

# Молекулярный наноконструктор на основе белкового комплекса барназа-барстар.

## Соединения для диагностики и терапии рака

Сергей Михайлович Деев

*Институт биоорганической химии РАН*



## Благодарности

### ИПФ РАН

Каменский В.А.  
Турчин И.В.  
Плеханов В.И.  
Балалаева И.В.  
Орлова А.Г.  
Шахова Н.М.  
Сергеев А.М.

### ИБХ РАН

Лебеденко Е.Н.  
Эдельвейс Э.Ф.  
Баландин Т.Г.  
Лукаш С.В.  
Стремовский О.А.  
Акципетрова Е.О.  
Здобнова Т. А.  
Семенюк Е.Г.

### ГУ РОНЦ им.Блохина

Трещалина Е.М.  
Степанова Е.В.  
Андропова Н.В.

### МНИОИ им.Герцена

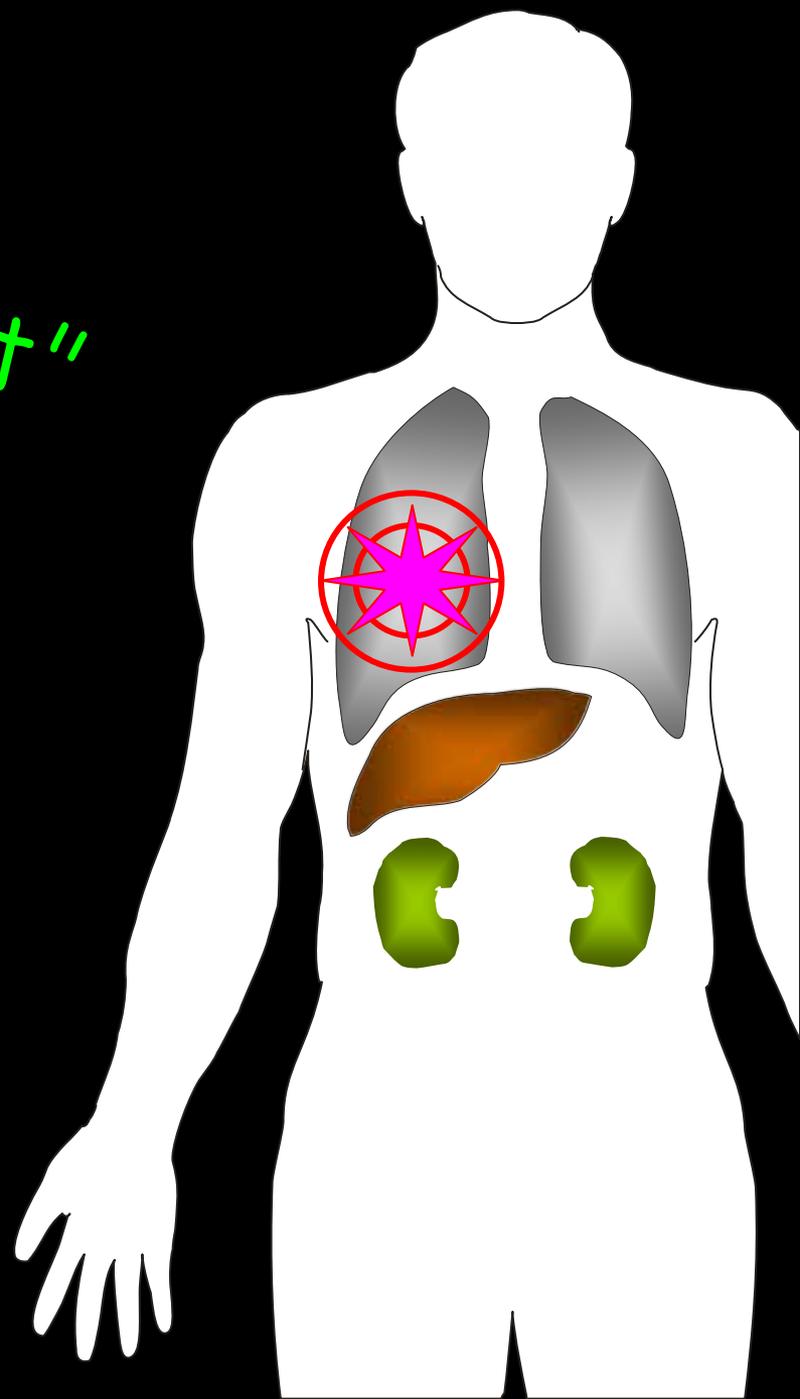
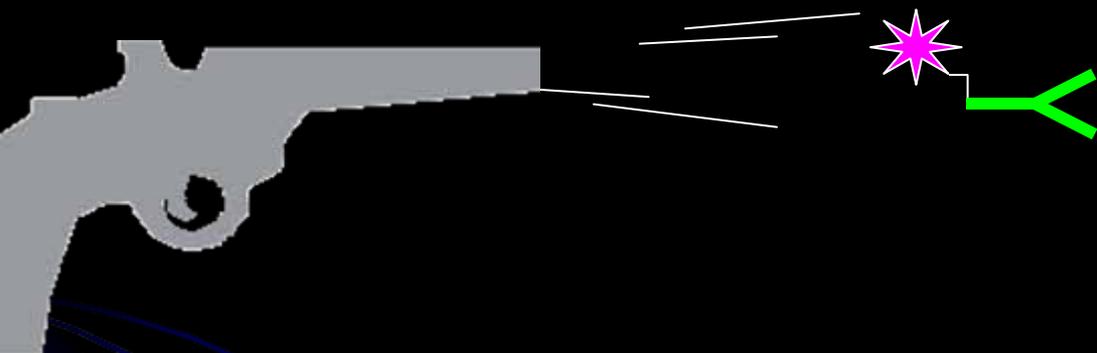
Франк Г. А.  
Завалишина Л.Э.

**«Все есть яд, только доза  
делает вещество лекарством»**

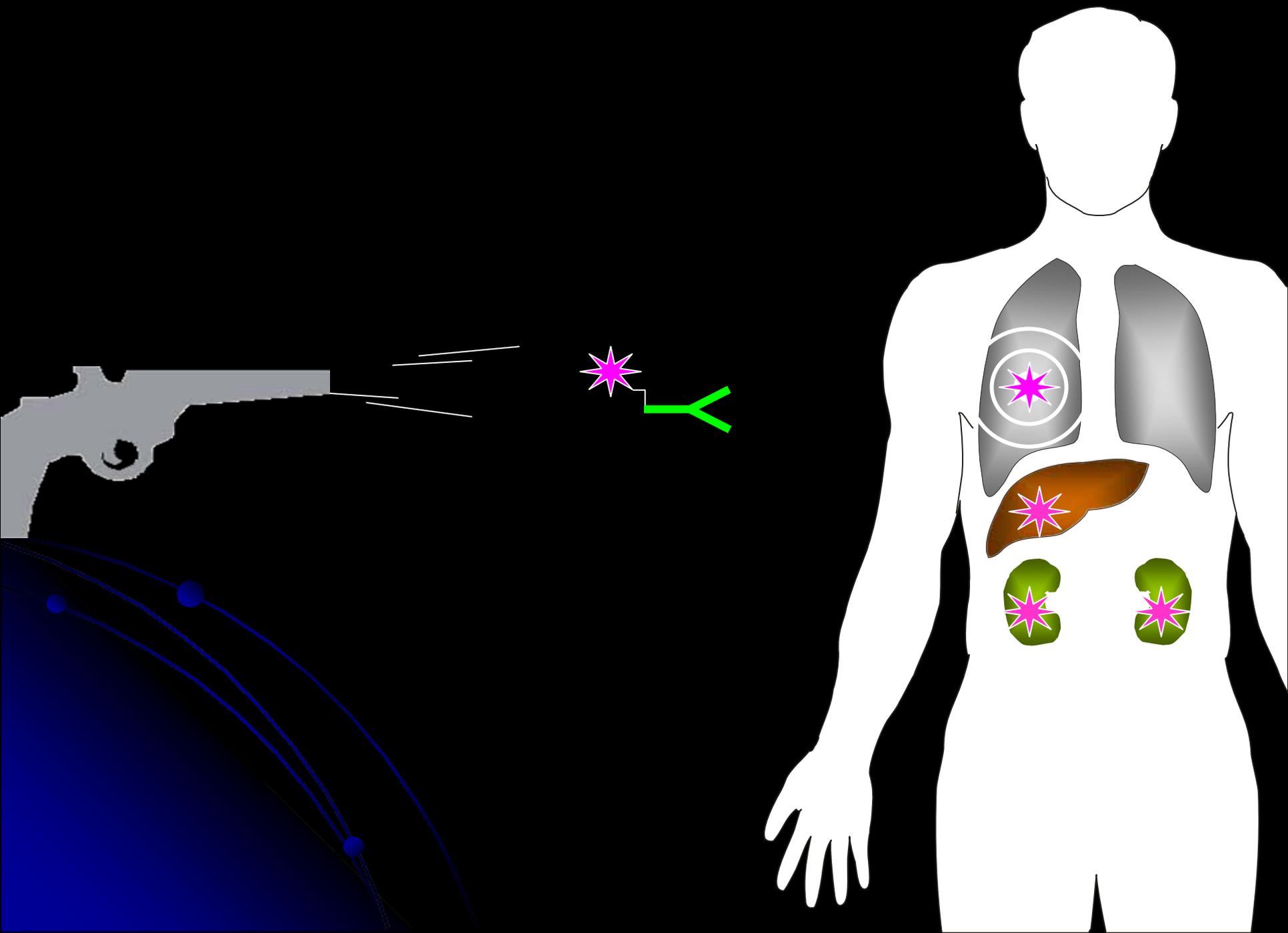


*Филип Ауреол Теофраст  
Бомбаст фон Гогенхайм  
(Парацельс) 1493-1541 г.*

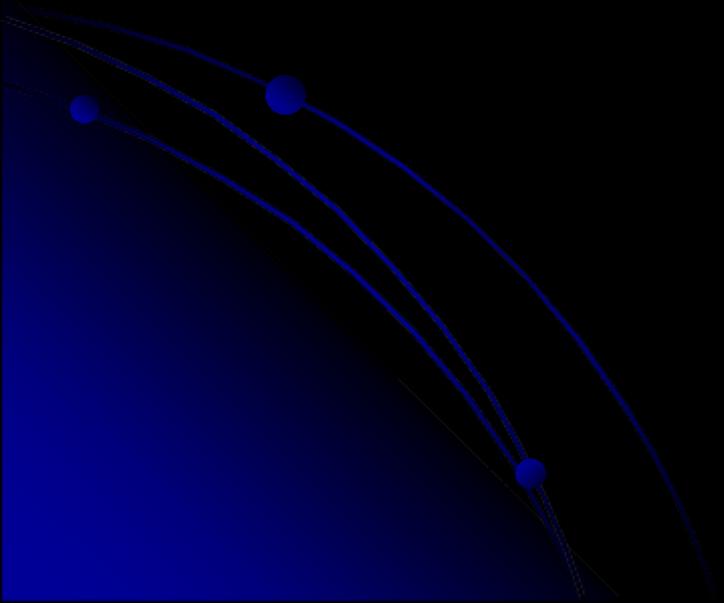
"magic bullet"



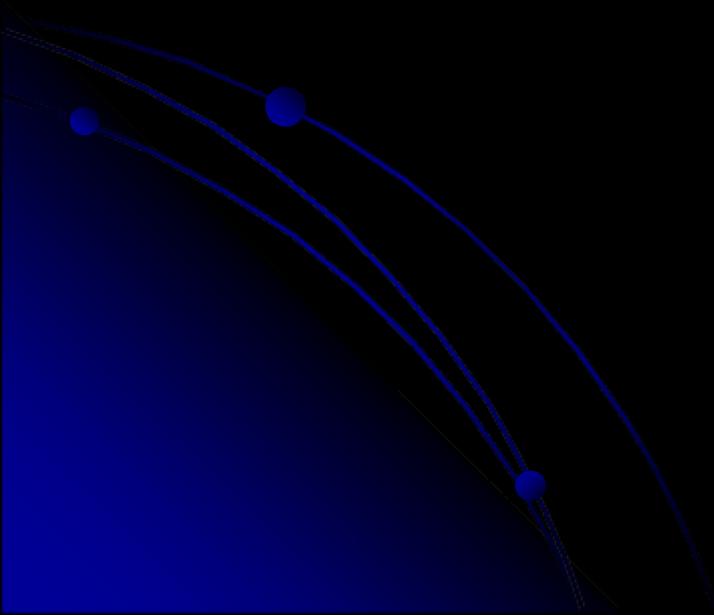
Paul Erlich, Нобелевская премия  
по физиологии и медицине, 1908

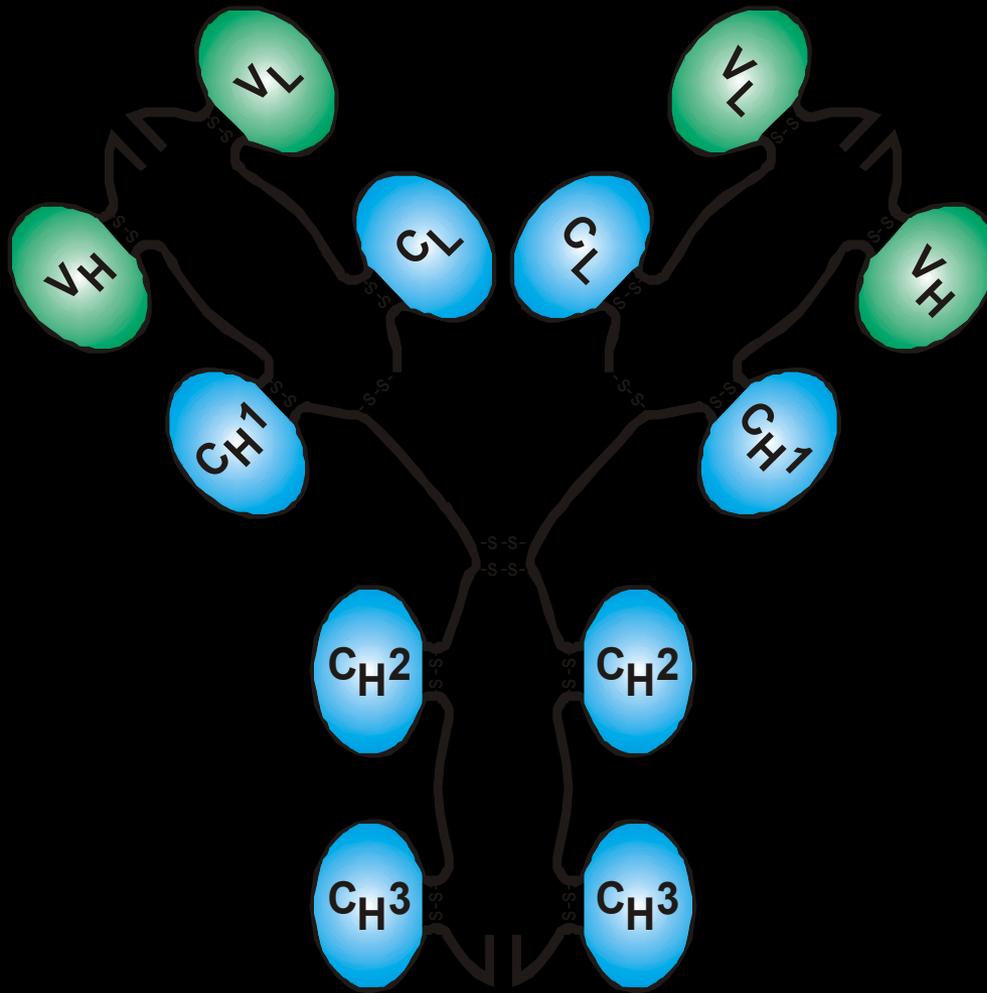


- Адресная доставка - воздействие на клетки с определенным «молекулярным портретом»



- Адресная доставка - воздействие на клетки с определенным «молекулярным портретом»
- **Создание бифункциональных соединений: нацеливающая часть + терапевтический (или диагностический) агент**





*Georges Köhler & Cesar Milstein*

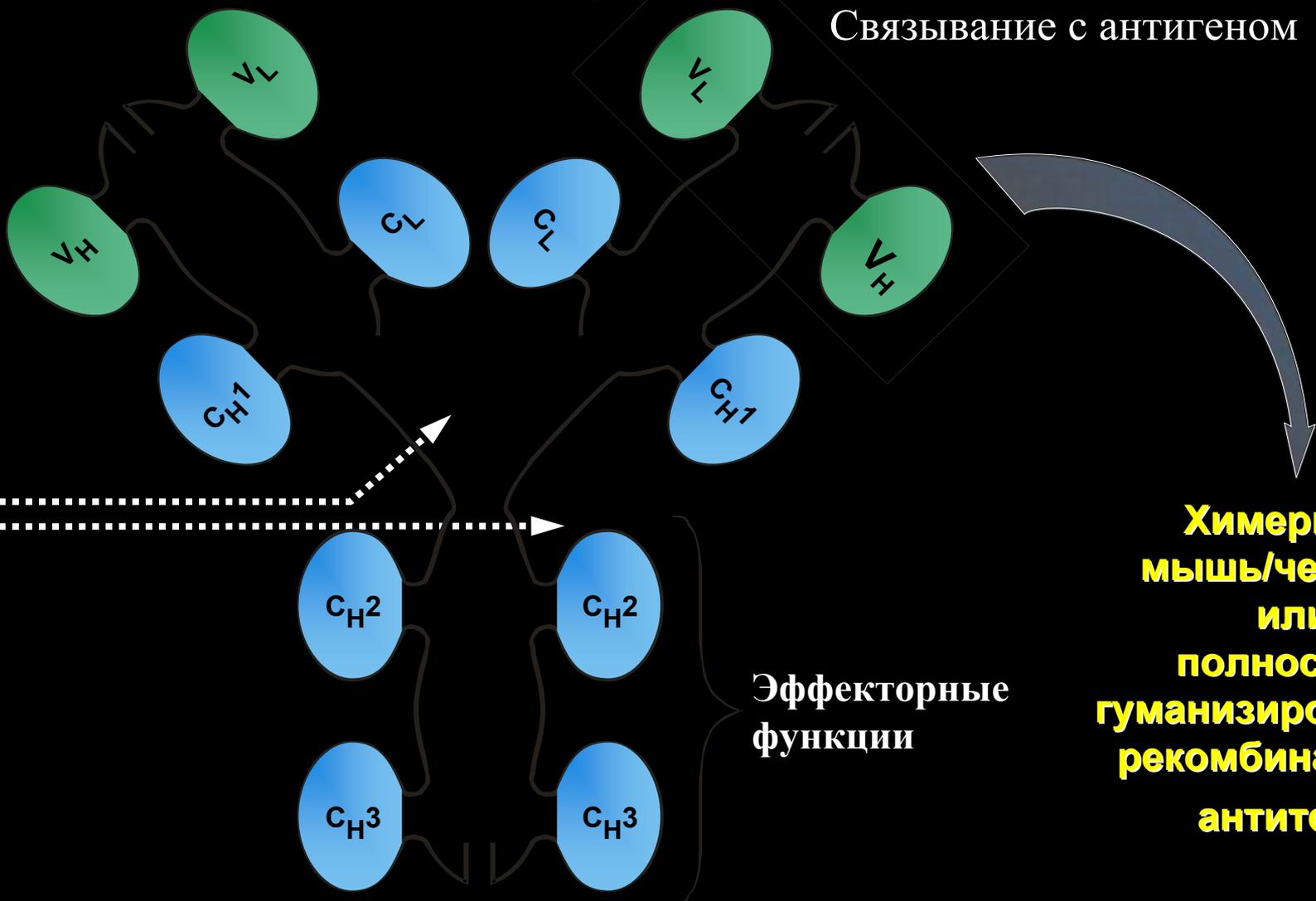
**Нобелевская премия по физиологии и медицине**

**1984**

# Инженерия антител

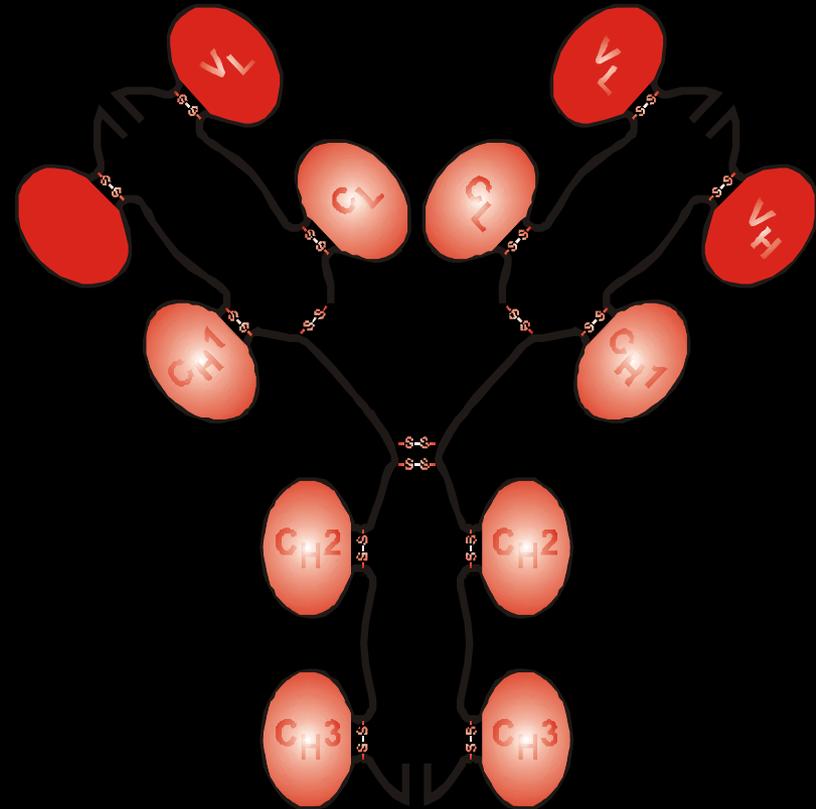
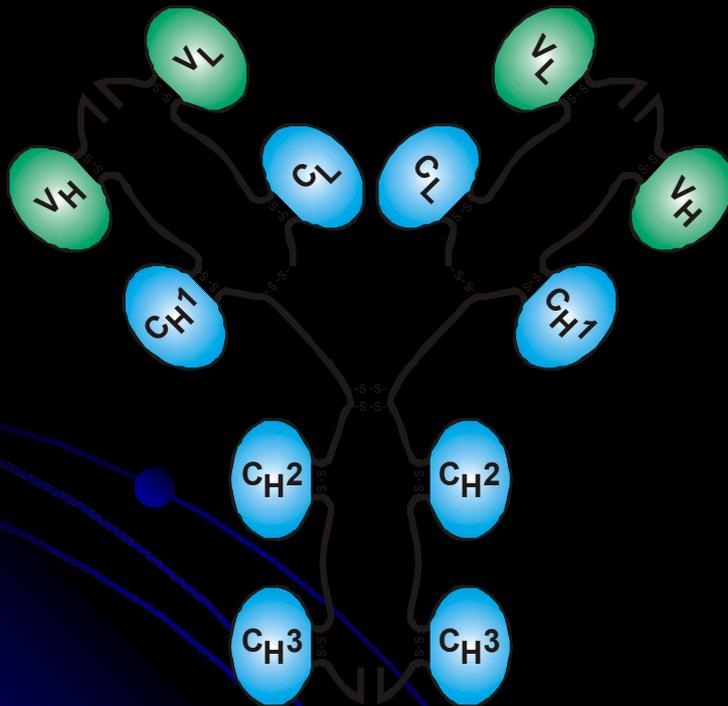
Полноразмерное моноклональное  
мышинное антитело

Связывание с антигеном



**Химерные  
мышь/человек  
или  
полностью  
гуманизированные  
рекомбинантные  
антитела**

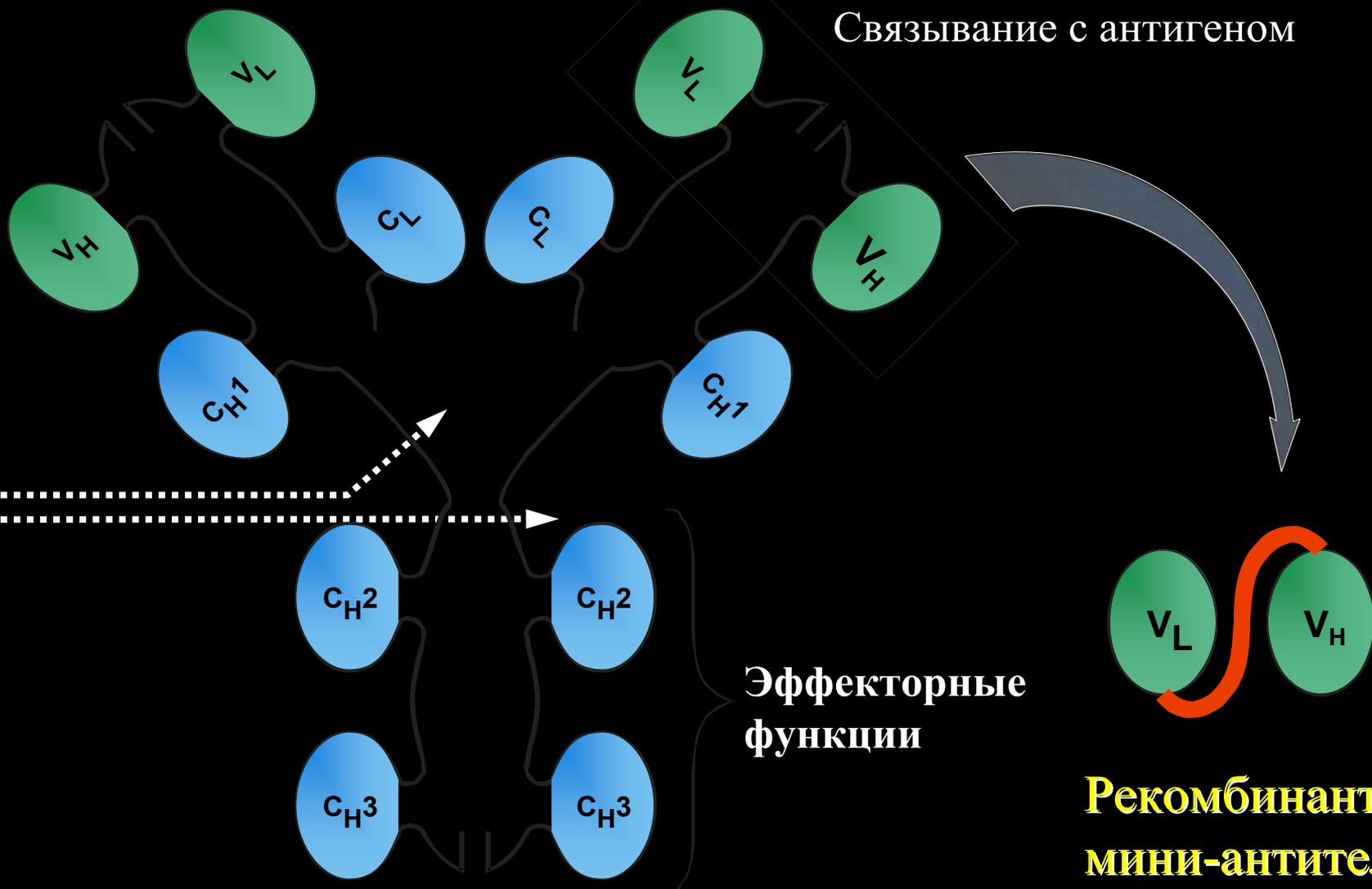
# Гуманизированные («очеловеченные») антитела



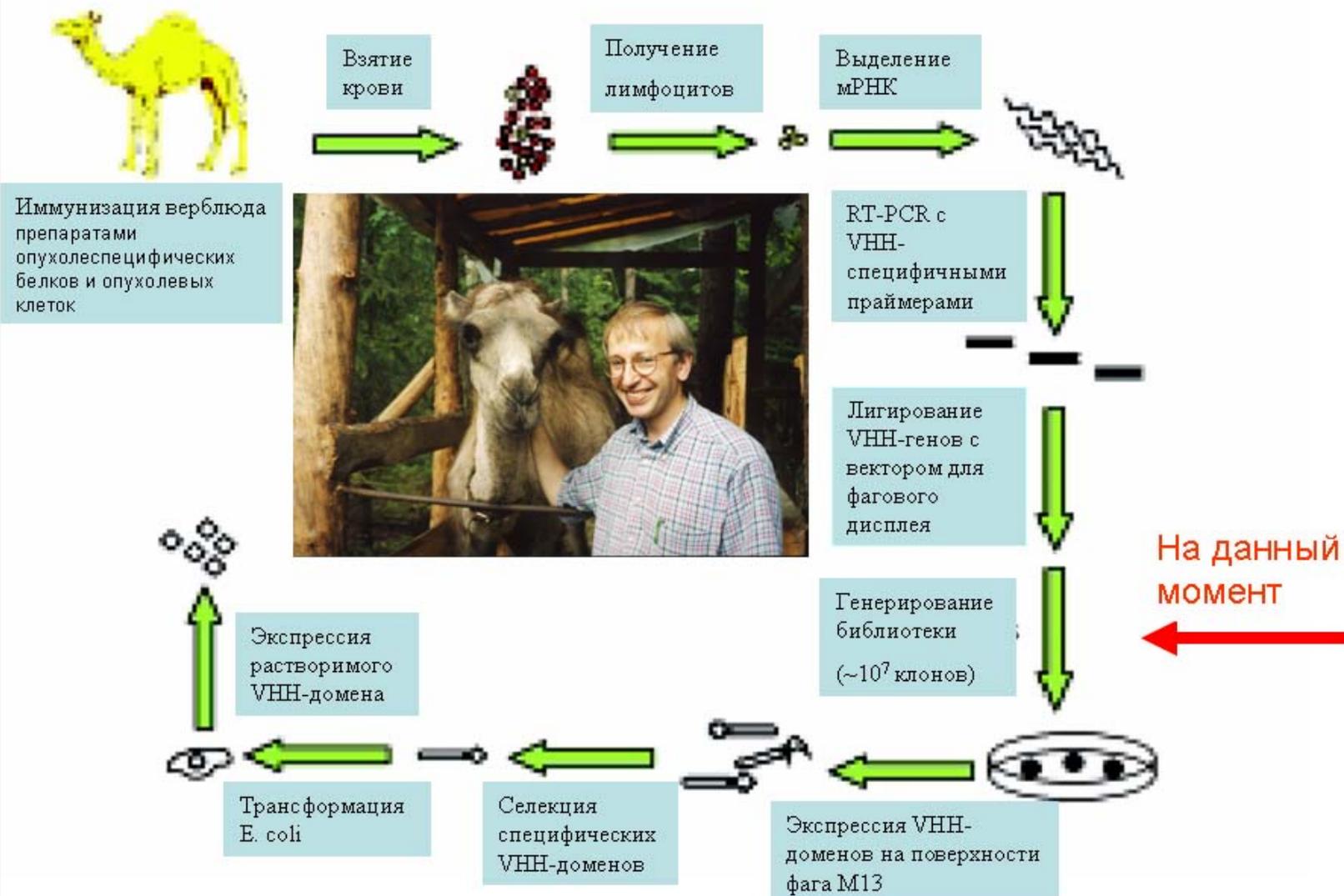
# Инженерия антител

Полноразмерное моноклональное  
мышинное антитело

Связывание с антигеном



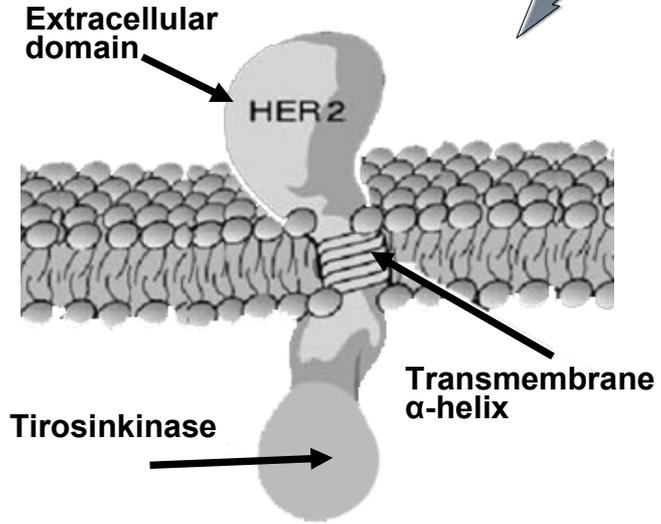
## Процедура получения антиген-специфичных VHH-миниантител



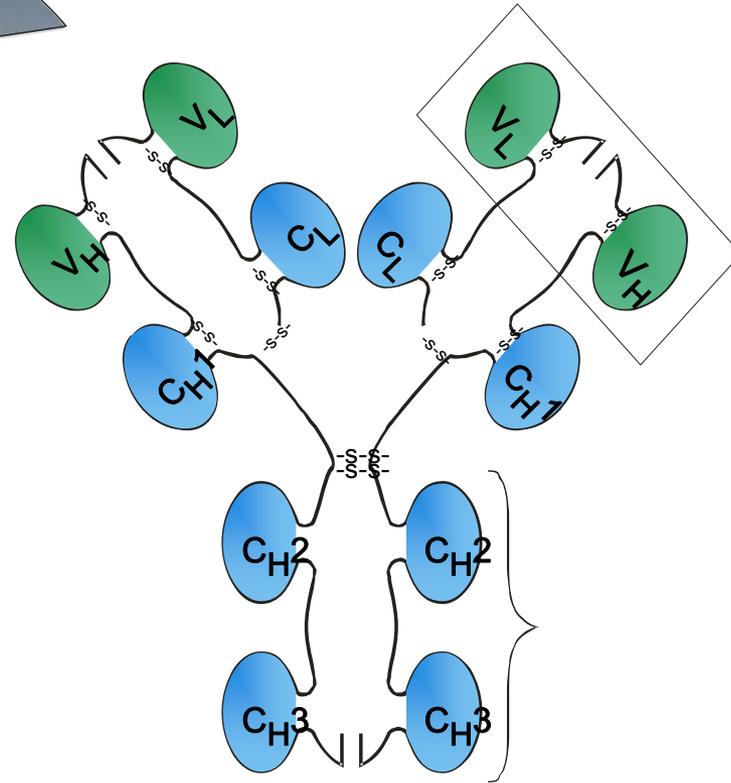
# Преимущества рекомбинантных мини-антител

- ① Низкая иммуногенность
- ② Эффективное проникновение к опухолям
- ③ Быстрое освобождение организма (clearance)
- ④ Возможность соединения с терапевтическими и диагностическими агентами
- ⑤ Биотехнологическая наработка
- ⑥ Стандартность препаратов

# HER2/neu

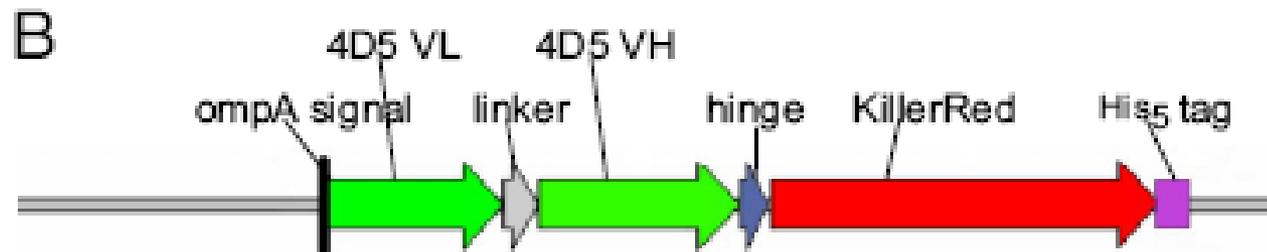
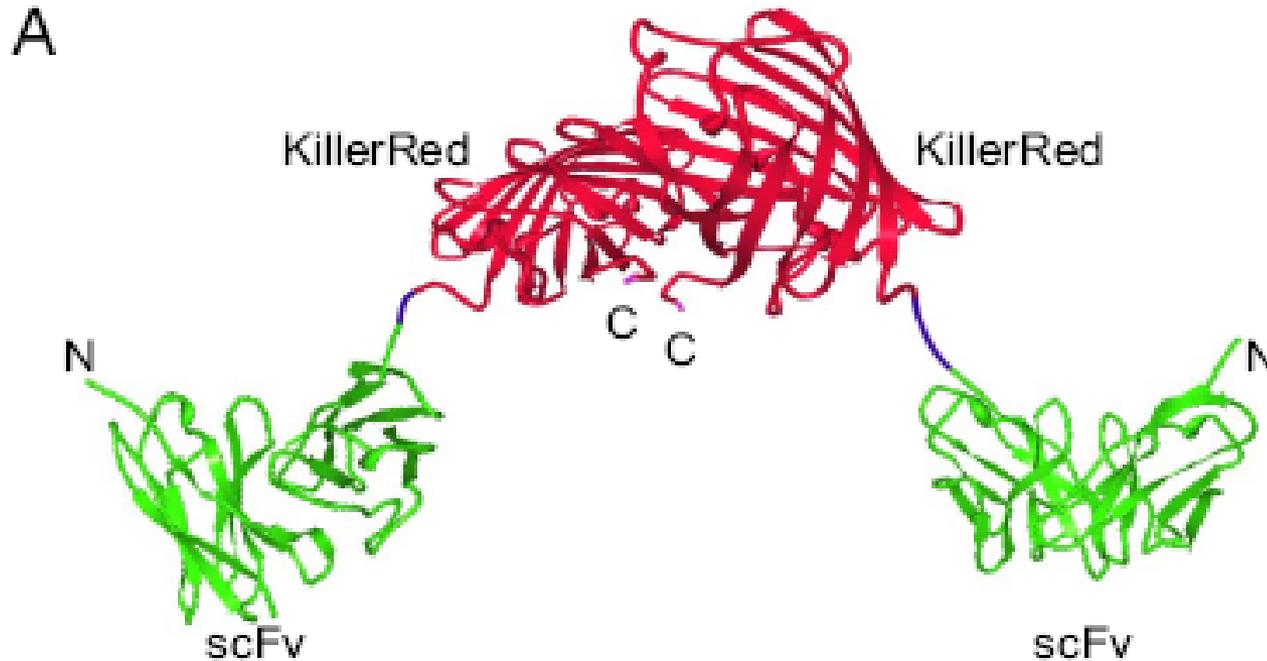


# Monoclonal antibody

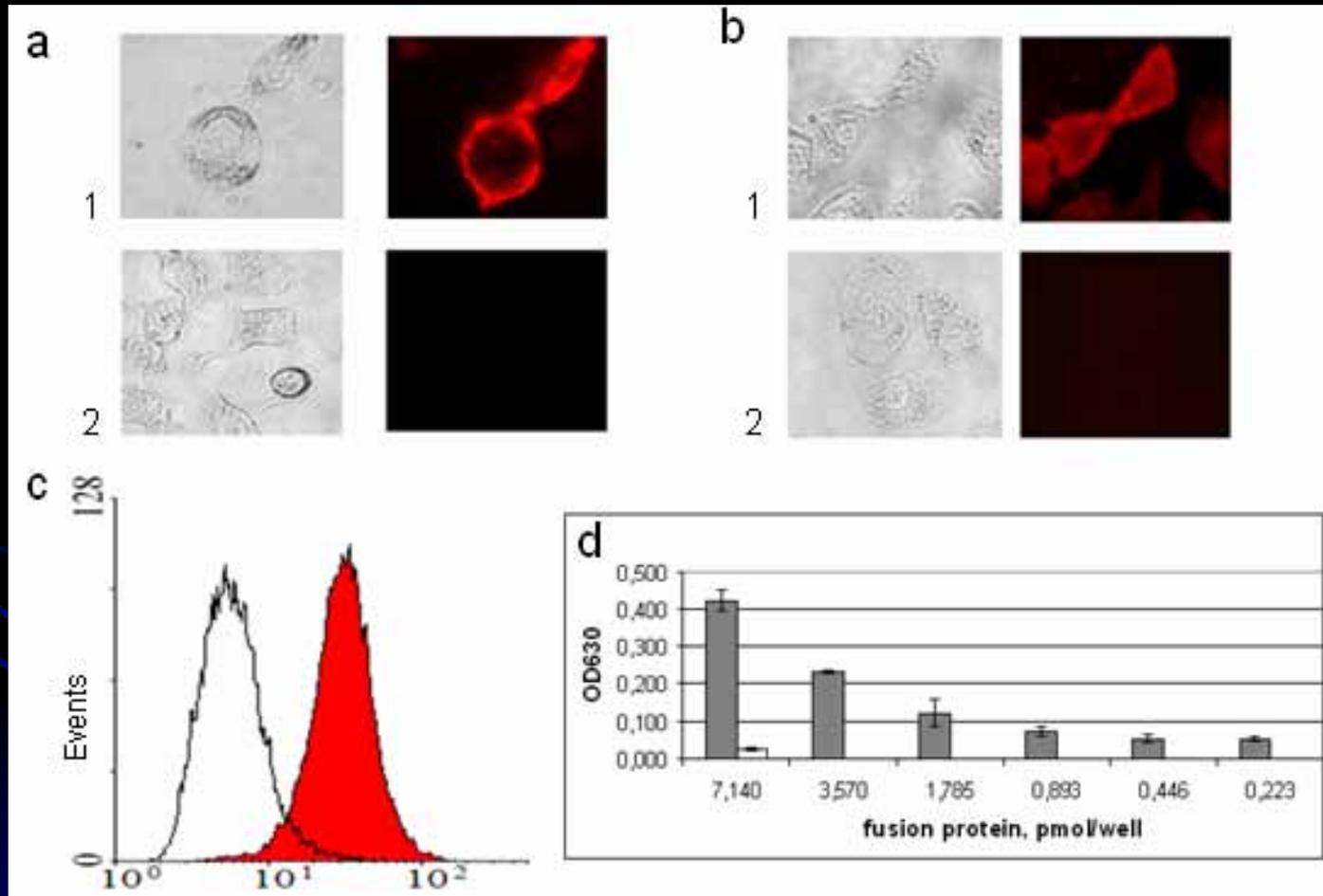


- breast cancer
- ovarian cancer
- stomach cancer
- lung cancer
- etc.

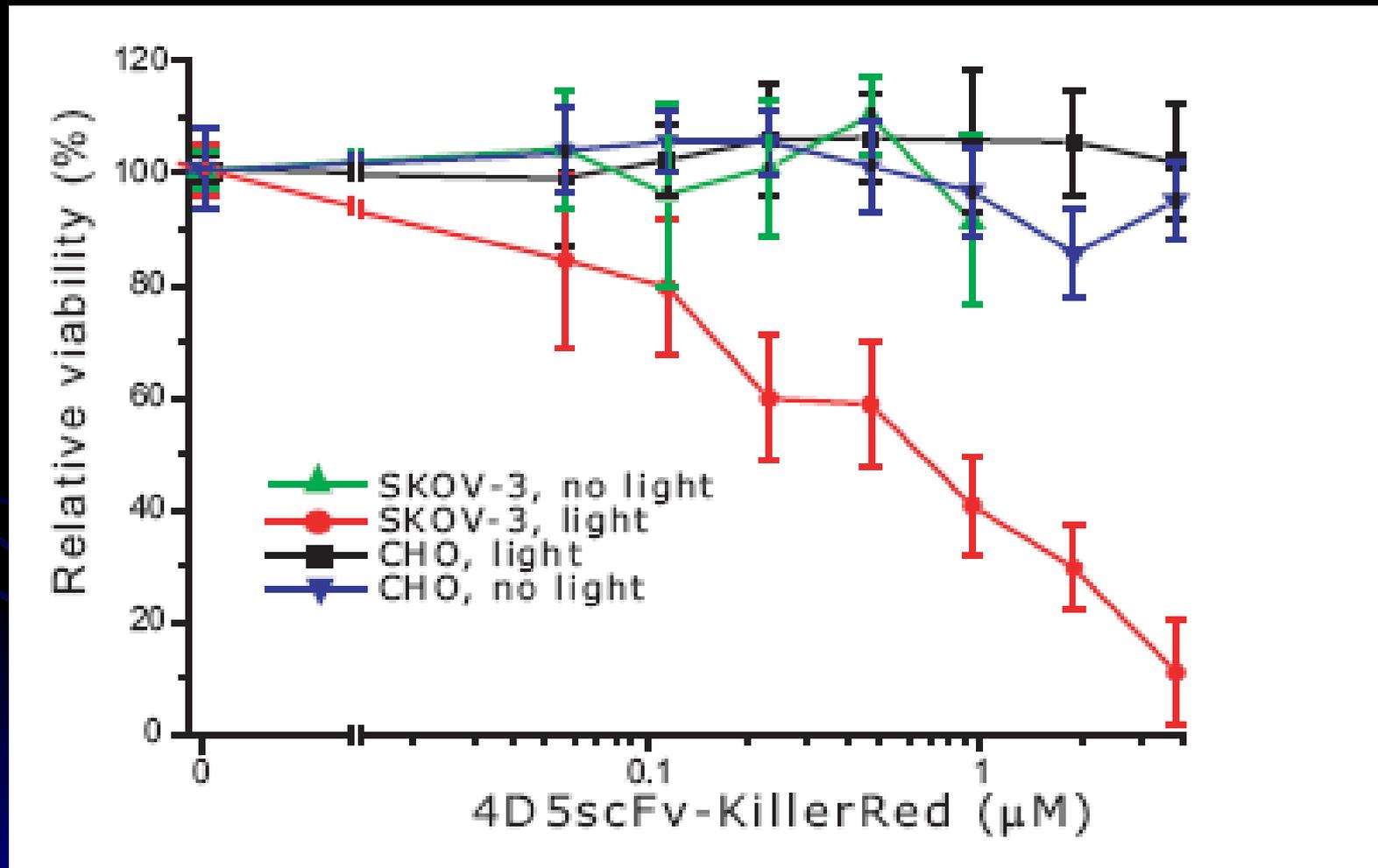
# Design of fully genetically encoded miniantibody-Killer Red-photosensitizer



# Miniantibody-Killer Red: fluorescent labeling of cancer cells

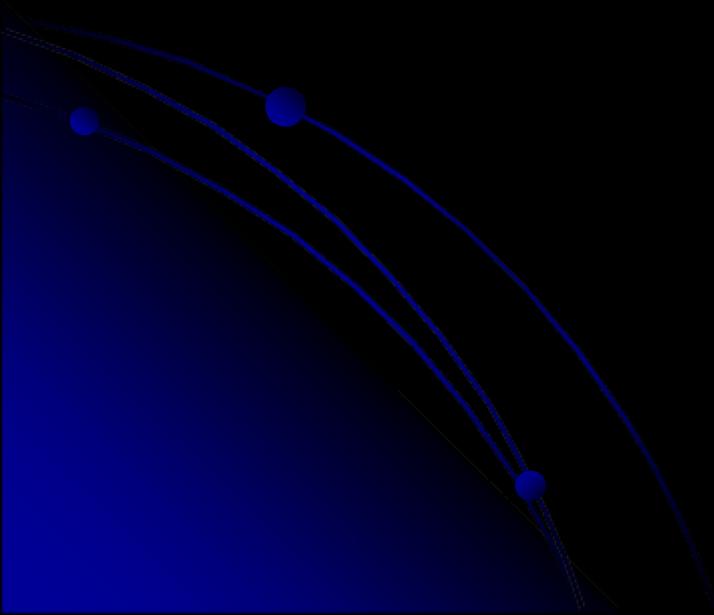


# Miniantibody-Killer Red: specific cytotoxicity on HER2/neu-positive cancer cells



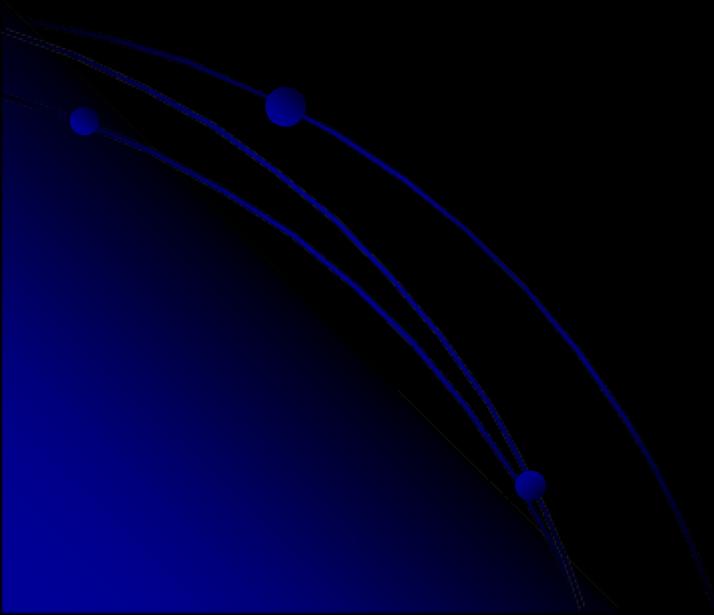
# Miniantibody-Killer Red-photosensitizer:

- specific cytotoxicity on cancer cells



# Miniantibody-Killer Red-photosensitizer:

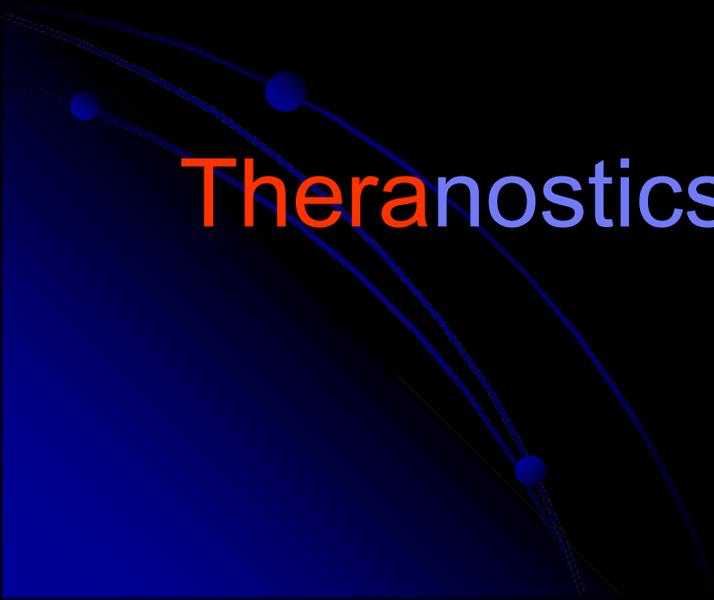
- specific cytotoxicity on cancer cells
- fluorescent labeling of cancer cells



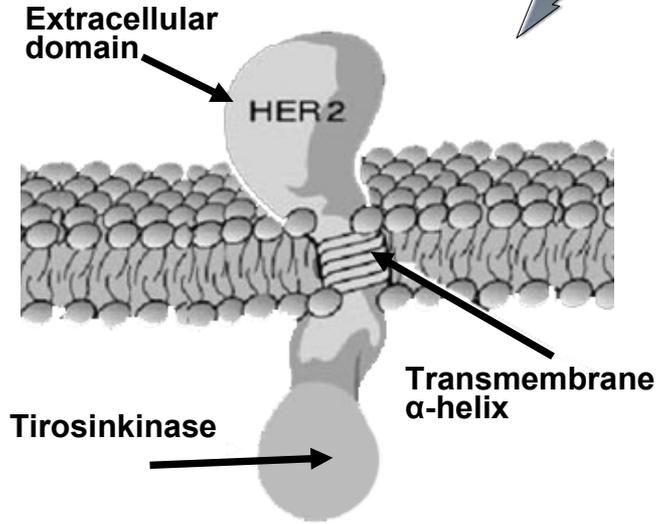
# Miniantibody-Killer Red-photosensitizer:

- specific cytotoxicity on cancer cells
- fluorescent labeling of cancer cells

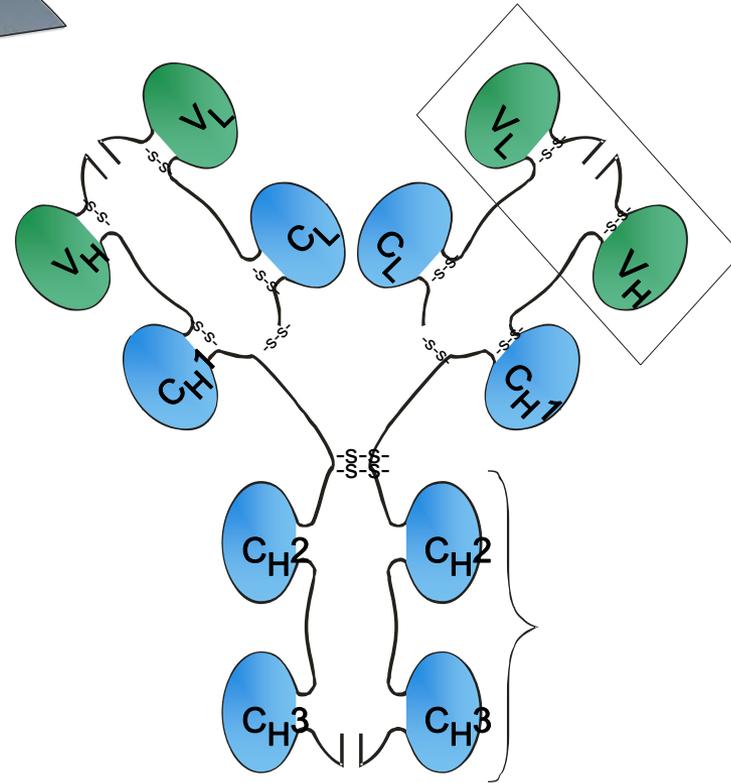
Theranostics = therapy + diagnostics



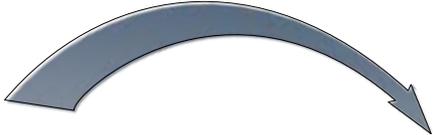
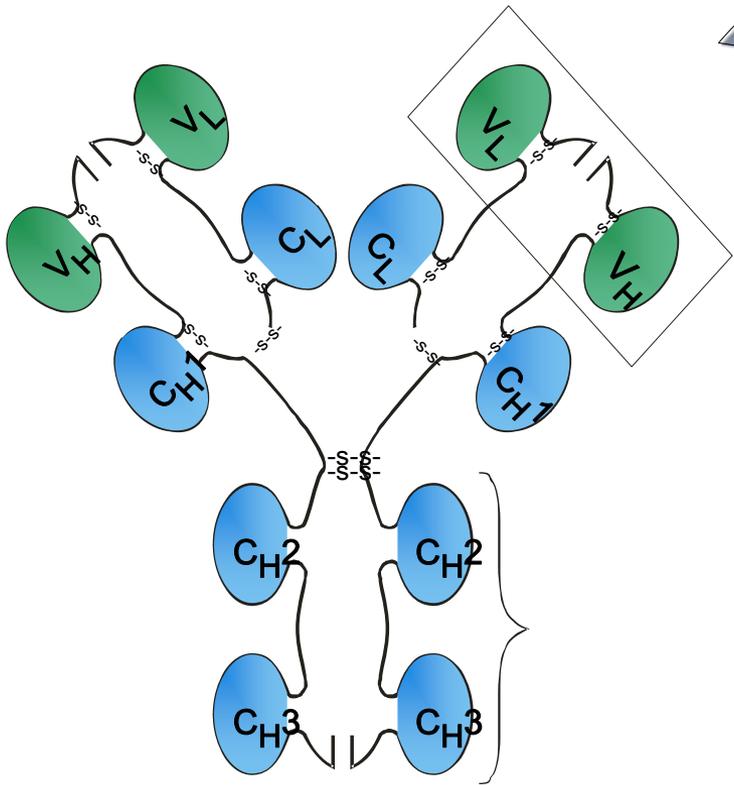
# HER2/neu



# Monoclonal antibody



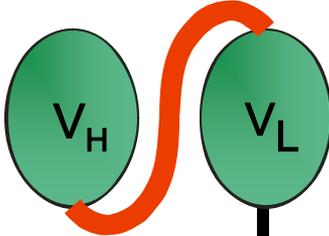
- breast cancer
- ovarian cancer
- stomach cancer
- lung cancer
- etc.



-S-S--S-S-

-S-S--S-S-

Miniantibody, scFv



barnase

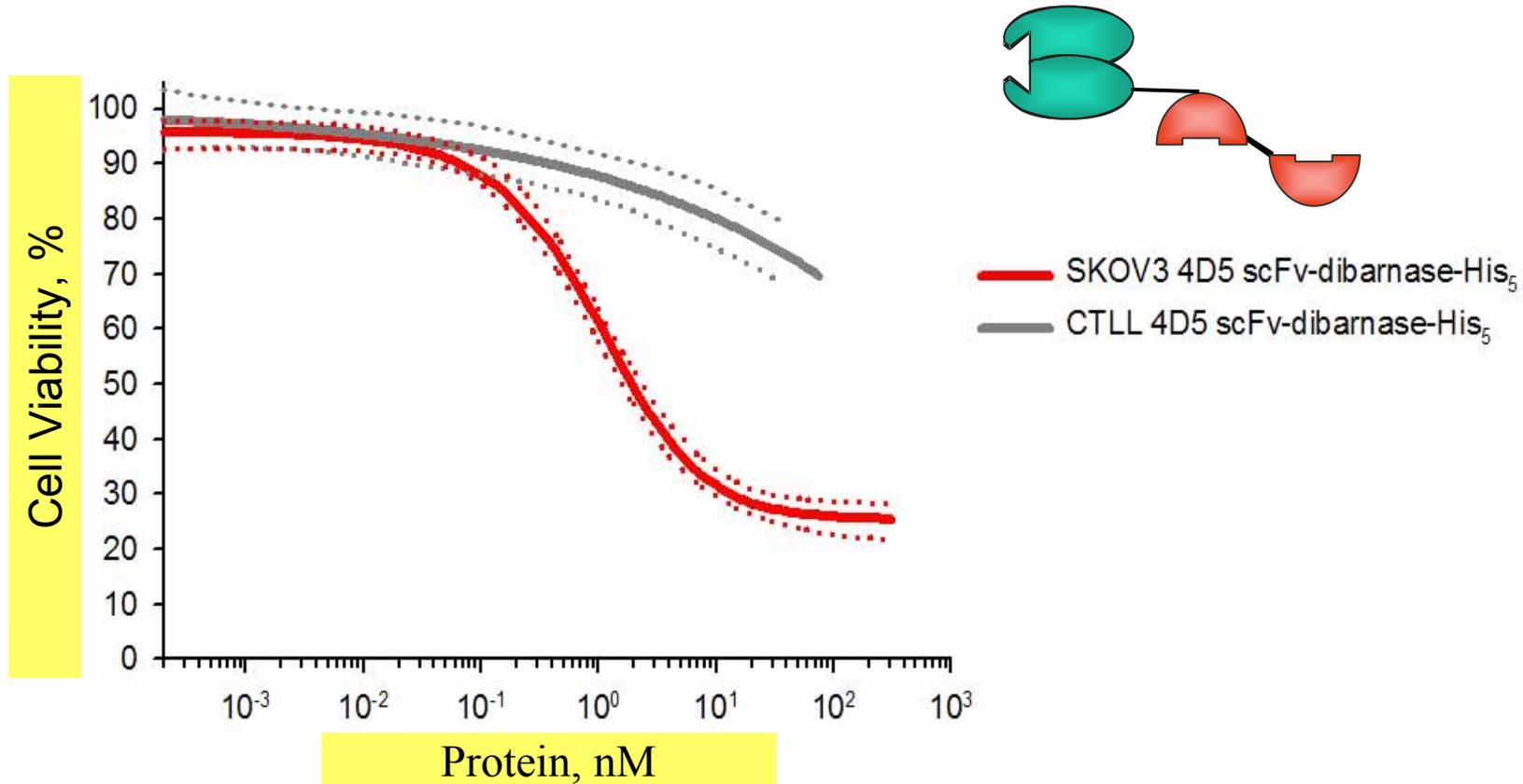


barnase



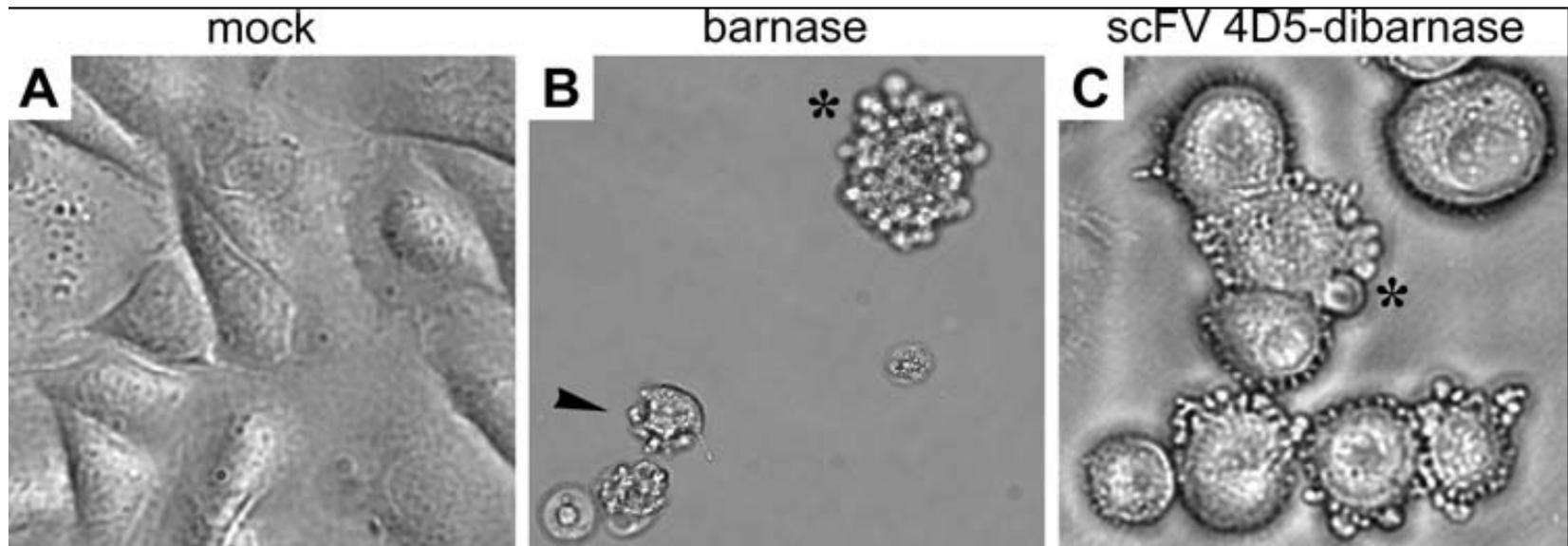
ImmunoRNase

# Specific toxicity of immunoRNase for HER2/neu-positive cancer cells

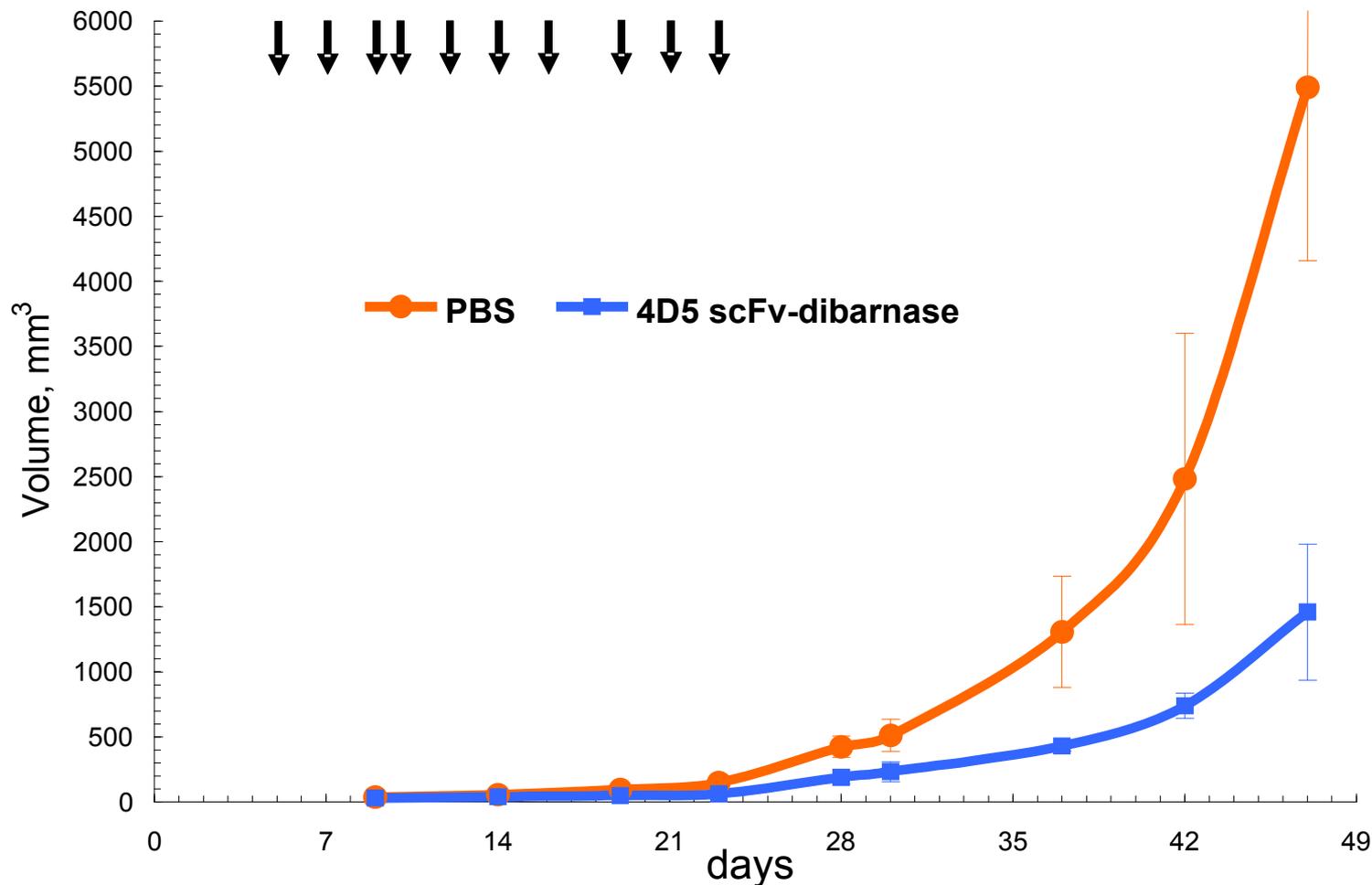


Concentration dependent cytotoxicity of immunoRNase for HER2/neu-positive (red) and HER2/neu-negative (grey) cells. 20 independent experiments.

# Membrane blebbing of SKOV-3 cancer cells treated by barnase and immunoRNase



# Торможение роста опухоли SKBR-3 иммуноРНКазой



*Balandin, Deyev at all, Invest New Drugs 2009.*

## Торможение роста опухоли иммуноРНКазой 4D5 scFv-dibarnase на 47 сутки составило 75%

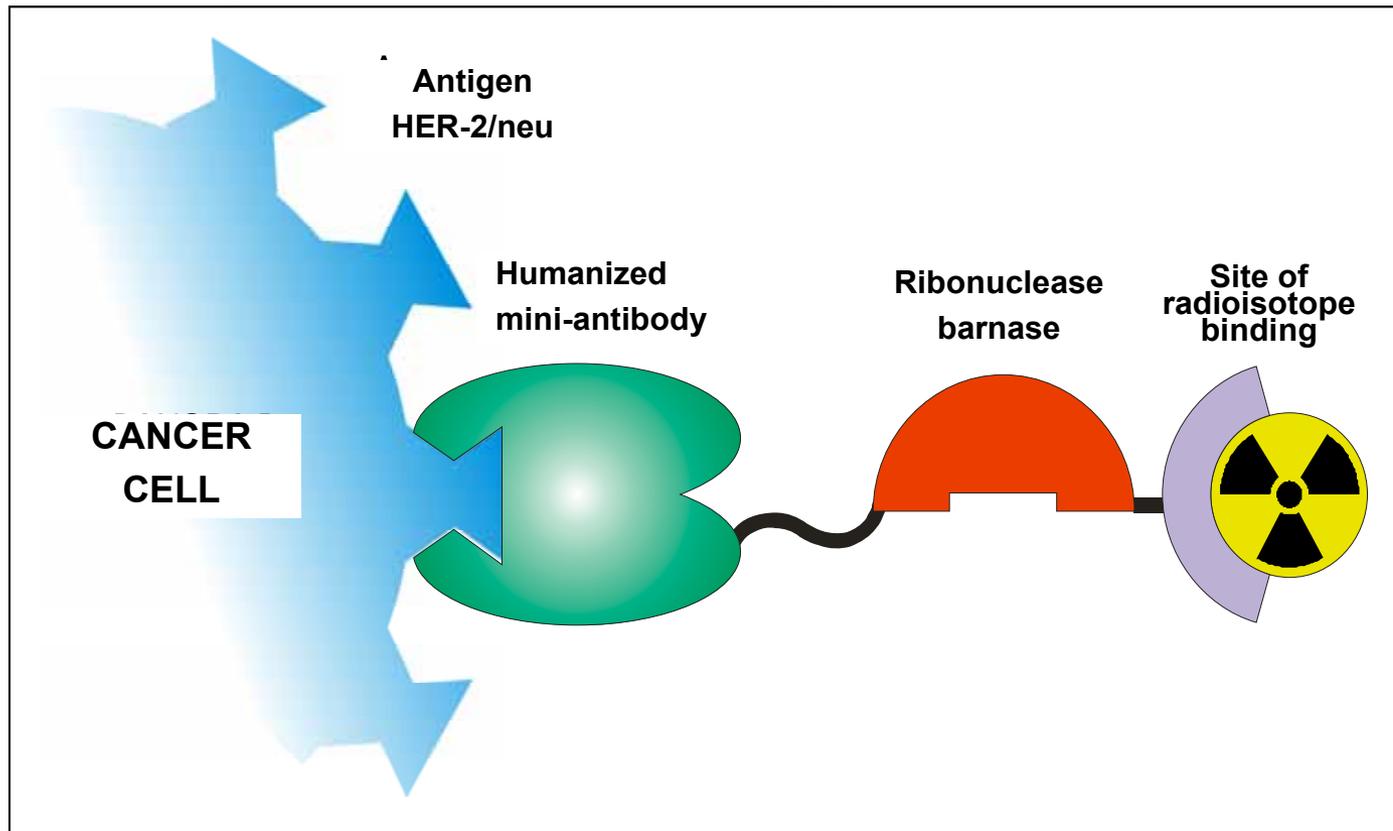


23 сутки, контрольная группа, опухоль 245 мм<sup>3</sup>.  
В пересчете на вес тела человека (70кг)  
такая опухоль весит **954 г**

Средний размер опухоли в контрольной группе мышей на 23 сутки составил 149 мм<sup>3</sup> (А), максимальный размер - 245 мм<sup>3</sup> у мыши весом 18 г (В). В опытной группе мышей средний размер опухоли 23 сутки составил 61,6 мм<sup>3</sup>(Б) максимальный размер-77 мм<sup>3</sup> у мыши весом 18 г. Таким образом, средний размер опухоли в опытной группе мышей **уменьшился в 2,4 раза** по отношению к контролю на 23 сутки.

***Balandin, Deyev at all, Invest New Drugs 2009.***

# Иммунотоксин бинарного действия



Иммунотоксин включает фрагмент миниантитела, обеспечивающий адресность доставки препарата к раковой клетке, рибонуклеазу, разрушающую биосинтетический аппарат опухолевой клетки и пептид для связывания радиоактивных изотопов.

Токсический эффект рибонуклеазы усиливается за счет радиоактивного излучения – отсюда бинарность действия

- Адресная доставка - воздействие на клетки с определенным «молекулярным портретом»
- Создание бифункциональных соединений: нацеливающая часть + терапевтический (или диагностический) агент
- **Диагностические и терапевтические соединения должны состоять из набора взаимодополняющих блоков, объединяемых с помощью универсального модуля**

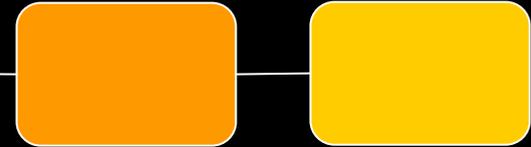
# Сборка из блоков



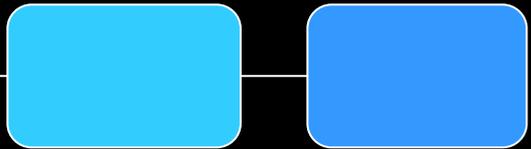
Producent 1



+



Producent 2

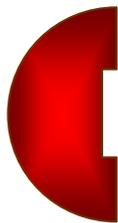


# Димеризационный модуль барназа-барстар

Barnase

\*

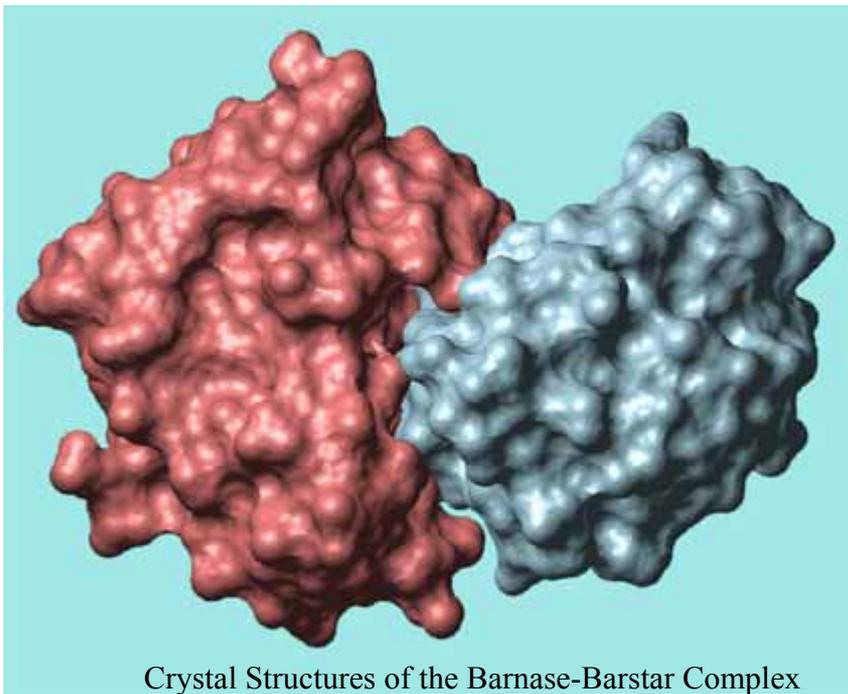
Barstar



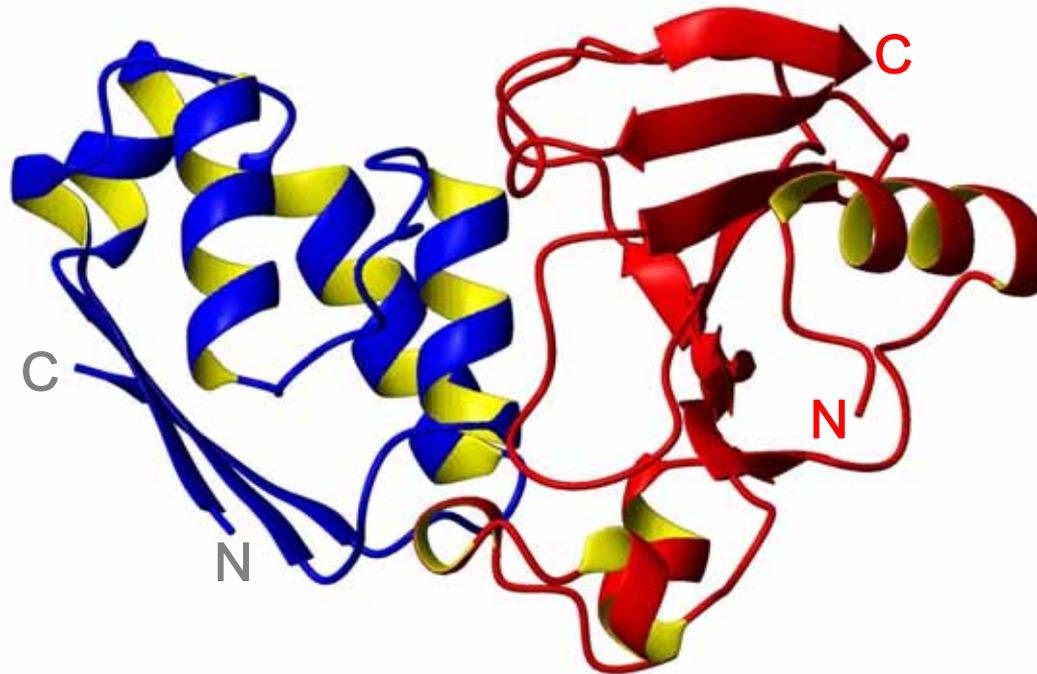
$$K_D = 10^{-14} \text{M}$$

RNAse  
Extracellular  
110 residues  
12 kDa  
Cys free  
H102,R83/87

Inhibitor  
Intracellular  
89 residues  
10 kDa  
Cys40/82  
D35/39,...



# Димеризационный модуль барназа-барстар



**barnase** – **barstar** complex  
one barnase molecule binds strictly  
to one barstar molecule

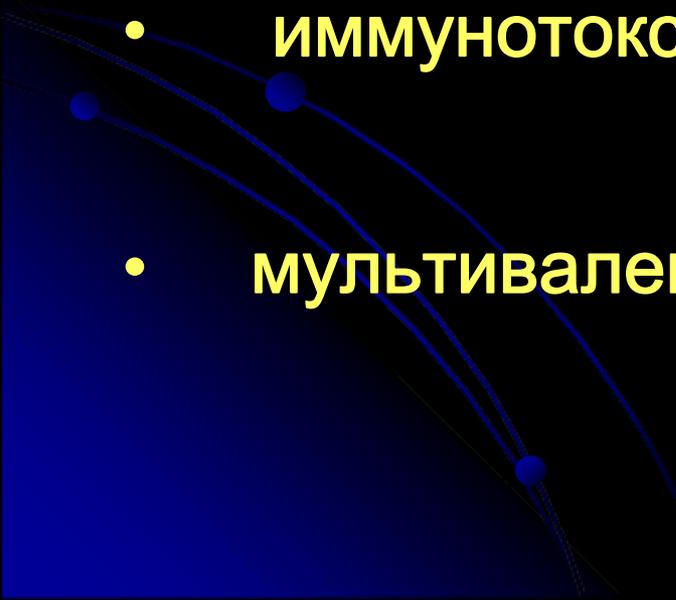
**EFPKPSTPPGSSGGAP**

linker peptide: modified hinge region



AUG 11 2007

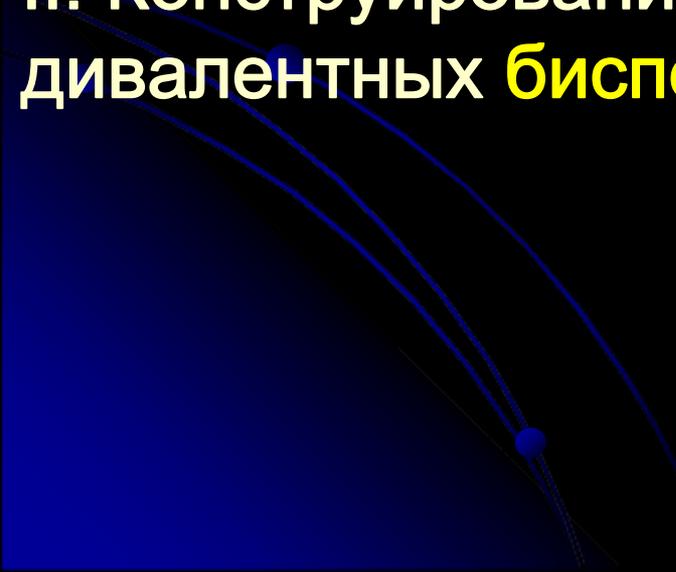
# Модуль «барназа-барстар» как молекулярный наноконструктор для создания:

- агентов, визуализирующих раковые клетки
  - ИММУНОТОКСИНОВ
  - мультивалентных мини-антител
- 

# I. Генно-инженерные наноконструкции на основе миниантител

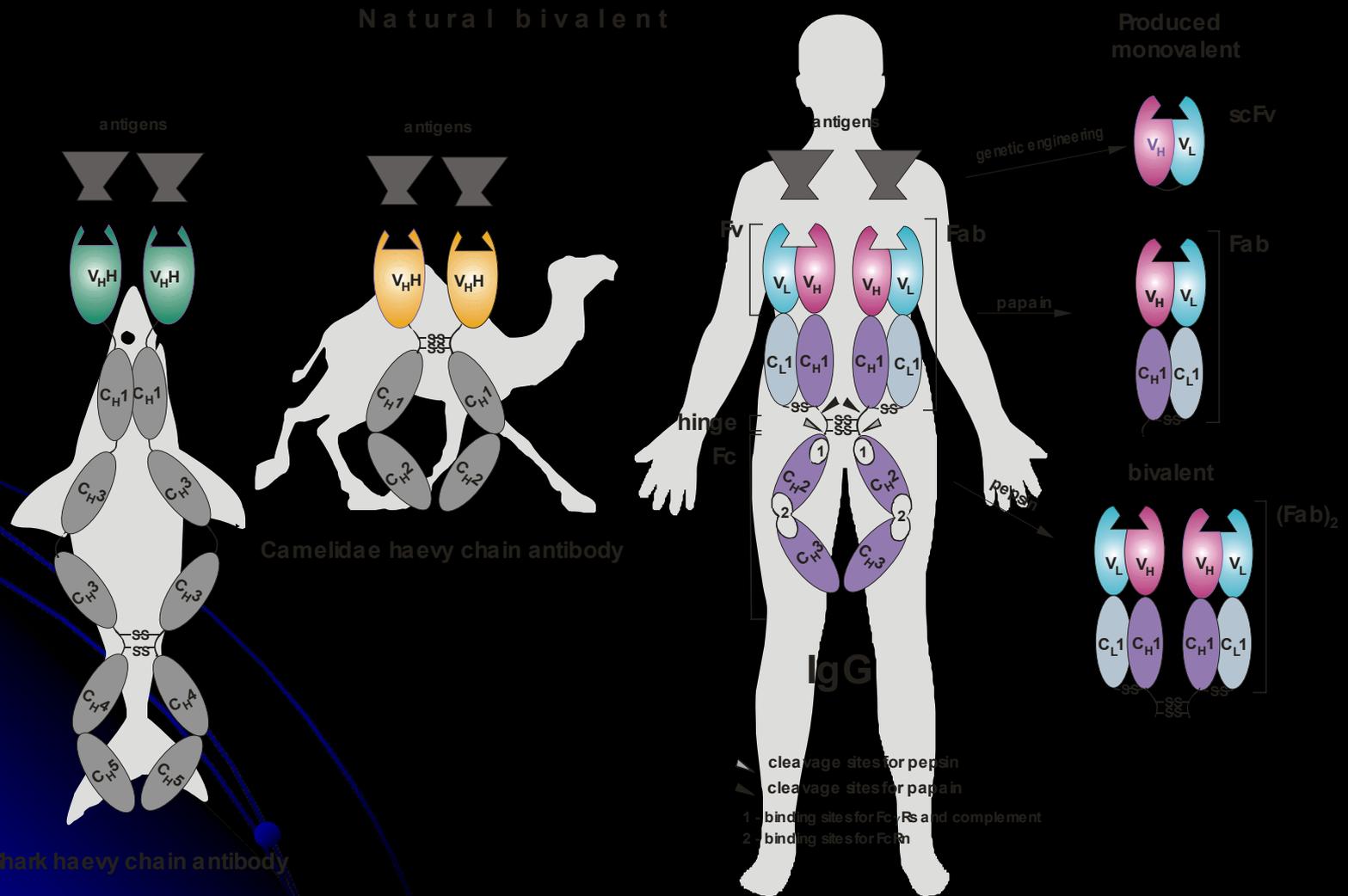
I. Конструирование мультивалентных **моноспецифических** мини-антител

II. Конструирование дивалентных **биспецифических** мини-антител



antigens

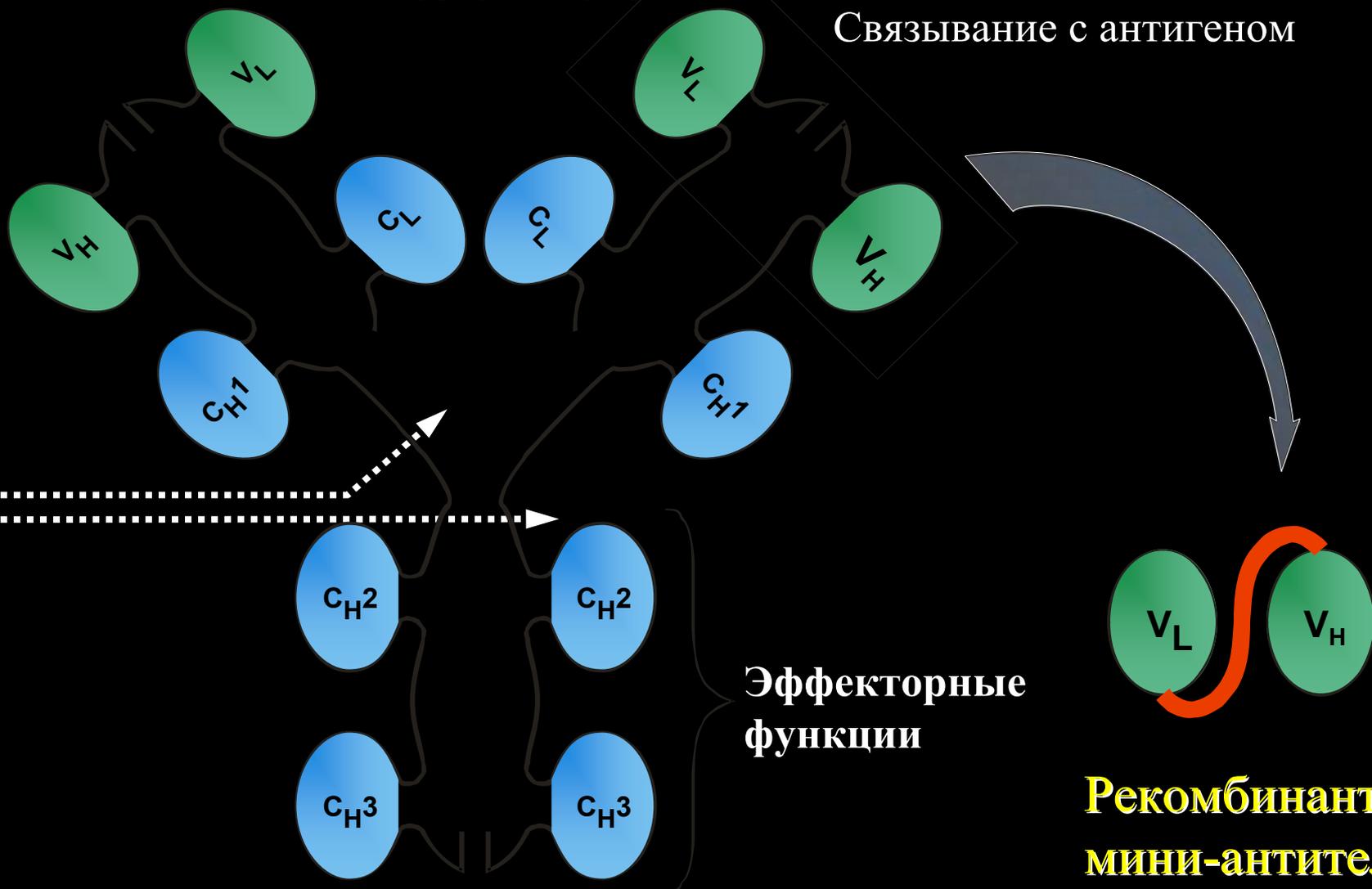
# Мультивалентность - – характерное свойство природных антител

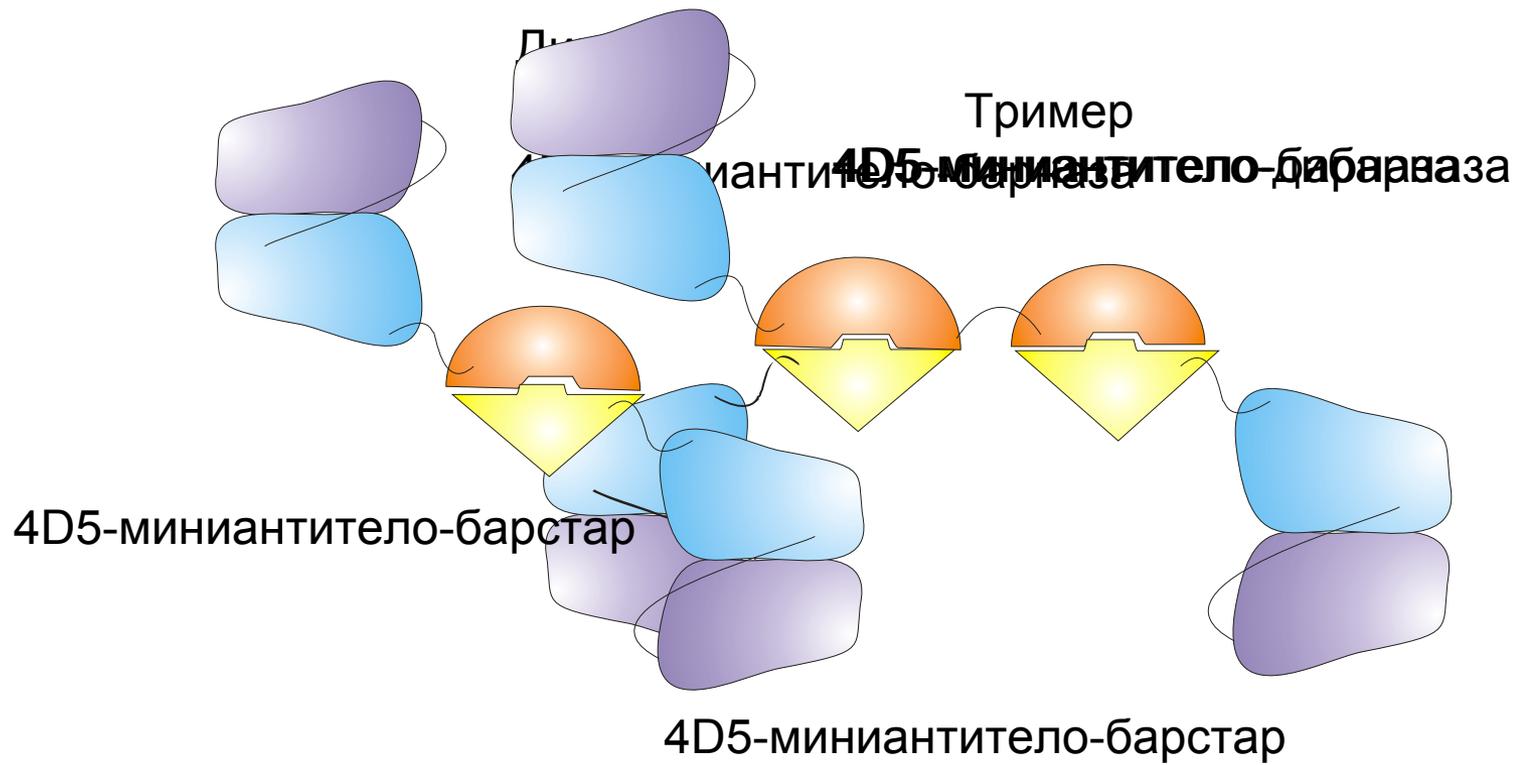


# Инженерия антител

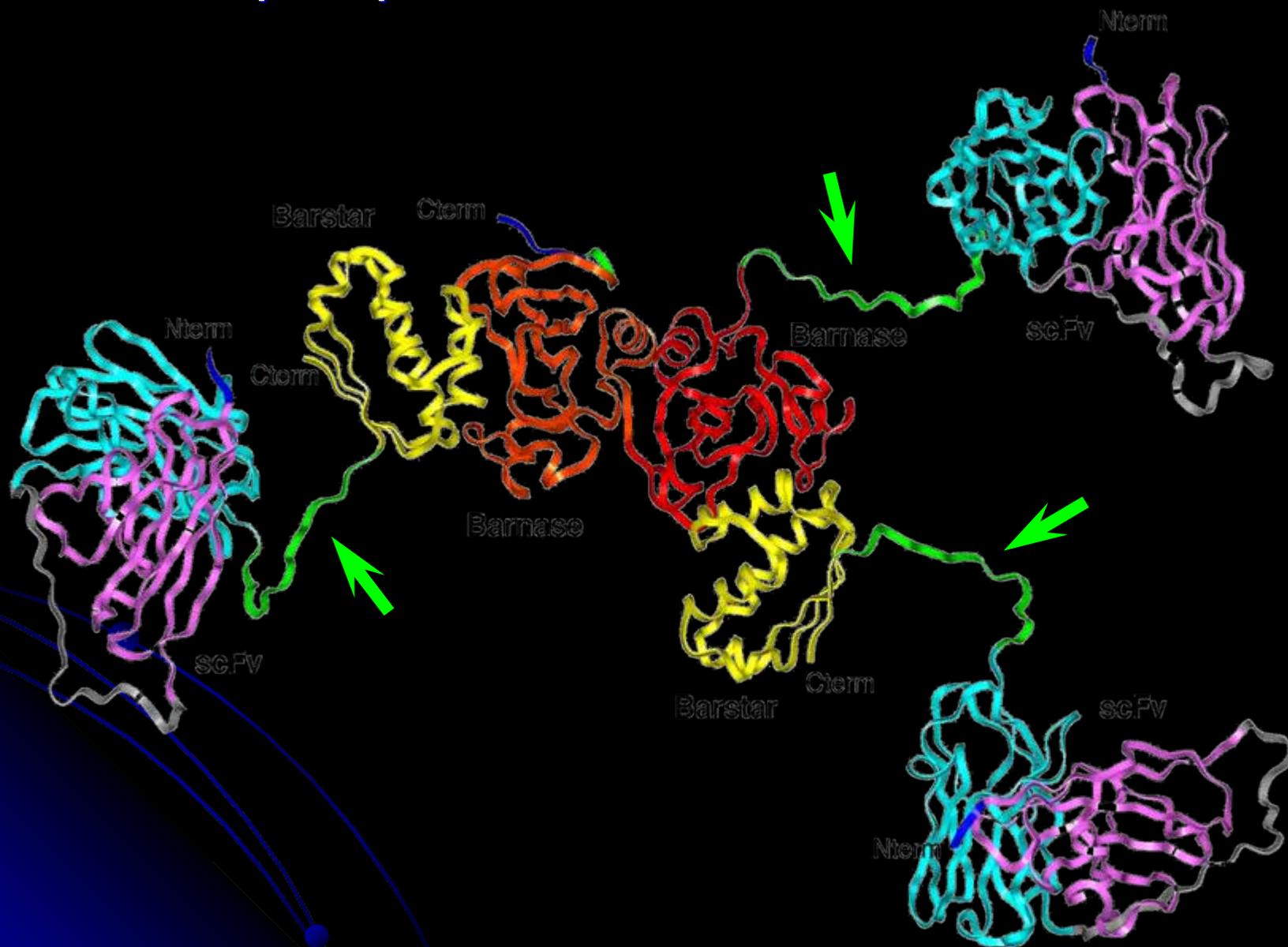
Полноразмерное моноклональное  
мышинное антитело

Связывание с антигеном



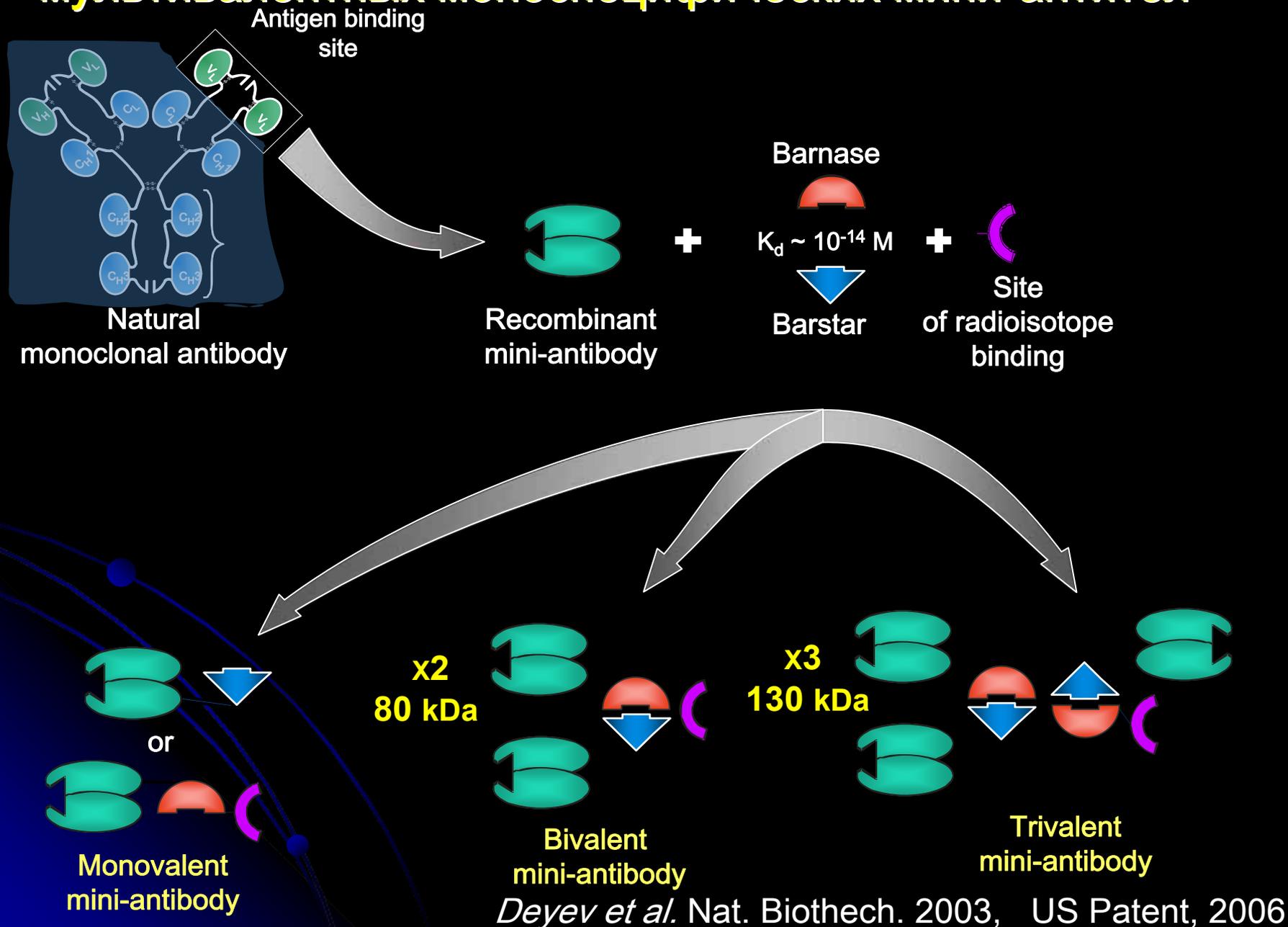


# Тримерные мини-антитела, 132 kDa



# Конструирование

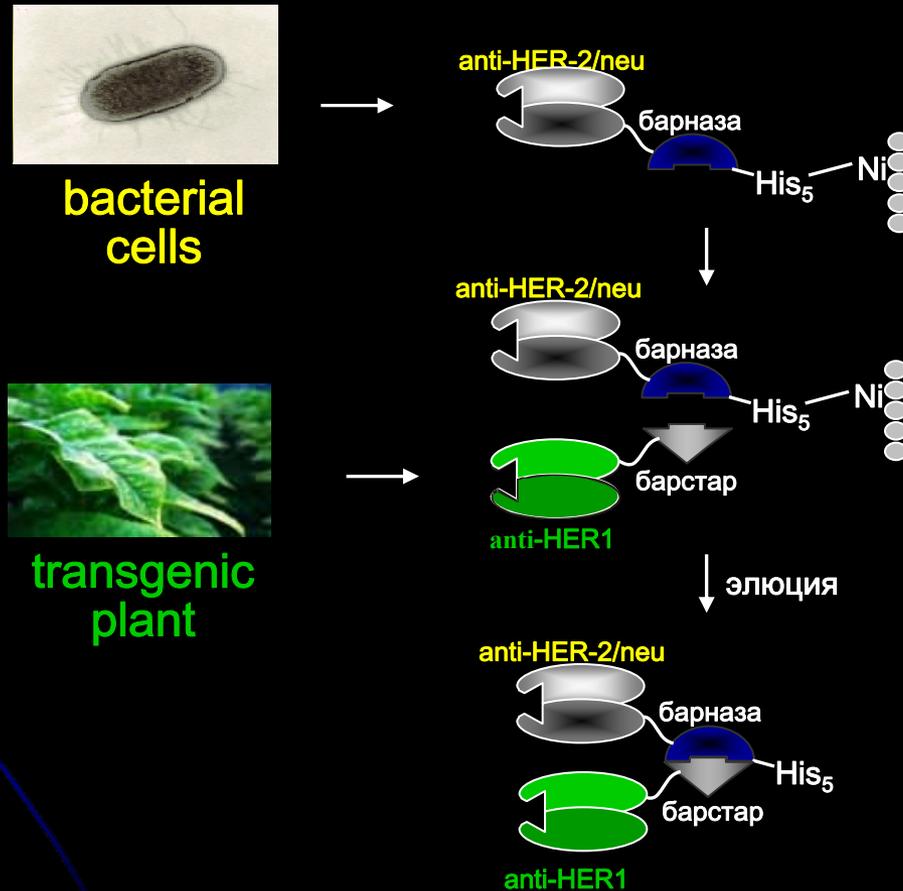
## мультивалентных моноспецифических мини-антител



# Конструирование

## дивалентных биспецифических мини-антител

Heterodimer anti-tumor scFv antibodies directed to HER1 and HER2/neu produced in different expression systems : transgenic plant and bacterial cells using barstar-barnase interaction.

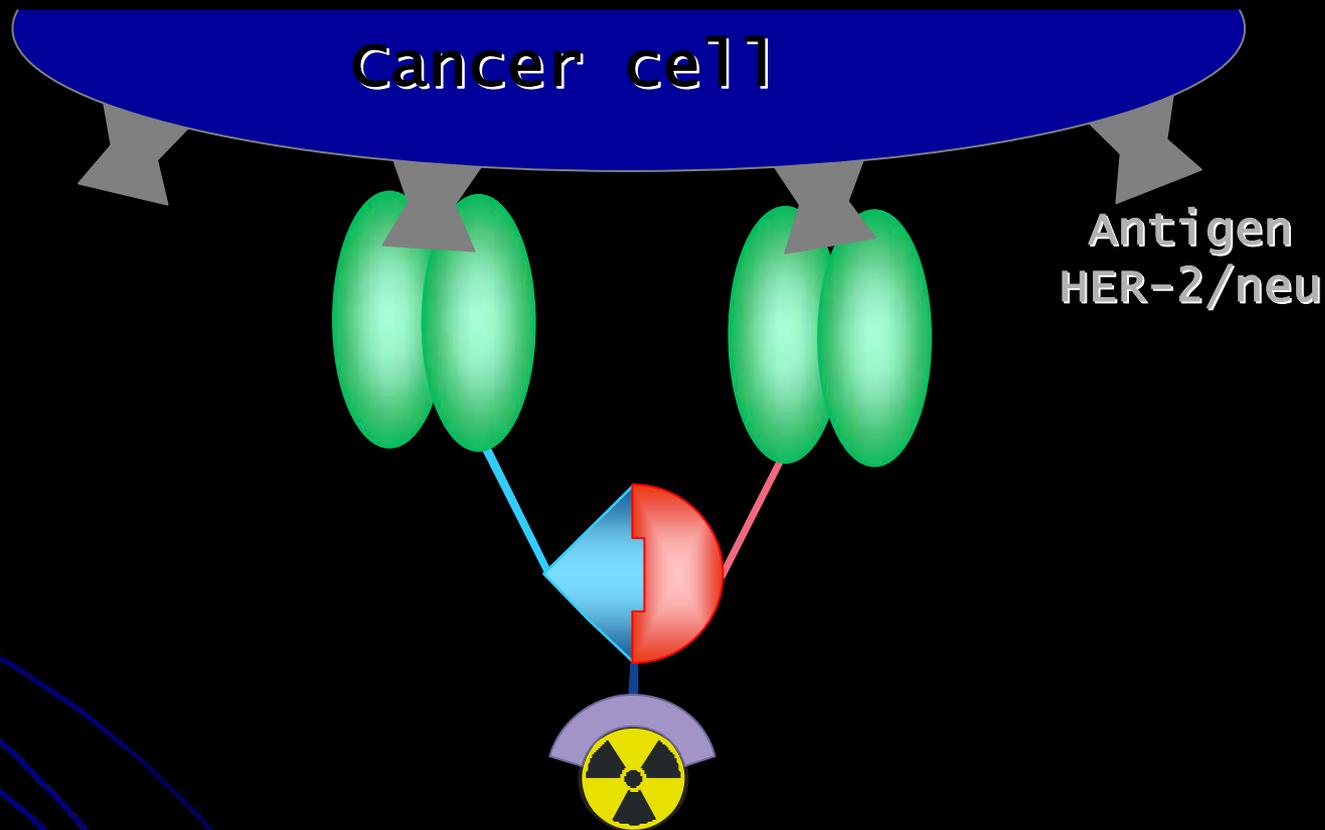


# ИГХ анализ HER2/neu на срезах парафиновых блоков опухолевого материала, полученного при хирургических операциях больных раком молочной железы .



Пациент №3.  
p185HER2/neu  
статус 3+  
А- опухолевые  
клетки,  
Б – клетки  
соединительной  
ткани  
(фибробласты);  
В – клетки  
жировой ткани  
(липоциты)  
Ядра клеток  
окрашены  
гематоксилином

# Направленная доставка радиоизотопов к опухолевым тканям



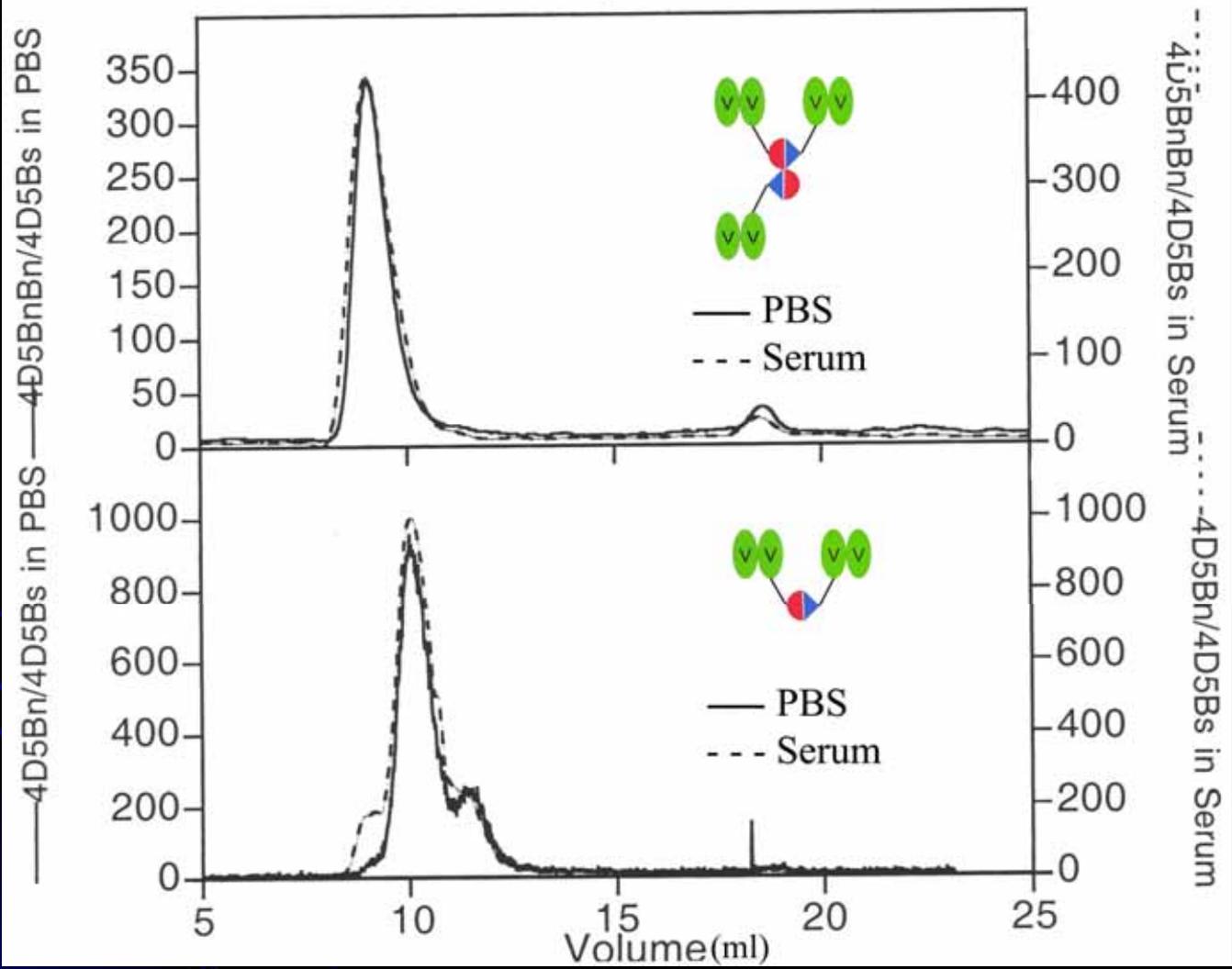
Radioisotope

$^{99m}\text{Tc}, \gamma \ t_{1/2} = 6 \text{ h}$

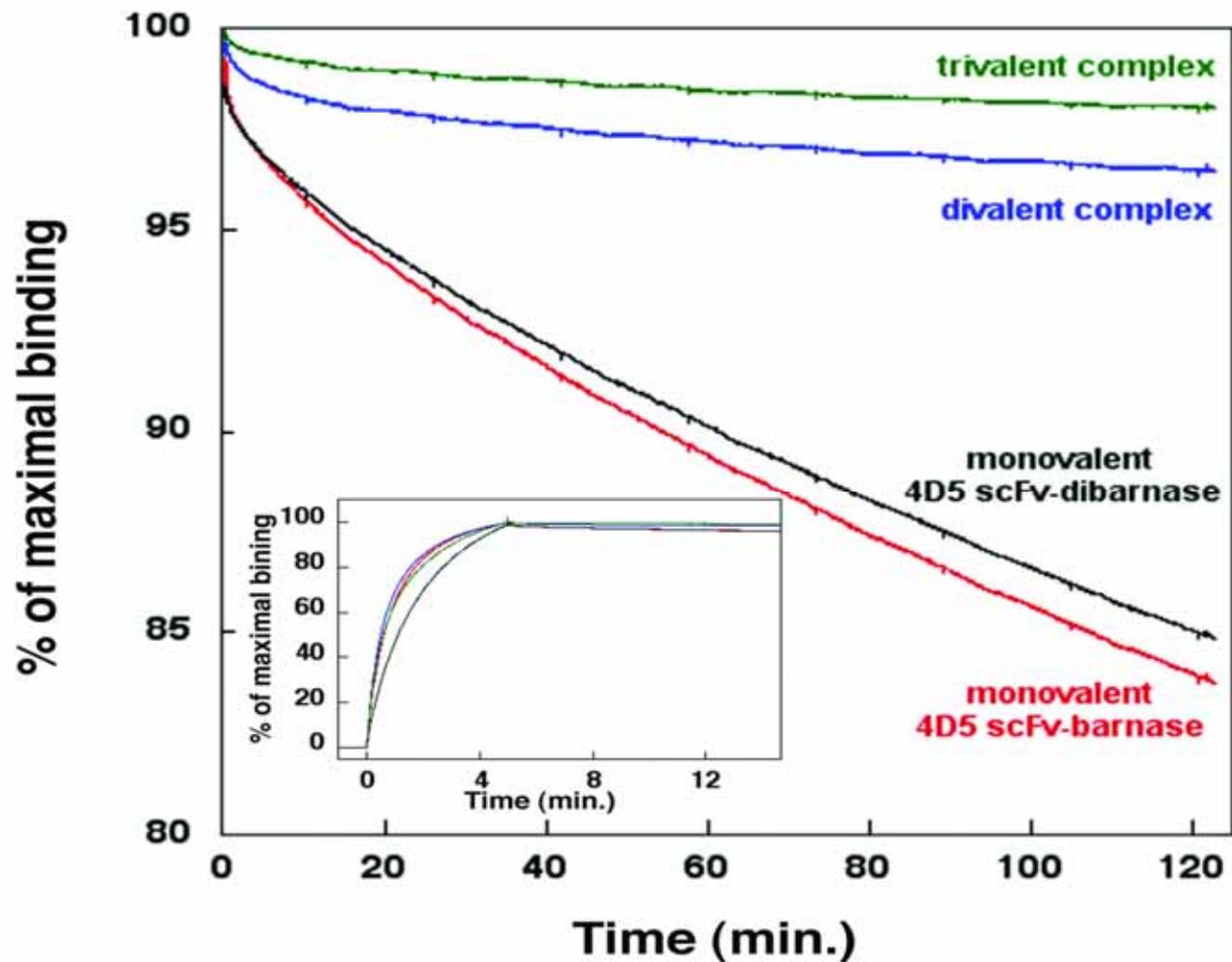
$^{186}\text{Re}, \beta \ t_{1/2} = 90 \text{ h}$

$^{188}\text{Re}, \beta \ t_{1/2} = 17 \text{ h}$

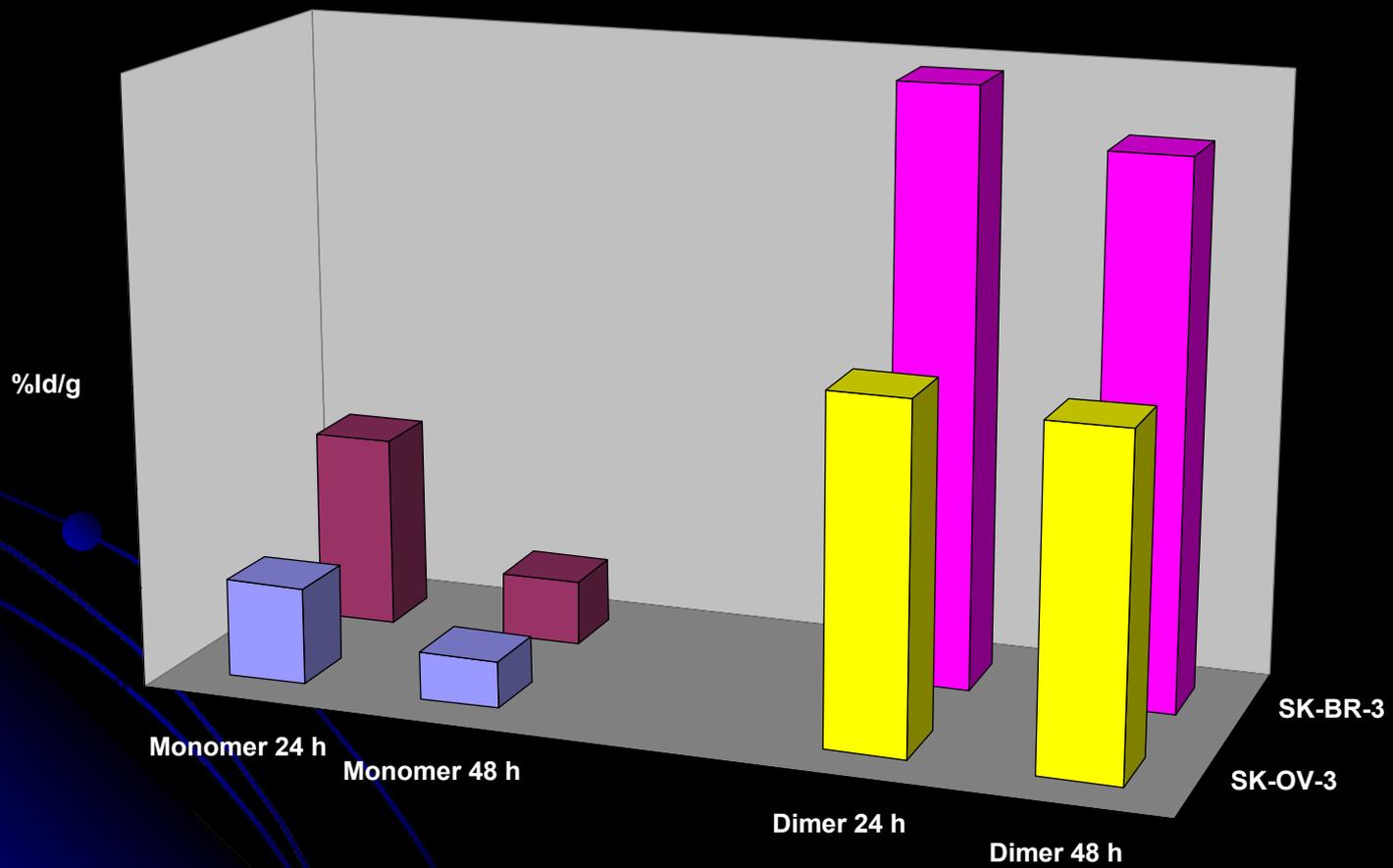
# Serum stability, 24h at 37°C



# Мультивалентность мини-антител увеличивает их связывающую активность (BIAcore)

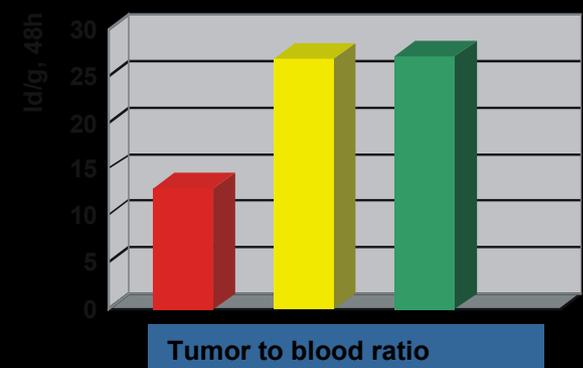
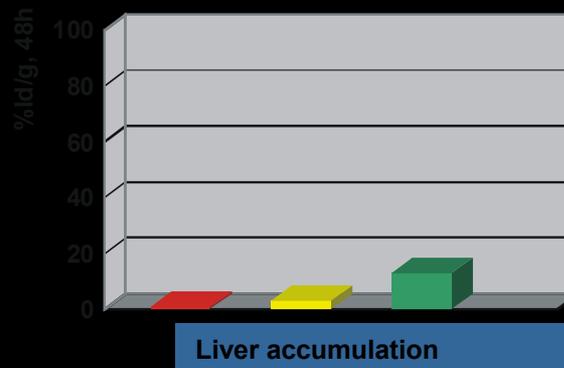
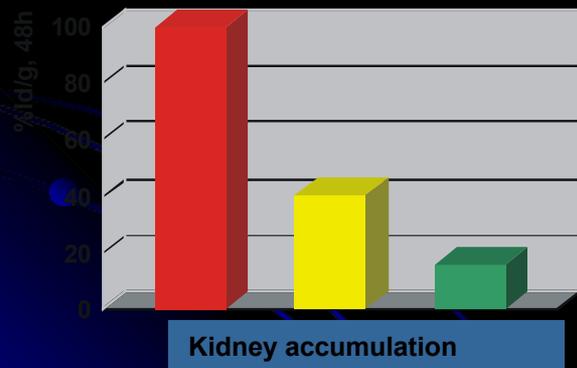


# Накопление радиоизотопа в опухоли, %Id/g



# Преимущества мультивалентных мини-антител

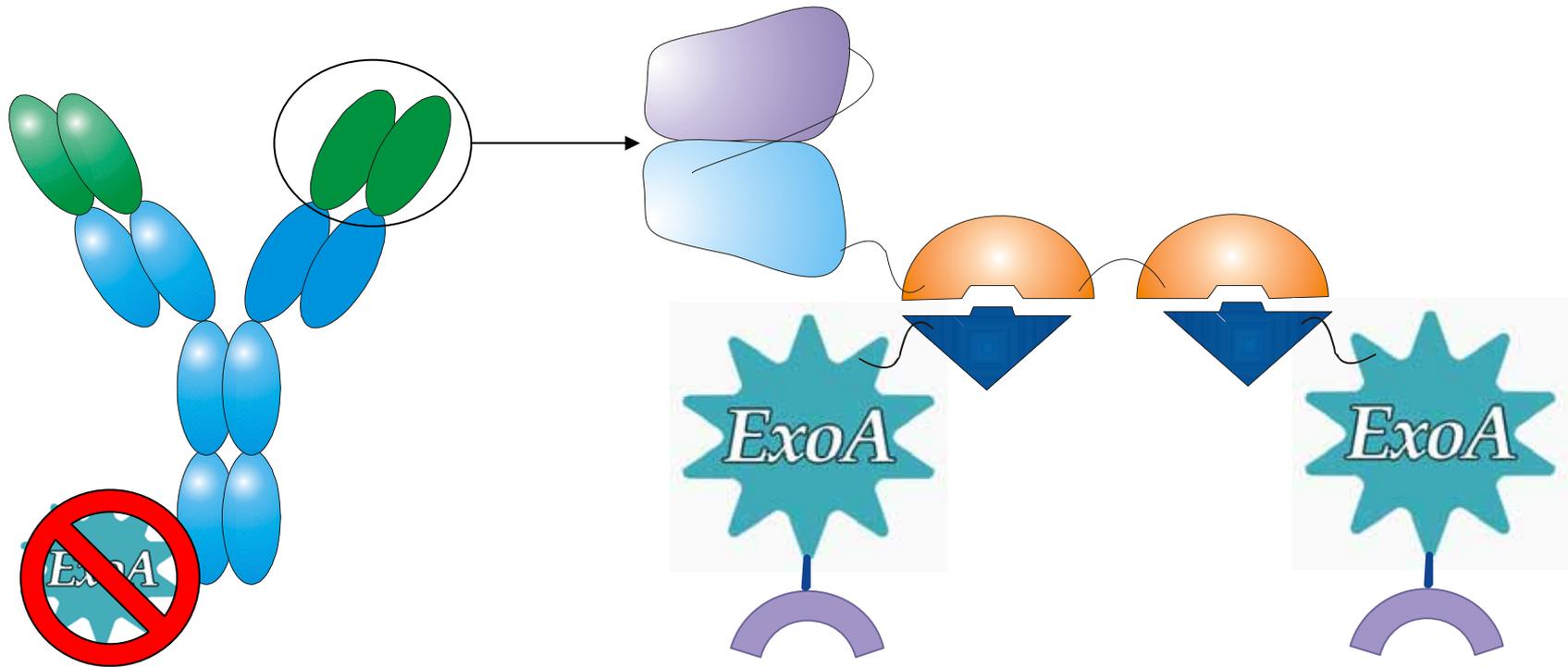
- Оптимальная молекулярная масса
- Соотношение опухоль/кровь = 27 : 1 (природные антитела – 2.5 : 1)
- Оптимальное время циркуляции в крови
- Невысокое накопление в печени и почках

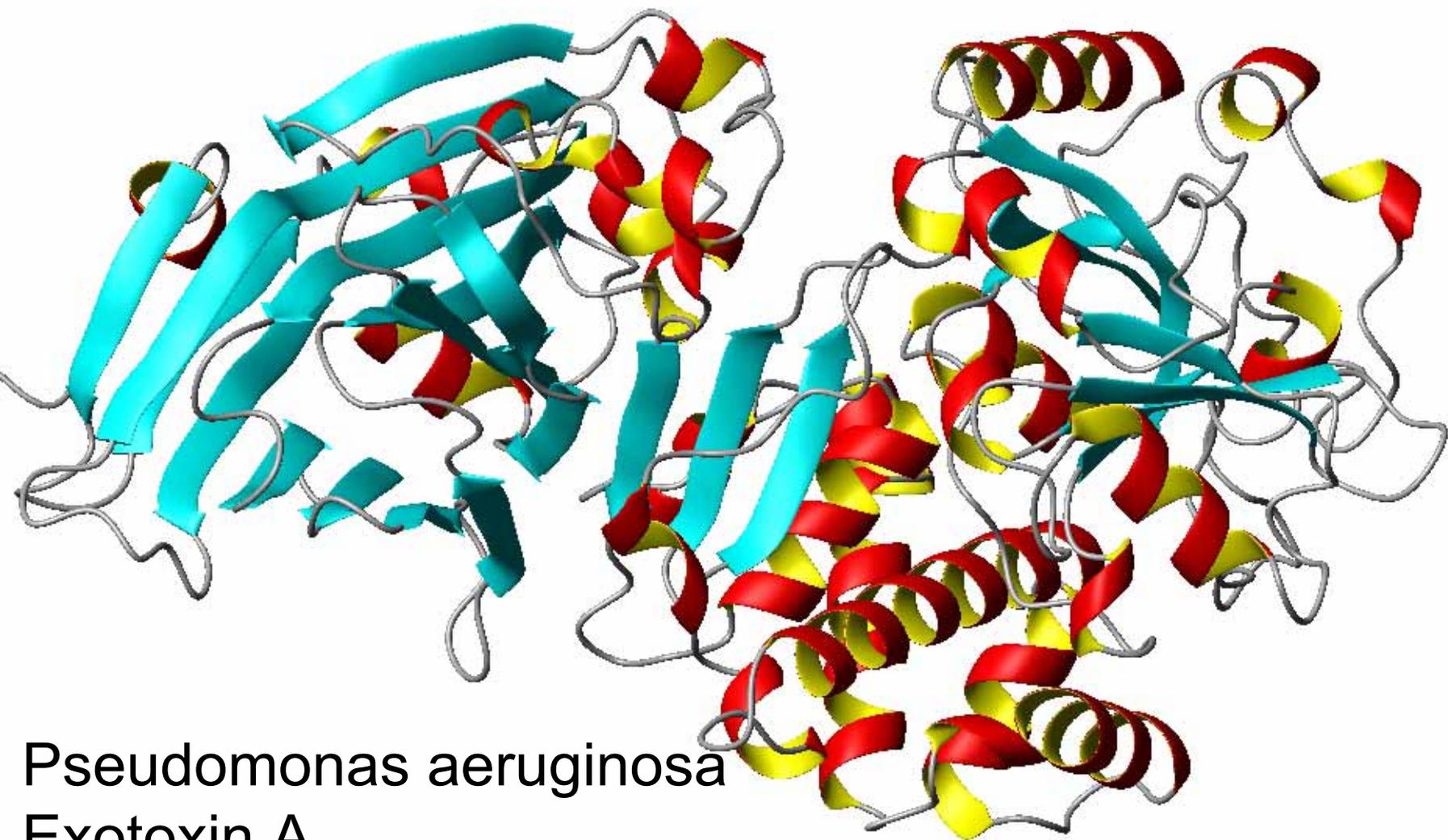


■ **Monomer**

■ **Dimer**

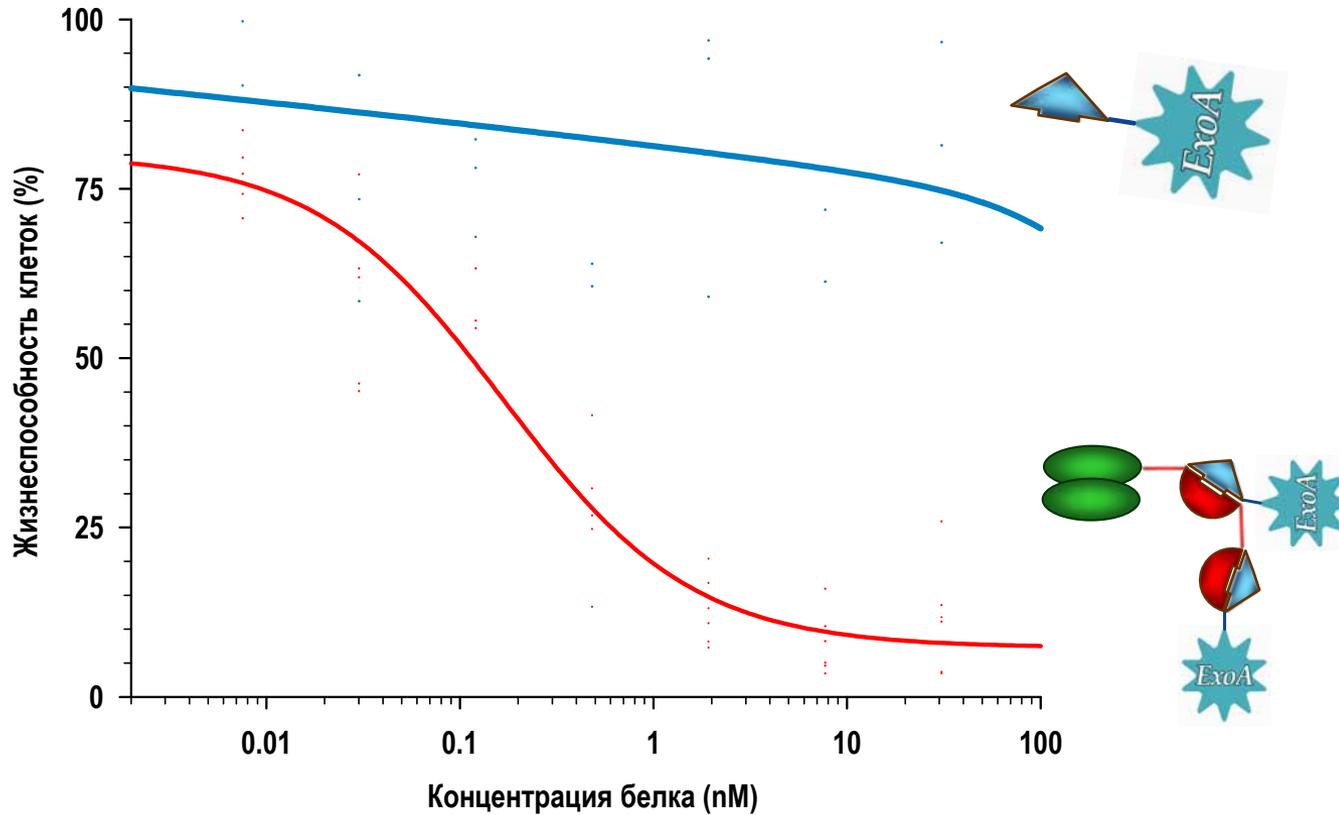
■ **Trimer**





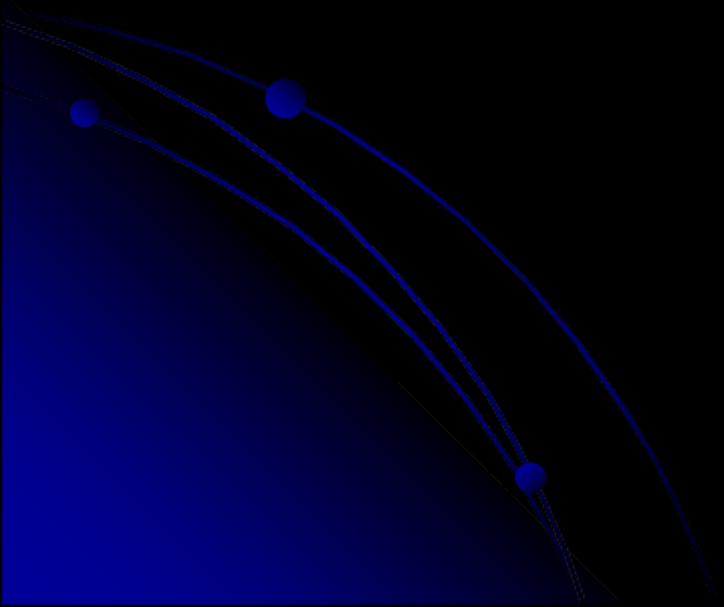
*Pseudomonas aeruginosa*  
Exotoxin A

# Подавление роста раковых клеток SKOV-3 надмолекулярным комплексом «анти-HER2/neu scFv-дибарназа/барстар-экзотоксин А»



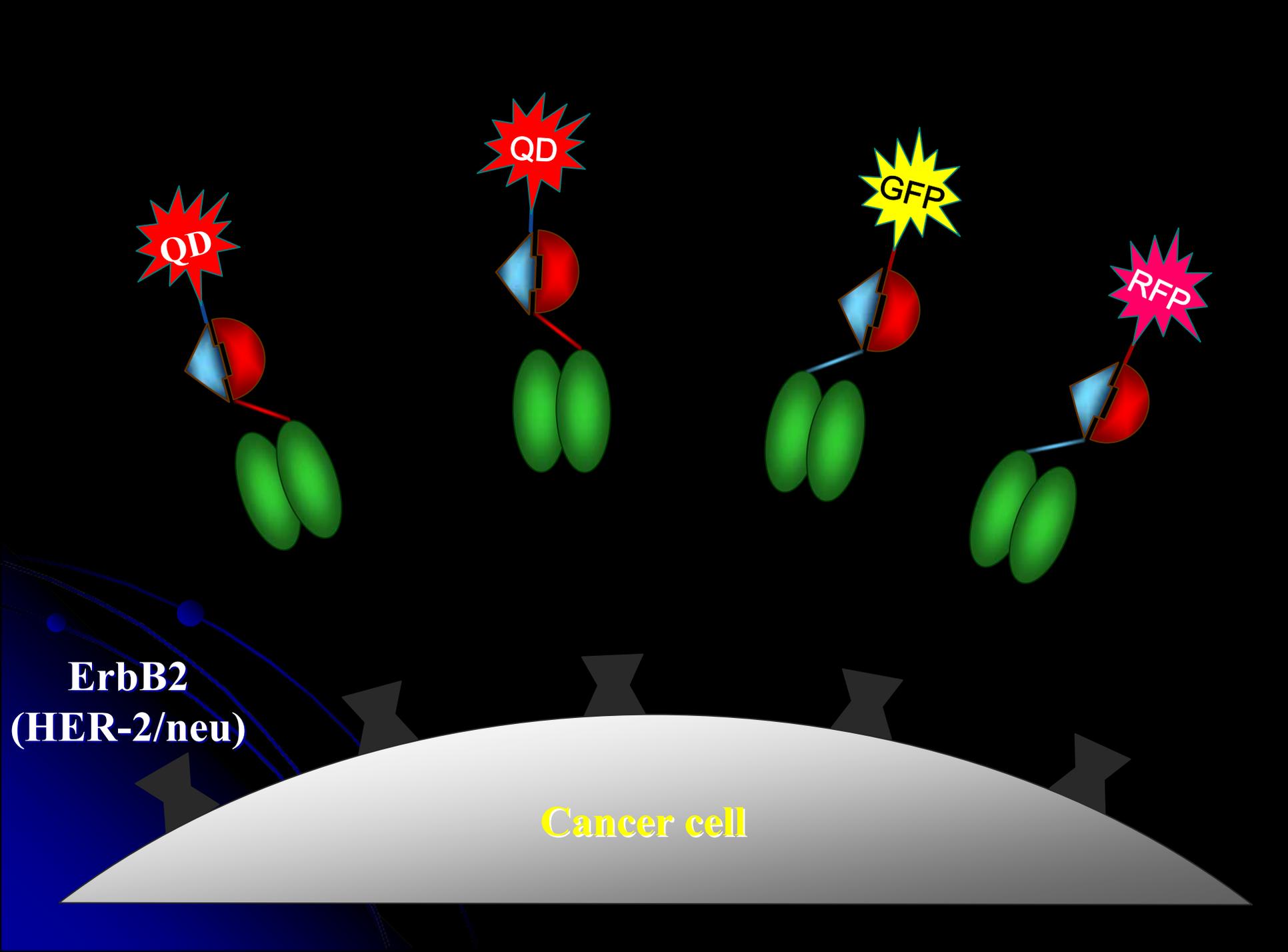
- 4D5 scFv-дибарназа \* барстар-экзотоксин А
- барстар-экзотоксин А

## II. Гибридные биосовместимые наноконструкции



## II. Гибридные биосовместимые наноконструкции

II.1. Синтез нанобиоконъюгатов на основе противораковых мини-антител, флуоресцентных белков и полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек)



QD

QD

GFP

RFP

ErbB2  
(HER-2/neu)

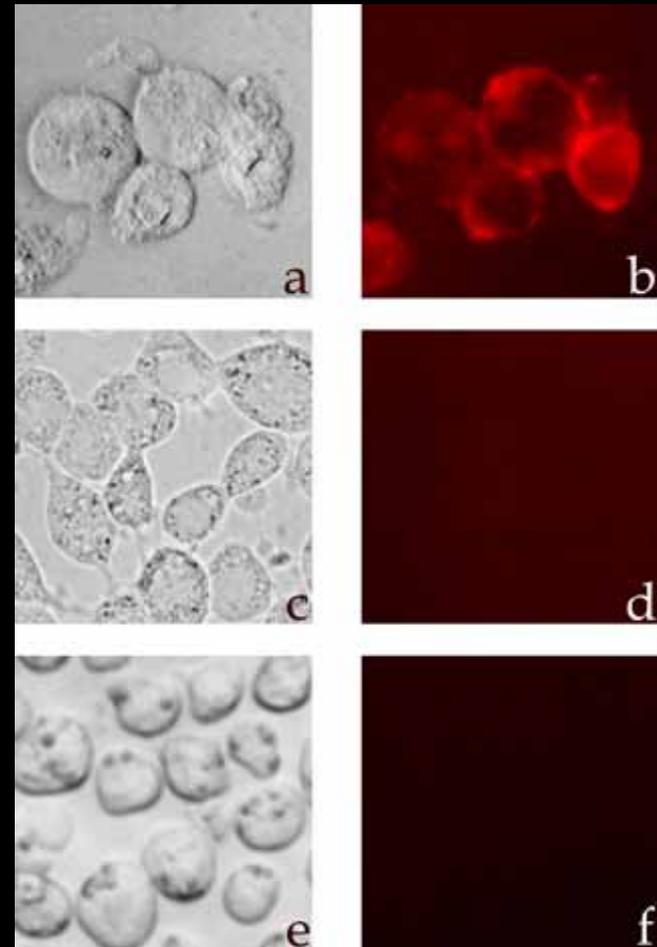
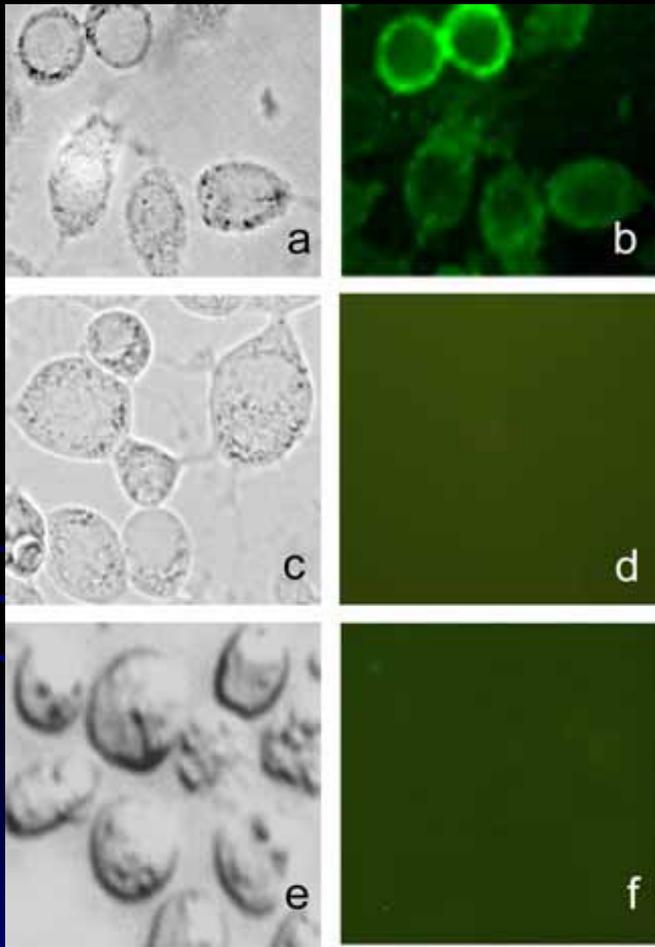
Cancer cell

# IV.1. Визуализация ракового маркера с помощью анти-HER2/неу мини-антитела, слитого с барназой, и флуоресцентных белков

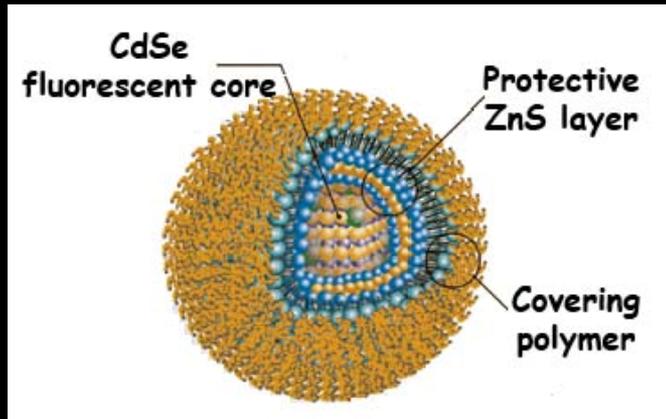
барстар-GFP

или

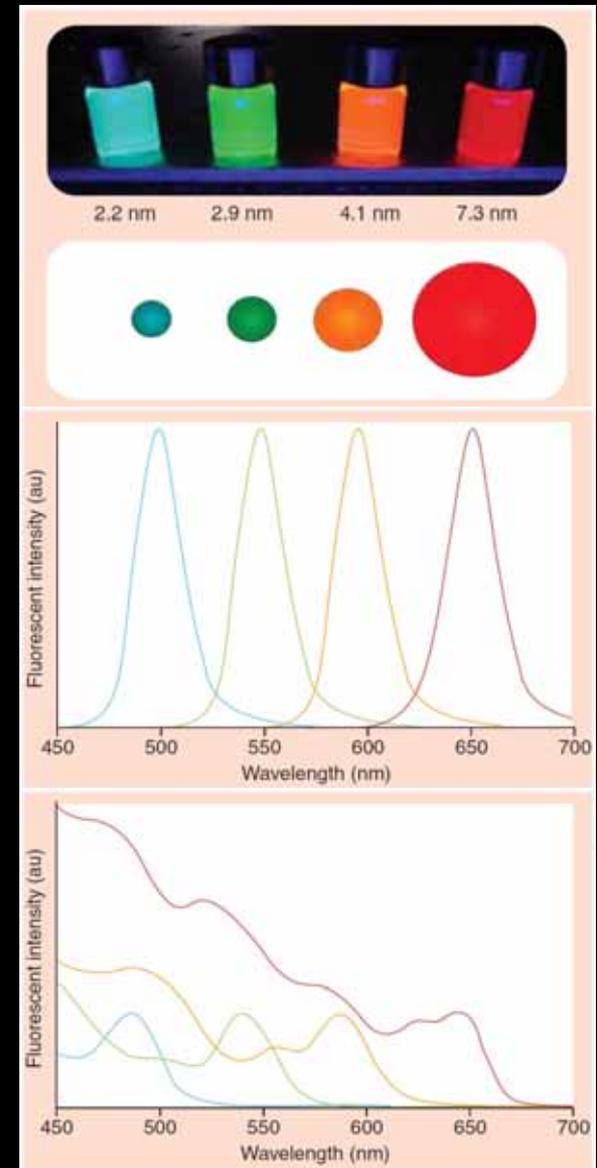
барстар-RFP



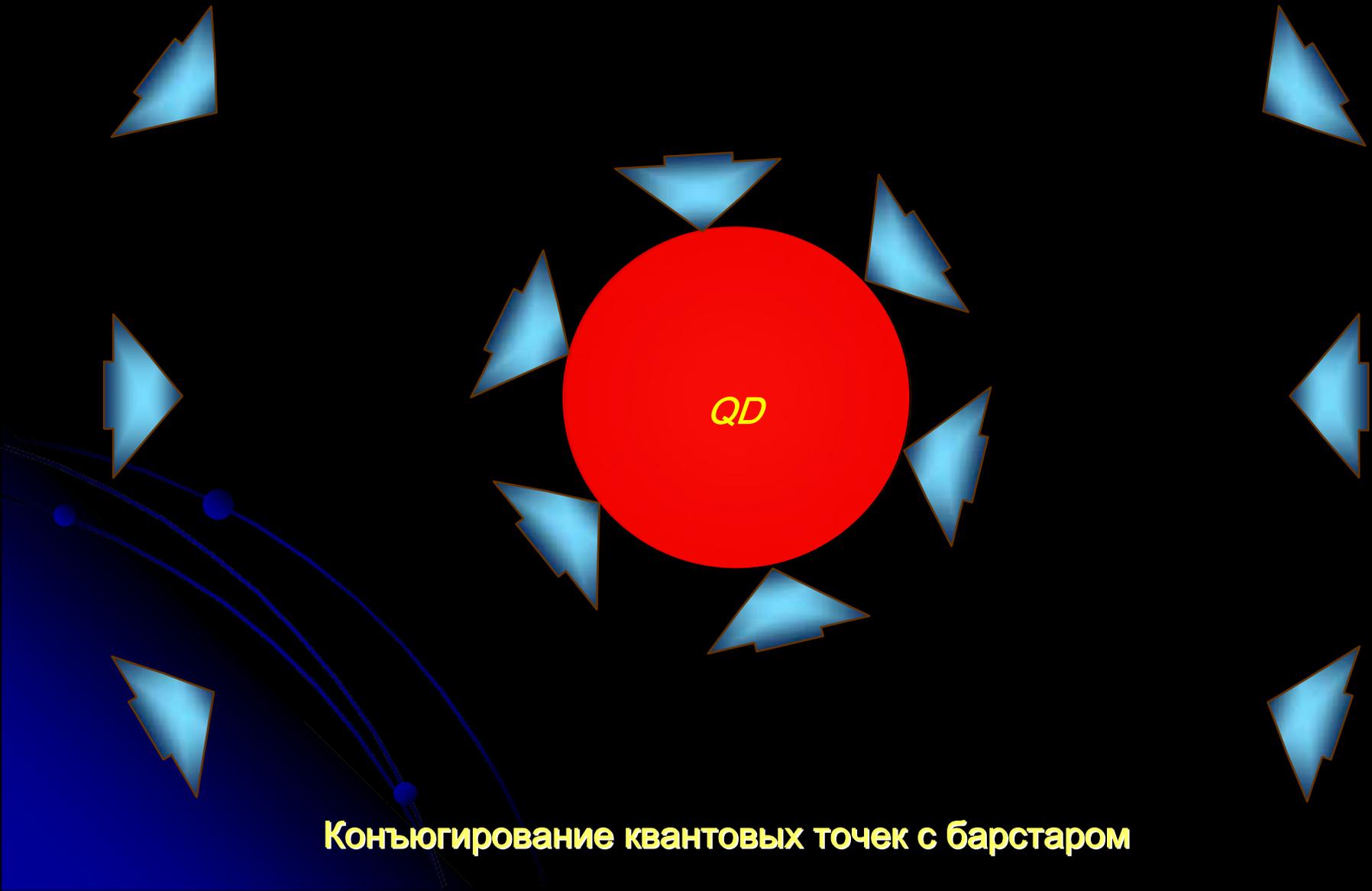
# Quantum dots (QDs)



Quantum dots - semiconductor nanocrystals (2-10 nm) with emission spectrum, controllable by the size and the material

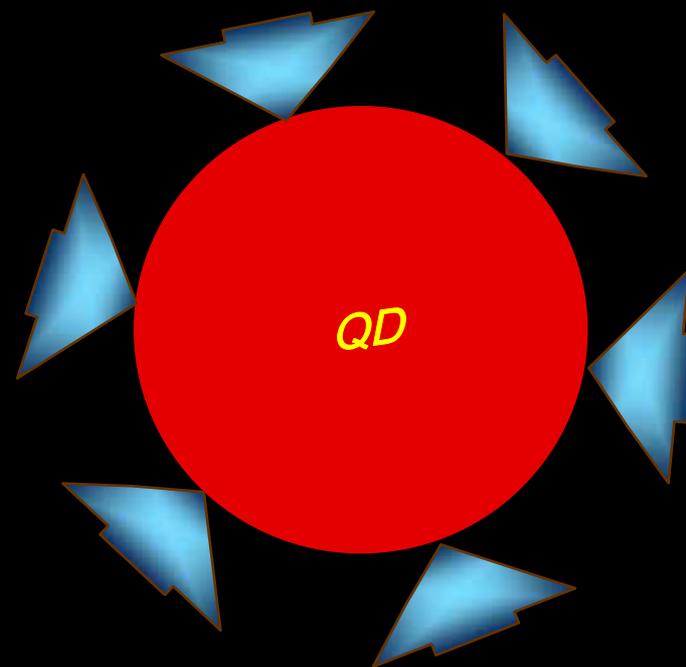
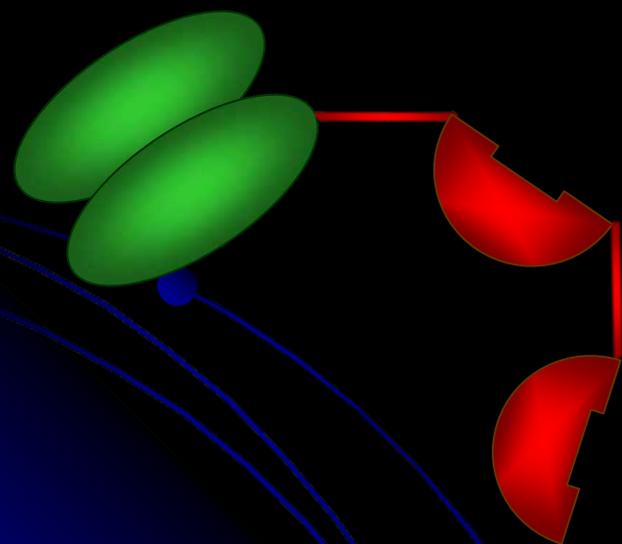


## II.1. Визуализация ракового маркера HER2/neu с помощью флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов («квантовых точек»)



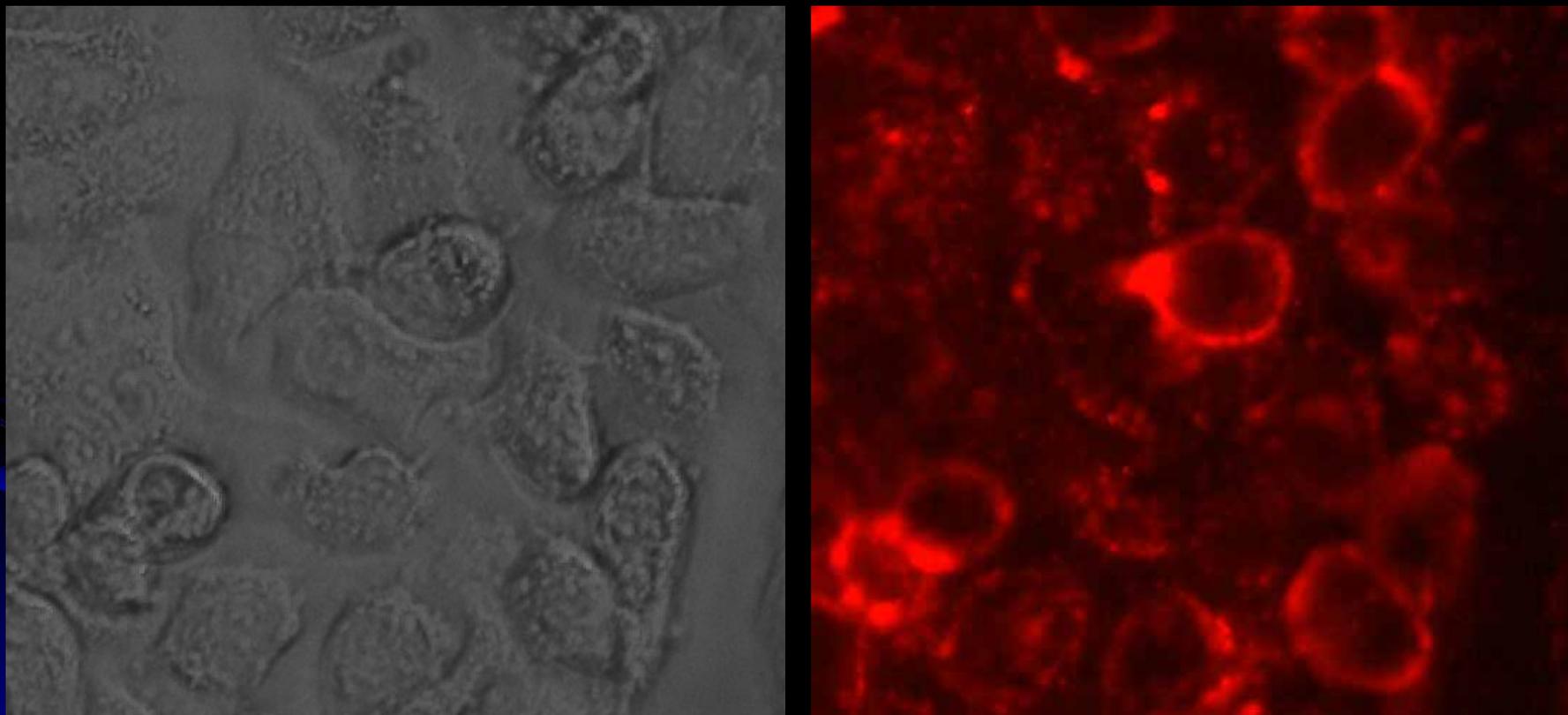
Конъюгирование квантовых точек с барстаром

## II.1. Визуализация ракового маркера HER2/neu с помощью флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов («квантовых точек»)



Оснащение квантовых точек антителами с помощью модуля барназа:барстар

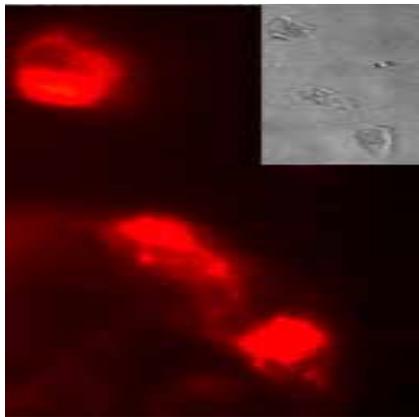
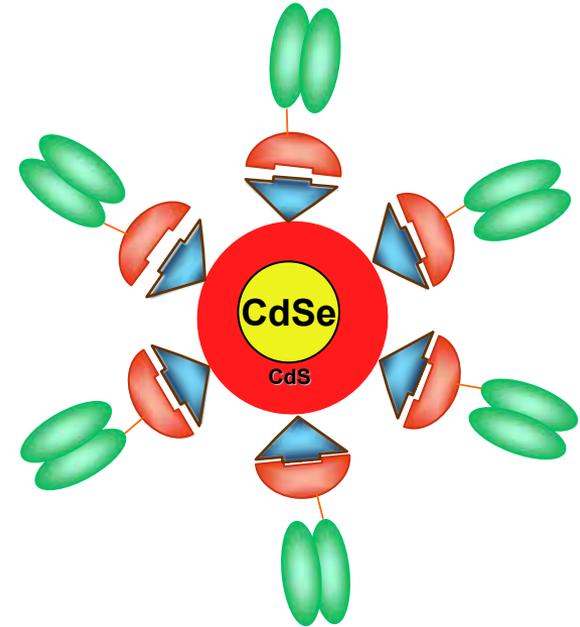
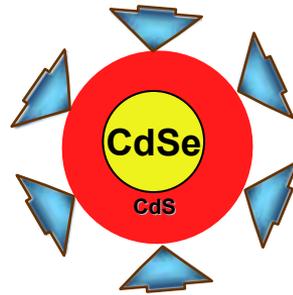
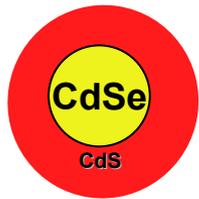
## II.1. Визуализация ракового маркера HER2/неи с помощью флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов («квантовых точек»)



*Detection of cancer marker HER2 on the surface of unfixed live cells. Ovarian cancer SKOV-3 cells were incubated with 4D5 scFv-barnase fusion and QD-barstar conjugate. QD, CdSe/CdS (5 nm), 597nm*

*Zdodnova, Deyev et al. JBO. 2009.*

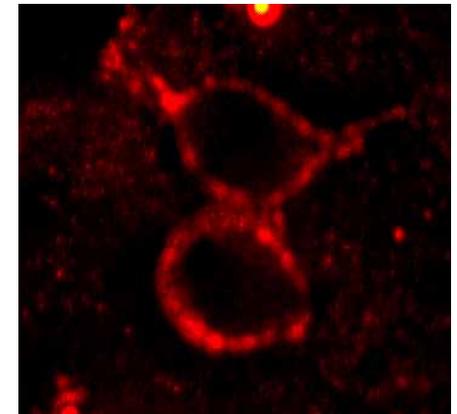
# Функциональные свойства наноконструкций зависят от их строения



Неизбирательное  
проникновение



Не проникают



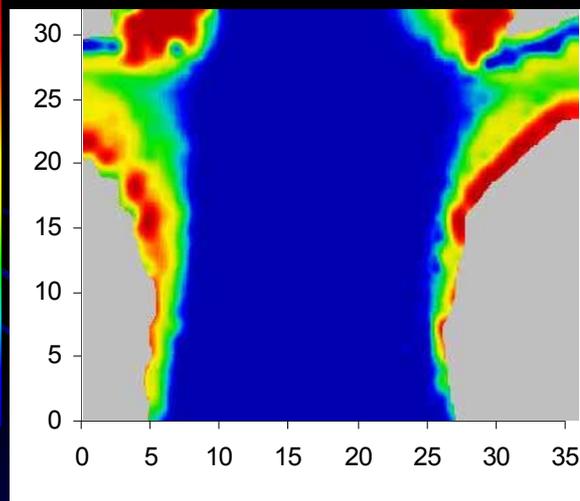
Избирательная доставка  
к клеткам-мишеням

# II.1. Прижизненное наблюдение опухоли, специфически меченной QDs

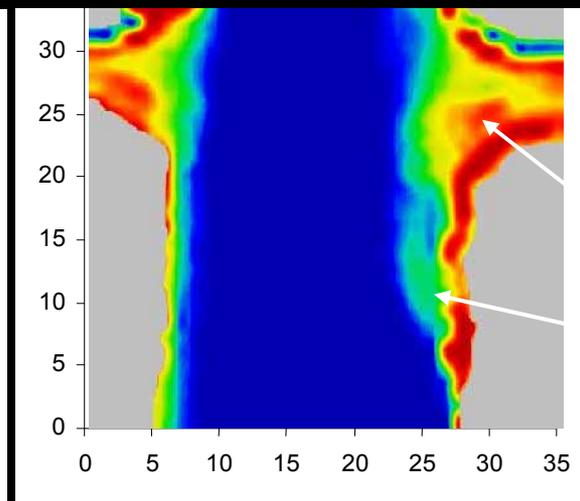
Иммунодефицитные мыши nude с перевитым раком молочной железы человека SKBR-3  
Внутривенное введение квантовых точек Qdot 705 ИТК (максимум флуоресценции на 705 нм, Invitrogen Inc. USA),  
конъюгированные с anti-HER2/neu мини-антителами 4D5 scFv  
посредством белкового модуля барназа-барстар  
(около 0.02 нМоль QDs на животное)

Усл. ед.  
1500

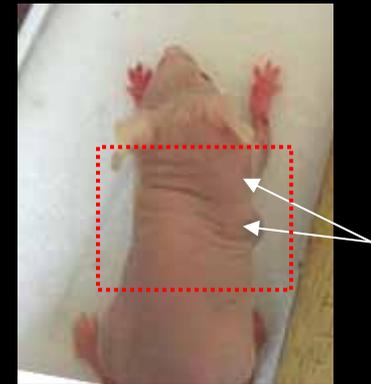
100



до



1 час после инъекции QDs



7 x 10 x 5 мм  
4 x 4 x 3 мм

узлы  
опухоли

## **II. Гибридные биосовместимые наноконструкции**

### **II.2. Синтез магнитоуправляемых нанобиокоњугатов**

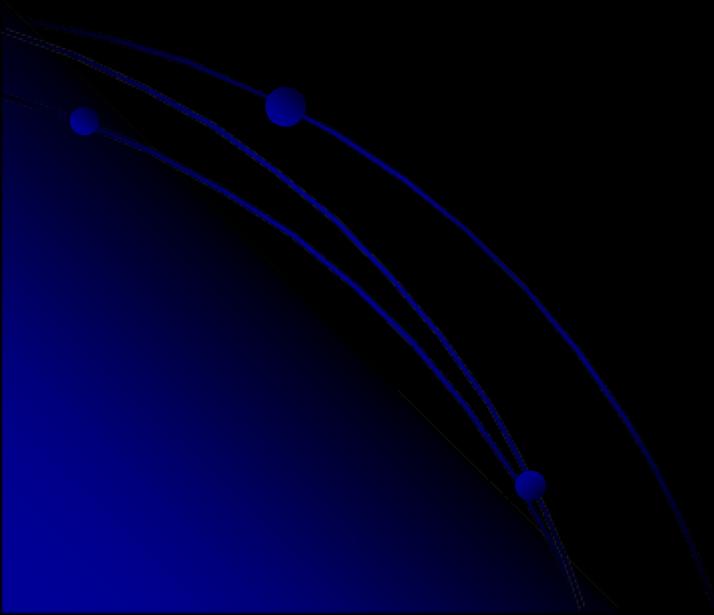
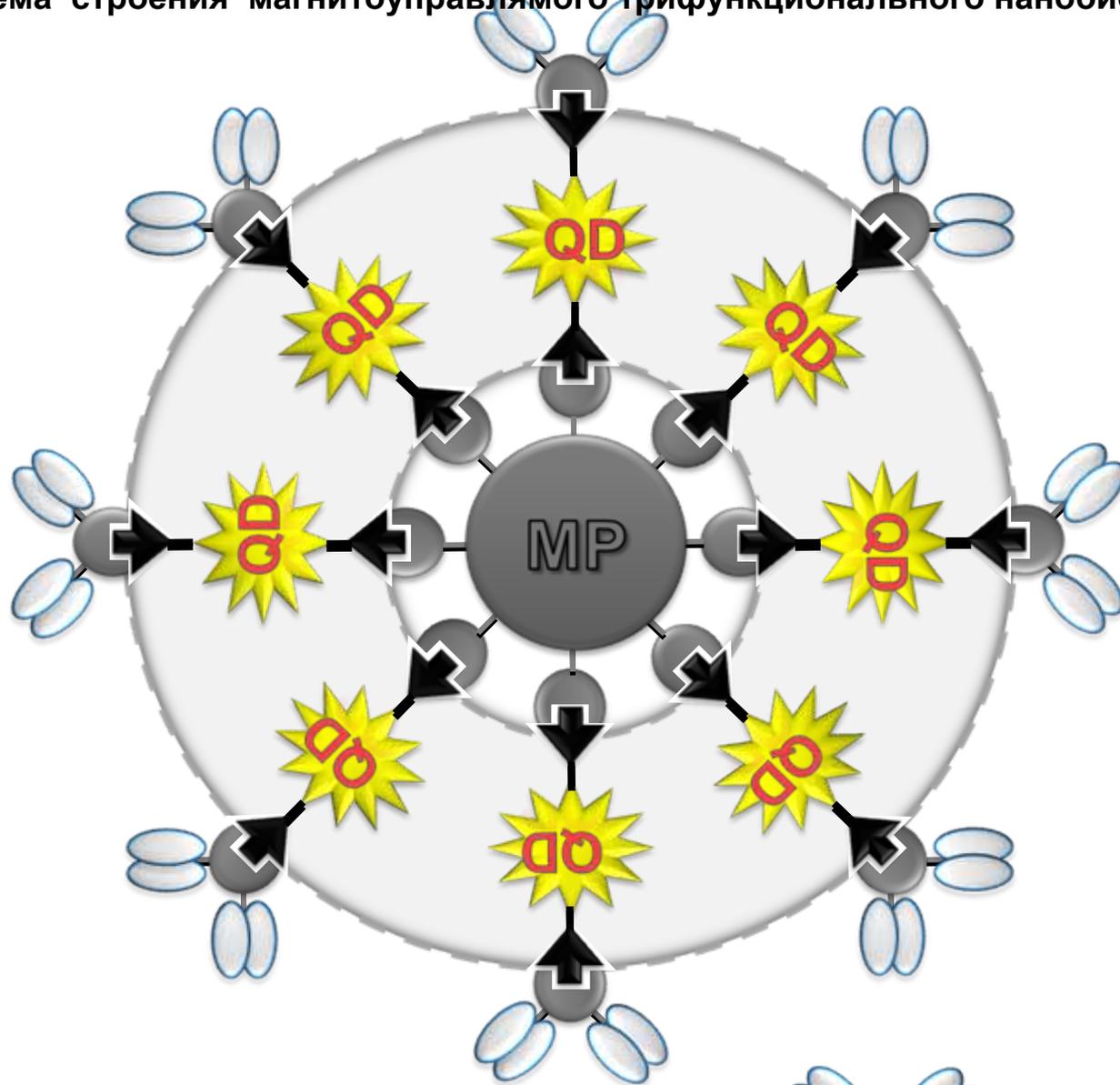
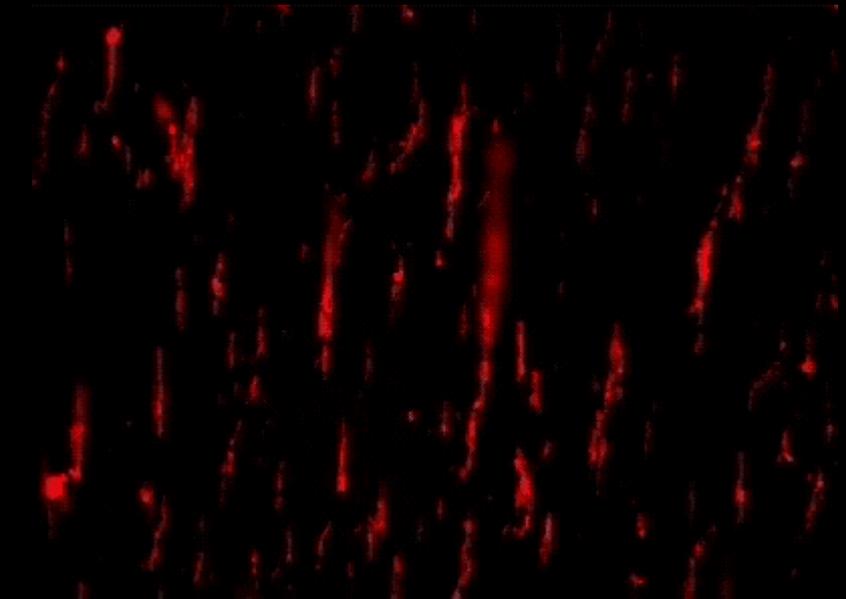
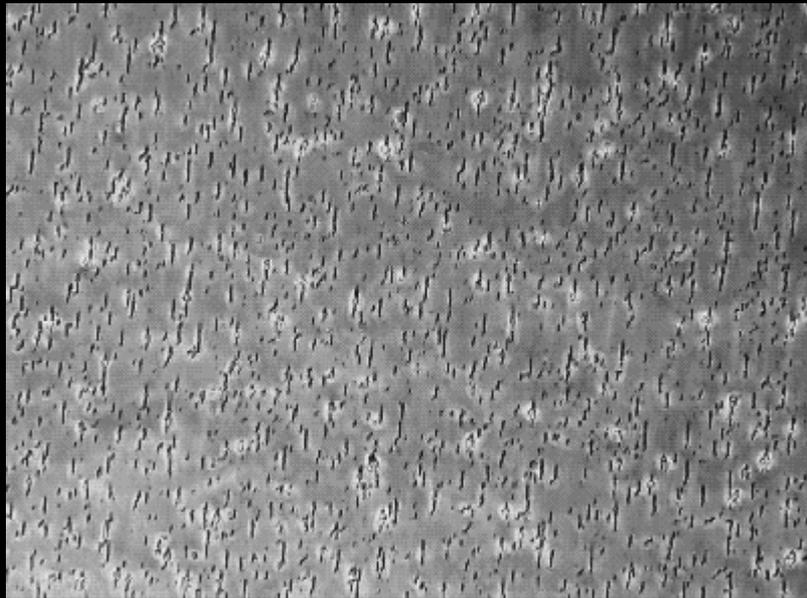


Схема строения магнитоуправляемого трифункционального нанобиоконъюгата

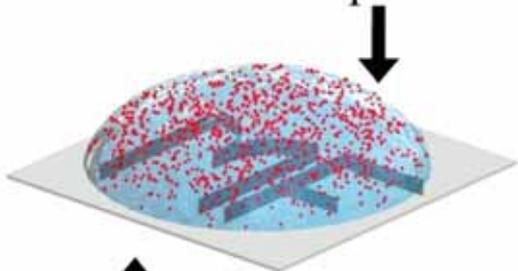


    
**Barnase** **Barstar** **4D5scFv-Barnase-4D5scFv**

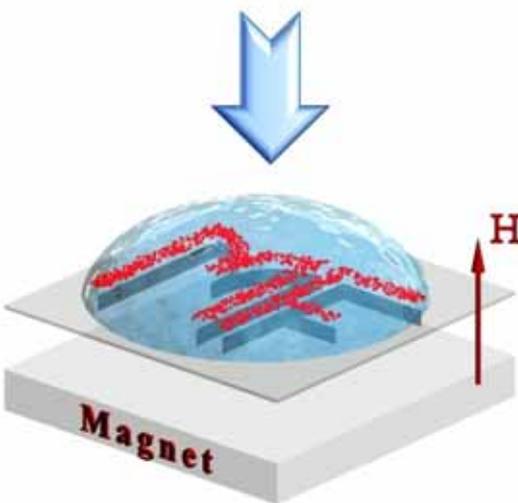


**a**

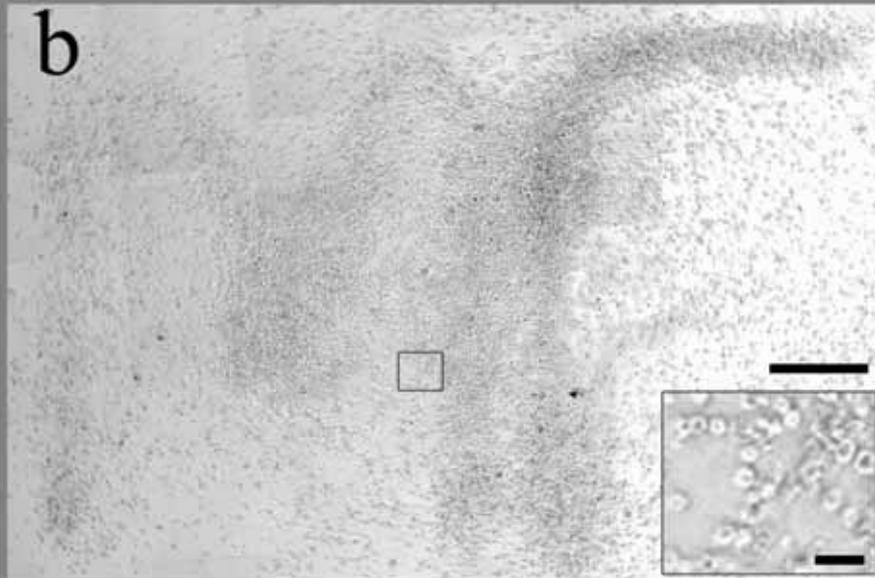
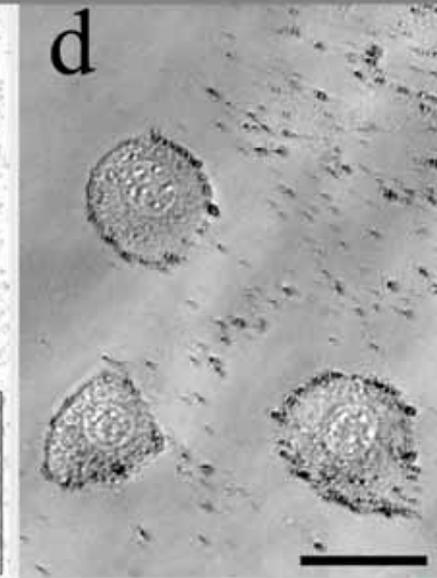
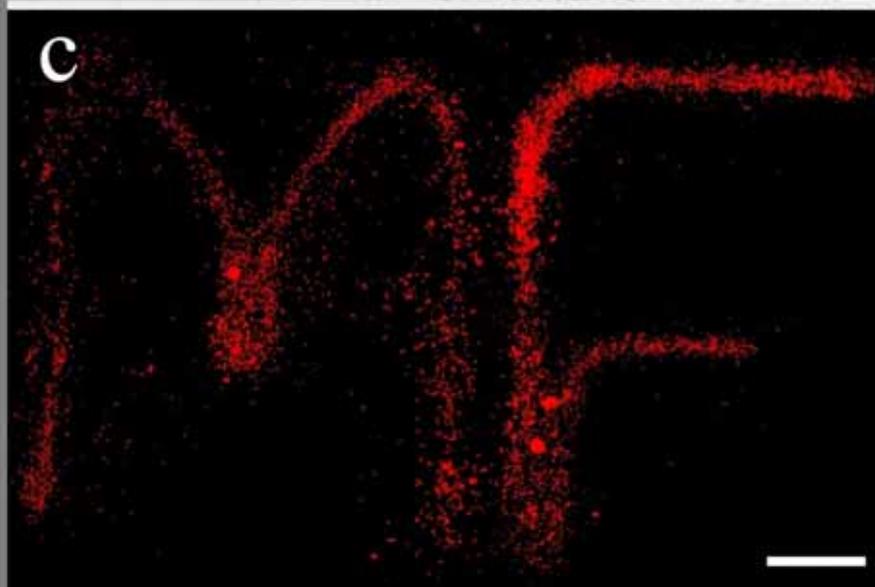
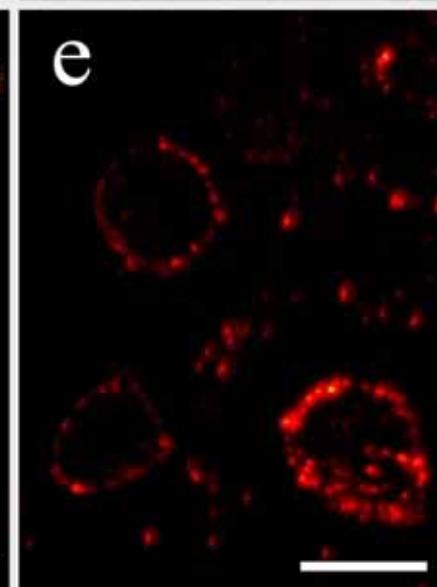
Labelled cell suspension



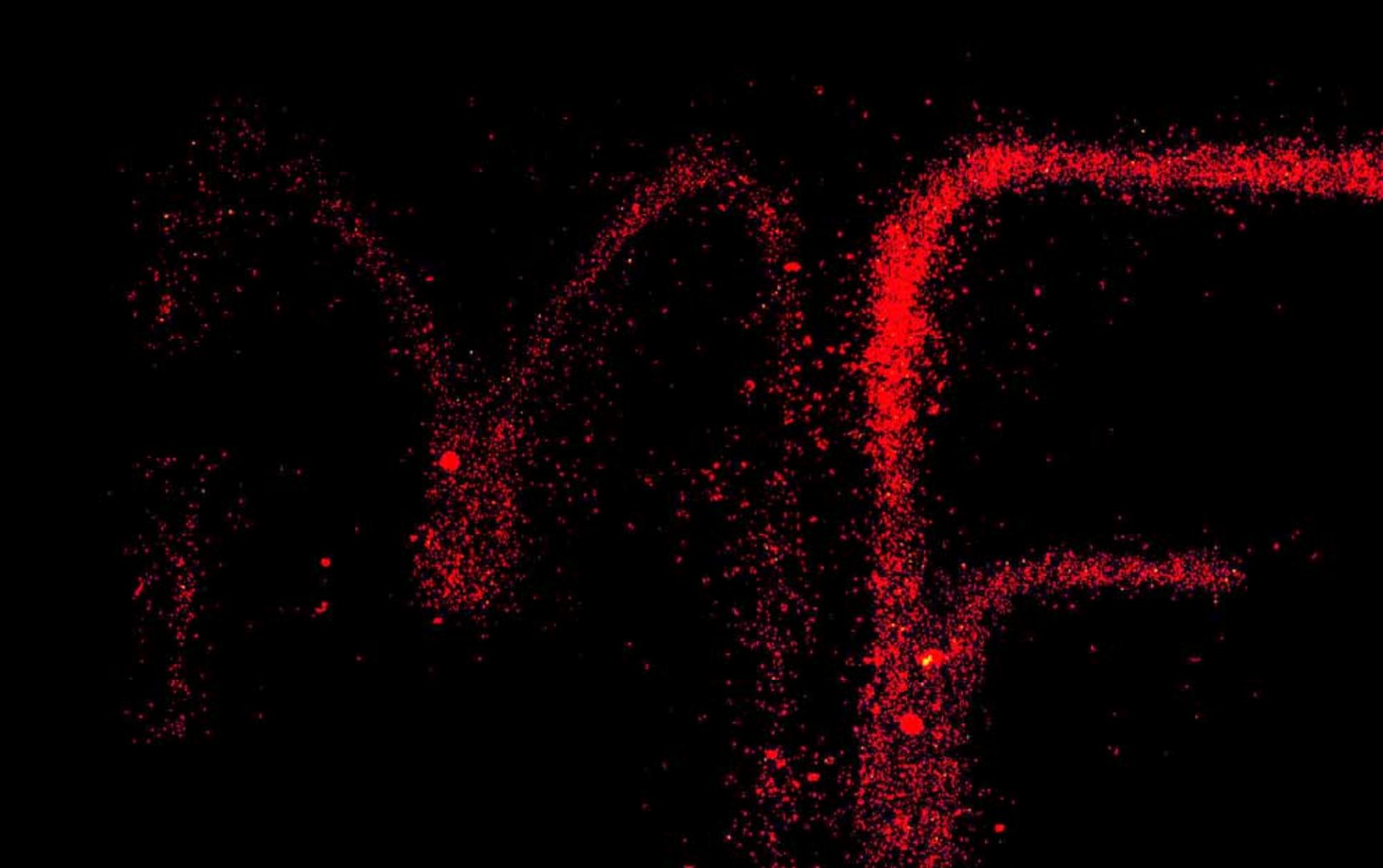
"MF" foil under cover slip



Foil is magnetized

**b****d****c****e**

Распределение меченных трифункциональными нанобиконъюгатами раковых клеток при выстраивании магнитным полем по контуру букв «MF»  
*Nikitin, Deyev et al. PNAS USA. 2010.107*

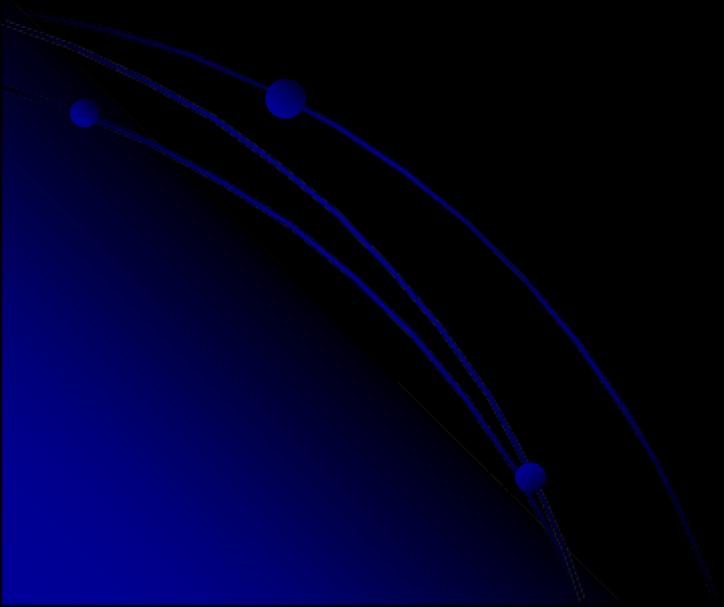


Распределение меченных трифункциональными нанобиконъюгатами раковых клеток при выстраивании магнитным полем по контуру букв «MF»

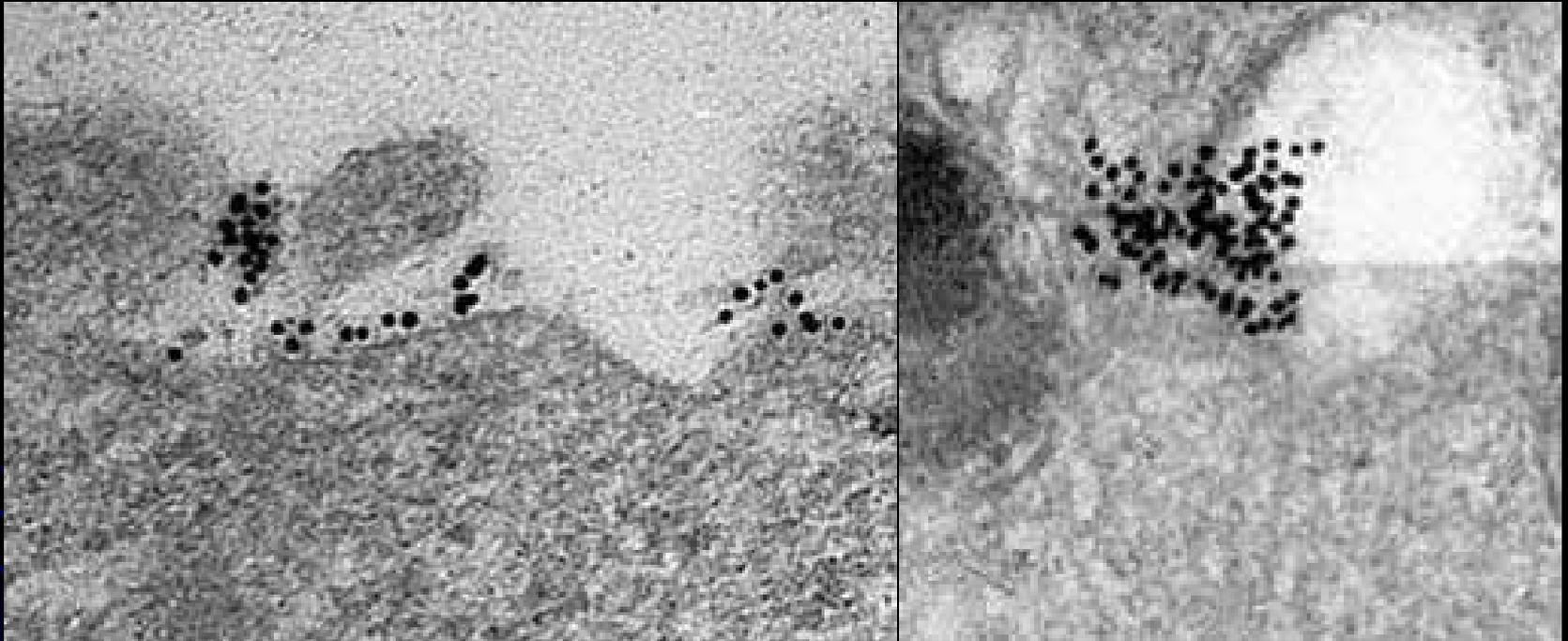
*Nikitin, Deyev et al. PNAS USA. 2010.1*

## II. Гибридные биосовместимые наноконструкции

### II.3. Синтез нанобиоконъюгатов с коллоидным золотом

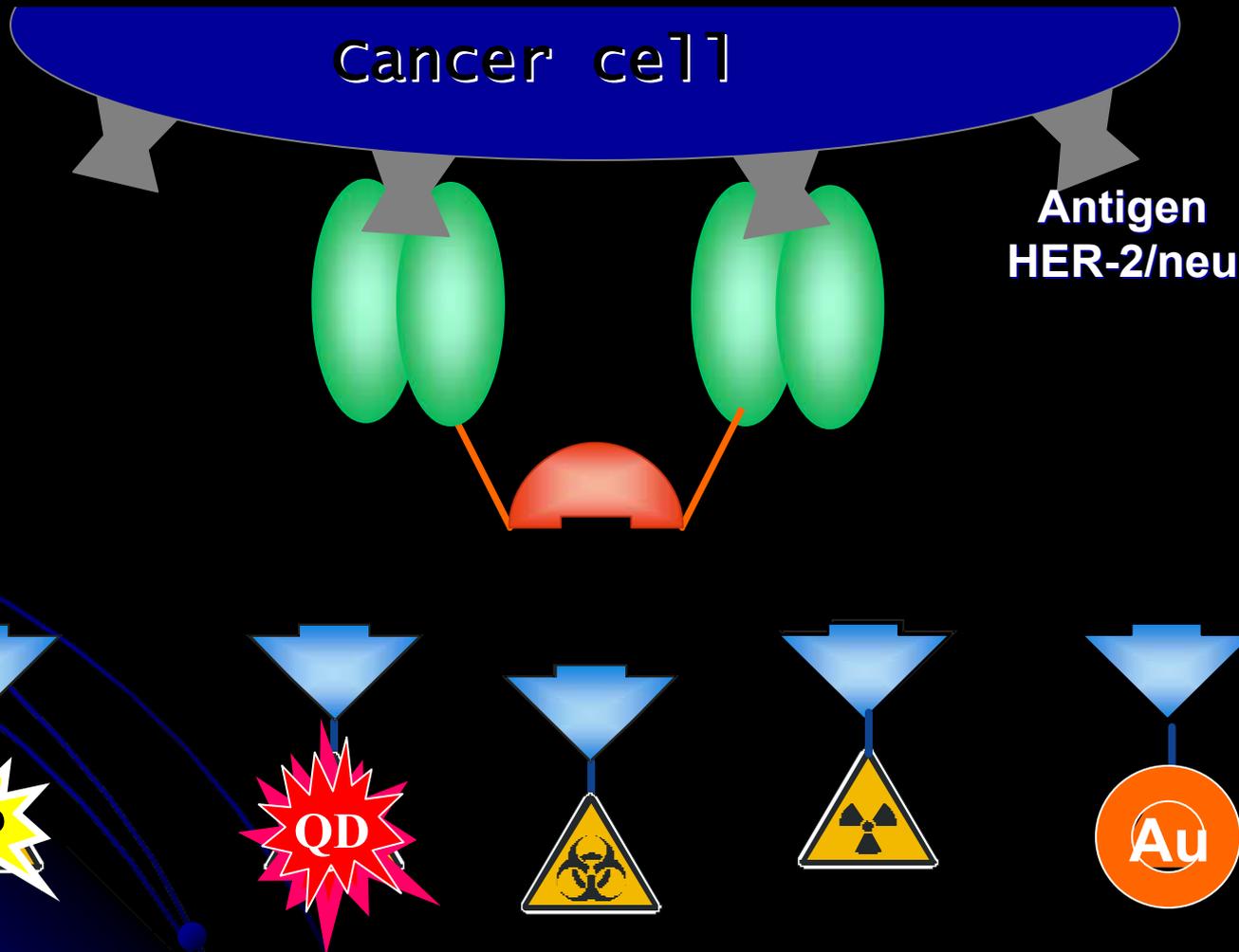


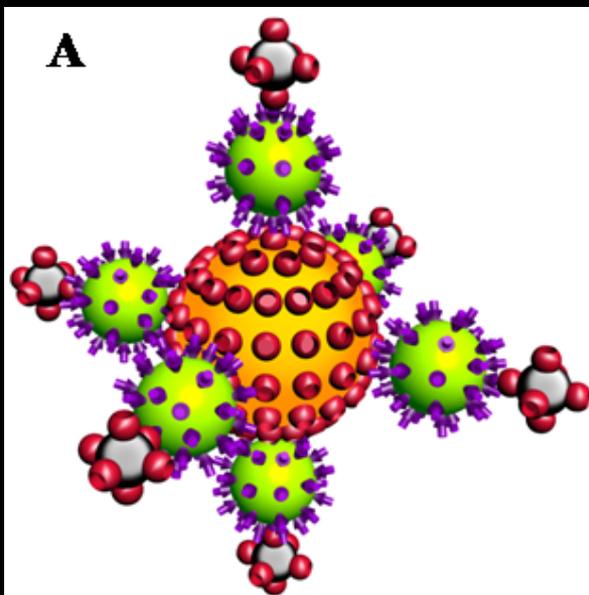
## II.3. Направленная доставка и интернализация scFv-barnase/barstar-Au в раковые клетки (электронная микроскопия)



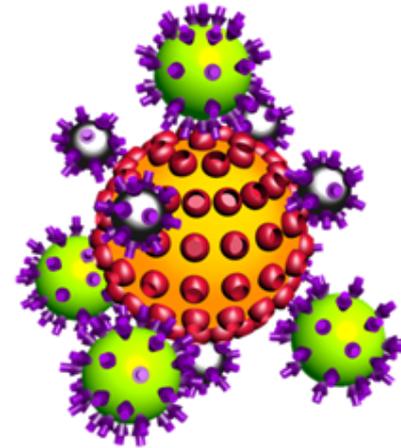
Adenocarcinoma SKOV-3 cells, 1 hr, 4°C, 4D5scFv-barnase/barstar-Au (10 nm).

# Молекулярный наноконструктор на основе модуля «барназа-барстар»

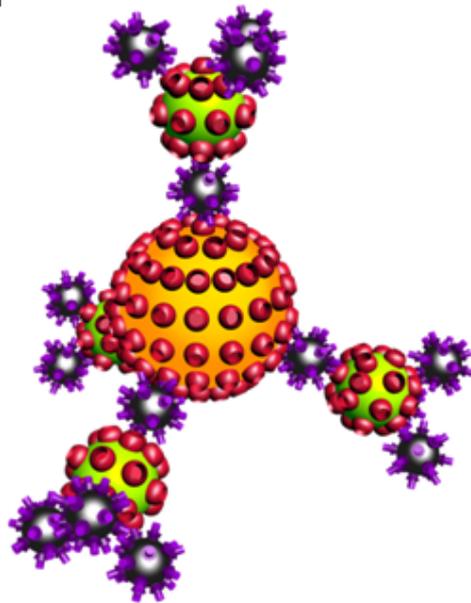




**B**



**C**



<b>Green Particle</b>		
<b>Grey Particle</b>	<b>Barstar</b>	<b>Barnase</b>
	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Barstar</b>		
	<b>A</b>	<b>No barstar module in the system</b>
<b>Barnase</b>		
<b>Orange particle is conjugated with barnase</b>		

**Theranostics = therapy + diagnostics**

# Transfectoma SKOV-3+katushka



Nude mice carrying human ovarian carcinoma SKOV-3 expressing Katushka



Scanning area

Control before tumor cells injection

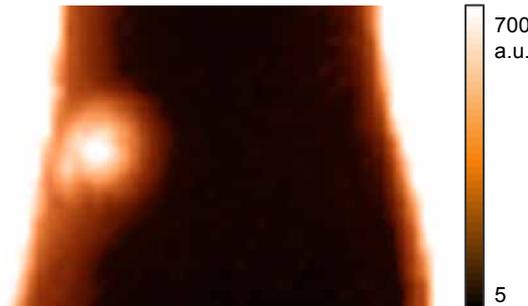


## intravital monitoring of tumor growth

15 d



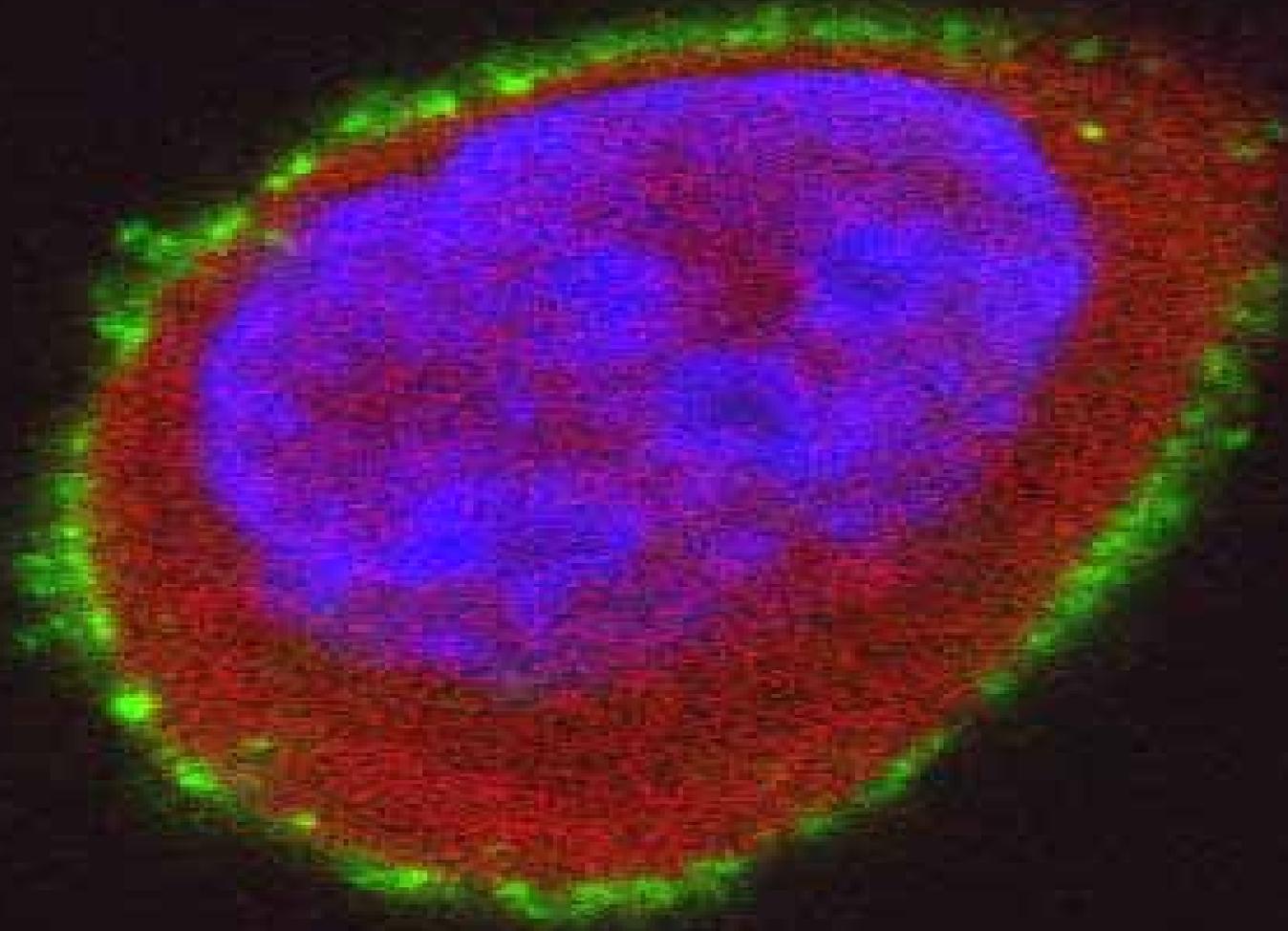
19 d



22 d



# TRANSFECTOMA SKOV-3+katushka



Detection of cancer marker HER2 on the surface of transfected live cells. Ovarian cancer SKOV-3 cells were incubated with 4D5 scFv-barnase fusion and QD-barstar conjugate. QD, CdSe/CdS (5 nm), 597nm .

# Трансфектома SKOV-kat

Апробирование методов  
и подходов флуоресцентной  
томографии

Изучение  
противоопухолевых  
воздействий

Изучение развития  
онкологического  
заболевания

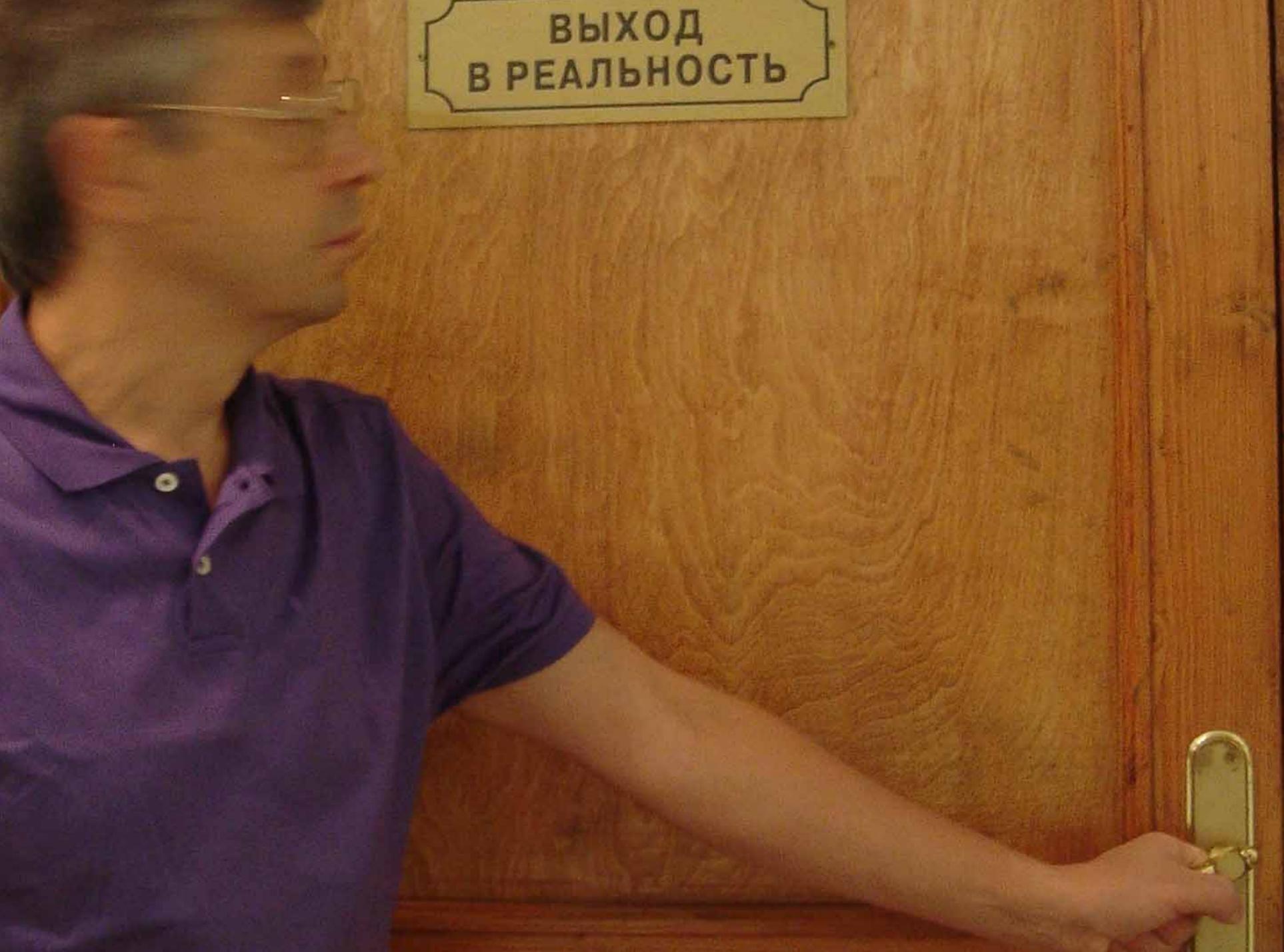
Изучение развития  
онкологического  
заболевания

Адресная доставка  
соединений

метастазирование

“Клеточная” терапия

ВЫХОД  
В РЕАЛЬНОСТЬ



«Для успехов  
современной науки  
за одним столом  
должны работать  
биолог, химик и физик»



*В.А.Энгельгардт*  
Основатель Института  
молекулярной биологии  
им. В.А.Энгельгардта РАН

**Спасибо за внимание**

**Приглашаем к сотрудничеству**

**Тел. 429-88-10, E-mail: [deyev@ibch.ru](mailto:deyev@ibch.ru)**

