопуляциях стимулированных ДК и МФ периферической крови человека. Полученные данные указывают на возможность использования стратегии нацеливания генетически кодируемых внеклеточных везикул в АПК для создания препаратов, направленных на коррекцию иммунного ответа у пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями. Препараты на основе везикул способны доставлять в клетки не только целевые белковые молекулы, но и липиды, нуклеиновые кислоты, транскрипционные факторы [1]. В перспективе подобные таргетные препараты на основе ВВ можно использовать и для нужд генотерапии. В настоящее время разработке и созданию систем доставки на основе ВВ посвящено множество исследований. Такие препараты специфично загружают белками [25], пептидами [26], РНК [27, 28]. При этом остро стоит вопрос переноса

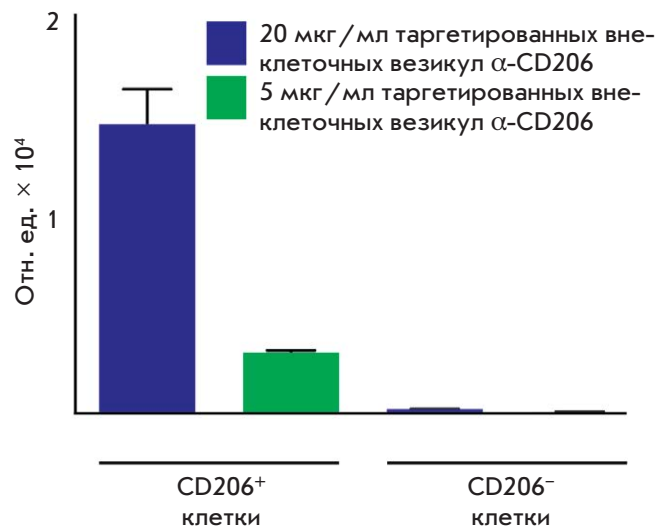


Рис. 5. Направленная доставка целевого белка внутрь клеток-мишеней при помощи таргетированных внеклеточных везикул. Таргетированные α-CD206 внеклеточные везикулы, загруженные NanoLuc, инкубировали с мононуклеарными клетками периферической крови человека после стимуляции дифференцировки ДК и МФ. После цитофлуорометрического сортировки субпопуляций CD206<sup>+</sup> и CD206<sup>-</sup> показано, что весь препарат NanoLuc был доставлен к клеткам CD206<sup>+</sup>. В люциферазном тесте использовали одинаковое количество клеток CD206<sup>+</sup> и CD206<sup>-</sup>.

не целевых, балластных молекул различных классов в составе продуцируемых ВВ. Попадание нежелательных компонентов внутрь клетки-мишени может серьезно повлиять на биосовместимость препарата и привести к непредсказуемым побочным эффектам. Одним из путей решения данной проблемы является использование аутологичных клеток для наработки везикул [29]. Безопасность применения таких препаратов ВВ подтверждена клиническими испытаниями [30–32]. Однако при создании потенциальных лекарственных средств следует тщательно оценивать долгосрочный эффект от попадания естественного содержимого ВВ в клетки. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-74-10079 «Самособирающиеся генетически кодируемые наноконтейнеры как инструмент лечения рассеянного склероза».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolov A.V., Kostin N.N., Ovchinnikova L.A., Lomakin Y.A., Kudriaeva A.A. // Acta Naturae. 2019. V. 11. P. 28–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-2-28-41>.
2. Stepanov A.V., Belogurov A.A., 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. P. e20991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020991>.
3. Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Nikitin M.P.,

- Deyev S.M. // *J. Control Release*. 2021. V. 330. P. 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.004>.
4. Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. P. 42–53. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-42-53>.
  5. Belogurov A., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *BioEssays*. 2009. V. 31. P. 1161–1171. <https://doi.org/10.1002/bies.200900020>.
  6. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. P. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.020>.
  7. Ovchinnikova L.A., Terekhov S.S., Ziganshin R.H., Bagrov D.V., Filimonova I.N., Zalevsky A.O., Lomakin Y.L. // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. P. 768. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060768>.
  8. Buschmann D., Mussack V., Byrd J.B. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. V. 174. P. 348–368. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.027>.
  9. Ukrainskaya V.M., Rubtsov Y.P., Knorre V.D., Maschan M.A., Gabibov A.G., Stepanov A.V. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. P. 33–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-33-41>.
  10. Beltrán-Gracia E., López-Camacho A., Higuera-Ciapara I., Velázquez-Fernández J.B., Vallejo-Cardona A.A. // *Cancer Nanotechnol.* 2019. V. 10. P. 11. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y>.
  11. Lamichhane N., Udayakumar T.S., D'Souza W.D., Simone C.B., Raghavan S.R., Polf J., Mahmood J. // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 288. <https://doi.org/10.3390/molecules23020288>.
  12. Bulbake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. // *Pharmaceutics*. 2017. V. 9. P. 9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
  13. Belogurov A.A., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. P. 222–231. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213975>.
  14. Belogurov A., Zakharov K., Lomakin Y., Surkov K., Avtushenko S., Kruglyakov P., Smirnov I., Makshakov G., Lockshin C., Gregoriadis G., et al. // *Neurotherapeutics*. 2016. V. 13. P. 895–904. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0448-0>.
  15. Ivanova V.V., Khaiboullina S.F., Gomzikova M.O., Martynova E.V., Ferreira A.M., Garanina E.E., Sakhapov D.I., Lomakin Y.A., Khaibullin T.I., Granatov E.V., et al. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1335. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01335>.
  16. Votteler J., Ogohara C., Yi S., Hsia Y., Nattermann U., Belnap D.M., King N.P., Sundquist W.I. // *Nature*. 2016. V. 540. P. 292–309. <https://doi.org/10.1038/nature20607>.
  17. Menzin J., Caon C., Nichols C., White L.A., Friedman M., Pill M.W. // *J. Manag. Care Pharm.* 2013. V. 19. P. 24–40. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2013.19.s1.s24>.
  18. Wollenberg A., Mommaas M., Oppel T., Schottdorf E.M., Günther S., Moderer M. // *J. Invest. Dermatol.* 2002. V. 118. P. 327–334. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x>.
  19. Fiani M.L., Barreca V., Sargiacomo M., Ferrantelli F., Manfredi F., Federico M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 6318. <https://doi.org/10.3390/ijms21176318>.
  20. Szolnokoy G., Bata-Csörgö Z., Kenderessy A.S., Kiss M., Pivarsci A., Novák Z., Newman K.N., Michel G., Ruzicka T., Maródi L., et al. // *J. Invest. Dermatol.* 2001. V. 117. P. 205–213. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.14071.x>.
  21. Blyckers A., Schoonooghe S., Xavier C., D'Hoe K., Laoui D., D'Huyvetter M., Vaneycken I., Cleeren F., Bormans G., Heemskerck J., et al. // *J. Nucl. Med.* 2015. V. 56. P. 1265–1271. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.156828>.
  22. Ahn J.S., Agrawal B. // *Int. Immunol.* 2005. V. 17. P. 1337–1346. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh312>.
  23. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Barak S., Rubinstein M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>.
  24. Kolangath S.M., Basagoudanavar S.H., Hosamani M., Saravanan P., Tamil Selvan R.P. // *VirusDisease*. 2014. V. 25. P. 441–446. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0229-5>.
  25. Yim N., Ryu S.-W., Choi K., Lee K.R., Lee S., Choi H., Kim J., Shaker M., Sun W., Park J., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12277. <https://doi.org/10.1038/ncomms12277>.
  26. Nakase I., Noguchi K., Aoki A., Takatani-Nakase T., Fujii I., Futaki S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 1991. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02014-6>.
  27. Lamichhane T.N., Jeyaram A., Patel D.B., Parajuli B., Livingston N.K., Arumugasaamy N., Schardt J.S., Jay S.M. // *Cell Mol. Bioeng.* 2016. V. 9. P. 315–324. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0457-4>.
  28. O'Loughlin A.J., Mäger I., de Jong O.G., Varela M.A., Schiffelers R.M., El Andaloussi S., Wood M.J.A., Vader P. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. P. 1580–1587. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.021>.
  29. Somiya M. // *J. Cell Commun. Signal.* 2020. V. 14. P. 135–146. <https://doi.org/10.1007/S12079-020-00552-9>.
  30. Dai S., Wei D., Wu Z., Zhou X., Wei X., Huang H., Li G. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. P. 782–790. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.1>.
  31. Morse M.A., Garst J., Osada T., Khan S., Hobeika A., Clay T.M., Valente N., Shreeniwas R., Sutton M.A., Delcayre A., et al. // *J. Transl. Med.* 2005. V. 3. P. 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-9>.
  32. Escudier B., Dorval T., Chaput N., André F., Caby M.-P., Novault S., Flament C., Leboulaire C., Borg C., Amigorena S., et al. // *J. Transl. Med.* 2005. V. 3. P. 10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-10>.