

УДК 577.35

Векторная наноплатформа для прижизненной визуализации глубинных опухолей

Е. И. Шрамова¹, С. М. Деев¹⁻³, Г. М. Прошкина^{1*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Первый Московский государственный медицинский университет имени Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123098 Россия

*E-mail: gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 12.05.2024

Принята к печати 16.05.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27425

РЕФЕРАТ Оптический биоимиджинг на основе люминесценции и флуоресценции в доклинических исследованиях на сегодняшний день является незаменимым подходом при оценке развития неопластических трансформаций, изучения пролиферативной активности опухоли, ее метастатического потенциала, а также при оценке терапевтического эффекта противоопухолевых агентов. В рамках расширения возможностей оптической визуализации интерес представляет создание сенсоров, основанных на биолюминесцентной резонансной передаче энергии (BRET) и не зависящих от внешнего источника облучения. Для визуализации глубинных опухолей, характеризующихся сверхэкспрессией рецептора второго типа эпидермального фактора роста человека (HER2), в данной работе разработана адресная наноплатформа на основе HER2-специфичных липосом, внутренняя среда которых содержит генетически кодируемый BRET-сенсор. BRET-сенсор представлен гибридным белком, функциональные модули которого включают высококаталитическую люциферазу NanoLuc (донор энергии) и красный флуоресцентный белок с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1 (акцептор энергии). В опытах *in vivo* по визуализации внутрибрюшинных диссеминированных опухолей, сформированных клетками серозной цистаденокарциномы яичников SKOV3.ip1 и характеризующихся сверхэкспрессией HER2, установлено, что разработанная система применима для детекции глубоко расположенных опухолей определенного молекулярного профиля. Разработанная адресная система может стать эффективной платформой для оптимизации доклинических исследований новых таргетных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биолюминесцентный резонансный перенос энергии, DARPins-белки, белок с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1, рецептор второго типа эпидермального фактора роста HER2, люцифераза NanoLuc, молекулярно-таргетный биоимиджинг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BRET (bioluminescence resonance energy transfer) – биолюминесцентный резонансный перенос энергии; DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins) – искусственные белки с анкириновыми повторами; HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека; LSS protein (large Stokes shift) – белок с большим стоксовым сдвигом.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на колоссальный прогресс терапии опухолей, обусловленный ранней диагностикой и инновационными методами лечения, рак по-прежнему остается одной из основных причин смертности во всем мире. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в 2022 году было зарегистрировано 20 миллионов новых случаев рака, почти половина из которых – 9.7 миллиона, за-

кончились летальным исходом (<https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>). Поскольку метастазирование является основной причиной смерти онкологических больных, актуальна разработка новых модельных систем и технологий для проведения доклинических исследований, позволяющих оценивать как процесс развития опухоли, так и отклик опухоли на терапию.

Современные знания о молекулярных основах онкогенеза, позволяющие проводить профилирование (или типирование) опухоли, определяют развитие таргетной терапии, строго селективно воздействующей на конкретные молекулярные мишени, специфичные для данного типа или подтипа рака, такие, как антигены клеточной поверхности, факторы роста, рецепторы или пути передачи сигналов, регулирующие клеточный цикл, пролиферацию, метастазирование и ангиогенез.

Вместе с развитием методов молекулярного профилирования опухоли в экспериментальной онкологии интенсивно развивается направление доклинических методов неинвазивной молекулярно-таргетной визуализации опухолей и метастазов [1–3]. Мониторинг в живом организме распространения клеточных популяций, экзогенно введенных в модельный организм, исключительно важен для понимания онкогенеза, а также для оценки терапевтического эффекта противоопухолевых агентов в доклинических фармакологических исследованиях [2, 4].

Оптический биоимиджинг в режиме реально времени на уровне целого организма на основе флуоресцентных и люминесцентных систем является незаменимым инструментом современных доклинических исследований [1, 3, 5].

Биолюминесцентная визуализация основана на детекции видимого света, выделяемого в результате реакции окисления люциферазой своего специфического субстрата [6]. Для мониторинга роста или регрессии опухоли, а также для оценки эффективности противоопухолевого препарата *in vivo* ген люциферазы конститутивно или индуцибельно экспрессируется в опухолевых клетках, на основе которых потом формируется модель рака у животного [7, 8]. Биолюминесцентная визуализация широко используется в доклинических исследованиях, однако внедрению данного метода в клинику препятствует необходимость получения клеточной линии, трансфицированной геном люциферазы.

Флуоресцентная визуализация позволяет получать изображения опухолей путем детекции света, генерируемого флуоресцентными белками, квантовыми точками или флуоресцентными красителями [1]. Однако необходимость использования внешнего источника света для возбуждения флуоресцентной метки накладывает существенные ограничения на применение этого метода для детекции глубоких опухолей: при прохождении через ткани интенсивность возбуждающего света резко падает вследствие дифракции, снижающей пространственное разрешение флуоресцентных изображений, диффузии, обуславливающей рассеяние света тканями,

а также вследствие поглощения фотонов биологическими хромофорами (меланином, гемоглобином, оксигемоглобином) [1, 9, 10].

Преодолеть описанные ограничения позволяют методы оптического биоимиджинга, основанные на механизме резонансной передачи энергии – биолюминесцентной (BRET, bioluminescence resonance energy transfer) или флуоресцентной (FRET, fluorescence resonance energy transfer), которые все чаще используются в доклинических исследованиях [11]. И хотя в основе BRET- и FRET-систем лежит один и тот же механизм – Фёрстеровский резонансный перенос энергии от донора к акцептору [12], BRET-системы являются более предпочтительными, поскольку отсутствие автофлуоресценции и фотообесцвечивания, связанных с возбуждением флуорофора, обеспечивает повышенную чувствительность детекции на уровне организма.

Стандартные системы BRET состоят из люциферазы, которая в присутствии своего биолюминесцентного субстрата действует как донор резонансной энергии, и акцептора, представленного флуоресцентным белком, красителем или квантовыми точками. Для эффективного оптического биоимиджинга на животных BRET-система должна обладать высокой передачей энергии от донора к акцептору, отличным спектральным разрешением, и акцептором, излучающим в красном диапазоне спектра. Для визуализации глубоких тканей и всего тела предпочтителен именно красный и ближний инфракрасный диапазон из-за отсутствия поглощения света гемоглобином, меланином и водой в этой области спектра.

На сегодняшний день разработано порядка двух десятков высокочувствительных BRET-систем [11], использующих в качестве донора энергии люциферазы кораллов *Renilla reniformis* (RLuc), североамериканского светлячка *Photinus pyralis* (Fluc), генно-инженерную люциферазу NanoLuc из глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* и белки различной цветовой палитры, в том числе с максимумом эмиссии в красном диапазоне спектра [13–19], в качестве акцепторов.

Во всех перечисленных работах по созданию BRET-сенсоров на основе флуоресцентных белков для мониторинга раковых клеток в организме животного использовали опухолевые модели на основе генно-модифицированных клеток, стабильно экспрессирующих ген BRET-сенсора. В своей работе мы предлагаем другой подход, предполагающий детекцию опухолей, глубоко расположенных в организме животного, с помощью BRET-сенсора, введенного в организм экзогенно и обладающего тропностью к опухоли определенного молекулярного профиля.

В качестве мишени нами выбран такой опухолю-ассоциированный антиген, как рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека HER2 (Human epidermal growth factor receptor type 2). Известно, что 15–20% опухолей молочной железы и рака яичника человека характеризуются повышенным уровнем экспрессии гена *HER2* [20, 21]. В современной медицинской практике онкомаркер HER2 служит терапевтической мишенью для моноклональных антител (Пертузумаб, Трастузумаб) и ингибиторов киназ (Лапатиниб) при HER2-положительных опухолях молочной железы [22].

В данной работе разработана платформа для детекции HER2-положительных опухолей на основе опухолю-специфичных липосом, загруженных генетически кодируемым BRET-сенсором (рис. 1). BRET-сенсор представлен гибридным белком на основе высокочастотной люциферазы NanoLuc и красного белка с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1 ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 463/624$ нм) [23] – NanoLuc-LSSmKate1. Люцифераза NanoLuc в присутствии субстрата фуримазина служит источником эндогенной биолюминесценции, будучи тем самым источником энергии для возбуждения красного флуоресцентного белка LSSmKate1. Тропность липосом к HER2-антигену на поверхности раковой клетки определяется HER2-специфичным белком DARPin_9-29 [24]. Функциональность разработанной системы *in vivo* показана в опытах на модели глубоких диссеминированных опухолей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование гена *NanoLuc-LSSmKate1* и наработка белков NanoLuc-LSSmKate1, NanoLuc и DARPin_9-29

Нуклеотидная последовательность, кодирующая *LSSmKate1*, получена введением мутаций K69Y/P131T/S148G/M167E/T183S/M196V в кодирующую последовательность *mKate2* (плазмида pmKate2-N, «Евроген», Россия). Затем последовательности, кодирующие люциферазу NanoLuc и красный флуоресцентный белок LSSmKate1, объединяли в одной рамке считывания и клонировали в вектор pET22b. Между кодирующими последовательностями генов *NanoLuc* и *LSSmKate1* находится линкер, кодирующий полипептид GGGGS. Пептидный линкер предусмотрен для того, чтобы два функциональных домена (люцифераза NanoLuc и флуоресцентный модуль LSSmKate1) в гибридном белке не испытывали стерических затруднений в пространстве, имея возможность сохранить свои функциональные свойства, но при этом быть сближенными для эффективного протекания BRET.

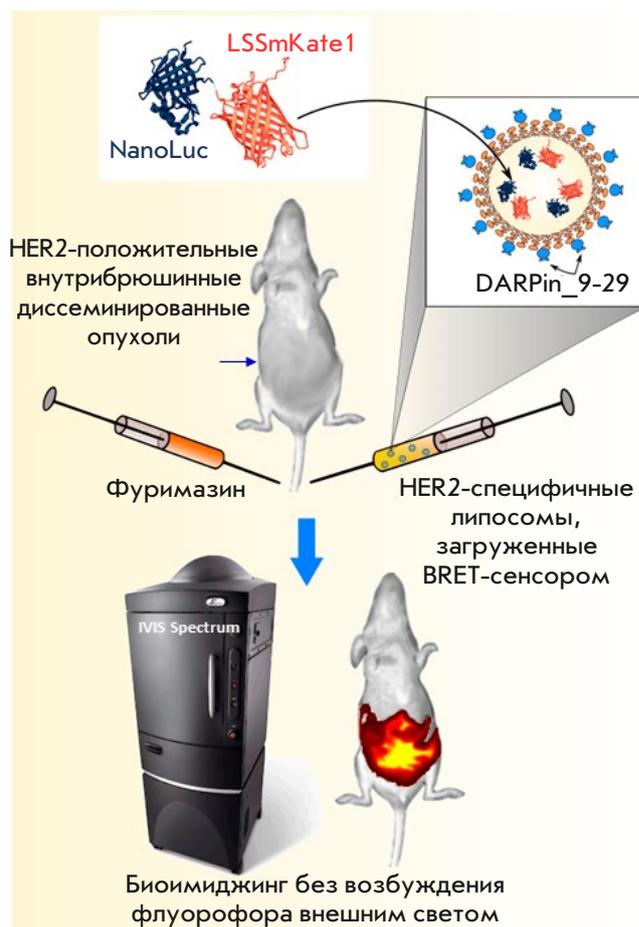


Рис. 1. Адресная наноплатформа на основе BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1 и HER2-специфичных липосом для неинвазивной диагностики глубоких опухолей. Концептуальная схема эксперимента: генетически кодируемый BRET-сенсор NanoLuc-LSSmKate1 включен в липосомы, модифицированные по внешней поверхности HER2-специфичным модулем DARPin_9-29. В присутствии люциферазного субстрата в организме животного происходит активация красного флуоресцентного белка без внешнего источника света, позволяя прижизненно в режиме реального времени детектировать глубоко расположенные опухоли в организме животного

Правильность финальной конструкции доказывали секвенированием. Кодирующая последовательность гена *NanoLuc-LSSmKate1* соответствует белку с первичной структурой: MVFTLEDVFGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDIHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDH HFKVILHYGTLVIDGVTPTNMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAGGGGSMVSELIKENMHMKLYMEGTVNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVVEGGPL

PFAFDILATSFMYGSYTFINHTQGIPDFFKQSFPEG
FTWERVTTYEDGGVLTATQDTSIQDGLIYNVKIR
GVNFTSNGPVMQKKTGWEAGTEMLYPADGGLE
GRSDEALKLVGGGHLICNLKSTYRSKPKAKNLKV
PGVYYVDRRLRIKEADKETVEQNEVAVARYCDL
PSKLGHKLNAAALENNNNNN.

Для получения белков (NanoLuc-LSSmKate1, NanoLuc и DARPin_9-29), использованных в этом исследовании, применяли метод автоиндукции [25]. Колонии *E. coli* BL21(DE3), трансформированные рЕТ22-NanoLuc-LSSmKate1, рЕТ22-NanoLuc или рЕТ22-DARPin, культивировали в автоиндукционной среде ZYM-5052 в присутствии ампициллина (100 мкг/мл) при 25°C и 200 об/мин в течение ночи. Автоиндукционная среда, содержащая эквивалентные концентрации гидрофосфата натрия и дигидрофосфата калия, препятствует закислению культуральной среды продуктами метаболизма бактерий и обеспечивает поддержание нейтральных значений pH даже при достижении культурой высоких плотностей ($OD_{600} \sim 10$). Сбалансированные концентрации глюкозы, лактозы и глицерина, а также высокая интенсивность перемешивания культуры (200 об/мин) позволяют индуцировать экспрессию гена целевого белка автоматически (при истощении в среде глюкозы), не прибегая к контролю плотности культуры. Биомассу осаждали центрифугированием при 6000 *g* в течение 15 мин, ресуспендировали в 20 мМ NaPi, pH 8.0, 150 мМ NaCl, лизоцим (30 мкг/мл). Клетки разрушали ультразвуком, дебрис удаляли высокоскоростным центрифугированием (25000 *g*). К осветленному лизату добавляли имидазол до конечной концентрации 30 мМ. Лизат фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.2 мкм и наносили на колонку HisTrap, 1 мл (Cytiva). Белок выделяли согласно протоколу производителя. Концентрации белков определяли спектрофотометрически (по закону Бугера–Ламберта–Бера) с использованием следующих коэффициентов экстинкции: NanoLuc-LSSmKate1: $\epsilon_{280} = 54570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; NanoLuc: $\epsilon_{280} = 25400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; DARPin: $\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Коэффициенты экстинкции определяли с помощью программы ProtParam tool (<https://web.expasy.org>).

Определение величины BRET в системе NanoLuc-LSSmKate1

Для оценки эффективности BRET в системе NanoLuc-LSSmKate1 проводили регистрацию спектров люминесценции NanoLuc-LSSmKate1 и NanoLuc в присутствии 5 мкМ фуримазина. Измерения проводили через 10 с после добавления люциферазного субстрата на приборе IVIS Spectrum CT (PerkinElmer, США) в режиме Excitation block,

спектр эмиссии регистрировали в диапазоне длин волн 500–740 нм с шагом 20 нм. Значение BRET рассчитывали как отношение энергии, излучаемой акцептором (NanoLuc-LSSmKate1), к энергии, излучаемой донором (NanoLuc) [26, 27].

Получение HER2-специфичных липосом, нагруженных NanoLuc-LSSmKate1

Инкапсулирование NanoLuc-LSSmKate1 в липосомы проводили согласно [28]. Суспензию фосфолипидов (0.3 мл, конечная концентрация 4 г/л), приготовленную из гранул L- α -фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, Soy 40%), смешивали с 0.2 мл NanoLuc-LSSmKate1 (конечная концентрация 150 мкМ в 20 мМ NaPi, pH 6.0). Инкапсуляция основана на электростатическом взаимодействии положительно заряженной полигистидиновой метки белка (pK_a имидазола гистидина ~ 6) и отрицательно заряженной внутренней липосомной мембраны при нейтральном значении pH. Суспензию фосфолипидов и NanoLuc-LSSmKate1 подвергали пятикратной процедуре быстрого замораживания (-150°C) и быстрого оттаивания ($+30^\circ\text{C}$), после чего с помощью экструдера продавливали через фильтр с размером пор 100 нм. Липосомы отделяли от свободного белка и липидов с использованием гелепроникающей хроматографии на колонке, упакованной сорбентом сефароза CL-2B.

Функционализацию внешней поверхности липосом HER-2-специфичным DARPin_9-29 проводили по аминокетильным фосфотидилэтанолamina. Для этого липосомы, нагруженные NanoLuc-LSSmKate1, инкубировали с 10-кратным молярным избытком сульфо-EMCS (эфир N- ϵ -maleимидокапроилоксисульфосукцинимид). Параллельно DARPin_9-29 (100 мкМ в 20 мМ NaPi, pH 7.5) инкубировали с 2-иминотиолоаном (6 мМ, реагент Траута, позволяющий ввести SH-группу по первичным аминам белка). Обе реакции проводили при комнатной температуре в течение 40 мин, после чего продукты отделяли от несвязавшихся модифицирующих агентов на колонке NAP5 (Cytiva). Конъюгацию сульфо-EMCS-протеолипосом с DARPin-SH проводили в течение 40 мин при комнатной температуре; DARPin-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) отделяли от несвязанного DARPin_9-29 с помощью гелепроникающей хроматографии на колонке, упакованной сефарозой CL-2B.

Клеточные линии

В работе использовали линию клеток серозной цистаденокарциномы яичников SKOV3.ip1, полученную из внутрибрюшинного асцита иммунодефицитной мыши, которой интраперитонеально

были введены клетки аденокарциномы яичника человека SKOV3 [29], а также клеточную линию SKOV3.ip1-NanoLuc, стабильно экспрессирующую ген люциферазы NanoLuc (коллекция клеточных линий лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН). SKOV3.ip1 и SKOV3.ip1-NanoLuc характеризуются сверхэкспрессией рецептора HER2 (10^6 рецептор/клетка). Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C во влажной атмосфере с $5\% \text{CO}_2$) в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко»), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и антибиотик (10 ЕД/мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина, «ПанЭко»).

Проточная цитометрия

Для изучения функциональной активности адресного модуля DARPIn₉₋₂₉ в составе липосом оценивали взаимодействие DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) с HER2-положительными клетками SKOV3.ip1 методом проточной цитометрии. Клетки (100 000 в 200 мкл полной ростовой среды) инкубировали в течение 10 мин при 37°C с 300 нМ DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) (концентрация указана по NanoLuc-LSSmKate1). Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером и анализировали на приборе NovoCyte 3000. Флуоресценцию LSSmKate1 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и детектировали в канале 615 ± 20 нм (канал PerCP-H).

Конфокальная микроскопия

Изучение связывания адресного модуля в составе DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) с рецептором HER2 на поверхности клеток SKOV3.ip1 проводили методом конфокальной микроскопии. Для этого 4000 клеток линии SKOV3.ip1 высевали в лунки 96-луночного планшета со стеклянным дном (Eppendorf) и культивировали в течение ночи. На следующий день к клеткам добавляли 300 нМ DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) (концентрация указана по NanoLuc-LSSmKate1). Инкубацию клеток с конъюгатом проводили в течение 20 и 90 мин. Ядра окрашивали 10 нМ Hoechst 33342 в течение 10 мин при 37°C . Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли среду FluoroBright (Gibco) и анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss), используя масляный иммерсионный объектив $63\times$ Plan-Apochromat. Флуоресценцию Hoechst 33342 возбуждали лазером с длиной волны 405 нм, детекцию проводили при 410–520 нм; LSSmKate1 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, флуоресценцию детектировали в диапазоне 600–755 нм.

Биолюминесцентная визуализация животных

Исследования *in vivo* проводили на мышах линии Balb/c nude/nude. Эксперименты на лабораторных животных проведены с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ECC) и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (протокол Комиссии ИБХ РАН по контролю за содержанием и использованием животных № 368/2022 от 19.12.2022 г.). Модель диссеминированных внутрибрюшинных метастазов получали внутрибрюшинной инокуляцией 2×10^6 клеток линии SKOV3.ip1-NanoLuc в 100 мкл культуральной среды без сыворотки и антибиотиков. Рост внутрибрюшинных опухолей оценивали по люминесцентному сигналу. Для этого через 10 дней после прививки мышам в ретроорбитальный синус вводили 7 мкг фуримазина (Nano-Glo, Promega) в 100 мкл PBS и проводили биоимиджинг на приборе IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer) в режиме «Люминесценция». Флуоресцентный биоимиджинг внутрибрюшинных опухолей проводили в режиме «Эпи-флуоресценция» в диапазоне 600–740 нм (с шагом 20 нм) без возбуждающего света (режим excitation block), при этом мышам в разные ретроорбитальные синусы вводили: за 60 мин до анестезии – 2 мкМ DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) (концентрация указана по NanoLuc-LSSmKate1), за 30 с до анестезии – 7 мкг фуримазина. Съёмку осуществляли сразу после засыпания животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Среди люцифераз, используемых в настоящее время в BRET-сенсорах, идеальным донором энергии является NanoLuc, поскольку выделяется своей необычайной яркостью (мощностью люминесценции) и малым размером [30]. В качестве акцептора энергии нами был выбран красный белок с большим стоксовым сдвигом LSSmKate1 с максимумом эмиссии при 624 нм [23]. Этот белок удовлетворяет двум важным условиям: 1) спектр возбуждения LSSmKate1 (максимум возбуждения 463 нм) совпадает со спектром эмиссии окисленной формы люциферазного субстрата (максимум эмиссии 460 нм) (рис. 2А); 2) спектр эмиссии LSSmKate1 находится в окне прозрачности биоткани (600–1000 нм), где коэффициент поглощения ткани минимален [31].

Известно, что эффективность BRET зависит от расстояния: чтобы процесс безызлучательного переноса энергии был эффективен, донор и акцептор должны находиться друг от друга на расстоянии, не превышающем 10 нм [32]. Именно поэтому

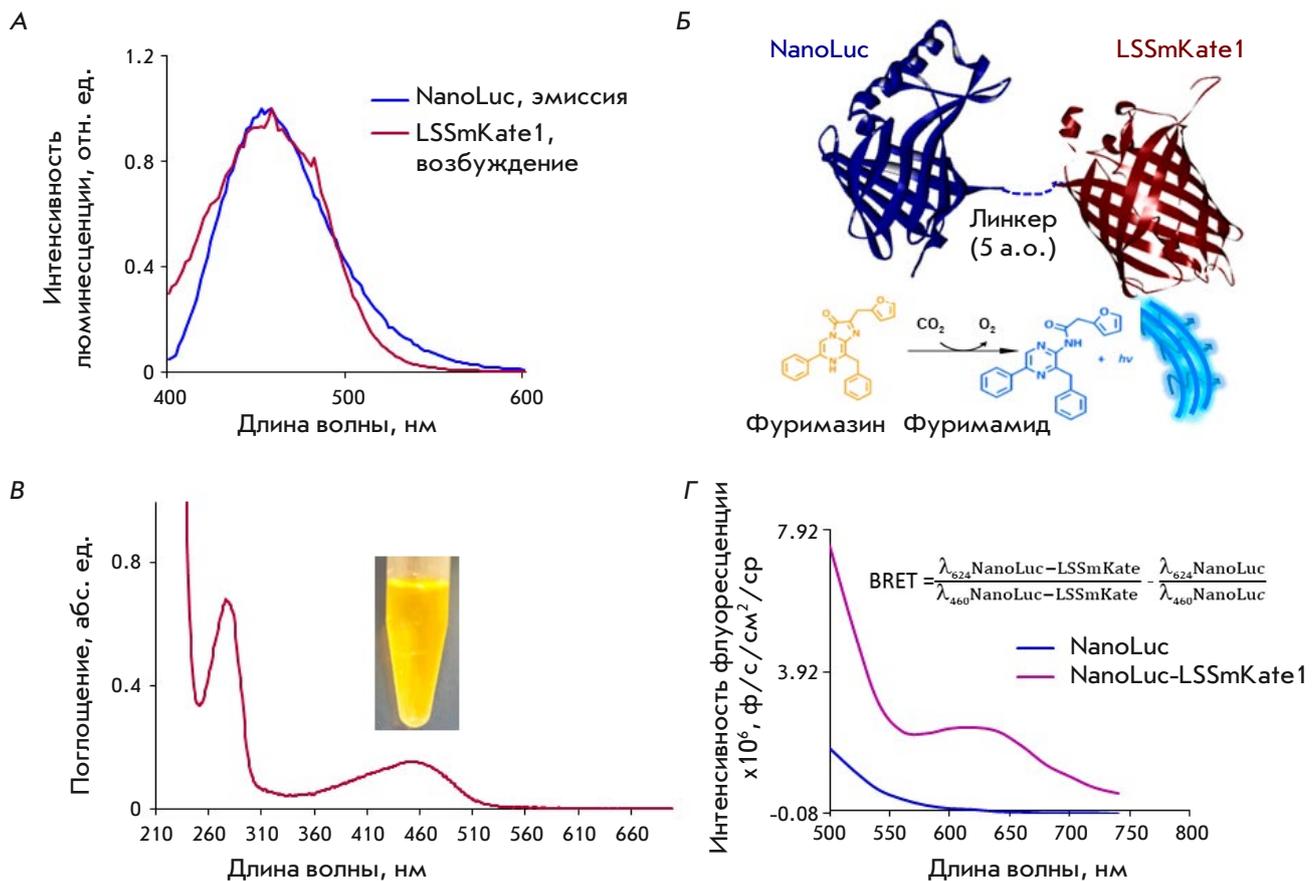


Рис. 2. Характеристика BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1. **А** – нормированные спектры люминесценции люциферазы NanoLuc в присутствии 30 мкМ фуримазина (синяя кривая) и флуоресценции LSSmKate1 (бордовая кривая). **Б** – схема BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1 и принцип работы: люцифераза NanoLuc высокоспецифично окисляет свой субстрат фуримазин, окисленная форма которого, фуримамид, излучает в синем диапазоне спектра. Часть этой энергии безызлучательно переносится на LSSmKate1, находящийся в одной полипептидной цепи с люциферазой NanoLuc. LSSmKate1 начинает флуоресцировать. **В** – спектр поглощения очищенного белка NanoLuc-LSSmKate1 и образец белка в пробирке. **Г** – спектры флуоресценции NanoLuc-LSSmKate1 (сиреневая кривая) и NanoLuc (синяя кривая), зарегистрированные на приборе IVIS Spectrum CT без возбуждения внешним светом (режим excitation block) в присутствии люциферазного субстрата. Приведена формула для расчета эффективности резонансного переноса энергии в системе NanoLuc-LSSmKate1

представлялось целесообразным получить гибридный белок NanoLuc-LSSmKate1 с максимально сближенными функциональными модулями (люцифераза и флуоресцентный белок). Схема работы BRET-сенсора представлена на рис. 2Б: люцифераза NanoLuc окисляет субстрат фуримазин, который при переходе в окисленную форму, фуримамид, испускает фотоны в видимой области спектра. Частично эта энергия поглощается акцептором – флуоресцентным белком LSSmKate1, который при этом переходит в возбужденное состояние и флуоресцирует.

Конструкцию NanoLuc-LSSmKate1 и соответствующий ей белок получали как описано

в «Экспериментальной части». Спектр поглощения очищенного белка NanoLuc-LSSmKate1 характеризуется сильным поглощением в видимой области спектра, о чем говорит наличие пика при 460 нм и ярко-желтый цвет очищенного белка (рис. 2В).

Эффективность резонансного переноса энергии в системе NanoLuc-LSSmKate1, рассчитанная как отношение величины эмиссии системы «донор-акцептор» (NanoLuc-LSSmKate1) на длине волны максимума испускания акцептора (624 нм) к величине эмиссии этой системы на длине волны максимума испускания донора (NanoLuc, 460 нм) за вычетом этого же отношения, детектированного только для донора [8, 33], составила 0.3 (рис. 2Г).

Для селективной доставки BRET-сенсора к HER2-положительным опухолям использовали липосомы, модифицированные по внешней поверхности HER2-специфичным модулем DARPin₉₋₂₉ (Designed Ankyrin Repeat Proteins), который взаимодействует с субдоменом I рецептора HER2 с высокой аффинностью ($K_D = 3.8$ нМ) [24]. DARPin-белки являются новым классом адресных молекул неиммуноглобулиновой природы. Эти молекулы отличаются от антител высоким уровнем экспрессии, мономерностью в растворе, небольшими размерами, устойчивостью к протеазам и высокой растворимостью [34, 35]. Перечисленные особенности позволяют DARPins конкурировать с антителами в качестве альтернативных адресных компонентов в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для терапии онкозаболеваний.

Метод загрузки BRET-сенсора в липосомы основан на электростатическом взаимодействии положительно заряженной полигистидиновой метки белка (pK_a имидазола гистидина ~6) и отрицательно заряженной внутренней липосомной мембраны при нейтральном значении pH [28]. Концентрацию липосом, загруженных NanoLuc-LSSmKate1, оценивали спектрофотометрически, сравнивая спектр поглощения пустых липосом со спектром протеолипосом. Как видно из *рис. 3А*, спектр протеолипосом (синяя кривая) совпадает со спектром пустых липосом с концентрацией 4.25 г/л (зеленая кривая), полученных 15-кратным продавливанием суспензии фосфолипидов через фильтр с диаметром пор 100 нм. Ранее с использованием гидрофильного мембранонепроницаемого красителя фталоцианин-3,4',4'',4'''-тетрасульфоната меди (CPTS) мы установили, что концентрация липидных везикул в 1 мг/мл суспензии соответствует 1.2 нМ [28]. Таким образом, молярная концентрация суспензии липосом 4.25 г/л составляет 5.1 нМ. Вычитание спектра пустых липосом (зеленая кривая на *рис. 3А*) из спектра липосом, нагруженных NanoLuc-LSSmKate1 (синяя кривая на *рис. 3А*), дает спектр NanoLuc-LSSmKate1, включенного в липосому (сиреневая кривая на *рис. 3А*). Концентрация белка, включенного в липосомы, составляет ~5.42 мкМ ($OD_{280}/\epsilon_{280} = 0.296/54570$). Следовательно, одна протеолипосома содержит ~1063 молекул BRET-сенсора.

Функционализацию протеолипосом адресным модулем DARPin проводили с использованием реагента Траута (2-иминотиолана) и гидрофильного аминокислотного агента сульфгидрильного сшивающего агента сульфо-EMCS как описано в «Экспериментальной части».

Способность липосом, загруженных BRET-сенсором и функционализированных адресным модулем DARPin, взаимодействовать с рецептором

HER2 *in vitro* изучена методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии (*рис. 3Б,В*). Данные проточной цитометрии подтверждают специфическое взаимодействие DARPin-модифицированных липосом с рецептором HER2 на поверхности клеток SKOV3.ip1. Как видно из *рис. 3Б*, средняя интенсивность флуоресценции (MFI, median fluorescence intensity) HER2-положительных клеток SKOV3.ip1, обработанных DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1), составляет 102279 (зеленая кривая на *рис. 3Б*), что примерно в 25 раз выше автофлуоресценции этих клеток (синяя кривая на *рис. 3Б*).

С помощью конфокальной микроскопии установлено, что в течение 20 мин инкубации клеток SKOV3.ip1 с 300-нМ суспензией DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) происходит эффективное связывание адресных протеолипосом с мембраной клетки (красная корона по мембране клеток на левом фото *рис. 3В*). Дальнейшая инкубация в течение 1.5 ч приводит к интернализации DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1), о чем свидетельствуют красные пиксели в цитоплазме (*рис. 3В*, правое фото).

Таким образом, как видно из приведенных данных (*рис. 3*), разработанная система характеризуется высокой степенью загрузки BRET-сенсора в липосомы и высокой специфичностью к HER2-мишени.

Применимость DARPin-модифицированных липосом, загруженных BRET-сенсором, для неинвазивной детекции *in vivo* HER2-положительных глубоко расположенных опухолей в режиме реального времени оценивали на мышинной модели диссеминированных внутрибрюшинных метастазов, сформированной на основе клеток карциномы яичника человека SKOV3.ip1, стабильно экспрессирующих репортерный ген *NanoLuc*. Клетки SKOV3.ip1 характеризуются высоким потенциалом метастазирования, имитируя при внутрибрюшинном введении позднюю стадию рака яичников с обширным распространением опухолевых клеток на стенку брюшины и поверхность органов [29]. Мониторинг роста внутрибрюшинных опухолей проводили по детекции люминесцентного сигнала через 10 дней после прививки животным опухолевых клеток, экспрессирующих *NanoLuc* (*рис. 4*, верхние фото). Мониторинг биораспределения липосом DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1), введенных в организм животного системно, осуществляли по детекции флуоресцентного сигнала, который регистрировали в режиме отсутствия возбуждения внешним светом (*рис. 4*, нижние фото). Как видно из *рис. 4*, интенсивность и топография люминесцентного сигнала, детектируемого после введения мышам фуримази-

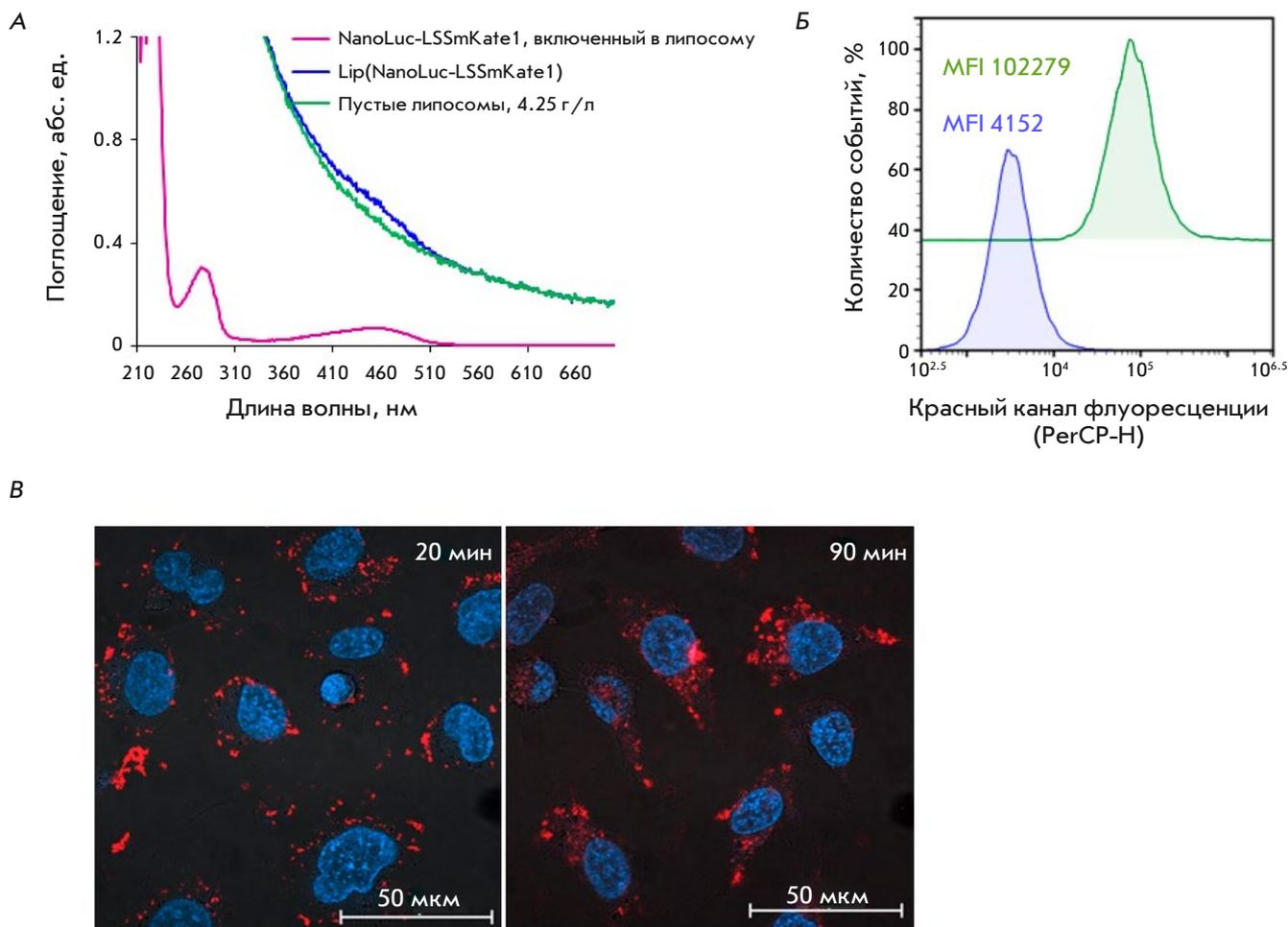


Рис. 3. Характеристика HER2-специфических липосом, загруженных BRET-сенсором NanoLuc-LSSmKate1. **А** – спектры поглощения пустых липосом (зеленая кривая) и липосом, содержащих NanoLuc-LSSmKate1 (синяя кривая). Сиреневая кривая соответствует белку NanoLuc-LSSmKate1, загруженному в липосомы. **Б** – данные проточной цитометрии по рецептор-специфическому взаимодействию DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) с HER2-положительными SKOV3ip-клетками. Синяя кривая соответствует флуоресцентно немеченым клеткам (контроль), зеленая кривая – клеткам, обработанным DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1). На пиктограмме указаны значения средней интенсивности флуоресценции (MFI). Детекцию сигнала вели в красном канале флуоресценции (PerCP-H, $\lambda_{em} = 615 \pm 20$ нм) при возбуждении лазером 488 нм. **В** – наложенные конфокальные изображения в синем (λ_{ex} 405 нм, детекция 410–520 нм) и красном (λ_{ex} 488 нм, детекция 600–755 нм) каналах флуоресценции клеток SKOV3.ip1 после 20 мин (левое фото) и 90 мин (правое изображение) инкубации с DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1). Ядра окрашены Hoechst 33342

на, полностью совпадают с интенсивностью и топографией флуоресцентного сигнала, детектируемого в режиме без возбуждения флуорофора (excitation block) после введения мышам DARP-Lip(NanoLuc-LSSmKate1) и фуримазина. Таким образом, разработанные HER2-специфические липосомы, несущие BRET-сенсор, могут использоваться в прижизненном оптическом биоимиджинге для детекции глубоко расположенных опухолей определенного молекулярного профиля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Число противоопухолевых препаратов, не эффективных в клинике, намного превышает количество препаратов, эффективных в доклинических исследованиях [2, 36]. Этот факт указывает на необходимость разработки новых моделей и новых технологий доклинического мониторинга отклика опухоли на лечение [36, 37]. Широко используемые в современных экспериментальных исследованиях модели ксенотрансплантатов подкожных опухолей *in vivo*

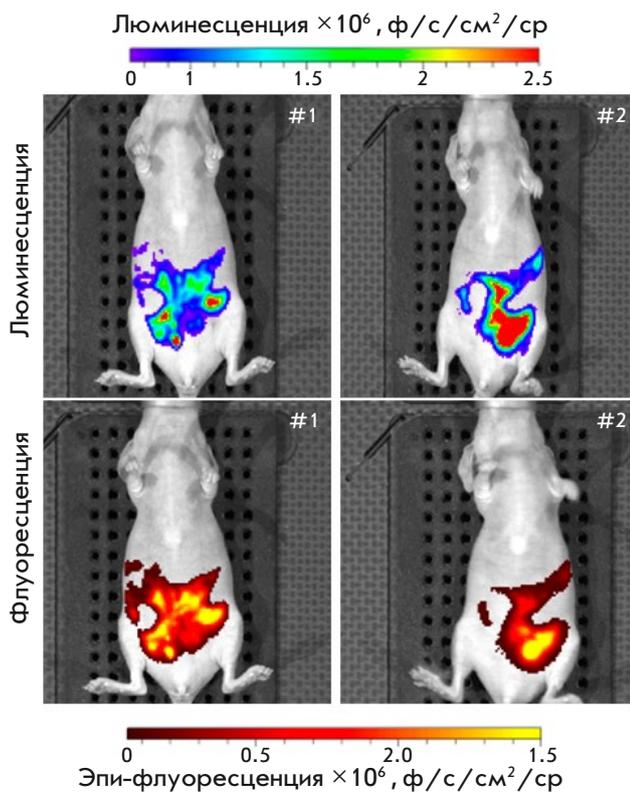


Рис. 4. Оптический биоимиджинг внутрибрюшинных диссеминированных опухолей с использованием HER2-специфичных липосом, загруженных BRET-сенсором NanoLuc-LSSmKate1. Прижизненные люминесцентные (верхние фото) и флуоресцентные (нижние фото) изображения животных, полученные в режиме реального времени на приборе IVIS Spectrum CT в двух разных режимах детекции сигнала: верхние фото – режим биолюминесценции; нижние фото – режим флуоресценции без возбуждения флуорофора

позволяют проводить целенаправленный скрининг лекарственных средств и могут предоставить данные об эффективности препарата, фармакокинетики и фармакодинамике, однако не позволяют оценить метастатический потенциал опухоли. Применение ортотопических моделей позволяет создать релевантную модель заболевания, однако встает проблема определения опухолевой нагрузки на ор-

ганизм: как быть, если опухоль нельзя измерить штангенциркулем? Очевидно, что ценность любой доклинической модели для оценки эффективности противоопухолевых соединений определяется, в конечном итоге, ее способностью максимально близко прогнозировать клинический ответ у человека. Потребность в прижизненной визуализации событий, происходящих в организме животного на стадии доклинических исследований противоопухолевых препаратов, обусловила бурное развитие оптического биоимиджинга, а развитие методов молекулярного профилирования опухоли заложило основу для создания молекулярно-таргетной визуализации опухолей.

В данной работе разработана система, позволяющая в режиме реального времени проводить неинвазивную детекцию HER2-положительных внутрибрюшинных диссеминированных опухолей с помощью адресных липосом, загруженных BRET-сенсором NanoLuc-LSSmKate1. Система характеризуется высокой степенью загрузки BRET-сенсора в липосому (рис. 3), специфичностью протеолипосом к HER2-рецептору *in vitro* и *in vivo* (рис. 3, 4), а также позволяет проводить неинвазивную визуализацию опухолевых процессов на уровне целого организма (рис. 4).

Полагаем, что разработанная адресная система оптического биоимиджинга в реальном времени на основе BRET-сенсора NanoLuc-LSSmKate1 может стать эффективной платформой для оптимизации доклинических исследований новых таргетных препаратов. Кроме того, разработанный принцип создания адресного BRET-сенсора может стать универсальной платформой для неинвазивного биоимиджинга глубоко расположенных опухолей любого молекулярного профиля путем простой смены векторной молекулы на поверхности липосомы. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-14-00088 «Таргетированные флуоресцентные липосомы как система для неинвазивной оптической детекции первичных опухолей и удаленных метастазов HER2/EpCAM-положительных карцином»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bai J.W., Qiu S.Q., Zhang G.J. // Signal Transduct Target Ther. 2023. V. 8. № 1. P. 89.
- O'Farrell A.C., Shnyder S.D., Marston G., Coletta P.L., Gill J.H. // Br. J. Pharmacol. 2013. V. 169. № 4. P. 719–735.
- Hilderbrand S.A., Weissleder R. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2010. V. 14. № 1. P. 71–79.
- Shramova E.I., Kotlyar A.B., Lebedenko E.N., Deyev S.M., Proshkina G.M. // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 3. P. 102–113.
- Badr C.E. // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1098. P. 1–18.
- Serkova N.J., Glunde K., Haney C.R., Farhoud M., De Lille A., Redente E.F., Simberg D., Westerly D.C., Griffin L., Mason R.P. // Cancer Res. 2021. V. 81. № 5. P. 1189–1200.
- Koessinger A.L., Koessinger D., Stevenson K., Cloix C.,

- Mitchell L., Nixon C., Gomez-Roman N., Chalmers A.J., Norman J.C., Tait S.W.G. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 15361.
8. Shramova E.I., Chumakov S.P., Shipunova V.O., Ryabova A.V., Telegin G.B., Kabashin A.V., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Light Sci. Appl.* 2022. V. 11. № 1. P. 38.
9. Ozawa T., Yoshimura H., Kim S.B. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 2. P. 590–609.
10. Grebenil E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296.
11. Endo M., Ozawa T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 18. P. 6538.
12. Förster T. // *Discuss. Faraday Soc.* 1959. V. 27. P. 7–17.
13. Yeh H.W., Karmach O., Ji A., Carter D., Martins-Green M.M., Ai H.W. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 10. P. 971–974.
14. Eyre N.S., Aloia A.L., Joyce M.A., Chulanetra M., Tyrrell D.L., Beard M.R. // *Virology.* 2017. V. 507. P. 20–31.
15. Iglesias P., Costoya J.A. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. V. 24. № 10. P. 3126–3130.
16. Branchini B.R., Rosenberg J.C., Ablamsky D.M., Taylor K.P., Southworth T.L., Linder S.J. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 414. № 2. P. 239–245.
17. Rumyantsev K.A., Turoverov K.K., Verkhusha V.V. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 36588.
18. Su Y., Walker J.R., Park Y., Smith T.P., Liu L.X., Hall M.P., Labanieh L., Hurst R., Wang D.C., Encell L.P., et al. // *Nat. Methods.* 2020. V. 17. № 8. P. 852–860.
19. Nishihara R., Paulmurugan R., Nakajima T., Yamamoto E., Natarajan A., Afjei R., Hiruta Y., Iwasawa N., Nishiyama S., Citterio D., et al. // *Theranostics.* 2019. V. 9. № 9. P. 2646–2661.
20. Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Pusztai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N. // *Oncologist.* 2009. V. 14. № 4. P. 320–368.
21. Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2012. V. 77. № 3. P. 227–245.
22. Blumenthal G.M., Scher N.S., Cortazar P., Chattopadhyay S., Tang S., Song P., Liu Q., Ringgold K., Pilaro A.M., Tilley A., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 18. P. 4911–4916.
23. Piatkevich K.D., Hult J., Subach O.M., Wu B., Abdulla A., Segall J.E., Verkhusha V.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 12. P. 5369–5374.
24. Steiner D., Forrer P., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 5. P. 121–127.
25. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. № 1. P. 207–234.
26. Dragulescu-Andrasi A., Chan C.T., De A., Massoud T.F., Gambhir S.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 29. P. 12060–12065.
27. Shramova E.I., Filimonova V.P., Frolova A.Y., Pichkur E.B., Fedotov V.R., Konevega A.L., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2023. V. 193. P. 208–217.
28. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
29. Yu D., Wolf J.K., Scanlon M., Price J.E., Hung M.C. // *Cancer Res.* 1993. V. 53. № 4. P. 891–898.
30. Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
31. Mahmood U. // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 2004. V. 23. № 4. P. 58–66.
32. Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 25. P. 12273–12277.
33. Proshkina G.M., Shramova E.I., Shilova O.N., Ryabova A.V., Deyev S.M. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2018. V. 188. P. 107–115.
34. Interlandi G., Wetzel S.K., Settanni G., Pluckthun A., Cafilisch A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 375. № 3. P. 837–854.
35. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., de Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 4. P. 1595–1605.
36. Suggitt M., Bibby M.C. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 3. P. 971–981.
37. Tolmachev V.M., Chernov M.I., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2023. V. 91. № 3. P. RCR5034.