

УДК 577.2

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ДОСТАВКА АНТИТЕЛОПОДОБНОЙ МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНОЙ ИНГИБИРОВАТЬ с-МУС

© 2023 г. Т. Н. Лупанова^{1,*}, А. В. Уласов¹, Ю. В. Храмцов¹, А. А. Розенкранц^{1,2}, академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,**}

Поступило 01.11.2022 г.
После доработки 30.11.2022 г.
Принято к публикации 01.12.2022 г.

Синтезирован и охарактеризован модульный нанотранспортер (МНТ), несущий последовательность антителоподобной молекулы, анти с-Мус нанободи. Продemonстрировано, что созданный МНТ способен взаимодействовать с белком-мишенью, онкогеном с-Мус, с константой диссоциации 46 ± 14 нМ, интернализироваться в клетки-мишени, изменять Мус-зависимую экспрессию и оказывать антипролиферативное действие.

Ключевые слова: модульные нанотранспортеры, внутриклеточная доставка, с-Мус, нанободи

DOI: 10.31857/S2686738922600819, **EDN:** LZHSX

Специфическое воздействие на внутриклеточные белок-белковые взаимодействия является многообещающим подходом к регуляции сигнальных путей, в том числе и вовлеченных в различные патологические процессы. Ингибирование белок-белковых взаимодействий вошло в клиническую практику как способ терапии ряда воспалительных, онкологических и вирусных заболеваний. Однако эффективные низкомолекулярные ингибиторы известны не для всех перспективных мишеней и во многом ограничены белками, имеющими в своей структуре карманы, куда такой ингибитор мог бы встроиться. При этом некоторые белок-белковые взаимодействия характеризуются значительно большей площадью контакта, делая невозможным использование низкомолекулярных ингибиторов [1]. В то же время антитела и антителоподобные молекулы можно подобрать и к таким сложным мишеням [2], однако возникает проблема их специфической внутриклеточной доставки [3]. Для решения этой задачи нами было предложено адаптировать технологию модульных нанотранспортеров (МНТ), ранее успешно использованную для доставки низкомолекулярных соединений и регуляторных белков в клетки-мишени как *in vitro*, так и

in vivo [4]. МНТ состоят из нескольких транспортных модулей, которые обеспечивают узнавание клетки мишени, рецептор-опосредуемый эндоцитоз, выход из эндосом в цитозоль и, при необходимости, транспорт из цитозоля в иной клеточный компартмент, например, в ядро через ядерную пору. В качестве модельной антителоподобной молекулы мы использовали нанободи к внутриклеточному белку с-Мус, онкогену, активированному в большинстве новообразований человека [5]. с-Мус — достаточно трудная мишень для воздействия из-за своей ядерной локализации, отсутствия полостей для связывания низкомолекулярных ингибиторов и вовлеченности в многочисленные клеточные процессы, что крайне затрудняет избирательное подавление с-Мус в живой клетке и организме такими ингибиторами.

В качестве конкурентного ингибитора использовали последовательность анти с-Мус нанободи CMYCVH-12-321, взаимодействие которого с с-Мус было продемонстрировано методом двугибридной системы [6]. Последовательность, кодирующая нанободи, была синтезирована и клонирована на N-конец ранее описанного МНТ [7] с получением гена слитого белка nb-DTox-HMP-NLS-EGF, где nb — анти с-Мус нанободи, эффекторная часть, DTox — эндосомолитический модуль, HMP — модуль-носитель, NLS — сигнал ядерной локализации, EGF — эпидермальный фактор роста в качестве лиганда к клеткам-мишеням со сверхэкспрессией EGFR. Нарработку целевого nb-МНТ (nb-DTox-HMP-NLS-EGF) и контрольного МНТ (DTox-HMP-NLS-EGF) осуществляли в штамме *E. coli* C3029. Индукцию

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: tatyanalupanova@yandex.ru

**e-mail: AlSobolev@yandex.ru

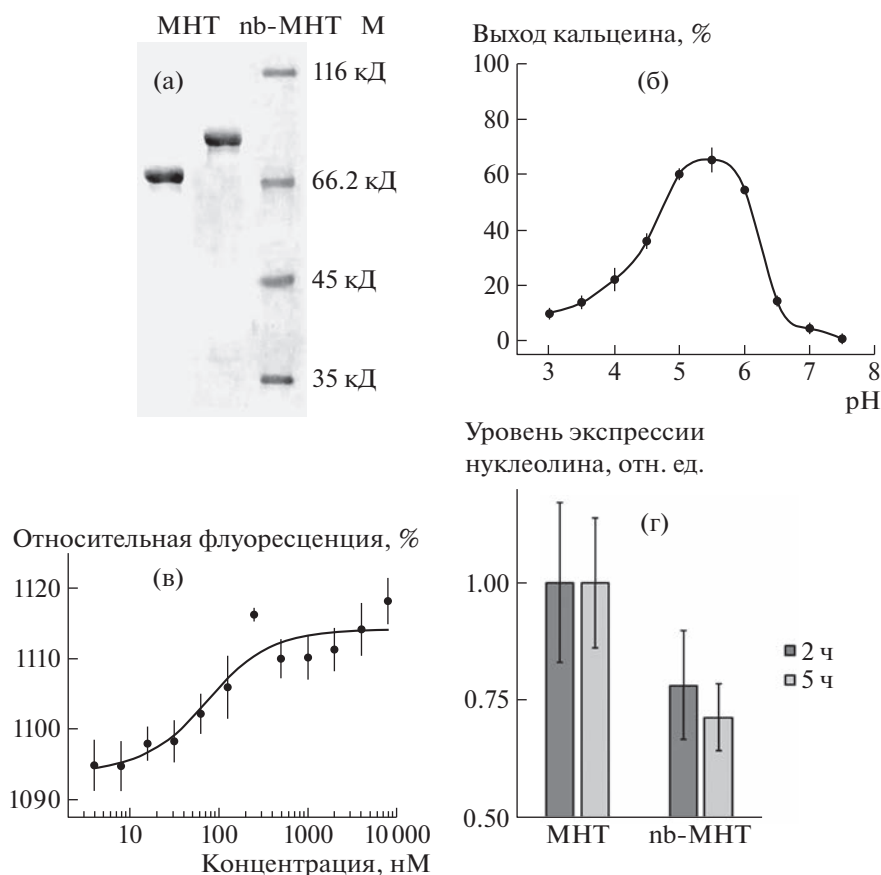


Рис. 1. (а) Денатурирующий электрофорез nb-MNT и MNT в полиакриламидном геле. М — белковый маркер. (б) Мембранолитические свойства nb-MNT в зависимости от pH окружения. (в) Кривая титрования с-Мус-EGFP (50 нМ) возрастающими концентрациями nb-MNT при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса nb-MNT:с-Мус-EGFP. (г) Уровни экспрессии нуклеолина в клетках A431 через 2 и 5 ч после добавления к ним 500 нМ nb-MNT или MNT, определенные методом вестерн-блоттинга.

экспрессии MNT проводили 500 мкМ изопропил- β -D-галактопиранозида в течение 20 ч при 16°C. Оба MNT выделяли из растворимой фракции, а затем очищали аффинной хроматографией на носителе HisTrap™ High Performance (Cytiva, США). Выделенные белки хранили в 10 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, pH 8. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученных белков (92% для nb-MNT и 96% для MNT) (рис. 1а).

Для оценки функциональности модулей MNT в составе nb-MNT было проведено комплексное исследование. Характеристики лигандного модуля nb-MNT были получены при помощи конкурентного радиолигандного анализа на клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431, характеризующейся сверхэкспрессией EGFR. При помощи конкурентного радиолигандного анализа с ^{125}I -EGF на клетках эпидермоидной карциномы человека A431 выявлено, что nb-MNT демонстрирует специфическое связывание

с EGFR с константой диссоциации 20.1 ± 2.1 нМ. Это свидетельствует о сохранении способности лигандного модуля в составе nb-MNT эффективно связываться с целевым рецептором. Интернализация меченных флуоресцентным красителем белков в клетки A431 была оценена методом точной цитофлуориметрии. Оба MNT демонстрировали специфическую интернализацию в клетки A431, которая блокировалась избытком свободного EGF.

Характеристика эндосомолитического модуля в составе nb-MNT была получена на модельной системе липосом, нагруженных флуоресцентным красителем кальцеином до концентрации самотушения флуоресценции. Проведенные эксперименты показали, что nb-MNT обладает мембранолитической активностью в области pH 5–6 (рис. 1б), соответствующей pH эндосом, что позволяет рассчитывать на работу этого модуля в составе nb-MNT после интернализации в ранних эндосомах.

Взаимодействие nb-MHT с c-Мус-EGFP было оценено методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series ("NanoTemper Technologies GmbH", Германия). Образование комплекса nb-MHT с EGFP-c-Мус влияет на величину падения интенсивности флуоресценции EGFP, обусловленное термофорезом. По зависимости относительной (по отношению к общей флуоресценции) глубины этого падения от концентрации МНТ (рис. 1в) при фиксированной концентрации EGFP-c-Мус (50 нМ) была рассчитана константа диссоциации комплекса nb-MHT с EGFP-c-Мус, которая составила 46 ± 14 нМ.

Антипролиферативное действие nb-MHT было изучено на клетках эпидермоидной карциномы человека A431, экспрессирующих и рецептор для nb-MHT — EGFR, и c-Мус. Эксперименты показали, что уже через 2 ч после добавления 500 нМ nb-MHT к клеткам A431 в них, по сравнению с добавленным контрольным МНТ (500 нМ), намечается снижение экспрессии нуклеолина — известной мишени Мус-индуцируемой активации [8], а спустя 5 ч экспрессия нуклеолина оказывается достоверно ($p = 0.03$ по критерию Манна-Уитни) подавленной на $\sim 1/3$ (рис. 1г). Похожие результаты были отмечены и на клетках аденокарциномы молочной железы MCF7. При помощи МТТ-теста на 6 день инкубации 500 нМ МНТ с клетками культуры MCF7 для nb-MHT был выявлен статистически значимый (t-критерий Стьюдента, $p < 0.05$) антипролиферативный эффект по сравнению с контрольным МНТ. Так, для nb-MHT относительная пролиферативная активность составляла $81 \pm 5\%$ от контрольного МНТ ($100 \pm 6\%$).

Полученные данные свидетельствуют о влиянии nb-MHT на c-Мус сигнальный путь, что проявляется в изменении c-Мус зависимой экспрес-

сии и снижении пролиферативной активности опухолевых клеток. Таким образом, показана принципиальная возможность эффективного воздействия на внутриклеточные мишени с помощью МНТ, несущих нанободи, которое мы планируем использовать в отношении других внутриклеточных белков, в том числе чужеродных, например, вирусных.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Эксперименты выполнены с использованием оборудования центра коллективного пользования ИБГ РАН и программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова при поддержке гранта РНФ 21-14-00130.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wells J.A., McClendon C.L. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7172. P. 1001–1009.
2. Shipunova V.O., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2022. V. 14. № 1(52). P. 54–72.
3. Santos R. et al. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2017. V. 16. P. 19–34.
4. Sobolev A.S. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. № 4 (47). P. 47–56.
5. Massó-Vallés D., Soucek L. // *Cells*. 2020. V. 9. № 4. P. 883.
6. Zeng J. et al. // *Journal of Immunological Methods*. 2015. V. 426. P. 140–143.
7. Gilyazova D.G. et al. // *Cancer research*. 2006. V. 66. № 21. P. 10534–10540.
8. Greasley et al. // *Nucleic acids research*. 2000. V. 28. № 2. P. 446–453.

INTRACELLULAR DELIVERY OF ANTIBODY-LIKE MOLECULE, CAPABLE TO INHIBIT C-MYC

T. N. Lupanova^{a, #}, A. V. Ulasov^a, Y. V. Khramtsov^a, A. A. Rozenkranz^{a, b},
Academician of the RAS G. P. Georgiev^a, and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a, b, ##}

^a Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: tatyanalupanova@yandex.ru

^{##}e-mail: AlSobolev@yandex.ru

A modular nanotransporter (MNT) carrying the sequence of an antibody-like molecule, an anti-c-Myc nanobody, was synthesized and characterized. It was demonstrated that the created MNT is able to interact with the target protein, c-Myc oncogene, with a dissociation constant of 46 ± 14 нМ, internalize into target cells, change Myc-dependent expression, and exert an antiproliferative effect.

Keywords: modular nanotransporters, intracellular delivery, c-Myc, nanobody