

УДК 577.29

## НОВЫЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ НОСИТЕЛИ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С РЕЦЕПТОРОМ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

© 2020 г. Т. С. Карягина<sup>1</sup>, А. В. Уласов<sup>1</sup>, А. А. Розенкранц<sup>1,2</sup>, Т. А. Сластиникова<sup>1</sup>, Ю. В. Храмцов<sup>1</sup>,  
Т. Н. Лупанова<sup>1</sup>, академик РАН Г. П. Георгиев<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН А. С. Соболев<sup>1,2,\*</sup>

Поступило 13.11.2019 г.  
После доработки 13.11.2019 г.  
Принято к публикации 13.11.2019 г.

Разработаны и охарактеризованы новые рекомбинантные носители – модульные нанотранспортеры (МНТ), содержащие N-концевой лигандный модуль, специфически связывающийся с рецептором к эпидермальному фактору роста (рЭФР). В качестве лигандного модуля были использованы эпидермальный фактор роста (ЭФР) человека и антителоподобный белок Z<sub>1907</sub>. Показано, что данные МНТ способны к рецептор-специфической интернализации в опухолевые клетки-мишени и внутриядерному накоплению. Присоединение эмиттера электронов Оже (ЭО) <sup>111</sup>In к этим МНТ значительно усиливало его цитотоксический эффект на клетки-мишени. Установлено, что перемещение ЭФР с C-конца на N-конец транспортера усиливало рост клеток-мишеней, тогда как использование Z<sub>1907</sub> не приводило к подобному эффекту.

*Ключевые слова:* модульные нанотранспортеры, направленная доставка, Z<sub>1907</sub>, ЭФР, ядерная доставка

**DOI:** 10.31857/S2686738920010114

Доставка лекарственных средств в ядра клеток-мишеней является перспективным подходом увеличения эффективности противораковой терапии [1]. Однако такая доставка затруднена из-за наличия естественных биологических барьеров: плазматической мембраны, мембраны эндосом, деградации в лизосомах, ядерной мембраны [2].

Системой доставки, позволяющей эффективно преодолевать эти барьеры, являются многофункциональные полипептидные конструкции – модульные нанотранспортеры (МНТ). Их лигандный модуль обеспечивает специфическое связывание транспортера с соответствующим рецептором; эндосомолитический модуль необходим для выхода из эндосом в цитозоль, модуль с сигналом ядерной локализации обеспечивает эффективный транспорт в ядро, модуль-носитель служит для объединения модулей в единую структуру [3].

В разработанных ранее МНТ лигандный модуль, представленный эпидермальным фактором роста (ЭФР) человека, располагался на C-конце молекулы транспортера [4] (далее МНТ-ЭФР). Основываясь на проведенных ранее работах *in vitro* [5] и *in vivo* [6–8], мы проверили возможность создания новых МНТ, в которых лигандный модуль, способный специфически связываться с рецептором к ЭФР (рЭФР), был перенесен на N-конец молекулы (далее ЭФР-МНТ). Это делает C-конец доступным для модификации и расширяет возможности МНТ как платформы для переноса лекарств в ядро клетки-мишени. В качестве лигандного модуля новых МНТ были использованы ЭФР (для ЭФР-МНТ) или антителоподобный белок аффибоди Z<sub>1907</sub> (Z<sub>1907</sub>-МНТ) [9]. Новые транспортеры были охарактеризованы по их способности проникать в ядра и цитотоксическому эффекту эмиттера ЭО <sup>111</sup>In, доставляемого МНТ в опухолевые клетки-мишени.

Известно, что связывание рЭФР ряда опухолевых клеток с природными лигандами приводит к активации рецептора с последующим запуском внутриклеточных каскадов, усиливающих пролиферацию [10], оказывая проонкогенный эффект. Поскольку в состав исследуемых МНТ входят ли-

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: sobolev@igb.ac.ru; alsobolev@yandex.ru

**Таблица 1.** Эффективность внутриядерного накопления МНТ, конъюгированных с  $^{111}\text{In}$ 

Тип МНТ	Доля внутриядерной радиоактивности от общей внутриклеточной радиоактивности, %
$^{111}\text{In}$ -NOTA-МНТ-ЭФР	$49 \pm 3$
$^{111}\text{In}$ -NOTA- $Z_{1907}$ -МНТ	$64 \pm 16$
$^{111}\text{In}$ -NOTA-ЭФР-МНТ	$65 \pm 13$

$M \pm m, n = 3.$

**Таблица 2.** Цитотоксический эффект  $^{111}\text{In}$  на клетках эпидермоидной карциномы человека А431

Цитотоксический агент	$A_{50}$ , МБк мл $^{-1}$
$^{111}\text{In}$ -NOTA- $Z_{1907}$ -МНТ	$0.11 \pm 0.02$
$^{111}\text{In}$ -NOTA-ЭФР-МНТ	$0.41 \pm 0.03$
Свободный $^{111}\text{In}$	$8 \pm 1$

Примечание. Значения  $A_{50}$  соответствуют добавленной радиоактивности, при которой происходит 50%-я гибель клеток.  $M \pm m, n = 3-6.$

ганды к рЭФР, была произведена оценка возможного влияния новых транспортеров на рост клеток-мишеней.

Новые транспортеры были наработаны в клетках *E. coli*, штамм С3029 (“NEB”, Великобритания), трансформированными плазмидами, кодирующими ЭФР-МНТ и  $Z_{1907}$ -МНТ. Ген  $Z_{1907}$  был синтезирован “General Biosystems”, США, на основе опубликованной аминокислотной последовательности [9] и клонирован на N-конец безлигандного МНТ. Модульные нанотранспортеры были очищены методом аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (“Qiagen”, Германия).

Проверку способности МНТ к рецептор-опосредованной интернализации оценивали методом проточной цитометрии, для чего они были конъюгированы с Alexa Fluor 647 (“Molecular Probes”, США).

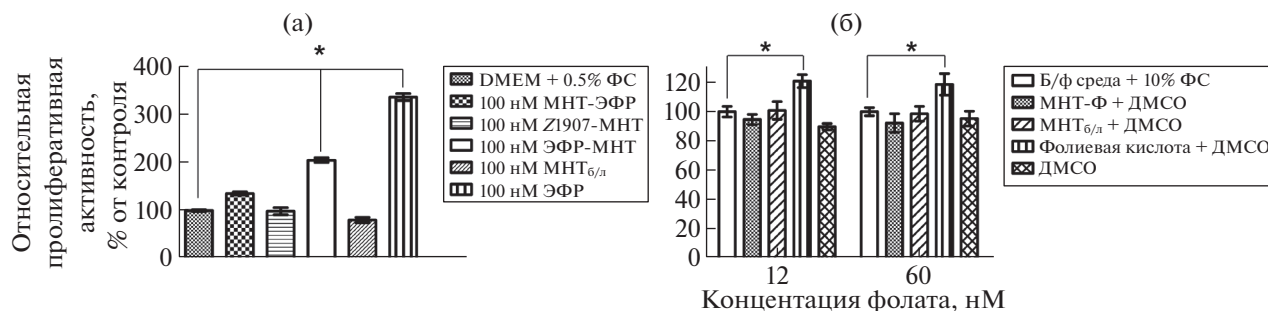
Оценку интернализации производили на клетках эпидермоидной карциномы человека А431, сверхэкспрессирующих рЭФР. Клетки культивировали в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФС) и гентамицина (50 мкг/мл) при 5%  $\text{CO}_2$  и 37°C в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Клетки были рассажены в 24-луночную плашку ( $2.5 \times 10^4$  клеток/луночка). Спустя 2 суток к клеткам были добавлены по

100 нМ ЭФР-МНТ, МНТ-ЭФР и  $Z_{1907}$ -МНТ, меченных Alexa Fluor 647. Клетки инкубировали с МНТ 18 ч при 37°C при 5%  $\text{CO}_2$  с или без избытка свободного ЭФР. Затем клетки с интернализированными транспортерами промывали, трипсинизировали, удаляя МНТ, находящиеся на поверхности клеток, центрифугировали при 200g в течение 10 мин и анализировали проточной цитометрией с использованием Epics Altra Flow Cytometer (“Beckman Coulter”, США) при возбуждении флуоресценции 633 нм и эмиссии при 675 нм. Для каждой пробы было проанализировано  $0.5-1 \times 10^4$  клеток. Добавление 2 мкМ свободного ЭФР существенно уменьшало среднюю интенсивность флуоресценции, соответствующей интернализированной клетками фракции МНТ, до  $19 \pm 1$ ,  $38 \pm 1$  и  $42 \pm 1\%$  от исходного уровня для МНТ-ЭФР,  $Z_{1907}$ -МНТ и ЭФР-МНТ соответственно. Этот результат свидетельствует о рецептор-опосредованном (рЭФР-специфическом) эндоцитозе данных МНТ клетками-мишенями.

Для исследования накопления МНТ в ядрах клеток-мишеней к МНТ был присоединен  $^{111}\text{In}$  через бифункциональный хелатор p-SCN-Bn-NOTA, как описано ранее [11]. Клетки А431 были рассеяны в 12-луночную плашку ( $5 \times 10^5$  клеток/луночка) в среде DMEM с 10% ФС. Спустя 2 суток клетки были инкубированы 2 ч с  $^{111}\text{In}$ -NOTA-МНТ (0.6 МБк/мл, 1.9 мкг/мл) в свежей среде, после чего ядра клеток выделяли по описанной ранее методике [12] на льду. Полученные данные свидетельствуют, что все исследуемые МНТ способны к доставке  $^{111}\text{In}$  в ядра клеток-мишеней, где эффективность действия эмиттера ЭО максимальна (табл. 1).

Исследование влияния МНТ на рост клеток-мишеней проводили на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. За 7 суток до эксперимента клетки переводили на среду DMEM с 0.5% ФС, после чего рассаживали в 24-луночные плашки по 8 тысяч клеток в луночку или 96-луночные плашки по 3 тысячи клеток в луночку. На следующий день к клеткам добавляли МНТ или ЭФР в концентрации 100 нМ. Рост клеток оценивали с помощью МТТ-теста на 10-й день инкубации. Оптическую плотность формазана и фона измеряли с помощью планшетного фотометра Synergy 4 (“Biotek”, США) при 570 и 650 нм соответственно.

Было продемонстрировано, что ЭФР и ЭФР-МНТ приводят к достоверному увеличению роста опухолевых клеток-мишеней, тогда как  $Z_{1907}$ -МНТ, МНТ-ЭФР и безлигандный МНТ не оказывают на него воздействия (рис. 1а). Необходимо отметить, что и другой тип МНТ, содержащий фолат в качестве лигандного модуля (МНТ-Ф) [11], в отличие от свободного фолата не вызывал увеличе-



**Рис. 1.** Влияние МНТ на пролиферативную активность клеток-мишеней MCF-7. а – влияние рЭФР-связанных МНТ. б – влияние МНТ-Ф. Среднее значение оптической плотности для контрольных клеток принято за 100%  $M \pm m$ ,  $n = 4$ . Звездочкой отмечены обозначены достоверно различающиеся результаты ( $p < 0.05$ ).

ния пролиферации клеток в бесфолатной среде (б/ф) с 10% ФС (рис. 1б).

Оценку цитотоксического эффекта <sup>111</sup>In, доставляемого внутрь опухолевых клеток-мишеней посредством МНТ, производили с помощью метода колониеобразования на клетках культуры A431. В качестве контроля использовали свободный <sup>111</sup>In. Клетки A431 рассеивали в 24-луночную плашку ( $2 \times 10^4$  клеток/лунка) в среде DMEM с 10% ФС. Спустя 2 суток среду заменяли и добавляли <sup>111</sup>In-NOTA-МНТ (0.02–6.5 МБк/мл), а также свободный <sup>111</sup>In (0.22–20 МБк/мл). Клетки инкубировали 48 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, после чего рассеивали в 25-см<sup>2</sup> флаконы ( $2 \cdot 10^3$  клеток на флакон) в среде DMEM/F12 с 10% ФС. Через 6 суток колонии фиксировали, окрашивали кристаллическим фиолетовым и подсчитывали.

Присоединение <sup>111</sup>In к МНТ существенно увеличивало его цитотоксичность, наибольший цитотоксический эффект обнаружился для <sup>111</sup>In-NOTA-Z<sub>1907</sub>-МНТ и <sup>111</sup>In-NOTA-МНТ-ЭФР (табл. 2).

Таким образом, разработаны и охарактеризованы новые МНТ с лигандными модулями на N-конце молекулы: ЭФР-МНТ и Z<sub>1907</sub>-МНТ, которые способны доставлять эмиттеры ЭО в ядра опухолевых клеток-мишеней, сверхэкспрессирующих рЭФР. Продемонстрировано, что Z<sub>1907</sub>-МНТ и МНТ-Ф не влияют на пролиферативную активность клеток-мишеней, в отличие от ЭФР, фолата и ЭФР-МНТ, что даёт основания считать их перспективным средством направленной доставки противораковых средств.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования ИБГ РАН и Программы развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 17–14–01304).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Розенкранц А.А., Уласов А.В., Слостникова Т.А. и др. // Биохимия. 2014. Т. 79. № 9. С. 1148–1168.
2. Belting M., Sandgren S., Wittrup A. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2005. V. 57. № 4. P. 505–527.
3. Sobolev A.S. // Front Pharmacol. 2018. 9: 959.
4. Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., et al. // Cancer Res. 2006. V. 66. № 21. P. 10534–10540.
5. Slasnikova T.A., Koumariyanou E., Rosenkranz A.A., et al. // EJNMMI Res. 2012. V.2. № 1. P. 59.
6. Slasnikova T.A., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., et al. // Int. J. Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 467–82.
7. Slasnikova T.A., Rosenkranz A.A., Morozova N.B., et al. // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 12. P. 395–410.
8. Rosenkranz A.A., Slasnikova T.A., Karmakova T.A., et al. // Front Pharmacol. 2018. 9: 1331.
9. Kim D., Yan Y., Valencia C.A., et al. // PLoS One. 2012. V. 7. № 8. P. e43 077.
10. Herbst R.S. // Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004. V. 59. № 2. P. 21–26.
11. Slasnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., et al. // Drug Des. Devel. Ther. 2017. V. 11. P. 1315–1334.
12. Lo H.W., Ali-Sayed M., Wu Y., et al. // J. Cell Biochem. 2006. V. 98. № 6. P. 1570–1583.

## NEW RECOMBINANT CARRIERS BINDING SPECIFICALLY TO THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR

**T. S. Karyagina<sup>a</sup>, A. V. Ulasov<sup>a</sup>, A. A. Rosenkranz<sup>a,b</sup>, T. A. Slastnikova<sup>a</sup>, Y. V. Khrantsov<sup>a</sup>,  
T. N. Lupanova<sup>a</sup>, Academician of the RAS G. P. Georgiev<sup>a</sup>, and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev<sup>a,b,#</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>b</sup> *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup> *e-mail: sobolev@igb.ac.ru; alsobolev@yandex.ru*

The new recombinant carriers – modular nanotransporters (MNT) – with N-terminal ligand module to the epidermal growth factor receptor (EGFR) were developed. Human epidermal growth factor (hEGF) and antibody-like protein Z<sub>1907</sub> were used as the ligand module. We demonstrated that the MNT are able to internalize in a receptor-specific manner into the target cancer cells and to accumulate in the target cell nuclei. Conjugation the MNT with Auger electron emitter <sup>111</sup>In significantly enhanced cytotoxic effect of <sup>111</sup>In on the target cells. It was found that the transfer of EGF from the C-terminus to the N-terminus of the MNT enhanced the proliferation of target cells, while the use of Z<sub>1907</sub> did not lead to the similar effect.

*Keywords:* modular nanotransporters, targeted delivery, Z<sub>1907</sub>, EGF, nuclear delivery