

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ, ХИРУРГИИ, РОБОТОТЕХНИКЕ

БИОКОНЬЮГАТЫ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO* И *IN VIVO*

Здобнова Т.А.^{1,2}, Стремовский О.А.¹, Балалаева И.В.^{2,3}, Деев С.М.¹

¹ ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

² Институт прикладной физики РАН,

³ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия
Москва, Россия

Введение. Целью работы было создание специфически связывающихся с опухолевыми клетками флуоресцентных конструкций, применимых для ранней диагностики онкологических заболеваний.

Полупроводниковые нанокристаллы или «квантовые точки» (QD) – флуорофоры, обладающие некоторыми интересными физико-химическими свойствами и перспективные для использования в методах молекулярной диагностики. Для их направленной доставки к определенным мишеням успешно используют антитела.

Получение флуоресцентных комплексов направленного действия. Для связывания QD с антителами была использована система модулей барназа-барстар, описанная нами ранее [1]. Барназа и барстар – небольшие белки бактериального происхождения (12 and 10 кД), обладающие высоким сродством друг к другу ($K_d \sim 10^{-14}$ М). Конъюгация одного из этих белков с QD, а другого – с различными антителами позволяет создавать флуоресцентные комплексы с разной специфичностью. В этом контексте, модуль барназа-барстар аналогичен стрептавидин-биотиновой системе [2].

Специфичность действия таких комплексов была продемонстрирована на примере клеток, гиперэкспрессирующих на своей поверхности онкомаркер HER2/neu. В качестве направляющего агента был использован рекомбинантный белок, состоящий из анти-HER2/neu мини-антитела 4D5 scFv и барназы. Ранее нами было показано, что такие молекулы эффективно связываются с внешним доменом HER2/neu [1, 3]. Квантовые точки с максимумом флуоресценции в ближней инфракрасной области спектра (Invitrogen) были конъюгированы с барстаром с использованием EDC в качестве сшивающего реагента. Было показано, что барстар и нанокристаллы сохранили свои физико-химические свойства и активность после конъюгации. Полученные конъюгаты образовывали самособирающиеся комплексы с рекомбинантным белком 4D5scFv-барназа.

Визуализация *in vitro*. Полученные флуоресцентные конструкции [4D5 scFv-барназа-барстар-QD] эффективно окрашивали поверхность клеток карциномы молочной железы человека SKBR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu (Рис. 1, А). После инкубации этих же клеток с конъюгатами QD-барстар

характерное свечение на поверхности клеток было на уровне шума или отсутствовало. Только небольшой сигнал или его отсутствие, свидетельствующие о специфичности действия полученной системы, наблюдались после инкубации HER2/neu-отрицательных клеток CHO с направленными комплексами [4D5 scFv-барназа-барстар-QD].

Визуализация *in vivo*. Для исследования возможности визуализации опухолей с помощью полученных направленных комплексов в организме *in vivo* были использованы иммунодефицитные мыши линии nu/nu. Мыши с модельной опухолью молочной железы человека были получены после

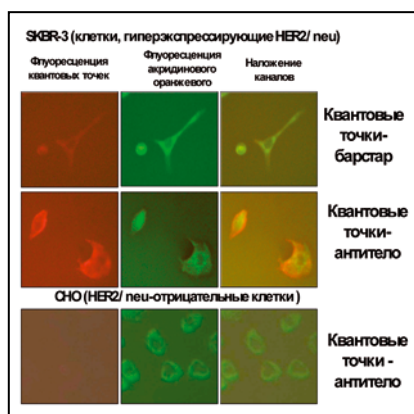


Рис. 1. Визуализация опухолевых клеток *in vitro*. Опухолевые клетки были инкубированы с неспецифическими конъюгатами QD-барстар и с направленным комплексом на основе QD и мини-антител 4D5 scFv. Клетки были дополнительно контрастированы Акридиновым оранжевым.

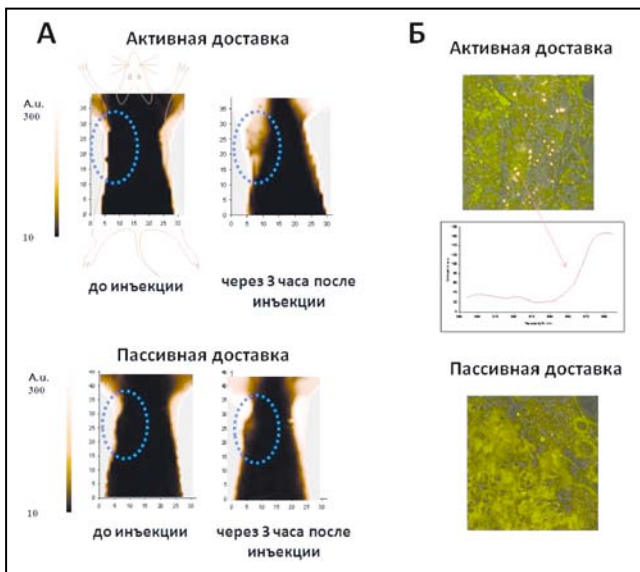


Рис. 2. Визуализация опухолей в организме *in vivo*. А – ФДТ-изображения мышей-опухоленосителей до и через 3 часа после введения направленных комплексов (активная доставка) и ненаправленных QD (пассивная доставка). Пунктирной линией показана область опухоли. Б – конфокальная микроскопия опухолевой ткани *post mortem* через 3 часа после введения направленных комплексов (активная доставка) и ненаправленных QD (пассивная доставка).

подкожной имплантации клеток SKBR-3. Комплексы квантовых точек с антителами (0.14 нмоль в 100 мкл PBS) вводили в хвостовую вену. Особям контрольной группы вводили квантовые точки без антитела в той же концентрации. Для получения прижизненного изображения животных использовали установку для флуоресцентной диффузионной томографии (ФДТ) разработанную в Институте Прикладной Физики РАН (г. Н. Новгород).

Через три часа после инъекции конъюгатов квантовых точек с антителами наблюдался значительный флуоресцентный сигнал в районе опухоли (рис. 2, А, активная доставка). Результаты флуоресцентной микроскопии подтвердили, что этот сигнал обусловлен накоплением квантовых точек в опухолевых клетках (рис.2, Б, активная доставка). Ненаправленные квантовые точки также частично аккумулировались в опухоли за счет так называемого EPR эффекта (Enhanced Permeability and Retention effect), однако наблюдаемый в этом случае флуоресцентный сигнал был заметно ниже (рис. 2, пассивная доставка).

Заключение. Были созданы флуоресцентные комплексы направленного действия на основе квантовых точек и противораковых мини-антител и показано их эффективное использование для визуализации опухолевых клеток, экспрессирующих онкомаркер HER2/neu, как *in vitro*, так и *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. S.M. Deyev, R. Waibel, E. N. Lebedenko, A. P. Schubiger, A. Pluckthun, «Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module», *Nat. Biotechnol.* 21 (12), 1486-1492 (2003)
2. S. M. Deyev and E. N. Lebedenko, «Multivalency: the hallmark of antibodies used for optimization of tumor targeting by design» *Bioessays.* 30(9), 904-918 (2008)
3. E.N. Lebedenko, T.G. Balandin, E.F. Edelweiss, O. Georgiev, E.S. Moiseeva, R.V. Petrov, S.M. Deyev, «Visualization of cancer cells by means of the fluorescent EGFP-barnase protein». *Dokl Biochem Biophys.* 414, 120-123 (2007)
4. T. A. Zdobnova, S. G. Dorofeev, P. N. Tananaev et al. «Fluorescent immunolabeling of cancer cells by quantum dots and antibody scFv fragment». *J. Biomed. Opt.* 14, 021004 (2009)