



НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА КВАНТОВЫХ ТОЧЕК К HER2-ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ОПУХОЛИ С ПОМОЩЬЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ¹

© 2015 г. И. В. Балалаева*, #, Т. А. Здобнова*, Е. А. Соколова*, С. М. Деев*, **

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

**ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 02.04.2015 г. Принята к печати 15.05.2015 г.

Продемонстрирована направленная доставка полупроводниковых квантовых точек (КТ) в организме иммунодефицитных лабораторных животных к экспериментальной опухоли молочной железы человека, гиперэкспрессирующей онкомаркер HER2. Для получения направленных комплексов КТ использована пара адаптерных белков, рибонуклеаза барназа и ее ингибитор барстар. Специфическое связывание с онкомаркером-мишенью обеспечено за счет бивалентного рекомбинантного белка, содержащего пептидные последовательности двух молекул одноцепочечного варибельного фрагмента анти-HER2 антитела 4D5 (4D5scFv) и одной молекулы барназы. КТ конъюгировали с барстаром, итоговая сборка направленных комплексов осуществлялась за счет нековалентного специфического взаимодействия барстара в составе конъюгатов с КТ и барназы в составе направляющего рекомбинантного белка. Показанная нами доставка КТ к опухоли, экспрессирующей HER2, демонстрирует возможности и перспективы описанного подхода для направленной доставки наночастиц к опухолевым клеткам *in vivo* с целью повышения эффективности диагностики, а также развития основанных на использовании наночастиц методов терапии.

Ключевые слова: квантовые точки, одноцепочечный варибельный фрагмент анти-HER2 антитела 4D5 (4D5scFv), онкомаркер HER2, флуоресценция.

DOI: 10.7868/S0132342315050048

ВВЕДЕНИЕ

Фотолюминесцентные наночастицы различной природы находят все более широкое применение в оптической диагностике и терапии благодаря уникальному набору физико-химических свойств [1]. К таким свойствам наночастиц относятся: программируемость физических и химических характеристик в зависимости от размеров, состава и способов получения; наличие химических активных функциональных групп на поверх-

ности, позволяющих модифицировать частицы, оптимизируя их для конкретной задачи; большая площадь поверхности, позволяющая присоединять значительное количество “модулей” с различными функциями, в том числе направляющих, терапевтических, визуализирующих.

Наиболее подробно изучены фотолюминесцентные частицы на основе полупроводниковых материалов, или квантовые точки (КТ). Среди привлекательных свойств этих наноматериалов необходимо отметить высокий квантовый выход фотолюминесценции, широкие спектры поглощения в сочетании с узкими спектрами эмиссии, исключительную фотостабильность и относительную легкость получения КТ с заданными оптическими свойствами [2]. КТ рассматриваются в качестве перспективных агентов в диагностике онкологических заболеваний для обнаружения и локализации опухолевых узлов и метастазов, оценки поражения регионарных лимфатических узлов и т.п. [3, 4].

Для придания способности избирательно маркировать опухолевые клетки и/или новообразо-

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

Сокращения: КТ – квантовые точки; PEG – полиэтиленгликоль; Bn – барназа; Bs – барстар; HER2 – рецептор 2 к фактору роста эпидермиса человека (Human Epithelial growth factor Receptor 2); scFv – одноцепочечный варибельный фрагмент антитела (single-chain variable fragment); PBS – натрий-фосфатный буфер (phosphate buffered saline), EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид.

Автор для связи (тел.: +7 (831) 462-32-13; факс: +7 (831) 462-32-02; эл. почта: irin-b@mail.ru).

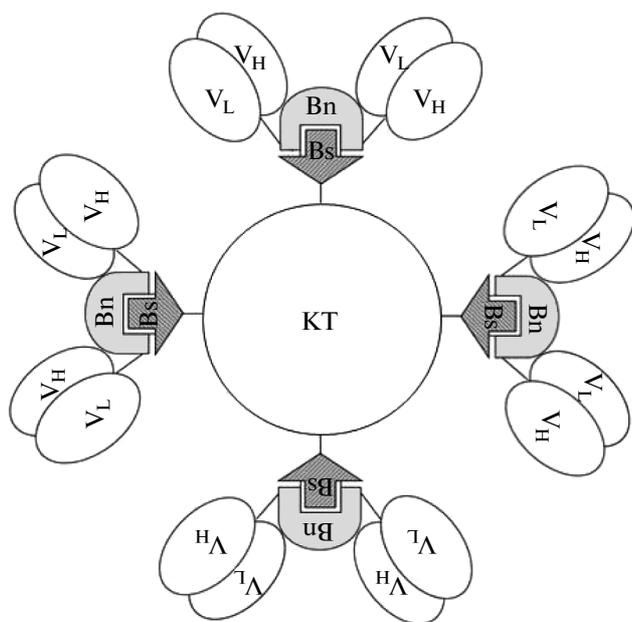


Рис. 1. Схема строения направленного комплекса КТ (КТ-4D5scFv). КТ – квантовая точка; Bn – барназа; Bs – барстар; V_L, V_H – вариабельные домены легкой и тяжелой цепей антитела 4D5 соответственно.

ванные сосуды опухолевой ткани КТ соединяют с направляющими модулями, специфически взаимодействующими с молекулярными мишенями (онкомаркерами) – молекулами на поверхности клеток, которые либо уникальны для опухоли данного типа, либо гиперэкспрессируются в опухолевой ткани, по сравнению с нормальной. В качестве направляющих модулей могут быть использованы, например, полноразмерные антитела [5], их фрагменты [6, 7], аффибоды [8, 9].

Перспективными для использования в качестве направляющего модуля считаются антитела формата scFv, представляющие собой единый полипептид, в котором вариабельные домены легких и тяжелых цепей иммуноглобулина соединены при помощи пептидного линкера [10]. Эти небольшие (25–30 кДа) молекулы легко нарабатываются в бактериальных продуцентах, стабильны в широком диапазоне параметров среды, сохраняют специфичность узнавания, присущую полноразмерному антителу, но лишены константных доменов, обуславливающих взаимодействие полноразмерных антител с клетками иммунной системы и белками комплемента и, как следствие, многочисленные побочные эффекты при их использовании *in vivo*.

Ранее нами были получены комплексы КТ с антителами 4D5scFv, узнающими клинически значимый онкомаркер HER2 и связывающимися с ним, и в эксперименте на клеточных культурах было продемонстрировано специфическое связывание таких комплексов с опухолевыми клет-

ками [11]. В данной работе мы исследовали доставку комплексов КТ к клеткам ксенографтной опухоли человека на иммунодефицитных мышах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения направленных комплексов КТ мы использовали разработанный ранее подход, основанный на использовании пары адаптерных белков: рибонуклеазы барназы (Bn) и ее ингибитора барстара (Bs) [12]. КТ конъюгировали с одним белком системы – Bs, в то время как антитело соединяли с другим белком системы – Bn. Для увеличения эффективности связывания с онкомаркером-мишенью использовали бивалентный вариант рекомбинантного белка, содержащего пептидные последовательности двух молекул 4D5scFv и одной молекулы барназы (4D5scFv-Bn-4D5scFv) [13]. Итоговая сборка направленных комплексов осуществлялась за счет нековалентного специфического взаимодействия барстара в составе конъюгатов с КТ и барназы в составе направляющего рекомбинантного белка (рис. 1).

Адаптерная система Bn-Bs является аналогом системы стрептавидин-биотин и позволяет осуществлять модульную сборку гибридных по составу многофункциональных комплексов за счет высокоаффинного взаимодействия ($K_d \sim 10^{-14}$ М), однако при использовании *in vivo* Bn-Bs обладает целым рядом преимуществ. Отсутствие аналогов этих белков в организме человека снижает уровень неспецифического взаимодействия с тканями, что характерно, например, для биотина, являющегося природным кофактором ряда ферментов. Неспецифическое взаимодействие препятствует использованию агентов, включающих биотин, для направленной доставки *in vivo*. Кроме того, белки Bn-Bs обладают существенно меньшим размером (12 и 10 кДа соответственно) по сравнению со стрептавидином (52.8 кДа), что предполагает и меньшую иммуногенность за счет снижения числа антигенных детерминант. Немаловажен также тот факт, что белковая природа обоих компонентов пары Bn-Bs обеспечивает возможность генетических манипуляций.

Через 3 ч после внутривенного введения направленных комплексов КТ (КТ-4D5scFv) животным, носителям опухоли человека SKBR-3 с гиперэкспрессией рецептора HER2, комплексы были зарегистрированы в периферической области опухоли (рис. 2a). Характер распределения флуоресценции позволяет говорить о локализации КТ-4D5scFv преимущественно в кровеносных сосудах или в непосредственной близости от них. Через 21 ч КТ-4D5scFv были зарегистрированы в значительном количестве и в глубине опухолевого узла, при этом четкой локализации с сосудами не прослеживалось. Сигнал флуоресценции в опухоли увеличивался в 2–2.5 раза по сравнению с

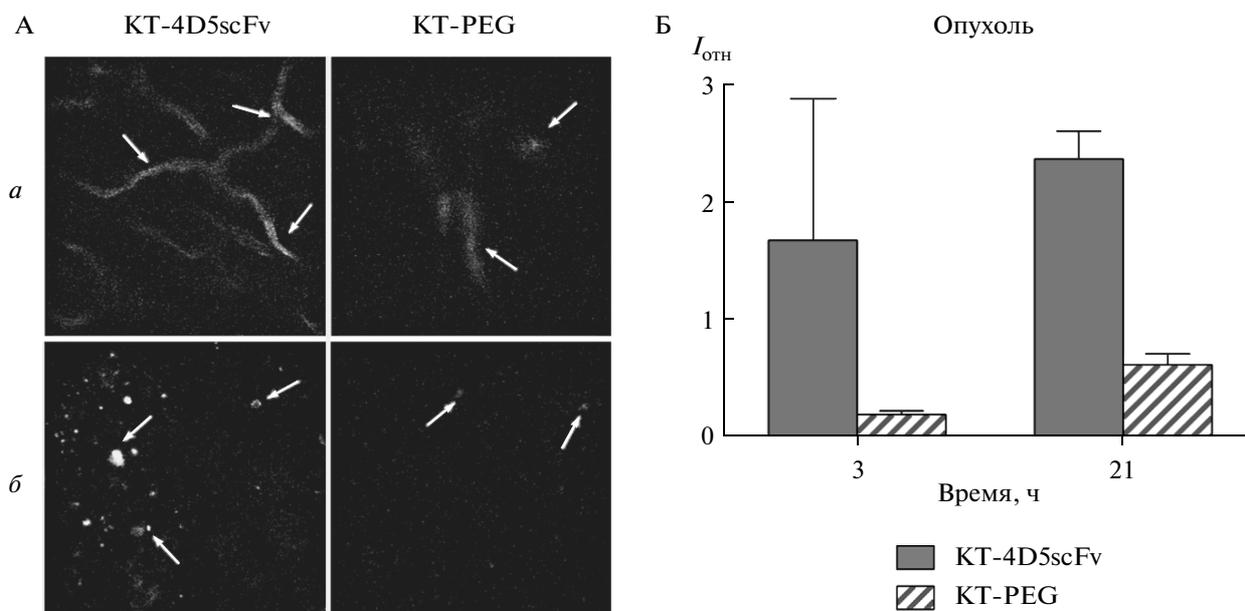


Рис. 2. Анализ накопления в опухоли SKBR-3 направленных и биоинертных КТ. А. Изображения опухолевой ткани экспериментальных животных, полученные методом конфокальной микроскопии через различное время после внутривенного введения направленного комплекса КТ-4D5scFv (слева) и биоинертных КТ-PEG (справа) в дозе 0.14 нмоль на животное. λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 660–710 нм. Размер изображения 110 × 110 мкм. Наночастицы обозначены стрелками. *a* – Срезы периферического слоя опухолевого узла через 3 ч после введения; *б* – срезы глубокого слоя опухолевого узла через 21 ч после введения. Б. Интенсивность флуоресцентного сигнала в опухолевой ткани по отношению к сигналу в мышце через различное время после внутривенного введения направленного комплекса КТ-4D5scFv (серые столбцы) и биоинертных КТ-PEG (заштрихованные столбцы).

мышечной тканью (рис. 2б). Значительная величина разброса количественных данных через 3 ч после инъекции отражает гетерогенность распределения КТ в пределах опухолевого узла для всех проанализированных образцов.

Для сравнения, биоинертные КТ, покрытые полиэтиленгликолем (КТ-PEG), практически не были обнаружены в опухолевой ткани (рис. 2). В первые часы после введения некоторое количество КТ-PEG было локализовано в периферических сосудах опухолевого узла, тогда как через сутки после введения были отмечены лишь единичные точечные участки с флуоресценцией, соответствующей КТ.

Хорошо известен эффект повышенного накопления и удержания в опухолевой ткани частиц нанометрового размера, обусловленный особенностями строения кровеносного русла опухоли и отсутствием адекватного лимфатического дренирования. В англоязычной литературе эта особенность получила название EPR-эффекта (от англ. “enhanced permeation and retention”) и используется для доставки в опухоль липосом, полимерных microspheres и т.п. [14]. Тем не менее, значимого накопления в опухоли КТ-PEG, лишенных направляющего модуля, в отличие от КТ-4D5scFv, мы не наблюдали.

В работе [15] для КТ, аналогичных использованным в данной работе, методом прижизненного просветного имиджинга было показано увеличение флуоресцентного сигнала КТ в проекции опухоли независимо от наличия направляющего модуля, однако в случае КТ-PEG такое увеличение наблюдалось в течение первого часа после введения, а через 2–3 ч сигнал в проекции опухоли снижался и не отличался от сигнала в проекции нормальных тканей. Не удалось достигнуть накопления в экспериментальных опухолях при введении ненаправленных КТ с различными свойствами поверхности и в работах [6, 9, 16].

По-видимому, определяющей накопление КТ в опухоли является способность наночастиц удерживаться за счет связывания с поверхностью и проникновения внутрь опухолевых клеток. Для антитела 4D5 (трастузумаб, Герцептин) хорошо известна способность к интернализации после связывания с рецептором-мишенью HER2 на поверхности клетки. В ряде работ показана эффективная направленная доставка внутрь опухолевых клеток различных терапевтических и диагностических агентов, содержащих антитело 4D5, в том числе и связанных с КТ [17–20]. Рекомбинантное антитело 4D5scFv, включенное нами в состав направленных комплексов, также сохраняет способность к интернализации и успешно используется в качестве направляющего модуля в составе

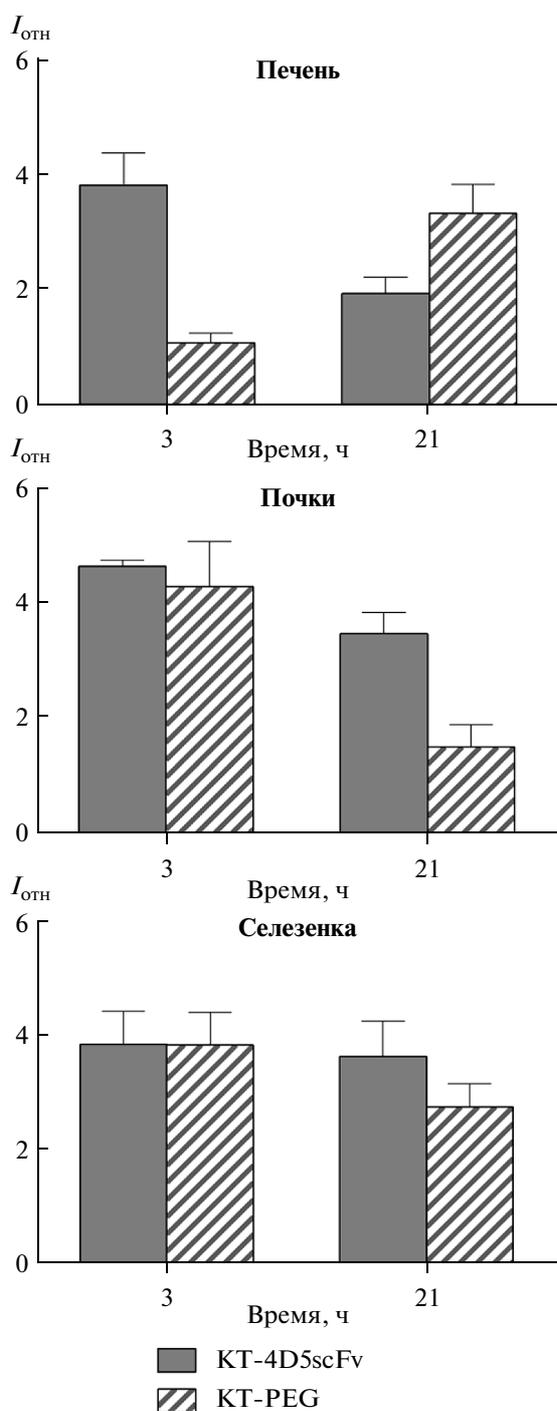


Рис. 3. Интенсивность флуоресцентного сигнала в тканях печени, почек и селезенки по отношению к сигналу в мышце через различное время после внутривенного введения направленного комплекса KT-4D5scFv (серые столбцы) и биоинертных KT-PEG (заштрихованные столбцы).

как рекомбинантных белков, так и конъюгатов с наночастицами [21–24].

Обратной стороной конъюгации КТ с белками, по сравнению с незаряженными биоинертными

КТ, является значительное усиление взаимодействия с клетками макрофагальной системы, ответственной за элиминацию чужеродных частиц из организма, и, как следствие, увеличение неспецифического накопления в нормальных тканях и органах.

Наименьшее содержание КТ, как направленных, так и биоинертных, было зарегистрировано в мышечной ткани, наибольшее – в печени, почках и селезенке животных (рис. 3). В печени через 3 ч после введения содержание КТ-4D5scFv было значительно выше, чем КТ-PEG, через 21 ч содержание КТ-PEG повышалось и даже превосходило направленные комплексы. В селезенке содержание КТ сохранялось практически на постоянном уровне в течение суток, а в почках наблюдалось снижение их количества.

Почки и печень являются органами, ответственными за выведение КТ из организма по двум альтернативным, или взаимодополняющим, путям. Несмотря на то, что общепринятым считается невозможным выведение через почки частиц или молекул с гидродинамическим диаметром более 5.5 нм, в ряде работ описано накопление в почках КТ, существенно превышающих этот размер [25, 26]. Гидродинамический диаметр использованных в работе КТ составляет 18 нм [27] и увеличивается после конъюгации с белком и сборки комплекса КТ-4D5scFv. Механизмы, отвечающие за их накопление в почках, требуют дополнительного изучения, но, несомненно, важную роль играет поверхностный заряд, определяющий взаимодействие КТ с базальной мембраной почечного клубочка. Покрытие поверхности КТ-4D5scFv белком 4D5scFv-Bn-4D5scFv с изоэлектрической точкой $pI \sim 9$ обеспечивает наличие положительного поверхностного заряда и может определять медленную скорость элиминации КТ-4D5scFv из почек за счет взаимодействия с отрицательно заряженной гломерулярной базальной мембраной.

Выведение через печень является основным путем в случае высокомолекулярных соединений и наночастиц. Медленная скорость данного процесса может быть причиной длительного накопления и сохранения высокой концентрации выводимого вещества. Такое же длительное удержание наночастиц характерно и для селезенки, выполняющей функцию сита, задерживающего чужеродные частицы, попавшие в кровь. В частности, в работе [26] показано сохранение высокой концентрации аналогичных использованным нами КТ-PEG в селезенке, печени и почках животных в течение 28 дней.

Свойство полиэтиленгликоля “экранировать” наночастицы для клеток иммунной системы хорошо известно и используется на практике [28]. Следствием придания наночастицам биоинертности за счет покрытия полиэтиленгликолем является существенное, а иногда и многократное увеличение времени циркуляции в кровотоке.

Нами были проанализированы образцы крови животных через разные интервалы времени после введения КТ и показано, что, в случае КТ-PEG, в отличие от КТ-4D5scFv, через 9 ч после инъекции в крови животного находилось значительное количество наночастиц (рис. 4), некоторое количество КТ-PEG было зарегистрировано и через 21 ч.

Таким образом, использованный в работе подход к получению направленных комплексов КТ с рекомбинантными антителами 4D5scFv с помощью адаптерной пары белков Vn-Bs обеспечил существенное увеличение эффективности доставки КТ к опухоли, экспрессирующей онкомаркер HER2, и удержание, по меньшей мере, в течение 21 ч. При этом через сутки после введения не показано практически значимого различия между распределением биоинертных и направленных КТ в нормальных тканях.

Описанный подход универсален в отношении наночастиц различного состава и размеров. Предыдущие исследования на культурах клеток показали его применимость для получения самособирающихся магнитно-флуоресцентных комплексов [13, 29], наноалмазов [30], антистоксовых нанофосфоров [31, 32], полимерных наночастиц [33]. Использование молекулярных адаптеров, нековалентно взаимодействующих друг с другом с высокой аффинностью и специфичностью, обеспечивает возможность легкой замены одного визуализирующего/направляющего модуля на другой без необходимости адаптации методики конъюгации. Кроме этого, предотвращается потеря аффинности антитела за счет хаотического взаимодействия с поверхностью частицы при прямой конъюгации.

Показанная нами доставка КТ к HER2-экспрессирующей опухоли с помощью рекомбинантных антител, специфически взаимодействующих с данным онкомаркером, демонстрирует возможности и перспективы описанного подхода для направленной доставки наночастиц к опухолевым клеткам с целью повышения эффективности диагностики, а также развития основанных на использовании наночастиц методов терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Квантовые точки и комплексы на их основе. В работе использовали полупроводниковые квантовые точки Qtracker[®] 705, покрытые полиэтиленгликолем (КТ-PEG), и Qdot[®] 705 ИТК[™], покрытые полимерной оболочкой с карбоксильными группами на поверхности (Invitrogen, США).

Qdot[®] 705 ИТК[™] конъюгировали с Bs с использованием в качестве сшивающего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, EDC (Sigma, США). Конъюгацию проводили в два этапа, как описано в [14]. Bs, КТ и EDC использовали в соотношении 1 : 200 : 1000. Нарботку, выделение и очистку Bs проводили как описано в [10].

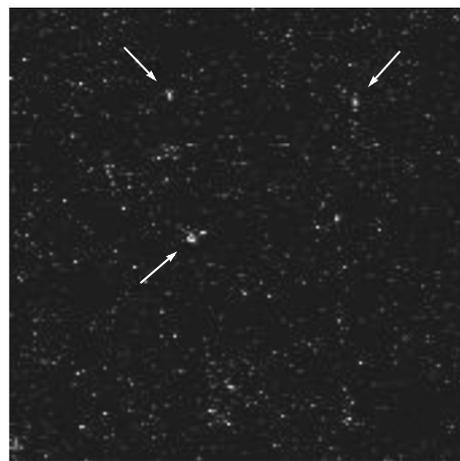


Рис. 4. Конфокальная микроскопия мазка крови экспериментального животного через 9 ч после внутривенного введения КТ-PEG. Наночастицы обозначены стрелками. λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 660–710 нм. Размер изображения 75 × 75 мкм.

Для получения направленных комплексов КТ был использован направляющий модуль 4D5scFv-Vn-4D5scFv, представляющий собой рекомбинантный белок, в котором два антитела 4D5scFv и Vn соединены в единую полипептидную цепь гибкими пептидными линкерами [13]. Для получения белка 4D5scFv-Vn-4D5scFv клетки *E. coli* штамма SB536 трансформировали плазмидой pSD-4D5-Vn-4D5-HIS, содержащей ген этого белка под контролем lac-промотора. Свежетрансформированные бактерии культивировали при 28°C до достижения культурой 0.8 ОЕ₅₅₀ и индуцировали lac-промотор 1 мМ ИПТГ. Затем бактерии культивировали при интенсивном перемешивании (6 ч, 28°C) и осаждали центрифугированием (10 мин, 7000 g, 4°C). Клетки разрушали обработкой ультразвуком в течение 5 мин (Labsonic M, Sartorius, Германия), полученный клеточный экстракт отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 18500 g. Надосадочную жидкость, содержащую растворимую форму целевого белка, очищали в денатурирующих условиях в присутствии 6 М гуанидина на колонке “HisTrap FF 1 ml” (GE Healthcare, США), содержащей Ni²⁺-NTA-сефарозу, согласно инструкциям производителя. Имобилизованный на колонке белок элюировали градиентом имидазола от 0 до 200 мМ. Собранные фракции, содержащие нужный белок, объединяли и наносили на колонку “HiTrap Protein A FF 1 mL” (GE Healthcare, США) с иммобилизованным на носителе белком А в 0.02 М фосфате натрия (рН 7.0). Белок элюировали 0.1 М цитратом натрия (рН 3.0).

Для получения направленных комплексов конъюгаты КТ с Bs смешивали с направляющим модулем 4D5scFv-Vn-4D5scFv в молярном соотношении 1 : 20 и отделяли избыток белка ультрафильтрацией с использованием мембраны Micro-

con YM-100 (Merck Millipore, Германия). Комплексы формировались путем самосборки, за счет специфического нековалентного взаимодействия Bs и Bn в составе отдельных модулей.

Животные и опухолевая модель. Исследования выполнены на иммунодефицитных мышах линии BALB/c-Nude (самки, 20–23 г, 6–8 недель), полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пушкино). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом дне.

Для создания модели опухоли человека использовали клетки карциномы молочной железы человека линии SKBR-3 (номер по каталогу ATCC – HTB-30), характеризующиеся гиперэкспрессией рецептора HER2. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (HyClone, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Наращивание клеток производили в культуральных флаконах площадью 75 см², исходно брали по 3 млн клеток на флакон, субкультивирование производили раствором Версена (ПанЭко, Россия), без использования трипсина, по достижении 90% конfluence.

Для получения ксенографтных опухолей суспензию клеток SKBR-3 в фосфатно-солевом буфере PBS, pH 7.4 (ПанЭко, Россия), вводили подкожно под правую лопатку в количестве 1×10^7 клеток (0.2 мл суспензии) на животное. Эксперимент начинали на 21 день после инокуляции, когда диаметр опухолевого узла достигал 5–7 мм. Гиперэкспрессия рецептора HER2 в развившейся опухоли была подтверждена методом иммуногистохимического анализа с использованием набора HercepTest (Dako).

Анализ распределения КТ в организме. Животные были поделены на три группы. Первой группе вводили КТ-4D5scFv (10 животных), второй – КТ-PEG (10 животных). КТ-4D5scFv и КТ-PEG вводили в латеральную хвостовую вену в дозе 0.14 нмоль на животное. Через 3 ч и 21 ч по 5 животных из каждой опытной группы умерщвляли методом цервикальной дислокации. Органы и ткани животного использовали для флуоресцентного анализа содержания КТ. Животные третьей “контрольной” группы (3 животных) служили для определения уровня автофлуоресценции тканей. Все образцы тканей и органов исследовали в течение 1 ч после извлечения.

Для анализа содержания в КТ образцах использовали систему конфокальной микроскопии Axiovert 200M LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия). Изображения получали с помощью масляно-иммерсионного объектива с увеличением 40× и числовой апертурой 1.3 (1024 × 1024 пикселя, размер пикселя 0.22 мкм). Флуоресценцию КТ возбуждали при 488 нм, сигнал регистрировали с помощью спектрального модуля META в диапазоне

540–710 нм с шагом 10 нм. Спектральная информация позволяла идентифицировать сигнал КТ на фоне автофлуоресценции тканей. Для представления конфокальных изображений диапазон 660–710 нм представлен в виде единого канала (белый).

Для каждого образца было получено не менее 3 изображений. В случае опухоли анализировали периферические и глубокие слои опухолевого узла. Все изображения получали в идентичных условиях на глубине 2 мкм от поверхности.

Обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ (версия 1.47v): определяли средний уровень флуоресцентного сигнала по площади изображений образцов опухоли и органов экспериментальных животных. Итоговое усредненное значение интенсивности флуоресценции получали за вычетом фона (усредненная интенсивность флуоресценции соответствующей ткани контрольных животных). Для наглядности представления данных производили нормировку усредненного флуоресцентного сигнала по опухоли и органам на мышечную ткань. На гистограммах данные изображены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа по получению рекомбинантных белков выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках соглашения RFMEFI57814X0051; конструирование биоконъюгатов с полупроводниковыми нанокристаллами осуществлено в рамках договора с Министерством образования и науки РФ № 14.Z50.31.0022; получение опухолевой модели с гиперэкспрессией HER2 и анализ ее гистоморфологических характеристик проведены в рамках проекта РНФ № 14-14-00813; эксперименты на животных выполнены при поддержке РФФИ, проект № 13-04-40228-Н.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sreenivasan V.K., Zvyagin A.V., Goldys E.M. // J. Phys. Condens. Matter. 2013. V. 25. P. 194101 (23 pp).
2. Здобнова Т.А., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. // Acta Naturae. 2011. Т. 3. С. 30–50. [Zdobnova T.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2011. V. 3. P. 29–47.]
3. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W., Nie S. // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 969–976.
4. Kairdolf B.A., Smith A.M., Stokes T.H., Wang M.D., Young A.N., Nie S. // Annu. Rev. Anal. Chem. 2013. V. 6. P. 143–162.
5. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. С. 32–50. [Deyev S.M., Lebedenko E.N. // Acta Naturae. 2009. V. 1. P. 32–50.]
6. Yang L., Mao H., Wang Y.A., Cao Z., Peng X., Wang X., Duan H., Ni C., Yuan Q., Adams G., Smith M.Q., Wood W.C., Gao X., Nie S. // Small. 2009. V. 5. P. 235–243.
7. Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Bala-

- laeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., Zlomanov V.P., Deyev S.M. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. P. 021004.
8. Saipathy M., Wang L., Zielinski R., Qian W., Lipowska M., Capala J., Lee G.Y., Xu H., Wang Y.A., Mao H., Yang L. // *Small*. 2014. V. 10. P. 544–555.
 9. Gao J., Chen K., Miao Z., Ren G., Chen X., Gambhir S.S., Cheng Z. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. P. 2141–2148.
 10. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н., Петровская Л.Е., Долгих Д.А., Габиров А.Г., Кирпичников М.П. // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. С. 1–26. [Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabirov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russian Chemical Reviews*. 2015. V. 84. P. 1–26.]
 11. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *PLOS ONE*. 2012. V. 7. P. e48248.
 12. Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1486–1492.
 13. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 5827–5832.
 14. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. // *J. Control. Release*. 2000. V. 65. P. 271–284.
 15. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brilkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics*. 2012. V. 5. P. 860–867.
 16. Cai W., Shin D.W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. P. 669–676.
 17. Tada H., Higuchi T.M., Wanatabe N., Ohuchi N. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 1138–1144.
 18. Wuang S.C., Neoh K.G., Kang E.-T., Pack D.W., Leckband D.E. // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 2270–2279.
 19. Barok M., Joensuu H., Isola J. // *Breast Cancer Research*. 2014. V. 16. P. 209.
 20. Han S.-J., Rathinaraj P., Park S.-Y., Kim Y., Lee J.H., Kang I.-K., Moon J.-S., Winiarz J.G. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 954307.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Cao Y., Marks J.W., Liu Z., Cheung L.H., Hittelman W.N., Rosenblum M.G. // *Oncogene*. 2013. V. 33. P. 429–439.
 24. Weng K.C., Noble C.O., Papahadjopoulos-Sternberg B., Chen F.F., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Wang D., Hom Y.K., Hann B., Park J.W. // *Nano Lett.* 2008. V. 8. P. 2851–2857.
 25. Hauck T.S., Anderson R.E., Fischer H.C., Newbigging S., Chan W.C. // *Small*. 2010. V. 6. P. 138–144.
 26. Yang R.H., Chang L.W., Wu J.P. // *Environ. Health Perspect.* 2007. V. 115. P. 1339–1343.
 27. Kobayashi H., Hama Y., Koyama Y., Barrett T., Regino C.A., Urano Y., Choyke P.L. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 1711–1716.
 28. Jakerst J.V., Lobovkina T., Zare R.N., Gambhir S.S. // *Nanomedicine*. 2011. V. 6. P. 715–728.
 29. Aghaeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. P. 950–961.
 30. 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.
 31. 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. P. 76004.
 32. Grebenik E.A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khaydukov E.V., Mironova K.E., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. P. 48–53.
 33. 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. // *Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays. Nanomedicine (UK)*. 2011. V. 6. P. 195–209.

Targeted Delivery of Quantum Dots to HER2-Expressing Tumor Using Recombinant Antibodies

I. V. Balalaeva*, #, T. A. Zdobnova*, E. A. Sokolova*, S. M. Deyev*, **

#Phone: +7 (831) 462-32-13; fax: +7 (831) 462-32-02; e-mail: irin-b@mail.ru

*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, ul. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 606095 Russia

**Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Targeted delivery of semiconductor quantum dots (QDs) to tumors overexpressing HER2 cancer marker has been demonstrated on immunocompromised mice bearing human breast cancer xenografts. To obtain targeted QDs complexes we applied the approach based on the use of protein adaptor system, RNAase barnase and its inhibitor barstar. Specific binding to target cancer marker was achieved through bivalent fusion protein containing two fragments of 4D5scFv recombinant antibody and a fragment of barnase. QDs were conjugated to barstar, and final assembly of targeted complexes was obtained through non-covalent specific interaction of barstar, attached to QD, and barnase, that is part of the recombinant targeting protein. The efficient delivery of QDs to HER2-expressing tumor demonstrates the possibilities and prospects of the approach for targeted delivery of nanoparticles to cancer cells in vivo as the way to improve the efficiency of diagnosis and promote development of therapies based on the use of nanoparticles.

Keywords: quantum dots, 4D5scFv, cancer marker HER2, fluorescence