



УДК 457.083.3:577.34

## ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЙ ИММУНОФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР

© 2011 г. Е. О. Серебровская<sup>#</sup>, О. А. Стремовский, Д. М. Чудаков, К. А. Лукьянов, С. М. Деев*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 21.07.2010 г. Принята к печати 29.07.2010 г.

Конъюгаты антител и фотосенсибилизаторов успешно применяются для специфического устранения раковых клеток, несущих определенные поверхностные маркеры, с помощью методики, называемой фотоиммунотерапией. Однако химическая конъюгация фотосенсибилизаторов и антител всегда представляет ряд трудностей. Среди них плохая воспроизводимость, агрегация и наличие примесей неконъюгированного фотосенсибилизатора. В данной работе мы представляем метод создания полностью генетически кодируемых иммунофотосенсибилизаторов, содержащих в качестве нацеливающей молекулы анти-HER2/neu-мини-антитело 4D5scFv, а в качестве фотосенсибилизирующей – фототоксический флуоресцентный белок KillerRed. Оба домена в составе рекомбинантного белка сохранили свои функциональные свойства – высокую аффинность к опухолевому антигену и фототоксические свойства. Рекомбинантный белок 4D5scFv-KillerRed показал хорошую специфичность по отношению к HER2/neu-гиперэкспрессирующим раковым клеткам и эффективно снижал их жизнеспособность при облучении.

*Ключевые слова:* фотоиммунотерапия; фотосенсибилизатор; флуоресцентный белок; мини-антитело; HER2/neu.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач протеомики является изучение воздействия на рецепторы трансформированных клеток специфических белков и создание на их основе средств направленной терапии.

Фотодинамическая терапия является многообещающим подходом к лечению рака благодаря а) отсутствию системной токсичности применяемых веществ в отсутствие облучения светом, б) возможности облучать непосредственно опухоль, не затрагивая окружающие ткани, в) возможности одновременно воздействовать на несколько новообразований и возможности применения повторной терапии для улучшения ответа [1]. При облучении фотосенсибилизатора светом соответствующей длины волны в присутствии кислорода образуются короткоживущие активные формы кислорода, такие, как синглетный кислород  $^1O_2$  или радикальные формы, например,  $OH\cdot$ ,  $O_2\cdot^-$ , которые способны с высокой эффективностью окислять клеточные компоненты вблизи того места, где они были произведены [2]. Для достижения необходимого терапевтического эффекта процедура не должна затрагивать здоровые окружающие ткани, а следовательно, продукция активных форм кислорода должна быть пространственно ограничена опухолевой тканью. Фотодинамическая терапия предоставляет два пути контроля селективности воздействия: а) с помощью преобла-

дающего накопления фотосенсибилизатора в опухоли; б) с помощью пространственно ограниченного облучения. Многие фотосенсибилизаторы при системном введении обладают свойством предпочтительно накапливаться в опухоли, а не в нормальных тканях. Однако такой селективности может быть недостаточно, поскольку при применении эффективных доз пациенты, независимо от успешности лечения, страдают впоследствии от фотосенсибилизации кожных покровов к солнечному свету [3].

Направленные макромолекулярные конъюгаты, использующие специфическую аффинность к поверхностным опухолевым маркерам (узнавание лиганда рецептором или антигена антителом), могут обладать большей специфичностью. В этом случае, фотосенсибилизатор химически присоединяется, например, к моноклональному антителу [4–6]. В частности, для HER2/neu-гиперэкспрессирующих клеток было создано несколько химических конъюгатов фотосенсибилизаторов с анти-HER2/neu-антителами [7, 8]. Основным недостатком химической конъюгации является недостаточная воспроизводимость синтеза конъюгатов [9], а также потеря аффинности антител или эффективности фотосенсибилизатора [10, 11]. Кроме того, химический подход не позволяет использовать такие перспективные пути доставки фотоиммуноконъюгатов, как создание клеточных линий, секретирующих иммуноконъюгаты непосредственно в кровотоки [12].

Недавно был создан фототоксический красный флуоресцентный белок KillerRed [13]. Будучи на

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: 8-916-201-99-50; эл. почта: katiya\_aks@mail.ru).

данный момент единственным полностью генетически кодируемым фотосенсибилизатором, KillerRed может быть использован для создания генетически кодируемого иммунофотосенсибилизатора, нацеленного на бактериальные или опухолевые клетки с помощью мини-антител. Такая гибридная молекула была бы лишена недостатков химических конъюгатов антител и фотосенсибилизаторов. Для клеток млекопитающих наибольшая фототоксичность была обнаружена при экспрессии KillerRed на внутренней стороне плазматической мембраны [14].

Полноразмерное гуманизованное моноклональное антитело 4D5 [15] широко используется в клинической практике (под коммерческим названием Herceptin) и является “золотым стандартом” в иммунотерапии HER2/neu-гиперэкспрессирующих опухолей. Фрагмент этого антитела, содержащий в составе единой полипептидной цепи вариабельные фрагменты тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина (4D5scFv), был с успехом использован для нацеливания различных эффекторных доменов — белковых токсинов, РНКаз и т.д. [16, 17].

Одноцепочечные антитела считаются перспективными терапевтическими молекулами благодаря их высокой проникающей способности, отсутствию побочных реакций, связанных с константными доменами, а также удобству создания рекомбинантных генетических конструкций, например scFv-связанных токсинов, ферментов для активации молекул-предшественников терапевтических веществ. Также существует возможность конструирования мультивалентных и мультиспецифических молекул [18] с помощью димеризующих доменов различной природы. Антитело 4D5 отличается высокой термодинамической стабильностью и способностью к фолдированию, благодаря чему оно было неоднократно использовано как каркас длястройки различных антигенсвязывающих участков [19].

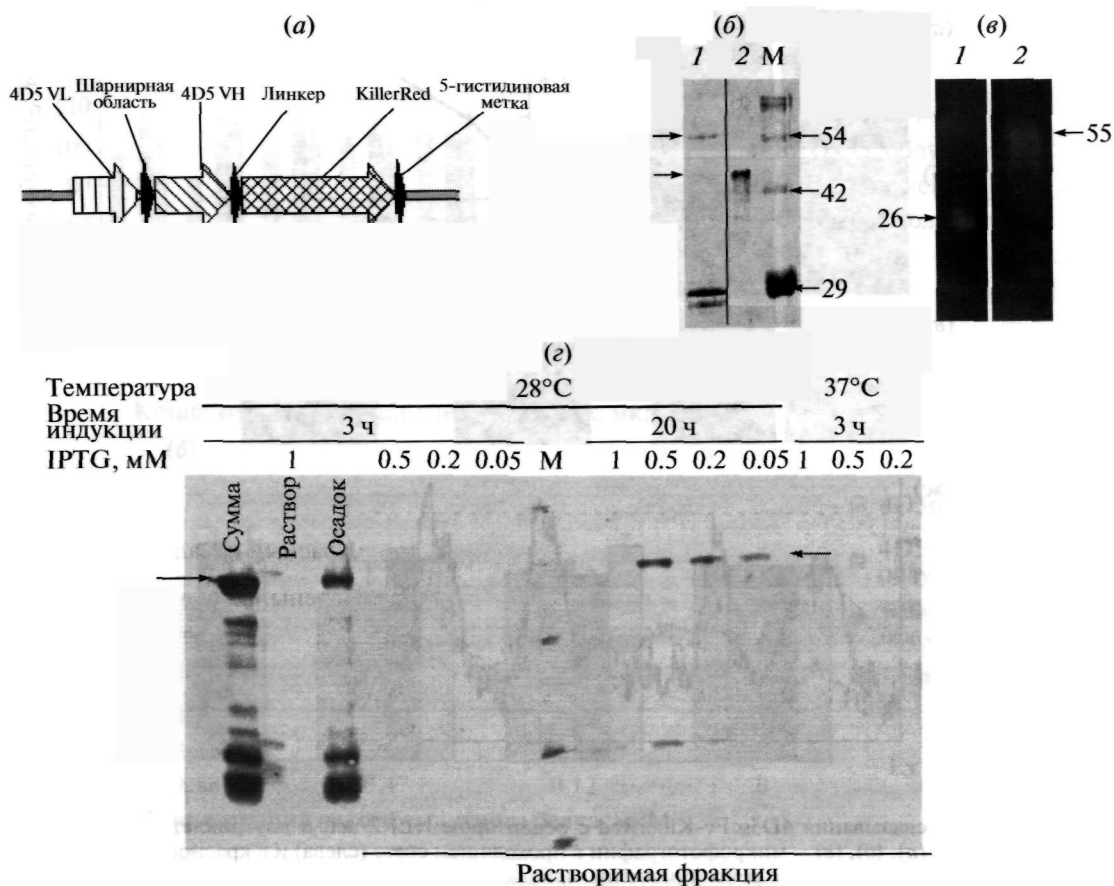
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе данной работы был впервые создан полностью генетически кодируемый иммунофотосенсибилизатор, содержащий в составе единой полипептидной цепи анти-HER2/neu-мини-антитело 4D5scFv и фототоксичный флуоресцентный белок KillerRed. Одноцепочечные мини-антитела (scFv) хорошо подходят для использования в качестве нацеливающих молекул при селективной доставке и имеют ряд преимуществ перед полноразмерными антителами благодаря меньшему размеру и легкости создания на их основе гибридных генетических конструкций [20, 21]. На основании имеющихся данных о структуре используемых белков, оптимальным для сохранения всех свойств KillerRed является присоединение мини-антитела к N-концу флуоресцентного белка. С одной стороны, это позволяет сохранить свободным N-конец мини-антитела, необходимый для сохранения его функциональных

свойств [17]. С другой стороны, KillerRed является облигатным димером и N-концы двух молекул в составе димера отстоят друг от друга на значительное расстояние (порядка 60 Å), в то время как C-концы находятся в непосредственной близости друг от друга. Последнее говорит о том, что присоединение мини-антитела к C-концу KillerRed привело бы к пространственным затруднениям, могущим помешать правильному фолдированию молекул мини-антитела. В то же время хорошо известно, что мультимеризация одноцепочечных мини-антител увеличивает их аффинность и понижает скорость диссоциации с поверхности клетки [20].

Таким образом, фрагмент антитела 4D5scFv был присоединен при помощи гексадекапептидного линкера к N-концу KillerRed (рис. 1а). Полученный в результате белок 4D5scFv-KillerRed массой 55 кДа был продуцирован в *E. coli*. Для максимального выхода растворимого белка были оптимизированы следующие параметры: штамм *E. coli*, температура и концентрация (рис. 1з). В результате выход очищенного белка в клетках штамма SB536 после очистки с помощью никель-аффинной хроматографии и гель-фильтрации составил 0.3–0.5 мг с литра жидкой культуры (рис. 1б, в). Образцы очищенных белков подвергали гелеэлектрофорезу либо без предварительного прогревания, либо после прогревания при 95°C в течение 5 мин (рис. 1б, дорожки 1, 2). При прогревании красные флуоресцентные белки с DsRed-подобным хромофором часто демонстрируют частичную фрагментацию, причем точка разрыва находится вблизи хромофора [22, 23]. Этот известный эффект наблюдается также для 4D5scFv-KillerRed и выражается в появлении дополнительных полос соответствующих молекулярной массе 31 (4D5scFv вместе с C-концевым фрагментом KillerRed) и 24 кДа (N-концевой фрагмент KillerRed).

Флуоресцентная спектроскопия рекомбинантного белка показала неизменность спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции (данные не представлены). Связывание 4D5scFv-KillerRed с антигеном HER2/neu исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Как показано на рис. 2а, очищенный рекомбинантный белок 4D5scFv-KillerRed эффективно накапливался на поверхности HER2/neu-гиперэкспрессирующих клеток аденокарциномы яичника SKOV-3 после часовой инкубации при +4°C. В то же время накопления не наблюдалось для клеток CHO, не гиперэкспрессирующих HER2/neu (рис. 2б). Для определения внутриклеточной локализации рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed после эндоцитоза проводили коинкубацию с флуоресцентно меченным эпидермальным фактором роста, для которого ранее показана локализация в лизосомах через 20 мин инкубации при 37°C [24]. На приведенных микрофотографиях (рис. 2д, е) наблюдается частичная колокализация флуоресценции KillerRed (рис. 2д) и



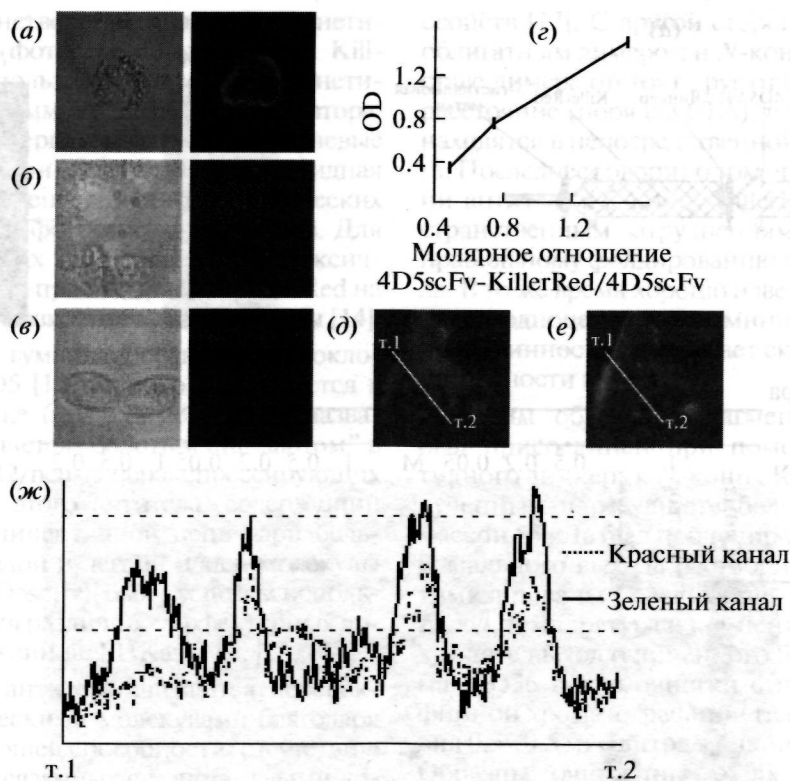
**Рис. 1.** Экспрессия и очистка белка 4D5scFv-KillerRed. (а) Схема генетической конструкции для экспрессии рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed. 4D5 VL, 4D5 VH – варибельные домены тяжелой и легкой цепи антитела 4D5scFv соответственно; (б) Вестерн-блот-анализ очищенного препарата 4D5scFv-KillerRed с антителами к His<sub>5</sub>-метке после электрофоретического разделения в SDS-PAGE прогретого (дорожка 1) и непрогетого (дорожка 2) образцов белка; М – маркеры молекулярных масс, кДа; (с) SDS-PAGE-электрофореграмма препарата 4D5scFv-KillerRed SDS-PAGE непрогетого образца, красная флуоресценция; (д) подбор условий для экспрессии 4D5scFv-KillerRed (температура, время индукции, концентрация IPTG). Стрелками указан целевой белок. Сумма – суммарный лизат клеток. Раствор – фракция растворимых белков в лизате клеток-продуцентов (супернатант после центрифугирования суммарного лизата). Осадок – фракция нерастворимых белков в лизате клеток (осадок после центрифугирования суммарного лизата).

EGF-Oregon Green (рис. 2е). Колокализация подтверждается профилями распределения интенсивности флуоресценции вдоль линии между точками 1 и 2 на рис. 2ж. Полученные данные позволяют предположить, что в результате эндоцитоза через 20 мин инкубации при 37°C некоторая часть рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed локализуется в клеточных лизосомах, при этом KillerRed сохраняет способность флуоресцировать, что косвенно указывает также на возможность сохранения его фототоксических свойств внутри лизосомального компартмента. Свободный KillerRed не демонстрирует существенного связывания с клетками SKOV-3 (рис. 2б).

Специфичность связывания определяли также с помощью ИФА с очищенным HER2/neu-антигеном (рис. 2з). Связывание 4D5scFv-KillerRed снижалось примерно в 4 раза при добавлении конкурирующего агента в виде свободного мини-антитела 4D5scFv в

молярном соотношении 1 : 2 (рекомбинантный белок – антитело).

Для определения специфической фототоксичности 4D5scFv-KillerRed использовали спектрофотометрический МТТ-тест жизнеспособности HER2/neu-гиперэкспрессирующих клеток SKOV-3. К культуре клеток добавляли рекомбинантный белок 4D5scFv-KillerRed в нескольких разведениях, а затем, после часовой инкубации при +4°C и 10 мин облучения белым светом (мощность облучения приблизительно 1 Вт/см<sup>2</sup>), определяли жизнеспособность с помощью МТТ-теста (через 72 ч после облучения) в сравнении с необработанными клетками. Как показано на рис. 3а, обработка 4D5scFv-KillerRed приводила к специфическому снижению жизнеспособности SKOV-3-клеток (LD<sub>50</sub> = 0.5 мкМ). В то же время клетки, не гиперэкспрессирующие HER2/neu, не снижали жизнеспособности



**Рис. 2.** Специфичность связывания 4D5scFv-KillerRed с рецептором HER2/neu и внутриклеточное распределение белка после эндоцитоза. (а), (б), (с) – микрофотографии в проходящем свете (слева) и в красном канале флуоресценции (справа) клеток после инкубации с рекомбинантными белками: (а) – клетки SKOV-3, белок 4D5scFv-KillerRed; (б) – клетки SKOV-3, белок KillerRed; (с) – клетки CHO, белок 4D5scFv-KillerRed; (з) – конкурентный ИФА с различными концентрациями 4D5scFv в качестве конкурирующего агента; (д), (е), (ж) – анализ внутриклеточного распределения белка 4D5scFv-KillerRed после эндоцитоза; (д) – конфокальная микрофотография в красном (4D5scFv-KillerRed) канале флуоресценции; (е) – конфокальная микрофотография в зеленом (EGF-Oregon Green) канале флуоресценции; (ж) – профиль распределения интенсивности зеленой и красной флуоресценции вдоль линии, соединяющей точки 1 и 2 на панелях д и е.

способность при подобной обработке (рис. 3а). Кроме того, свободное антитело и свободный KillerRed также не оказывали существенного воздействия на жизнеспособность клеток (рис. 3б).

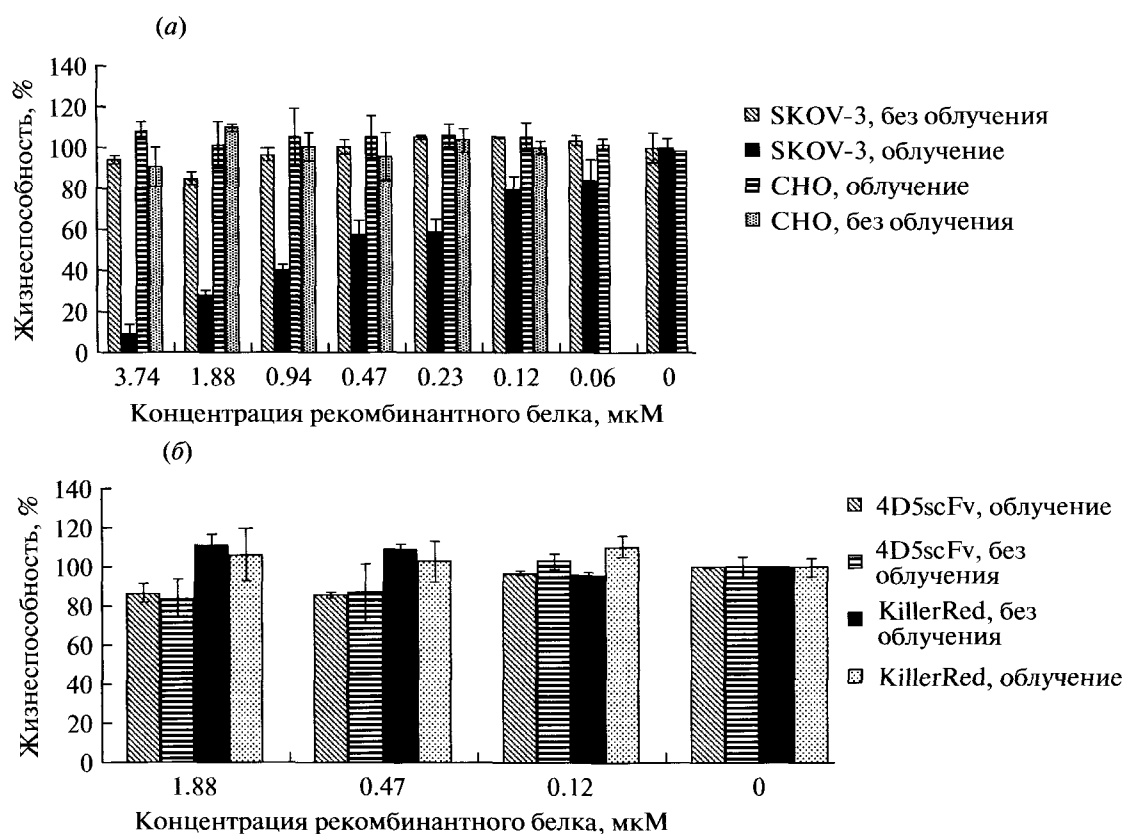
Гиперэкспрессия HER2/neu в опухолях груди и яичников человека коррелирует с плохим прогнозом [25], поэтому именно HER2/neu-антиген – привлекательная мишень для направленной терапии. Было создано несколько вариантов антител, специфичных к внеклеточному домену рецептора HER2/neu, которые демонстрировали значительное ингибирование роста различных опухолей как *in vitro*, так и *in vivo* [25]. Однако, поскольку HER2/neu экспрессируется также в эпителиальных тканях, например, в коже, печени и сосудистом эндотелии, при использовании анти-HER2/neu-иммунотоксинов возникают побочные эффекты, затрагивающие нормальные ткани.

Рекомбинантный белок 4D5scFv-KillerRed должен в меньшей степени вызывать подобные эффекты, поскольку цитотоксический эффект в данном случае ограничен зоной облучения. Кроме того, в

отличие от химической конъюгации, генетический метод получения данной молекулы позволяет точно определить структуру связи и молярное соотношение между фотосенсибилизатором и антителом, а также легко продуцировать молекулу в бактериях без участия каких-либо кофакторов.

Известны фотосенсибилизаторы двух типов: участвующие в фотореакциях типа I и II [26]. В реакциях типа I первичным этапом является фотоиндуцированный перенос электрона с подходящей молекулы на фотосенсибилизатор, который затем взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием супероксид-анион-радикала  $O_2^{\cdot-}$ . При фотореакции второго типа происходит прямой перенос энергии с возбужденного фотосенсибилизатора на кислород с образованием синглетного кислорода. Последний является хорошим индикатором, позволяющим различать реакции I- и II-типа.

Согласно Вентворту и соавт. [27], антитела также способны катализировать реакцию окисления воды в пероксид водорода с помощью молекул синглетного кислорода. Таким образом, будь



**Рис. 3.** Фототоксичность 4D5scFv-KillerRed. (а) – Воздействие 4D5scFv-KillerRed на клетки SKOV-3 и CHO при облучении и в отсутствие облучения; (б) – воздействие свободного антитела 4D5scFv и свободного KillerRed на клетки SKOV-3 при облучении и в отсутствие облучения (контроль).

KillerRed фотосенсибилизатором второго типа, следовало бы ожидать проявления синергизма между 4D5scFv и KillerRed. Однако, согласно приведенным данным, реакция второго типа не характерна для белка 4D5scFv-KillerRed. Кроме того, механизм каталитического окисления воды был показан для полноразмерных антител, а не для scFv-фрагментов [28]. Исходя из этого, мы считаем, что фототоксический эффект полностью обусловлен фототоксичностью KillerRed, а не синергическим действием KillerRed и scFv.

KillerRed обладает более низкой фототоксичностью по сравнению с химическими фотосенсибилизаторами. Следовательно, для достижения достоверного снижения жизнеспособности клеток необходима большая доза облучения. С одной стороны, это является одним из самых существенных недостатков данного метода, который может быть преодолен лишь с помощью создания улучшенных вариантов KillerRed в будущем. С другой стороны, низкий уровень продукции активных форм кислорода может представлять собой некоторое преимущество. Например, в этом случае возможно продуцировать конъюгат в присутствии света и кислорода, что в случае более эффективного фотосенсибилизатора могло бы привести к нарушению функционально-

сти антитела [5]. Кроме того, слишком высокая фототоксичность фотосенсибилизатора может приводить к таким нежелательным побочным эффектам, как некроз окружающих здоровых тканей. Также, при использовании химических фотосенсибилизаторов часто наблюдается кожная фототоксичность, и пациентам приходится избегать солнечного света в течение длительного времени после облучения [5]. Появление таких проблем в случае KillerRed маловероятно, поскольку в этой системе только сильное облучение может вызвать существенное повреждение клеток.

Наши результаты демонстрируют эффективное уничтожение клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 после инкубации с рекомбинантным анти-HER2/неу-иммунотоксином 4D5scFv-KillerRed и последующего облучения белым светом. Представляет интерес проверка аналогичных конструкций, созданных на основе рекомбинантных антител, узнающих другие виды раковых клеток человека [29]. В перспективе представляется возможной разработка вирусных систем доставки в опухоль [30], которая должна будет обеспечить продукцию генетически кодируемого иммунофотосенсибилизатора непосредственно внутри опухоли.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Создание генетической конструкции и экспрессия гена 4D5scFv-KillerRed.** Генно-инженерные манипуляции, культивирование клеток и их лизис производили в соответствии со стандартными протоколами. Фрагмент ДНК, кодирующий белок KillerRed, амплифицировали с помощью праймеров (5'–3'):

ATCTATGGCGCGCTGCCTATGGGTTTCAGAGGGCGG – (жирным шрифтом выделен сайт узнавания рестрикционной эндонуклеазы BssHI) и ATCATAGGCGCGCCATCCTCGTTCGCTACCGATG (жирным шрифтом выделен сайт узнавания рестрикционной эндонуклеазы BssHI и AscI), используя в качестве матрицы плазмиду KillerRed-N (Евроген, Россия), содержащую ген *KillerRed*. Продукт амплификации был обработан BssHI и встроен по сайтам AscI в вектор pSD-4D5scFv-barnase [17] вместо гена барназы.

Для получения рекомбинантного белка клетки *E. coli* штамма SB536 или BL21(DE3) трансформировали плазмидой pSD-4D5scFv-KillerRed и культивировали в среде LB с ампициллином в течение ночи. Затем полученные инокуляты высевали в колбы объемом 2 л и культивировали при интенсивном помешивании. Оптимальные условия продукции рекомбинантного белка подбирали путем изменения следующих параметров: температура культивации, оптическая плотность культуры на момент индукции, концентрация индуцирующего агента – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид (IPTG), время индукции. Растворимая фракция белка была получена в виде супернатанта после ультразвукового разрушения бактериальных клеток и центрифугирования в течение 10 мин при 22000 g. Оптимальный выход растворимого белка был достигнут при экспрессии в штамме SB536 при следующих условиях: по достижении оптического поглощения  $A_{550} = 1.2$  культуру индуцировали внесением 0.5 мМ IPTG и культивировали в течение 24 ч при 27°C.

**Очистка рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed.** Клетки осаждали центрифугированием, отмывали фосфатно-солевым буфером (1.7 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.2 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.15 М NaCl), затем осадок ресуспендировали в буфере для разрушения клеток (0.01 М Трис-HCl, 0.01 М  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 0.01 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 М NaCl, 10% глицерин, pH 8.3) и разрушали при помощи ультразвука на льду. Обработка ультразвуком производилась дробно, 5 раз по 30 с, с двухминутным охлаждением на льду в промежутке между обработками. Затем к суспензии добавляли 0.5% Твин-20 и NaCl до конечной концентрации 1.125 М. Полученный лизат центрифугировали при 22000 g при +4°C в течение 20 мин. Затем из полученного лизата выделяли целевой белок, содержащий последовательность из пяти остатков гистидина, с помощью хроматографии на  $\text{Ni}^{2+}$ -НТА-сефарозе (Amersham, США). Белки элюировали раствором имидазола в концентрации 200 мМ, концентрирова-

ли с помощью концентратора Microcon (Millipore, США) с нижней границей удержания 10 кДа.

Белковый состав полученных фракций анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа. В качестве стандартов молекулярной массы были использованы белки 4D5scFv-His<sub>5</sub>, 4D5scFv-Barnase-His<sub>5</sub> и 4D5scFv-dibarnase-His<sub>5</sub> [17] (29, 42 и 54 кДа соответственно). Электрофорез белков в 12% ПААГ проводили в соответствии со стандартным протоколом. Иммуноблот-анализ на мембране Immobilon-P (Millipore, США) осуществляли в соответствии с протоколом производителя, с антителами к 4D5scFv, выделенными в нашей лаборатории, и вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными со щелочной фосфатазой (Sigma, США). Полосы соответствующих белков визуализировали на мембране с использованием хромогенных субстратов нитросинего тетразолия и 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфата.

**Флуоресцентная микроскопия.** Клеточные линии яичников китайского хомячка CHO и аденокарциномы яичника человека SKOV-3 культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с 10% фетальной телячьей сыворотки (HyClone, Бельгия) и 2 мМ L-глутамином (Flow Laboratories, Великобритания) в культуральных флаконах. Для экспериментов по связыванию антител клетки рассеивали в 96-луночные планшеты (Corning, США) до конечной плотности  $4 \times 10^3$  клеток на лунку и культивировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ .

После краткой промывки фосфатно-солевым буфером клетки инкубировали с 1.8 мкМ 4B5scFv-KillerRed или KillerRed (контроль) в течение 1 ч на льду. Микрофотографии были выполнены с помощью ПЗС-камеры AxioCam HRc (Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision (Zeiss, Германия). Конфокальные микрофотографии выполнены с помощью микроскопа TCS SP2 (Leica, Германия).

**Конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ.** Специфичность связывания рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed определяли с помощью конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с использованием свободного антитела 4D5scFv в качестве конкурирующего агента. 96-луночные планшеты (Corning, США) покрывали HER2/neu-антигеном в концентрации 200 нг/мл в течение 16 ч при +4°C в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9.6). Затем планшеты промывали дважды фосфатно-солевым буфером (pH 7.4) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в 5% обезжиренном молоке на фосфатно-солевом буфере, и затем снова промывали. Затем планшеты инкубировали в течение 1.5 ч при комнатной температуре с раствором рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed, разведенного фосфатно-солевым буфером до концентраций 1.5 мкг/мл в смеси с конкурирующим агентом в концентрациях 0.8 и 1.5 мкг/мл, а также в его отсутствие. Затем планшеты трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере с

% Твин-20 и инкубировали с антителами кролика отив KillerRed (1 : 5000 в 1% молоке на фосфатно-соевом буфере) 1.5 ч при комнатной температуре. Гем планшеты снова отмывали и инкубировали 1 ч при комнатной температуре с конъюгатом пероксидазы хрена с антителами козы против иммуноглобулинов кролика (1 : 4000 в 1% молоке на фосфатно-соевом буфере) (Amersham, США). После окончательной отмывки планшеты проявляли в течение 20 мин при комнатной температуре с 0.04% раствором орто-фенилендиамина в 0.05 М цитратном буфере (pH 5.5), содержащем 0.06% пероксида водорода. После инкубации определяли коэффициент поглощения раствора при 492 нм с помощью планшетного ридера MR 580 Microelisa Autoreader (MTP, США).

**Окрашивание клеток с помощью конъюгата эпирмального фактора роста с флуорофором Oregon Green.** Клетки линии SKOV-3 снимали с культуральной посуды без использования трипсина, с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия), определяли количество интактных клеток с помощью подсчета в камере Горяева с окрашиванием трипановым синим и высевали на чашки FluoroDish диаметром 35 мм со стеклянным дном толщиной 0.17 мм (World Precision Instruments, США) в количестве  $\approx 2.5 \times 10^5$  клеток на чашку и культивировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем проводили окрашивание рекомбинантным белком 4D5scFv-KillerRed в концентрации 0.03 г/л в фосфатно-соевом буфере с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки в течение 10 мин на льду. Далее к раствору рекомбинантного белка добавляли конъюгат эпирмального фактора роста с флуорофором Oregon Green 488 (Molecular Probes, США) в концентрации 5 мг/л и инкубировали еще 30 мин на льду. Затем инкубировали 15 мин при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> для интернализации рекомбинантного белка и конъюгата и немедленно проводили микроскопию с помощью конфокального микроскопа Zeiss TCS SP2. Для возбуждения флуоресценции Oregon Green использовали аргоновый лазер с длиной волны излучения 488 нм, для возбуждения флуоресценции KillerRed — гелий-неоновый лазер с длиной волны излучения 543 нм.

**Обработка клеток рекомбинантным белком 4D5scFv-KillerRed и определение их жизнеспособности.** Фотоиндуцированную цитотоксичность рекомбинантного белка в отношении клеточной линии SKOV-3 определяли с помощью метода реакции 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) как описано ранее [31]. Клетки SKOV-3 рассеивали в количестве  $\approx 4.0 \times 10^3$  клеток на лунку 96-луночного планшета, а клетки CHO в количестве  $\approx 6.0 \times 10^3$  клеток (процедура открепления клеток от культуральной посуды производилась без использования трипсина, с помощью раствора Версена (ПанЭко, Россия)) и инкубировали в среде RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сыворотки в течение 18 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем

среду заменяли на раствор рекомбинантного белка 4D5scFv-KillerRed в фосфатно-соевом буфере и инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Далее клетки облучали в течение 10 мин белым светом ( $\approx 1$  Вт/см<sup>2</sup>), фосфатно-соевой буфер заменяли на среду RPMI-1640, и клетки инкубировали еще 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. По прошествии 72 ч клетки отмывали фосфатно-соевым буфером и в течение 1 ч инкубировали в среде RPMI без сыворотки, содержащей 0.5 мг/мл МТТ. Формазан, образующийся в результате восстановления МТТ митохондриальными дегидрогеназами клетки, растворяли в DMSO и измеряли поглощение раствора при 540 нм. Жизнеспособность клеток рассчитывали в процентах от поглощения раствора в лунках, не обработанных 4D5scFv-KillerRed, по результатам экспериментов, проведенных в тройной повторности.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана программами Президиума РАН “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов” и “Молекулярная и клеточная биология”, ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”, грантами РФФИ (№ 09-04-01201-а, 11-04-92471-МНТИ\_а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verma S., Watt G.M., Mai Z., Hasan T. // Photochem. Photobiol. 2007. V. 83. P. 996–1005.
2. Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R. // J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2007. V. 21. P. 39–51.
3. Ell C., Gossner L., May A., Schneider H.T., Hahn E.G., Stolte M., Sroka R. // Gut. 1998. V. 3. P. 345–349.
4. Mew D., Lum V., Wat C.K., Towers G.H., Sun C.H., Walter R.J., Wright W., Berns M.W., Levy J.G. // Cancer Res. 1985. V. 45. P. 4380–4386.
5. van Dongen G.A., Visser G.W., Vrouwenraets M.B. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2004. V. 56. P. 31–52.
6. Del Governatore M., Hamblin M.R., Piccinini E.E., Ugolini G., Hasan T. // Br. J. Cancer. 2000. V. 82. P. 56–64.
7. Savellano M.D., Pogue B.W., Hoopes P.J., Vitetta E.S., Paulsen K.D. // Cancer Res. 2005. V. 65. P. 6371–6379.
8. Kuimova M.K., Bhatti M., Deonarain M., Yahioglu G., Levitt J.A., Stamatii I., Suhling K., Phillips D. // Photochem. Photobiol. Sci. 2007. V. 6. P. 933–939.
9. Staneloudi C., Smith K.A., Hudson R., Malatesti N., Savoie H., Boyle R.W., Greenman J. // Immunology. 2007. V. 120. P. 512–517.
10. Aveline B.M., Hasan T., Redmond R.W. // J. Photochem. Photobiol. B. 1995. V. 30. P. 161–169.
11. Vrouwenraets M.B., Visser G.W., Stigter M., Oppelaar H., Snow G.B., van Dongen G.A. // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 1970–1975.
12. Wang T., Zhao J., Ren J.L., Zhang L., Wen W.H., Zhang R., Qin W.W., Jia L.T., Yao L.B., Zhang Y.Q., et al. // Cancer Res. 2007. V. 67. P. 11830–11839.

13. *Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanush-evich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A.* // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 95–99.
14. *Bulina M.E., Lukyanov K.A., Britanova O.V., Onich-tchouk D., Lukyanov S., Chudakov D.M.* // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 947–953.
15. *Shalaby M.R., Shepard H.M., Presta L., Rodrigues M.L., Beverley P.C., Feldmann M., Carter P.* // *J. Exp. Med.* 1992. V. 175. P. 217–225.
16. *Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e2434.
17. *Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Pluckthun A.* // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1486–1492.
18. *Carter P., Merchant A.M.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997. V. 8. P. 449–454.
19. *Willuda J., Honegger A., Waibel R., Schubiger P.A., Stahel R., Zangemeister-Wittke U., Pluckthun A.* // *Cancer Res.* 1999. V. 59. P. 5758–5767.
20. *Deyev S.M., Lebedenko E.N.* // *Bioessays.* 2008. V. 30. P. 904–918.
21. *Worn A., Pluckthun A.* // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 305. P. 989–1010.
22. *Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 11990–11995.
23. *Martynov V.I., Maksimov B.I., Martynova N.Y., Pakho-mov A.A., Gurskaya N.G., Lukyanov S.A.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 46288–46292.
24. *Bequino L., Lyall R.M., Willingham M.C., Pastan I.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 2384–2388.
25. *Yarden Y., Sliwkowski M.X.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. P. 127–137.
26. *Rosenthal I., Ben-Hur E.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. V. 67. P. 85–91.
27. *Wentworth P., Jr., Jones L.H., Wentworth A.D., Zhu X., Larsen N.A., Wilson J.A., Xu X., Goddard W.A., 3rd, Janda K.D., Eschenmoser A., et al.* // *Science.* 2001. V. 293. P. 1806–1811.
28. *Datta D., Vaidehi N., Xu X., Goddard W.A., 3rd.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 2636–2641.
29. *Деев С., Лебедеико Е.* // *Acta Naturae.* 2009. T. 1. C. 32–50.
30. *Yu Y.A., Shabahang S., Timiryasova T.M., Zhang Q., Beltz R., Gentshev I., Goebel W., Szalay A.A.* // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 313–320.
31. *Hall T.J., Heckel C.* // *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1990. V. 67. P. 293–296.

## Genetically Encoded Photoimmunosensitizer

E. O. Serebrovskaya\*, O. A. Stremovsky, D. M. Chudakov, K. A. Lukyanov, and S. M. Deyev

\*Phone: 8-916-201-99-50; e-mail: katya\_akts@mail.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997*

Photosensitizer-antibody conjugates are successfully used for targeted elimination of cancer cells bearing specific membrane markers. This method is known as photoimmunotherapy. However, chemical conjugation of photosensitizer and antibody poses a number of complications such as low reproducibility, aggregation and unconjugated photosensitizer impurities. Here we report a fully genetically encoded photoimmunosensitizer, consisting of an anti-HER2/neu miniantibody 4D5scFv and a phototoxic fluorescent protein KillerRed. Both domains in this photoimmunosensitizer retained their functional qualities – high affinity for HER2/neu antigen and phototoxicity respectively. 4D5scFv-KillerRed fusion protein showed high specificity for HER2/neu-over-expressing cells and effectively lowered their viability upon illumination.

*Key words: photoimmunotherapy; photosensitizer; fluorescent protein; miniantibody; HER2/neu.*

---

Сдано в набор 09.09.2010 г.	Подписано к печати 18.11.2010 г.	Формат бумаги 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>
Цифровая печать	Усл. печ. л. 18.0	Уч.-изд. л. 18.0
	Тираж 169 экз.	Бум. л. 9.0
	Усл. кр.-отг. 3.1 тыс.	Зак. 911

---

Учредители: Российская академия наук,  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

---

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90  
Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”  
Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099, Москва, Шубинский пер., 6