

## СОЗДАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ДАРПИНОВ

**Е.В. Коновалова<sup>1</sup>, А.А. Шульга<sup>1</sup>, Т.И. Лукьянова<sup>1</sup>, А.Г. Воробьева<sup>2</sup>, В.М. Толмачев<sup>2</sup>, С.М. Деев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия*

<sup>2</sup> *Уппсальский университет, Уппсала, Швеция*

Все молекулярные визуальные диагностики основаны на использовании меченных адресных соединений, которые накапливаются преимущественно в местах повышенного содержания узнаваемых ими молекул-мишеней, а также прибора, который способен детектировать эти сайты с высокой точностью. Принимая во внимание требования, предъявляемые к современным диагностическим методам, касающиеся чувствительности, глубины проникновения в ткани организма детектируемого сигнала, а также пространственное разрешение, можно с уверенностью констатировать, что методы, основанные на использовании радионуклидов, будут доминировать в клинике в предстоящие годы.

Для целей молекулярной диагностики желательно, чтобы адресные радиофармпрепараты как можно быстрее находили свою мишень, а не связавшиеся молекулы быстро покидали организм. Тем самым упрощается процесс получения высококонтрастного изображения опухоли и сокращается время диагностики. Обычно такое поведение характерно для сравнительно небольших молекул. Большинству этих требований удовлетворяют дарпины (DARPs, Designed Ankyrin Repeat proteins), которые являются искусственными белками, происходящими от природных анкиринов (ankyrin) [1]. Дарпины состоят, по меньшей мере, из трех повторяющихся мотивов. Обычно таких мотивов четыре или пять. Первый (N-capping repeat) и последний (C-capping repeat) повторы обогащены гидрофильными аминокислотными остатками для лучшей растворимости белка [2]. Благодаря небольшому размеру (прим. 15 кДа), простоте структуры и высокой специфичности к онкомаркерам, дарпины очень популярны в научном мире, где успешно используются в качестве адресных агентов. Немаловажным является то, что эти белки, в отличие от иммуноглобулинов, можно получать в больших количествах в бактериях. Их структуру легко модифицировать, приспособив под конкретные нужды. Например, присоединять различные таги, расширяющие функционал белка. Имея небольшие размеры, дарпины легче проникают в опухолевые ткани и быстрее выводятся из организма через почки, нежели иммуноглобулины. Поэтому эти белки предпочтительны при создании диагностикумов [3].

В данной работе были получены модифицированные адресные белки на основе дарпинов G3 и EC1 для их мечения короткоживущими изотопами, главными компонентами терапии и диагностики рака. Функционал дарпинов G3 и EC1 был расширен за счет добавления аминокислотных последовательностей, способных связывать короткоживущие радиоизотопы ионов металлов, на N- и / или C-конец молекулы. В качестве таких последовательностей выступали ННННН, НЕНЕНЕ, а также последовательности, содержащие единичные цистеины ЕЕЕС и GGGC.

Дарпин G3 – это каркасный белок длиной 136 а.о., избирательный и высоко аффинный лиганд рецептора эпидермального фактора роста второго типа HER2/neu (Kd, 90pM) [4]. Раковые опухоли с повышенным содержанием этого рецептора, характеризуются быстрым темпом роста и повышенным риском появления отдаленных метастазов. Стратификация пациентов по HER2/neu позволяет выбрать правильный способ лечения [5]. Дарпин EC1 – каркасный белок длиной 167 а.о., избирательный и высоко аффинный лиганд онкомаркера еpСAM (Kd, 68pM), молекулы клеточной адгезии эпителия. Многие опухоли (рак стволовых клеток, ретинобластома) имеют повышенное содержание еpСAM. Изотопно-меченный дарпин EC1 может использоваться в качестве высокоэффективного диагностирующего средства для локализации раковых опухолей, а также для отбраковки раковых стволовых клеток [6].

Гены дарпинов G3 и EC1 были собраны при помощи ПЦР из химически синтезированных олигонуклеотидов, содержащих частично комплементарные последовательности. Короткие последовательности на N- и / или C-концы дарпинов были добавлены при помощи ПЦР [7]. Для наработки дарпинов использовали клетки бактериального штамма E. coli BL21(DE3).

Бактерии, трансформированные соответствующими плазмидами, выращивали в автоиндукционных средах [8]. Рекombинантные штаммы дарпинов характеризовались высокими выходами целевого продукта – не менее 100 мг с литра. Был разработан метод выделения и очистки белков, включающий металлхелатную аффинную и анионообменную хроматографии. При разработке метода очистки дарпинов особое внимание уделялось таким параметрам, как содержание в белковых препаратах эндотоксинов и хозяйских белков.

Правильная молекулярная масса и гомогенность препаратов мутантных дарпинов была подтверждена при помощи тандемной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Кинетику связывания мутантных дарпинов измеряли при помощи прибора LigandTracer [9]. Было установлено, что на мембранах клеток имело место быть два типа взаимодействия – низкоаффинное (в наномолярном диапазоне) и высокоаффинное (в пикомолярном диапазоне) [10].

*Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (научные проекты № 18-34-00899 мол\_а и № 18-29-08030мк*

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] C.N. Jost, et al. (2013) Structure, 21: 1979–1991
- [2] M.T. Stumpp, P. Amstutz (2007) Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10:153–159.
- [3] G.L. Sennhauser, et al. (2006) PLoS Biol. 5:106–113.
- [4] N.E. Hynes, H.A. Lane (2005) Nat. Rev. Cancer. 5:341–354
- [5] H.K. Binz, et al. (2004) Nat. Biotechnol. 22:575–582
- [6] N.A. Stefan, et al. (2011) Mol. Biol. 413(4):826–843
- [7] M.P. Malakhov, et al., J. Struct. Funct. Genomics, 5: 75–86
- [8] F.W. Studier (2005) Protein Expression Purif., 41: 207–234
- [9] S.M. Deyev, et al. (2019) Mol. Pharm., 16: 995–1008
- [10] A.G. Vorobyeva, et al. (2018) Contrast Media Mol. Imaging, 6930425

УДК 616–006–092.9

#### ИНГИБИРОВАНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SET7/9 ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

*А.А. Дакс, О.М. Семенов, А.В. Жарова, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова, А.В. Петухов, Н.А. Барлев*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

Метилтрансфераза Set7/9, продукт гена *setd7*, представляет собой фермент, осуществляющий метилирование гистонов H3 и H3Z, а также множества транскрипционных факторов, таких как p53, E2F1, YAP, эстрогеновый рецептор ER, NFκB и других. На основании того, что субстраты Set7/9 играют ключевую роль в регуляции клеточного ответа на генотоксический стресс, клеточного цикла и апоптоза, мы предположили и доказали, что при ингибировании экспрессии или активности Set7/9 повышается чувствительность раковых клеток к ДНК-повреждающим агентам доксорубину и метилнитрозогуанидину (МНГ). Доксорубин является ингибитором топоизомеразы II и приводит к активации систем репарации двуцепочечных разрывов, таких как гомологичная рекомбинация и негомологичное соединение концов, в то время как МНГ обладает сходным с цисплатином действием, вызывая точечные модификации пуриновых оснований и активацию ошибочно спаренных нуклеотидов. Соответственно, Set7/9 опосредует устойчивость клеток к основным генотоксическим химиопрепаратам. В ходе наших исследований мы обнаружили, что повышенный уровень данного белка наблюдается при наиболее агрессивных формах рака легкого и рака молочной железы. Так, мы продемонстрировали, что для немелкоклеточного рака легкого с мутациями в гене KRAS, а также для HER2-позитивного подтипа рака молочной железы характерно повышение экспрессии Set7/9. Кроме того мы показали, что подавление экспрессии Set7/9, а также применение специфического ингибитора данного фермента (R) – PFI-2 повышает чувствительность клеток рака легкого и рака молочной железы к генотоксическим препаратам доксорубину и цисплатину, широко применяемым в онкологии в настоящее время. Таким образом, метилтрансфераза может рассматриваться в качестве онкобиомаркера и перспективной мишени для разработки противораковой терапии.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19–75–10059.*