



УДК 577.112.7:616-006

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ<sup>1</sup>

© 2015 г. С. М. Деев\*, \*\*, Е. Н. Лебеде́нко\*., #

\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

Поступила в редакцию 01.04.2015 г. Принята к печати 25.04.2015 г.

В мини-обзоре суммированы данные работ за последние 5 лет по созданию универсальной модульной платформы, предназначенной для конструирования супрамолекулярных агентов для терапостики, на примере мультифункциональных гибридных агентов для визуализации и уничтожения раковых клеток. Описано применение адаптерной белковой системы барназа:барстар для получения адресных мультифункциональных гибридных структур на основе высокоспецифичных пептидов и мини-антител в качестве нацеливающих модулей и рекомбинантных белков и/или наночастиц различной природы (квантовые точки, нанозолото, магнитные частицы, наноалмазы, апконвертирующие нанофосфоры, полимерные наночастицы) в качестве модулей, обеспечивающих визуализацию и различные виды повреждающего воздействия на раковые клетки. Рассмотрены перспективы создания селективных и высокоэффективных соединений для терапостики и персонализированной медицины.

*Ключевые слова:* наноразмерные частицы, надмолекулярные биосовместимые комплексы, адаптерный модуль барназа:барстар, визуализация, опухолевые клетки.

DOI: 10.7868/S013234231505005X

ТЕРАНОСТИКА КАК НОВАЯ СТРАТЕГИЯ  
В МЕДИЦИНЕ

Терапостика — дисциплина, которая объединяет диагностику заболевания и персонализированное лечение пациента с улучшенной эффективностью и безопасностью. Она возникла в последнее десятилетие как новая стратегия в медицине в ответ на колоссальный прогресс в трех не слишком близких областях — исследовании молекулярных механизмов заболеваний, совершенствовании приборов и агентов для получения изображений и визуализации биологических объектов и технологии создания новых наноматериалов. Именно тесное сотрудничество исследователей в этих областях определяет дальнейшее развитие нового направления биомедицинских исследований — терапостики.

<sup>1</sup> Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VII Российском симпозиуме “Белки и пептиды”; Новосибирск, 12–17 июля 2015 г.

Сокращения: АСББ — адаптерная система барназа:барстар, КТ — квантовые точки, ЛНА — люминесцентные наноалмазы, ММЧ — магнитные микрочастицы, МНЧ — магнитные наночастицы, НАФ — наноразмерные антистоксовы фосфоры (или антистоксовы нанофосфоры), 4D5scFv — одноцепочечный переменный фрагмент антитела 4D5, ETA — бактериальный экзотоксин А, HER2/neu — трансмембранный клеточный рецептор из семейства тирозинкиназных рецепторов ErbB человека (HER1–4).

# Автор для переписки (тел.: +7 (926)-241-70-30, e-mail: elebedenko@mail.ru).

Выяснение молекулярных механизмов заболеваний и поиск молекулярных мишеней для их диагностики и лечения — важнейшая область исследований, которая входит составной частью в терапостику и делает ее именно медицинской стратегией. Повышение эффективности терапевтического воздействия на патологический очаг и безопасности для здоровых тканей в большой степени зависит от правильного выбора молекулярной мишени и селективности воздействия на нее. Такой подход применим для диагностики и лечения различных видов заболеваний, таких как онкологические, аутоиммунные, сердечнососудистые, и представляется особенно актуальным в области онкологии. Действительно, за последние два десятилетия подробно изучена сигнальная сеть клетки, активируемая поверхностными рецепторами, выявлены молекулярные механизмы опухолевого перерождения, определены опухолевые маркеры, ассоциированные с конкретными патологиями, установлены молекулярные механизмы воздействия различных агентов на опухолевые клетки. Подробно изучены причины резистентности опухолей к терапевтическому воздействию, в том числе, связанные с особенностями (генотипом) каждого отдельного пациента, а также влияние микроокружения опухоли на развитие патологического процесса и резистентность к терапии [1–3]. При этом стратегическими направлениями в терапии рака становятся определение индивидуального молекулярного профиля заболевания каж-

дого конкретного пациента для персонифицированной терапии и интегральный подход к воздействию на опухоли. В результате основные на мультидисциплинарных технологиях методы диагностики и лечения все более привлекают внимание как альтернатива традиционным методам [1, 4, 5].

Одним из ключевых компонентов тераностики является диагностический имиджинг (визуализация патологических очагов и их мониторинг в процессе лечения) с высокой чувствительностью и молекулярной специфичностью. Разработка методов молекулярного имиджинга способствовала революционным изменениям в традиционной визуализации, позволив осуществлять пространственную и временную характеристику процессов на клеточном и молекулярном уровне [6]. В зависимости от средств (приборов) молекулярного имиджинга и используемых контрастирующих агентов тераностический подход может осуществляться путем имиджинга в процессе планирования лечения, выбора лекарства и его дозы и мониторинга хода лечения.

Развитию тераностики способствовал также значительный прорыв в нанотехнологиях при разработках целого ряда материалов нового вида, представляющих собой частицы различной природы (квантовые точки, нанозолото, магнитные частицы, наноалмазы, апконвертирующие нанофосфоры, полимерные наночастицы) с размерами 1–200 нм и обладающие уникальными физико-химическими характеристиками, не свойственными их аналогам большого размера [7–12]. К таким необычным свойствам наночастиц относятся, например, квантово-размерный эффект в полупроводниковых наночастицах (квантовых точках) [7], суперпарамагнетизм в некоторых оксидных наночастицах [10], поверхностно усиленное Рамановское рассеяние металлических наночастиц (SERS — surface-enhanced Raman scattering, плазмонный резонанс) [9]. Эти уникальные физические свойства значительно расширили возможности молекулярного имиджинга и физического (теплового, оптического, электромагнитного, акустического) воздействия на клетки, а также способствовали разработке новых высокочувствительных и экономичных тераностических агентов [6]. Условно эти агенты можно разделить на следующие виды: оптические (флуоресцентные, фотоакустические, плазмонно-резонансные), магнитные, радиоактивные, рентгеноконтрастные (наночастицы с высокой электронной плотностью) и СВЧ-чувствительные.

Важной особенностью наночастиц является их развитая поверхность с чрезвычайно большой удельной площадью, пригодная для связывания с различными молекулами. Для биомедицинского применения наночастицы, как правило, покрывают полимерами с различными реакционноспособными группами, которые предоставляют широкую возможность интегрировать в наночастицы дополнительные функциональные модули,

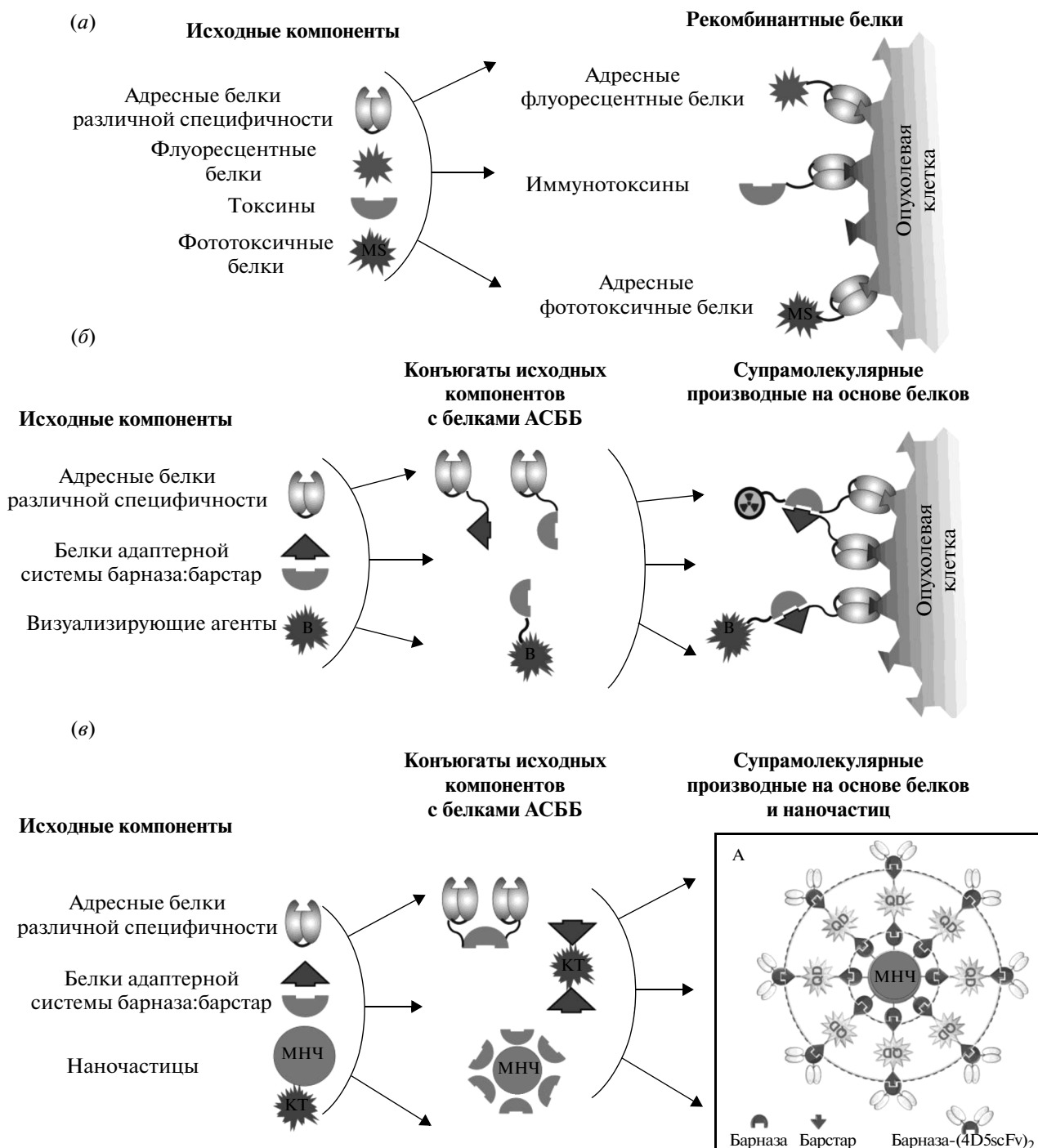
сообщая им новые свойства. Такая функциональная гибкость наночастиц позволяет использовать их в качестве диагностических или терапевтических агентов, а также одновременно в обоих качествах. По сути, дальнейшее развитие тераностики как нового направления в медицине в большой степени зависит от этой гибкости. Для придания наночастицам требуемых функций их конъюгируют с различными биомолекулами, например, с адресными лигандами — для специфического связывания с клетками, с лекарственными средствами — для химиотерапии, с генами — для генной терапии, а также с различными комбинациями таких агентов — для комбинированного воздействия. Большинство тераностических наночастиц — липосомы, мицеллы, нанокомпозиты и др., сконструированы из блоков разнообразного химического состава.

Благодаря своим нанометровым размерам, наночастицы способны проникать в микроциркуляторное русло в организме, а также преодолевать различные биологические барьеры для достижения тканей-мишеней [13]. Размер, поверхностный заряд и гидрофобность наночастиц можно настраивать (регулировать) в процессе получения для минимизации клиренса в почках и печени, увеличения времени циркуляции в кровяном русле и уменьшения потенциальной иммуногенности [14].

Суммируя выше изложенное, можно сказать, что тераностический агент должен одновременно обеспечивать следующие возможности: 1) направленную доставку к молекулярной мишени, 2) визуализацию патологического очага и его прижизненный имиджинг в процессе лечения, 3) эффективное и селективное воздействие на молекулярную мишень.

## ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫЕ ТЕРАНОСТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

Стандартные методы конструирования тераностических агентов основаны на присоединении адресной молекулы к визуализирующему и/или лекарственному компоненту. В случае, когда оба структурно-функциональных модуля представлены белковыми молекулами, они могут быть объединены в единую полипептидную цепь методами генной инженерии. Генно-инженерный подход к конструированию белковых мультифункциональных тераностических агентов позволяет преодолевать целый ряд существенных недостатков традиционных методов химической конъюгации белков: недостаточную воспроизводимость и непостоянство состава конъюгатов, возможное снижение аффинности антитела или эффективности действия токсина, а также наличие примесей неконъюгированных антител и токсина в конечном продукте. Еще одним преимуществом рекомбинантных тераностических агентов является возможность их применения либо в виде белка [15], который может быть наработан в препаративных масштабах в



**Рис. 1.** Схема универсальной модульной платформы для конструирования адресных мультифункциональных гибридных структур для терагностики: мультифункциональных рекомбинантных белков (а), супрамолекулярных комплексов на основе белков (б) и гибридных супрамолекулярных комплексов на основе белков и наночастиц (в).

биотехнологических системах экспрессии, либо в виде генов для генотерапии [16], доставляемых в опухоль, например, с помощью вирусных систем.

В рамках этого подхода для воздействия на опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие поверхностный маркер HER2/neu, были сконструированы два иммунотоксина [17, 18] и два полностью

генетически кодируемых иммунофотосенсибилизатора [19, 20] (рис. 1). Действующим компонентом в этих бифункциональных рекомбинантных белках являются токсичные белки с разным механизмом действия: соответственно, бактериальная рибонуклеаза барназа [21], фрагмент псевдомонадного экзотоксина А [22], флуоресцентные фототоксич-

ные белки Killer Red [23] и miniSOG [24], а роль адресного компонента выполняет мини-антитело 4D5scFv, специфичное к опухолевому маркеру HER2/neu [25].

Трансмембранный клеточный рецептор HER2/neu (англ., human epidermal growth factor receptor 2) относится к семейству тирозинкиназных рецепторов ErbB и является одним из наиболее изученных опухолевых маркеров, а также успешно апробированной мишенью таргетной терапии. Гиперэкспрессия этого маркера коррелирует, как правило, с метастазированием и плохим прогнозом для пациента. Мини-антитело 4D5scFv представляет собой соединенные в единый полипептид вариабельные домены антитела 4D5, лежащего в основе широко применяемого в медицинской практике противоопухолевого препарата Herceptin<sup>®</sup>, предназначенного для лечения пациентов с повышенной экспрессией онкомаркера HER2.

В качестве токсического модуля использован фрагмент PE40 псевдомонадного экзотоксина А (ETA), обеспечивающий элиминацию опухолевых клеток-мишеней за счет блокирования биосинтеза белка. Псевдомонадный экзотоксин А является одним из самых высокотоксичных белковых токсинов, известных на сегодняшний день, на основе которого создан целый ряд иммунотоксинов к различным мишеням, в том числе иммунотоксинов, находящихся на последних стадиях клинических испытаний [26]. Бактериальная рибонуклеаза барназа в качестве токсического модуля характеризуется более мягким действием на клетку и отсутствием системной токсичности. Показано, что сконструированные белковые иммунотоксины **4D5scFv-ETA** и **4D5scFv-барназа** (таблица) селективно действуют на опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие опухолевый маркер HER2/neu, вызывая их гибель посредством различных механизмов в результате рецептор-опосредованной интернализации. В дополнение к этим иммунотоксинам созданы рекомбинантные белки на основе того же адресного мини-антитела и флуоресцентных белков. Такие взаимодополняющие пары и призваны выполнять тераностические функции.

Благодаря использованию флуоресцентных фототоксичных белков Killer Red и miniSOG для создания полностью генетически кодируемых иммунофотосенсибилизаторов **4D5scFv-KillerRed** и **4D5scFv-miniSOG** (рис. 1а; таблица) впервые удалось объединить в единой полипептидной молекуле все три функции, необходимые для тераностического агента: адресную, диагностическую и терапевтическую. Было показано, что сконструированный иммунофотосенсибилизатор **4D5scFv-KillerRed** при облучении специфически поражает клетки аденокарциномы яичника человека SKOV3, гиперэкспрессирующие онкомаркер HER2 [19]. Поскольку оказалось, что белок KillerRed обладает

более низкой фототоксичностью, чем химические фотосенсибилизаторы, была продолжена работа по созданию более эффективной конструкции. Второй полностью генетически кодируемый иммунофотосенсибилизатор **4D5scFv-miniSOG** специфически связывается с клетками аденокарциномы молочной железы SKBR3, гиперэкспрессирующими гистомаркер HER2-neu, и обладает в отношении них высокоспецифичной фотоиндуцированной цитотоксичностью (IC<sub>50</sub> 160 нМ), в 10 раз превышающей цитотоксичность химических конъюгатов порфиринов с анти-HER2/neu-мини-антителами 4D5scFv [20]. Оба иммунофотосенсибилизатора являются, кроме того, флуоресцентными рекомбинантными белками и могут быть использованы для оптической визуализации опухолевых клеток [19, 20].

При необходимости адресные и действующие компоненты в генетически кодируемом тераностическом агенте можно варьировать путем замены соответствующего фрагмента гена. Например, для элиминации патогенных аутореактивных В-клеток был сконструирован бифункциональный иммунотоксин, в котором в качестве действующего агента сохранялась рибонуклеаза барназа, а в качестве адресного компонента вместо противоопухолевых антител был применен спус-эпитоп, избирательно взаимодействующий с рецептором патогенных В-клеток и обуславливающий их гибель в результате рецепторопосредованной интернализации иммунотоксина [27]. В качестве перспективного адресного компонента, альтернативного анти-HER2/neu-мини-антителу, был применен искусственно полученный полипептид DARPIn9-29, принадлежащий к новому классу нацеливающих молекул неиммуноглобулиновой природы, обладающий высокой аффинностью к этому же гистохимическому маркеру [28]. DARPins-белки в качестве адресных молекул обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами. Это белки небольшого размера, что облегчает биохимические манипуляции с ними; они не имеют цистеиновых остатков в своей структуре, поэтому не проявляют тенденции к агрегации и хорошо экспрессируются; эти белки термодинамически стабильны и легче интернализуются.

На основе полипептида DARPIn9-29 в сочетании с красным флуоресцентным белком mCherry дальнекрасного спектра эмиссии [29] был получен визуализирующий агент для качественной и количественной флуоресцентной детекции опухолевых клеток [30]. Белки дальнекрасного спектра эмиссии, к которым относится mCherry, имеют большой потенциал в качестве визуализирующих агентов на моделях животных, так как возбуждаются длинноволновым светом. Спектральные характеристики таких белков позволяют разделять необходимый флуоресцентный сигнал и сигналы аутофлуоресценции ткани благодаря различию их

Гибридные и супрамолекулярные агенты для тераностики

	Агент	Состав, наночастица/белок	Метод сборки	Конъюгирующий агент	Полимерное покрытие	Мультифункциональность			Ссылка
						детекция	воздействие на клетку	адресный компонент/мишень	
1	4D5scFv-барназа	-/барназа+ мАТ	ГИ	-	-	Нет	РНК-аза	4D5scFv/HER2/neu	[17]
2	4D5scFv-ETA	-/ETA + мАТ	ГИ	-	-	Нет	БТ	4D5scFv/HER2/neu	[18]
3	4D5scFv-KillerRed	-/ФТБ + мАТ	ГИ	-	-	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 585 нм	ФДТ	4D5scFv/HER2/neu	[19]
4	4D5scFv-miniSOG	-/ФТБ + мАТ	ГИ	-	-	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 500/528 нм	ФДТ	4D5scFv/HER2/neu	[20]
5	c-тус-барназа	-/барназа + анги-ген	ГИ	-	-	нет	РНК-аза	c-тус/патогенные В-клетки	[27]
6	DARPin-mCherry	-/ФБ + DARPin	ГИ	-	-	ФМ $\lambda_{\text{ем}}$ 610 нм	Нет	4D5scFv/HER2/neu	[30]
7	4D5scFv-барстар: барназа-EGFP	-/ФБ + мАТ	АСББ	-	-	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 508 нм	Нет	4D5scFv/HER2/neu	[35]
8	ММЧ-барназа: (барстар-КТ): барназа-(4D5scFv) <sub>2</sub>	ММЧ + КТ/мАТ	АСББ	EDC, sNHS	Нет	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 605	ГТ, МП	4D5scFv/HER2/neu	[39]
9а			АСББ	EDC	ПМНЧ + ПЭГ ПФНЧ – нет	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 565 нм, $\lambda_{\text{ем}}$ 450/490 нм; ЭМ	ГТ, МП	Нет	[40]
9б	Полимерные мультифункциональные наночастицы	ПМНЧ + ПФНЧ/-	Стрептавидин-биотин	EDC	ПМНЧ + ПЭГ ПФНЧ – нет	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 565 нм, $\lambda_{\text{ем}}$ 450/490 нм; ЭМ	ГТ, МП	Нет	[40]
9в			белок А-IgG	EDC	ПЭГ(ПМНЧ) нет (ПФНЧ)	ФМ, $\lambda_{\text{ем}}$ 565 нм, $\lambda_{\text{ем}}$ 450/490 нм; ЭМ	ГТ, МП	Нет	[40]
10	4D5scFv-дибарназа: барстар-Au	КЗ/мАТ	АСББ	Адсорбция	Нет	ЭМ	ГТ, ПР	4D5scFv/HER2/neu	[41]

Таблица. Окончание

	Агент	Состав, наночастица/белок	Метод сборки	Конъюгирующий агент	Полимерное покрытие	Мультифункциональность			Ссылка
						детекция	воздействие на клетку	адресный компонент/мишень	
11	(4D5scFv) <sub>2</sub> -барназа-барстар-КТ <sub>605</sub>	КТ/МАГ	АСББ	EDC	Полимерное покрытие	ФМ, λ <sub>ем</sub> 605 нм; <i>in vitro</i>	Нет	4D5scFv/HER2/neu	[42, 43]
12	425scFv-барстар-барназа-КТ <sub>565</sub>	КТ/МАГ	АСББ	EDC	Полимерное покрытие	ФМ, λ <sub>ем</sub> 565 нм; <i>in vitro</i>	Нет	425scFv/HER1	[42, 43]
13	(4D5scFv) <sub>2</sub> -барназа-барстар-КТ <sub>705</sub>	КТ/МАГ	АСББ	EDC	Полимерное покрытие	ИК-излучение, λ <sub>ем</sub> 705 нм; <i>in vivo</i>	Нет	4D5scFv/HER2/neu	[44]
14	ЛНА-барстар-барназа-EGFP	ЛНА/ФБ	АСББ	EDC, NHS	Нет	ФМ, λ <sub>ем</sub> 508 нм; <i>in vitro</i>	Нет	Нет	[45]
15	ЛНА-барстар-барназа-коллоидное золото	ЛНА + КЗ/—	АСББ	EDC, sNHS (ЛНА) Адсорбция (КЗ)	Нет	ЭМ	Нет	Нет	[45]
16	НАФ-барстар-барназа-4D5scFv	НАФ/МАГ	АСББ	EDC, sNHS	ПМАО	ФЛМ, λ <sub>ем</sub> 545/665 нм <i>in vitro</i>	Нет	4D5scFv/HER2/neu	[46]

Сокращения, использованные в таблице: АСББ — адаптерная система барназа-барстар; БТ — бактериальный токсин; ГИ — генно-инженерный метод; ГТ — гипертермия; КЗ — коллоидное золото; ЛНА — люминесцентные наноалмазы; МАТ — мини-ангитела; ММЧ — магнитные микрочастицы; МНЧ — магнитные наночастицы; МП — магнитное поле; НА — наноалмазы; НАФ — наноразмерные антистоксовы фосфоры; ПМАО — чередующийся сополимер поли(малеинового ангидрида-1-октадецен); ПМНЧ — полистирольные магнитные наночастицы; ПР — плазмонный резонанс; ПФНЧ — полистирольные флуоресцентные наночастицы; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ФМ — флуоресцентная микрокопия; ФБ — флуоресцентный белок; ФДТ — фотодинамическая терапия; ФТБ — фототоксичный белок; ФЛМ — фотолюминесцентная микрокопия; ЭМ — электронная микрокопия; 4D5scFv — одноцепочечный вариационный фрагмент антитела 4D5; EDC — 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид; EGFP — улучшенный зеленый флуоресцентный белок; (s)NHS — N-гидрокси(сульфо)сукцинимид.

спектральных профилей. Наряду с этим, белок mCherry устойчив к перепадам pH, что делает его перспективным компонентом в составе гибридных белков для конъюгации с наночастицами.

Генно-инженерный подход позволяет получить биотехнологическим способом белковые тераностические агенты постоянного состава, хорошо охарактеризованные физико-химическими и иммуно-химическими методами. Определяющим моментом при конструировании генетически кодируемых мультифункциональных белков является сохранение функций каждого компонента в составе гибридного белка. Эта задача не является тривиальной и требует точного подбора белковых компонентов с учетом особенностей их структуры и заряда, специальных усилий при конструировании и тщательной проверки конечного продукта [25]. Таким образом, создание каждого белкового тераностического агента всегда представляет собой новое самостоятельное исследование.

Одним из решений этой проблемы является создание универсальной модульной платформы, обеспечивающей простоту сборки мультифункциональных комплексов с заранее заданными свойствами из уже имеющегося (готового) набора модулей различной функциональности — направляющих, диагностических, терапевтических. Следует отметить, что полученные рекомбинантные мультифункциональные белки можно использовать как в качестве индивидуальных тераностических агентов, так и в качестве функциональных модулей в составе более сложных гибридных надмолекулярных комплексов, в том числе, на основе наноразмерных частиц различной природы (рис. 1).

#### УНИВЕРСАЛЬНАЯ МОДУЛЬНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ АДРЕСНЫХ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГИБРИДНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ

Для разработки универсальной платформы для конструирования тераностических агентов был предложен принцип самосборки гетеромерных надмолекулярных структур с помощью белковой адаптерной пары барназа:барстар [25, 31], ранее использованной для гетеромультимеризации белков, в частности, для получения би- и тривалентных мини-антител для улучшения фармакокинетики радиоактивного препарата на их основе [25], а также биспецифических антител для комбинированного воздействия на опухолевую клетку [32] (рис. 1). Бактериальная рибонуклеаза барназа и ее природный ингибитор барстар представляют собой белки небольшой молекулярной массы (12.4 и 10 кДа, соответственно), стабильные в широком диапазоне pH и температуры, устойчивые к действию протеаз и низко иммуногенные. Барназа и барстар при взаимодействии образуют прочный

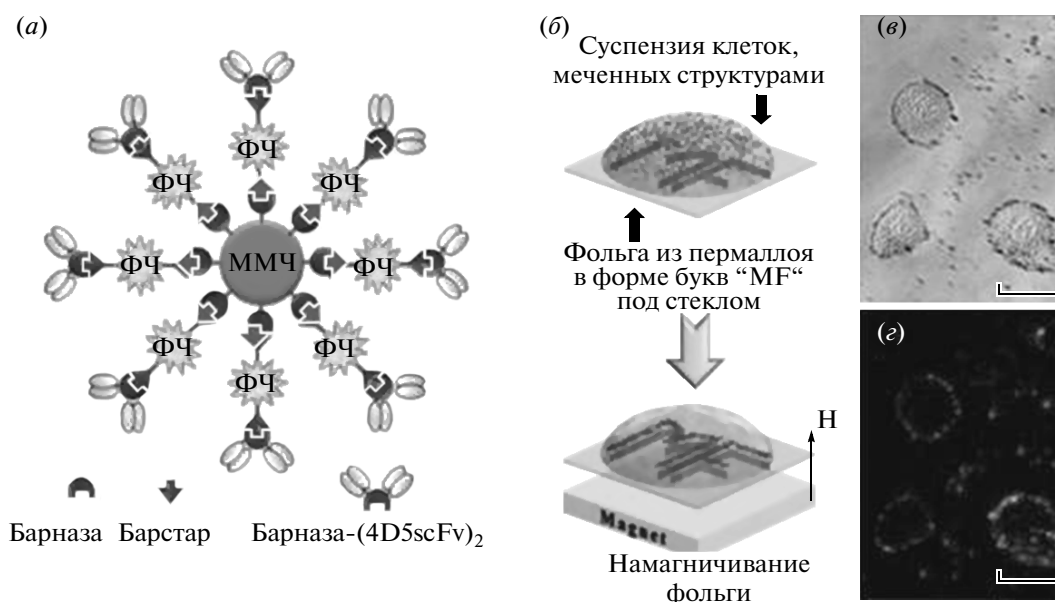
комплекс и характеризуются чрезвычайно быстрой кинетикой (константа скорости образования комплекса  $k_{\text{он}} \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) и высокой аффинностью связывания (константа ассоциации  $K_{\text{ас}} \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ) [33]. У обоих белков N- и C-концевые части локализованы на поверхности белковых глобул вне интерфейса их взаимодействия и доступны для соединения с другими белками в составе рекомбинантных конструкций. Теоретически, предложенная стратегия применима для олигомеризации любых белков, которые без потери функциональности могут быть присоединены к паре барназа:барстар, и является особенно привлекательной для получения гетероолигомерных конструкций, благодаря исключительно высокой специфичности взаимодействия барназы и барстара, практически исключаящей проблемы образования неправильных пар.

Важнейшим преимуществом адаптерной пары барназа:барстар перед другими гетероолигомеризационными системами является также строгое соотношение компонентов 1 : 1 в комплексе и отсутствие их неспецифической агрегации. Кроме того, эти белки обладают и рядом частных свойств, обеспечивающих биотехнологичность применения этого конструкционного модуля и улучшение свойств конструируемых надмолекулярных комплексов. Применение белковой пары барназа:барстар позволяет получать полностью генетически кодируемые бифункциональные белки, при этом в ряде случаев барназа играет роль внутримолекулярного шаперона, обеспечивая правильное сворачивание составных белков, включающих мини-антитела [34].

Адаптерная система барназа:барстар (АСББ) хорошо себя зарекомендовала экспериментально в качестве “молекулярного конструктора” для создания белковых бифункциональных агентов, предназначенных для визуализации опухолевых клеток человека *in vitro* и *in vivo* [35], для создания противоопухолевых мультивалентных и биспецифических миниантител [25, 31] (рис. 1б; таблица), а также для некоторых других биомедицинских задач [36, 37].

Применение АСББ для самосборки более сложных надмолекулярных структур с заданными свойствами из готового набора модулей, включающих наряду с белками наночастицы различной природы, потребовало фундаментального изучения этого процесса. Было показано, что силы взаимодействия двух белков, барназы и барстара, достаточно для объединения и удерживания как нано-, так и микрочастиц в единой суперструктуре [38].

Самосборку надмолекулярных структур с использованием АСББ исследовали на примере магнитных микрочастиц (ММЧ) и флуоресцентных полупроводниковых наночастиц (квантовых точек, КТ) в коллоидном растворе. Предварительно магнитные микрочастицы конъюгировали с барназой, а флуоресцентные наночастицы с



**Рис. 2.** Схема трифункциональных структур, полученных с помощью адаптерной системы барназа:барстар, из магнитных микрочастиц (ММЧ) и квантовых точек (КТ) (а) и локализация опухолевых клеток, меченных трифункциональными структурами ММЧ-барназа:(барстар-ФЧ):барназа-(4D5scFv)<sub>2</sub>, по контуру букв “MF” с помощью магнитного поля (б). Представлены изображения меченых опухолевых клеток, полученные светлопольной (с) и флуоресцентной микроскопией (с'). Шкала 17мкм. Использован фрагмент рис. 3 из работы [39].

барстаром. Было показано, что при смешивании этих частиц происходит самосборка бифункциональных комплексов за счет взаимодействия барназы и барстара [39] (рис. 1а; таблица). Расчеты показали, что при этом контакт между двумя частицами осуществляется, в среднем, за счет одной пары барназа:барстар (точечное связывание). Добавление адресных мини-антител в составе рекомбинантного белка с барназой позволило получить трифункциональный надмолекулярный комплекс, третий слой которого также был присоединен в результате взаимодействия барназы и барстара (рис. 1б).

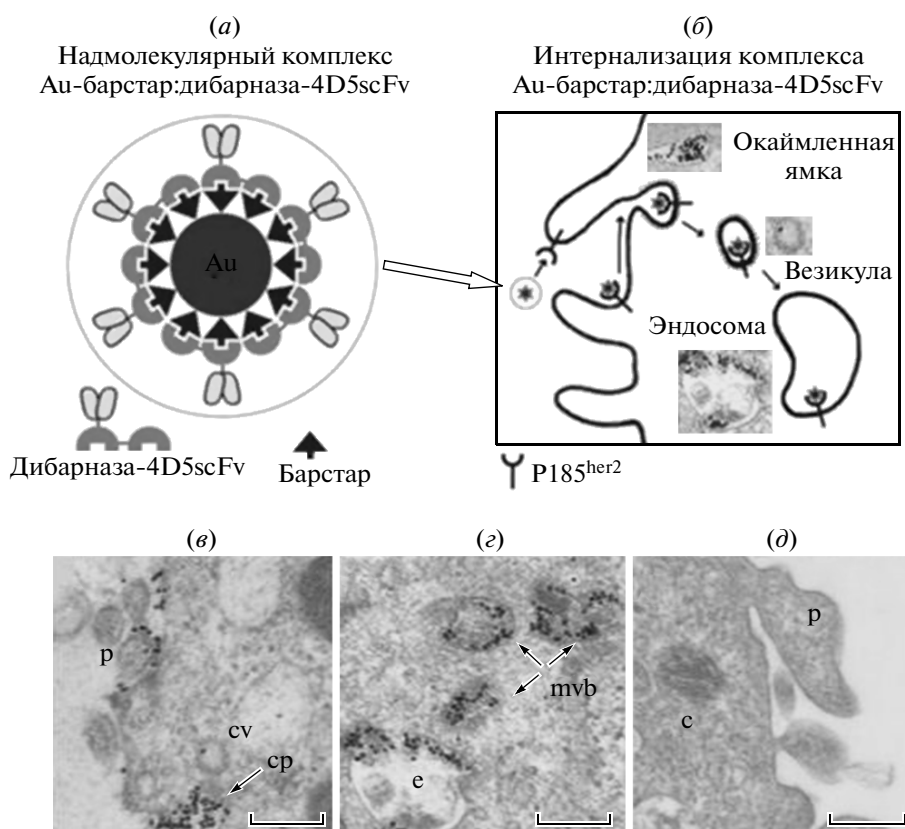
Благодаря адресным антителам полученный комплекс **ММЧ-барназа:(барстар-КТ):барназа-(4D5scFv)<sub>2</sub>** хорошо связывался с опухолевыми клетками, флуоресценция КТ в составе комплекса позволяла проводить их оптическую детекцию, а ММЧ – манипулировать клетками с помощью магнитного поля (рис. 2).

Важной характеристикой адаптерной системы является стабильность полученных комплексов в различных условиях. Маленький размер барназы и барстара (3.5 и 2.5 нм) при их непосредственной конъюгации с поверхностью частиц из-за пространственных ограничений позволяет осуществлять только точечное взаимодействие между двумя частицами за счет одной пары барназа:барстар. Для формирования более прочного “многоточечного” связывания, а также для увеличения коллоидной стабильности частиц, на их поверхность вводили гибкий полимерный линкер (полиэтиленгликоль). Увеличение расстояния между частицами за счет

полимерных линкеров позволило задействовать несколько пар барназа:барстар для связывания двух частиц. На примере полистирольных микро- и наночастиц с двумя разными функциональностями (магнитные и флуоресцентные) было показано, что полученные за счет “многоточечного” связывания надмолекулярные комплексы необычно стабильны и устойчивы в течение длительного времени к воздействию высоких концентраций мочевины и хлорида натрия, а также к высокой температуре (80°C в течение 2 ч) и низким значениям pH, как правило, вызывающим денатурацию белка [40] (таблица). Сравнение АСББ с другими белковыми системами самосборки (стрептавидин-биотин, антиген-антитело и иммуноглобулин-белок А) показало значительное преимущество АСББ при сборке надмолекулярных комплексов в жестких (нефизиологичных) условиях, тогда как резистентность к этим же условиям уже сформированных комплексов была сравнима при использовании всех указанных адаптерных систем [40].

Способность надмолекулярных комплексов на основе АСББ сохранять свою целостность в экстремальных условиях делает эту адаптерную систему привлекательной для целого ряда практических задач, особенно учитывая ее применимость для функциональных модулей различной природы, включая белки и микро- и наночастицы различного химического состава. Предлагаемый подход может быть особенно полезен для применения в тех случаях, если требуется исключительная устойчивость к внешним факторам, например,





**Рис. 3.** Визуализация рецепторопосредованной интернализации иммунотоксина 4D5scFv-дибарназа в клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3 использованием надмолекулярного комплекса 4D5scFv-дибарназа:барстар-Au. *a* – Схема надмолекулярного комплекса 4D5scFv-дибарназа:барстар-Au; *b* – схема процесса рецепторопосредованной интернализации иммунотоксина; *c*, *d*, *e* – визуализация рецепторопосредованной интернализации иммунотоксина *in vitro* с помощью конфокальной микроскопии. Обозначения на микрофотографиях: с – цитоплазма; cv – окаймленная везикула, e – эндосома, cp – окаймленная ямка, mvb – мультивезикулярные тельца, p – протрузии. Шкала 200 нм. Использован фрагмент рис. 1 из работы [41].

для создания сенсоров экологического загрязнения, а также для биофотоники и других методов детекции [40].

К этому следует добавить, что обнаруженная в этих исследованиях неожиданно высокая “прочность на разрыв”, характерная для структур на основе белковых адаптерных систем, свидетельствует о перспективности и большом потенциале таких самоассоциирующихся комплексов. При этом использование квазиковалентных взаимодействий дает большую функциональную гибкость при конструировании надмолекулярных комплексов с заданными свойствами из модулей с разными функциями, а сам процесс делает более контролируемым, чем при химических реакциях.

Возможности модульного подхода к конструированию мультифункциональных гибридных структур как универсальной платформы, применимой для микро- и наночастиц различной природы, были исследованы на целом ряде наночастиц, обладающих характеристиками, привлекательными для целей терагностики и биоимиджинга, включая коллоидное

золото, квантовые точки, магнитные наночастицы люминесцентные наноалмазы и апконверсионные нанофосфоры (таблица).

**Коллоидное золото (КЗ)** представляет собой водную суспензию наночастиц Au и применяется, в частности, в качестве электронно-плотной метки для визуализации методом электронной микроскопии с высоким разрешением, а также позволяет воздействовать на клетки путем оптической гипертермии [9]. Для изучения распределения рецептора HER2/neu на опухолевых клетках на основе АСББ был создан надмолекулярный бифункциональный комплекс с коллоидным золотом, способный специфически связываться с указанным онкомаркером [41]. В качестве узнающего компонента этого комплекса использовали рекомбинантный белок, состоящий из мини-антитела 4D5scFv, специфичного к внеклеточному домену рецептора HER2/neu, и двух молекул барназы (рис. 3). Второй компонент надмолекулярного комплекса, обеспечивающий визуализацию с помощью электронной микроскопии, получили путем конъюгации коллоидного золота с

барстаром. Для мечения опухолевых клеток использовали надмолекулярный комплекс 4D5scFv-дибарназа:барстар-Au, который собирали из узнающего и визуализирующего компонентов за счет нековалентного связывания молекул барназы и барстара. Распределение рецептора HER2/neu изучали при 4 и 37°C. Было показано, что при 4°C рецептор HER2/neu расположен исключительно на поверхности опухолевых клеток, а при 37°C наблюдается его интернализация, обусловленная взаимодействием с антителом 4D5scFv. Внутри клеток HER2/neu локализуется в окаймленных ямках и везикулах, эндосомах и мультивезикулярных тельцах (рис. 3). Надмолекулярный комплекс на основе АСББ обладает гораздо большей стабильностью, устойчивостью при хранении и эффективностью мечения, чем стандартный комплекс антитело-Au, а также позволяет почти полностью сохранить активность антитела в составе комплекса с наночастицами.

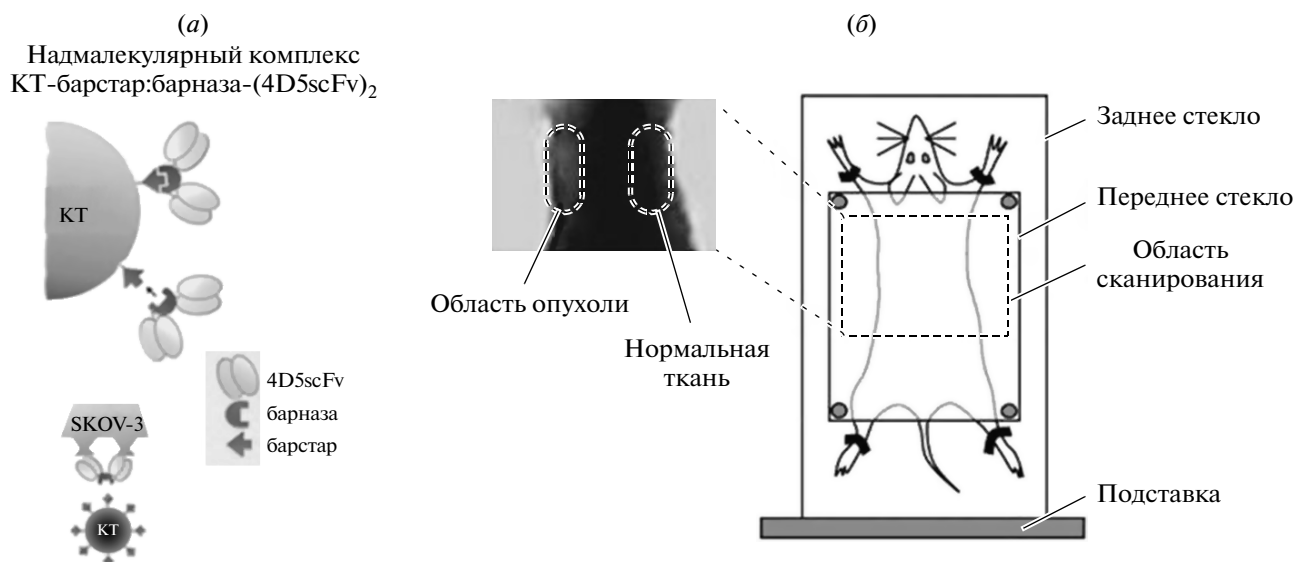
**Квантовые точки (КТ)** – полупроводниковые нанокристаллы, состоящие из небольшого числа атомов полупроводниковых материалов II–VI (например, CdSe, CdTe, CdS и ZnSe) или III–V (например, InP и InAs) групп периодической таблицы Д.И. Менделеева, представляют относительно новый класс флуорофоров, обладающих своеобразными оптическими и физико-химическими свойствами, не характерными для других флуоресцентных красителей. По сравнению с органическими флуоресцентными красителями для КТ характерны более высокий молярный коэффициент поглощения, высокий квантовый выход, устойчивость к фотовыцветанию, кроме того, их спектры флуоресценции можно варьировать в процессе синтеза в зависимости от размеров ядра наночастиц [7]. Эти особенности делают КТ привлекательными агентами для многоцветного мечения и одновременной идентификации различных биологических объектов, для длительных экспериментов по визуализации процессов, происходящих в клетке в реальном времени, а также для окраски образцов, требующих длительного хранения [7].

Для визуализации опухолевых клеток человека *in vitro* и *in vivo* на основе разработанных принципов с применением АСББ созданы и охарактеризованы самоассоциирующиеся надмолекулярные комплексы противораковых мини-антител различной специфичности и полупроводниковых квантовых точек КТ<sub>605</sub> и КТ<sub>565</sub> с максимумами флуоресценции при 605 и 565 нм, соответственно [42] (таблица). В качестве направляющих антител использованы мини-антитела scFv425 и scFv4D5, узнающие онкомаркеры HER1 (EGFR) и HER2/neu, соответственно. В качестве биологических объектов в экспериментах *in vitro* использованы клеточные линии эпидермоидной карциномы человека A431 (гиперэкспрессия онкомар-

кера HER2/neu), а также аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3 (гиперэкспрессия онкомаркера HER2/neu). Показано, что полученные надмолекулярные комплексы **(4D5scFv)<sub>2</sub>-барназа:барстар-КТ<sub>605</sub>** и **425scFv-барназа:барназа-КТ<sub>565</sub>** (таблица) позволяют эффективно и специфично визуализировать опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие соответствующий онкомаркер [43]. Использование АСББ позволяет метить раковые клетки как в одну стадию заранее сформированным комплексом, так и в две стадии – с предварительной обработкой клеток нацеливающими антителами, конъюгированными с барназой, с последующей визуализацией конъюгатом квантовых точек с барстаром. Установлено, что конъюгация КТ с компонентами АСББ – барназой или барстаром, не влияет на их физико-химические свойства, а в ряде случаев повышает стабильность и квантовый выход. Более того, конъюгация с барстаром позволяет значительно уменьшить неспецифическое связывание КТ с мембранами клеток. Отсутствие окрашивания клеток, не несущих соответствующий онкомаркер, свидетельствует о высокой специфичности полученных конструкций. В отличие от традиционного способа прямой конъюгации с помощью химических агентов, которая может приводить к нарушению специфичности и аффинности направляющих молекул, а также требует тестирования активности антитела после каждой конъюгации, предложенная стратегия является универсальным способом получения флуоресцентных диагностических агентов с различной специфичностью и различными параметрами флуоресценции, которые можно менять в зависимости от целей и задач исследования.

Для визуализации новообразований непосредственно в организме модельных животных на основе разработанной универсальной стратегии молекулярных адапторов сконструирован надмолекулярный комплекс, состоящий из квантовых точек с максимумом флуоресценции в ближней ИК-области (КТ<sub>705</sub>), лежащим в “окне прозрачности” биоткани, и противоопухолевых антител 4D5scFv. С использованием сконструированного надмолекулярного комплекса **4D5scFv-барназа:барстар-КТ<sub>705</sub>** (таблица) показано, что такое специфическое мечение опухоли позволяет получить более контрастное изображение, а также увеличить интенсивность и длительность сигнала в 1.5–2 раза, по сравнению с использованием биоинертных КТ, не снабженных нацеливающими антителами [44] (рис. 4). Полученные данные подтверждены результатами исследования тканевого распределения квантовых точек путем конфокальной микроскопии *post mortem*.

**Люминесцентные наноплазмы (ЛНА)** обладают очень стабильным кристаллическим ядром и раз-



**Рис. 4.** Применение надмолекулярного комплекса  $(4D5scFv)_2$ -барназа:барстар-КТ<sub>705</sub> (а) для визуализации *in vivo* аденокарциномы молочной железы человека, привитой иммунодефицитным мышам, методом флуоресцентной диффузионной томографии (б). Адаптирован рис. 1 из работы [44].

витой химически активной поверхностью, что делает эти наночастицы привлекательными в качестве носителей для диагностических и терапевтических агентов. Азотные вакансии в кристалле алмаза обуславливают его люминесцентные свойства при внешнем воздействии, а также восприимчивость к магнитному полю. Для ЛНА характерны фотостабильность и низкая цитотоксичность [8]. Однако успешному биомедицинскому применению этих наночастиц и их конъюгации с биомолекулами мешает нестабильность коллоидных растворов ЛНА и флокуляция (образование хлопьев) в солевых растворах. Метод конъюгации флуоресцентных наноалмазов, основанный на взаимодействии высокоафинной белковой пары барназа:барстар, позволил получить конъюгаты люминесцентных наноалмазов с флуоресцентным белком EGFP и с золотыми наночастицами [45]. Для этого отрицательно заряженные ЛНА конъюгировали химическим путем с барстаром, а флуоресцентный белок EGFP и золотые частицы — с барназой. Полученные комплексы ЛНА–барстар:барназа–EGFP и ЛНА–барстар:барназа–КЗ (таблица) устойчивы в виде водных суспензий в течение длительного времени, способны неспецифически метить эукариотические клетки, обладают широким спектром излучения и фотостабильностью.

**Апконвертирующие нанофосфоры** (или наноразмерные антистоксовы фосфоры, НАФ) — это инновационные неорганические люминесцентные наночастицы на основе  $NaYF_4:Yb; Er$ , возбуждение которых инфракрасным светом вызывает люминесценцию в УФ-диапазоне. НАФ привлекли внимание исследователей благодаря способности

к апконверсии инфракрасного света в коротковолновую люминесценцию как возможные кандидаты, способные при поглощении света в “окне прозрачности” биоткани (750–1000 нм) детектировать патологический очаг на глубине тканей [11]. Еще одной важной для целей тераностики особенностью НАФ является отложенное время излучения, позволяющее проводить визуализацию после затухания фонового излучения живых тканей [11].

Для прижизненной оптической визуализации опухолей молочной железы человека НАФ с размером  $130 \pm 20$  нм были покрыты амфифильным полимером и оснащены с помощью адапторной системы барназа:барстар белковым направляющим модулем, состоящим из мини-антител 4D5scFv, специфичных к онкомаркеру HER2/neu. С помощью эпифлуоресцентной микроскопии при возбуждении лазером с длиной волны 978 нм было показано, что полученный гибридный диагностический наноконкомплекс НАФ-барстар:барназа-4D5scFv (таблица) эффективно и специфично связывается с опухолевыми клетками аденокарциномы молочной железы SKBR3 с оптическим контрастом 10 : 1 против отрицательного контроля с клетками CHO [46]. На экспериментальной модели показана возможность оптической детекции опухолевых клеток с помощью полученных адресных наноконкомплекс на глубине 4 мм [46].

Разработанная универсальная модульная платформа на основе АСББ для конструирования адресных супрамолекулярных структур для тераностики обладает высокой эффективностью и специфичностью, что было показано с помощью оптической, флуоресцентной и сканирующей электронной

микроскопии на примере наночастиц различной природы и функционально активных белков [39, 41, 43, 46]. Принципиально новизной данного подхода является простота сборки комплексов с заранее заданными свойствами из уже имеющегося (готового) набора модулей. Несомненное преимущество модульности комплекса заключается в возможности реализации интегрального подхода к терапии опухолей с привлечением различных механизмов воздействия на раковые клетки. Заменяя только терапевтический модуль, можно осуществлять комбинированное/сочетанное воздействие на опухолевые клетки с одним и тем же молекулярным профилем, а варьируя адресные модули, – воздействовать на различные поверхностные рецепторы, блокируя “обходные” сигнальные пути.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наноразмерные платформы для доставки диагностических и терапевтических соединений к патогенным клеткам и тканям становятся чрезвычайно востребованными в современной медицине благодаря уникальным физико-химическим свойствам, способности хорошо проникать в клетки и ткани организма, минуя различные барьеры, и универсальности, позволяющей создавать на их основе мультифункциональные агенты. В совокупности эти особенности наноразмерных платформ позволяют использовать их для решения старых, но все еще актуальных, задач принципиально новыми средствами. Стало возможным в одном мультифункциональном комплексе объединить функции детекции патологического очага, селективного воздействия на него терапевтического агента и мониторинга ответа на лечение, реализуя принцип, когда целое больше, чем сумма составляющих частей. Мультифункциональные супрамолекулярные соединения на основе наночастиц перспективны как агенты для воздействия на опухоль непосредственно в патологическом очаге за счет различных видов физического воздействия (гипертермия, фотодинамическая терапия и др.), а также для адресного воздействия на опухолевое микроокружение по принципу “Троянского коня” [47, 48]. Еще одним многообещающим направлением является разработка биохимической вычислительной системы на основе нано- и микрочастиц, реализующей любую логическую функцию исходя из анализа присутствия/отсутствия в окружающей среде каких-либо двух молекул [49], которая может быть положена в основу создания медицинских нанороботов, в том числе, умных сенсоров и агентов для тераностики опухолевых заболеваний.

Авторская идея универсальной модульной платформы с использованием АСББ для создания супрамолекулярных соединений для тераностики, описанная в настоящем обзоре, позволила создать и успешно применить единые принципы для кон-

струирования адресных тераностических соединений на основе микро- и наночастиц различной природы и биомолекул с разными функциями. Это комплексное междисциплинарное исследование стало возможным благодаря тесному сотрудничеству с лабораториями биофотоники и биокатализа ИБХ РАН, электронной микроскопии ИМБ РАН, биофотоники ИОФ РАН (Москва), кафедрой биофизики ННГУ им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород), Университетом Маккуори (Сидней, Австралия; Macquarie University, Sydney, Australia), ИПЛИТ РАН (Троицк), что в полной мере отражает насущную необходимость совместных исследований физиков, химиков и биологов для дальнейшего развития нового направления биомедицинских исследований – тераностики.

Несмотря на значительные успехи в создании инновационных соединений для тераностики, остается еще целый ряд проблем, которые предстоит решить при создании наночастиц для терапии рака, связанных, прежде всего, с биосовместимостью, фармако-кинетикой, селективностью доставки *in vivo*, эффективностью терапевтического воздействия, безопасностью наночастиц для пациента и экологической безопасностью. Оптимизация большинства этих характеристик связана с дизайном параметров наночастиц: размера, поверхностного заряда, химического состава, дополнительного покрытия, а также с технологией получения наночастиц и введением функциональных компонентов. Необходимы также систематические исследования безопасности наноматериалов *in vitro* и *in vivo* для полной оценки факторов риска как для здоровья пациентов, так и для окружающей среды, и для разработки рекомендаций по их безопасному производству и использованию. Несомненно, что успех применения тераностических агентов будет связан с дальнейшим прогрессом в области выяснения молекулярных механизмов заболеваний и резистентности к терапевтическим агентам, а также поиска адекватных молекулярных мишеней [50].

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФ № 14-24-00106 (разработка адаптерной системы барназа:барстар) и Министерством образования и науки, уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI57814X0051 (конструирование рекомбинантного белка на основе псевдомонадного экзотоксина А для таргетной терапии HER2-положительных опухолей).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang Z., Stiegler A.L., Boggon T.J., Kobayashi S., Halmos B. // *Oncotarget*. 2010. V. 1. P. 497–514.

2. Поляновский О.Л., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 3. С. 289–311. (*Poljanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M.* // Biochemistry (Mosc). 2012. V. 77(3). P. 227–245.)
3. Wu L., Qu X. // Chem. Soc. Rev. 2015 Mar 5. В печати.
4. Свердлов Е.Д. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 5. С. 505–541.
5. Bae Y.H., Park K. // J. Control. Release. 2011. V. 153(3). P. 198–205.
6. Weissleder R., Pittet M.J. // Nature. 2008. V. 452. P. 580–589.
7. Здобнова Т.А., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Acta naturae. 2011. Т. 3. № 2(8). С. 30–50. (*Zdobnova T.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M.* // Acta Naturae. 2011. V. 3(1). P. 29–47.)
8. Chang Y.R., Lee H.Y., Chen K., Chang C.C., Tsai D.S., Fu C.C., Lim T.S., Tzeng Y.K., Fang C.Y., Han C.C., Chang H.C., Fann W. // Nat. Nanotechnol. 2008. V. 3. P. 284–288.
9. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // Chem Rev. 2014. V. 114(2). P. 1258–1288.
10. Frey N.A., Peng S., Cheng K., Sun S. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. P. 2532–2542.
11. Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. // Chem. Rev. 2014 May 28. 114(10). P. 5161–214.
12. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. // Nanomedicine (UK). 2011. V. 6. P. 195–209.
13. Sriraman S.K., Aryasomayajula B., Torchilin V.P. // Tissue Barriers. 2014. V. 2. P. e29528.
14. Nel A., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. // Nat. Mater. 2009. V. 8. P. 543–557.
15. Choudhary S., Mathew M., Verma R.S. // Drug Discov. Today. 2011. V. 16. P. 495–503.
16. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Gene. 2006. V. 366. P. 97–103.
17. Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // Invest New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32.
18. Соколова Е.А., Здобнова Т.А., Стрёмовский О.А., Балалаева И.В., Деев С.М. // Биохимия. 2014. Т. 79. № 12. С. 1682–1688. (*Sokolova E.A., Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M.* // Biochemistry (Moscow). 2014. V. 79. P. 1376–1381.)
19. Serebrovskaya E.A., Edelweiss E., Stremovskiy O., Lukyanov K., Chudakov D., Deyev S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 9221–9225.
20. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. P. 831–840.
21. Hartley R.W. // Methods Enzymol. 2001. V. 341. P. 599–611.
22. Di Paolo C., Willuda J., Kubetzko S., Lauffer I., Tschudi D., Waibel R., Pluckthun A., Stahel R.A., Zangemeister-Witke U. // Clin. Cancer Res. 2003. V. 9. P. 2837–2848.
23. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Nat. Biotechnol. 2006. V. 24. P. 95–99.
24. Shu X., Lev-Ram V., Deerinc T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 4. e1001041.
25. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // Nat. Biotechnol. 2003. V. 21. P. 1486–1492.
26. Weldon J.E., Pastan I. // FEBS J. 2011. V. 278. P. 4683–4700.
27. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., Sashchenko L.P., Tonevitsky A.G., Friboulet A., Gabibov A.G., Deyev S.M. // PLoS One. 2011. V. 6. e20991.
28. Деев С.М., Лебеденко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габибов А.Г., Кирпичников М.П. // Успехи химии. 2015. Т. 84. Вып. 1. С. 1–26. (*Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P.* // Russian Chemical Reviews. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.)
29. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. P. 1103–1163.
30. Миронова К.Е., Черных О.Н., Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. // Биохимия. 2014. Т. 79. № 12. С. 1700–1706. (*Mironova K.E., Chernykh O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Proshkina G.M., Deyev S.M.* // Biochemistry (Mosc.). 2014. V. 79(12). P. 1391–1396.)
31. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Acta Naturae. 2009. Т. 1(1). С. 32–50. (*Deyev S.M., Lebedenko E.N.* // Acta Naturae. 2009. V. 1(1). P. 32–50.)
32. Semenyuk E.G., Stremovskiy O.A., Edelweiss E.F., Shirshikova O.V., Balandin T.G., Buryanov Y.I., Deyev S.M. // Biochimie. 2007. V. 89. P. 31–38.
33. Schreiber G., Fersht A.R. // Nat. Struct. Biol. 1996. V. 3. P. 427–4311.
34. Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odincov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I., Deyev S.M. // Protein Engineering Design and Selection. 2004. V. 17. P. 85–93.
35. Лебеденко Е.Н., Баландин Т.Г., Эдельвейс Э.Ф., Георгиев О., Моисеева Е.С., Петров Р.В., Деев С.М. // ДАН. 2007. Т. 414. С. 408–411. (*Lebedenko E.N., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Georgiev O., Moiseeva E.S., Petrov R.V., Deyev S.M.* // Dokl. Biochem. Biophys. 2007. V. 414. P. 120–123.)
36. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Биорган. химия. 2009. Т. 35. С. 761–778. (*Deyev S.M., Lebedenko E.N.* // Bioorg Khim. 2009. V. 35(6). P. 761–778.)
37. Sreenivasan V.K.A., Kelf T.A., Grebenik E.A., Stremovskiy O.A., Say J.M., Rabeau J.R., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // Proteomics. 2013. V. 13. № 9. P. 1437–1443.
38. Sekatskii S.K., Favre M., Dietler G., Mikhailov A.G., Klinov D.V., Lukash S.V., Deyev S.M. // J. Mol. Recognit. 2010. V. 23. P. 583–558.
39. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832.

40. *Aghaeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M.* // ACS Nano. 2013. V. 7. P. 950–961.
41. *Ivanova J.L., Edelweiss E., Leonova O.G., Balandin T.G., Popenko V.I., Deyev S.M.* // Biochimie. 2012. V. 94. P. 1833–1836.
42. *Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M.* // PLoS One. 2012. V. 7. P. e48248.
43. *Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., Zlomanov V.P., Deyev S.M.* // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14. P. 021004\_1–021004\_5.
44. *Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M.* // J. Biophotonics. 2012. V. 5(11–12). P. 860–867.
45. *Sreenivasan V.K.A., Ivukina E.A., Deng W., Kelf T.A., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Veryugin B.V., Stremovskiy O.A., Zvyagin A.V., Deyev S.M.* // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 65–68.
46. *Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., Zubov V.P., Klinov D.V., Panchenko V.Y., Deyev S.M., Zvyagin A.V.* // J. Biomed. Opt. 2013. V. 18(7). P. 76004.
47. *Nelson D., Fisher S., Robinson B.* // J. Immunol. Res. 2014. V. 2014. P. 789069.
48. *Vinogradov S, Warren G, Wei X.* // Nanomedicine (Lond). 2014. V. 9(5). P. 695–707.
49. *Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I.* // Nat. Nanotechnol. 2014. V. 9. № 9. P. 716–722.
50. *Hanahan D., Weinberg R.A.* // Cell. 2011. V. 144(5). P. 646–674.

## Supramolecular Agents for Theranostics

S. M. Deyev\*, \*\*, E. N. Lebedenko\*, #

# Phone: +7 (926) 241-70-30; e-mail: elebedenko@mail.ru

\*Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, pr. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

This mini-review summarizes recent data obtained in the process of creation of a versatile module platform suitable for construction of supramolecular theranostic agents. As an example, we consider multifunctional hybrid agents for imaging and elimination of cancer cells. The use of an adapter protein system barnase:barstar for producing targeted multifunctional hybrid structures on the basis of highly specific peptides and mini-antibodies as addressing modules and recombinant proteins and/or nanoparticles of different nature (quantum dots, nanogold, magnetic nanoparticles, nanodiamonds, upconverting nanophosphores, polymer nanoparticles) as agents visualizing and damaging cancer cells is described. New perspectives for creation of selective and highly effective compounds for theranostics and personalized medicine are contemplated.

*Keywords: nanoparticles, supramolecular biocompatible complexes, barnase:barstar module, imaging, cancer cells*