

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

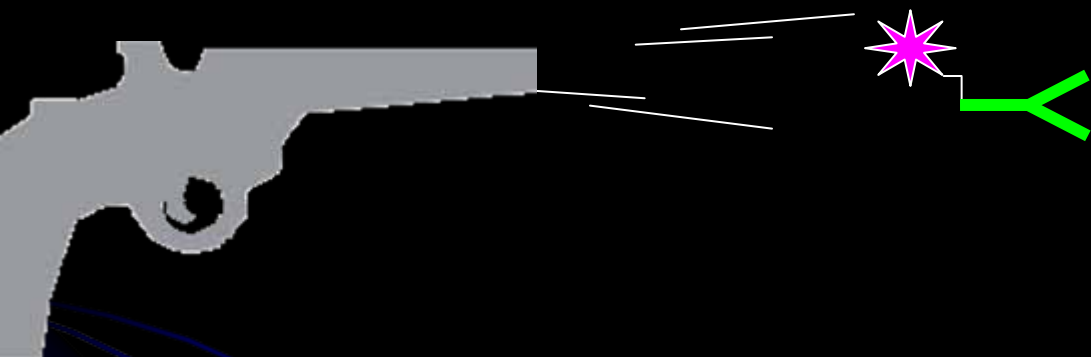
Франк Г. А.
Завалишина Л.Э.

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

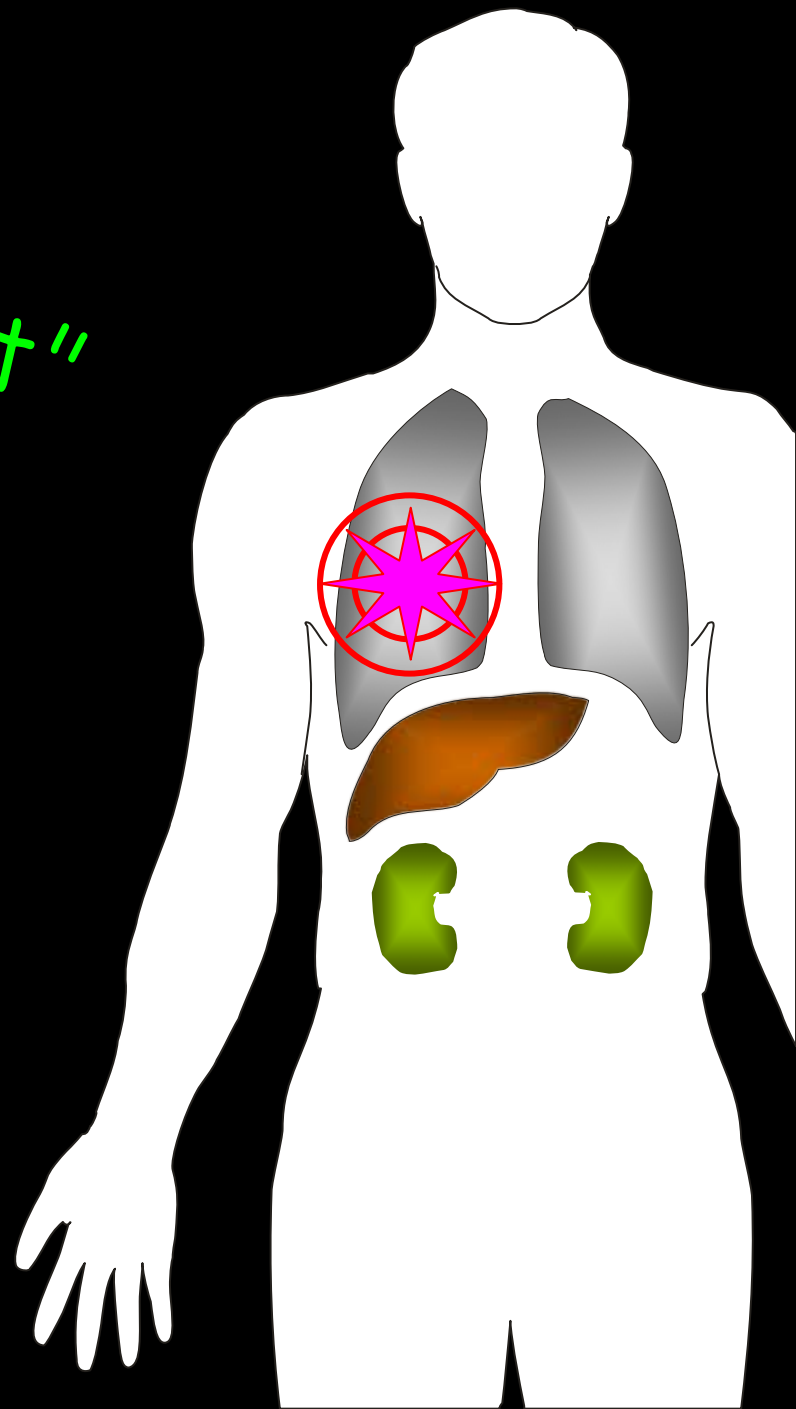


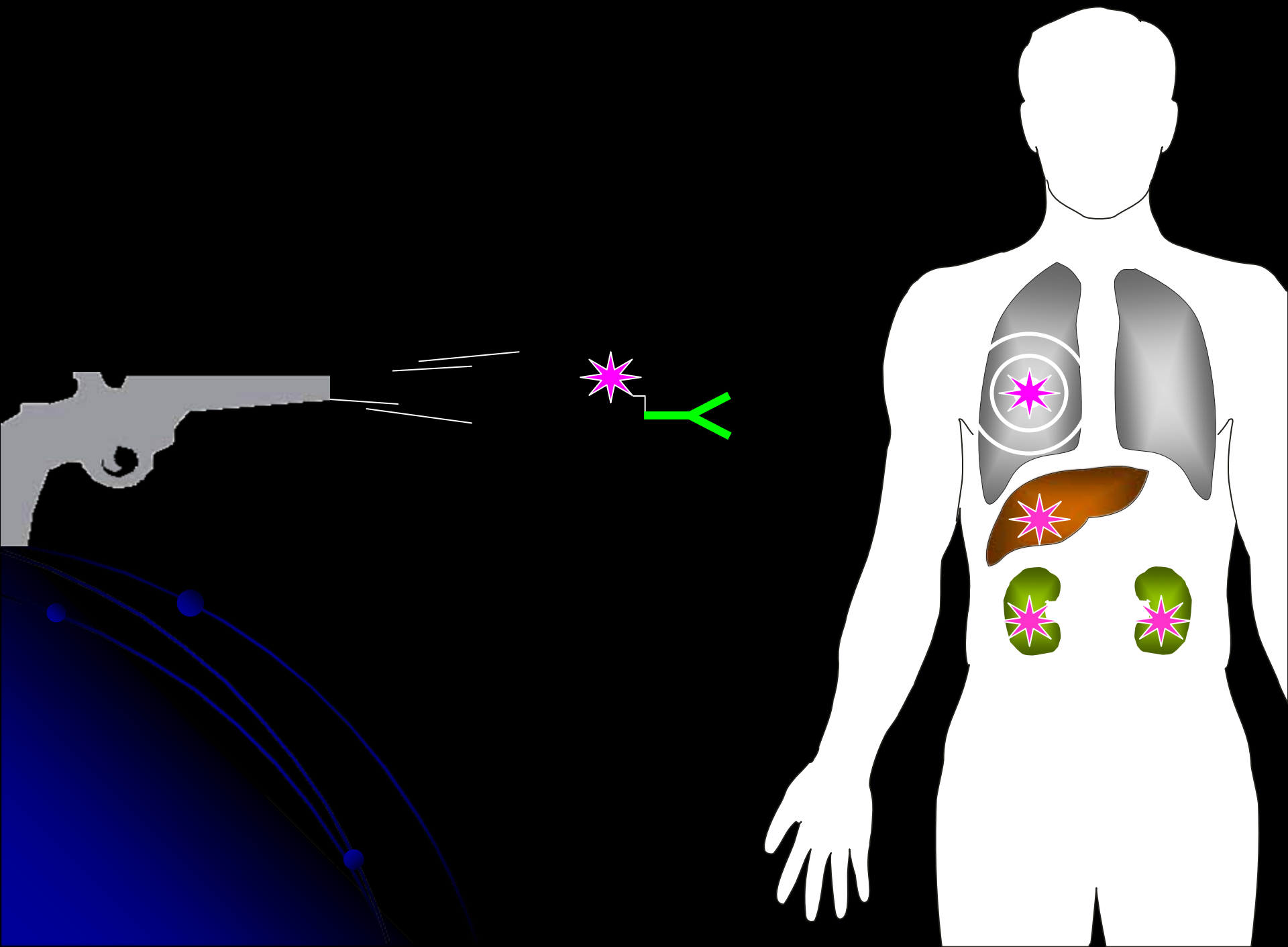
*Филип Ауреол Теофраст
Бомбаст фон Гогенхайм
(Парацельс) 1493-1541 г.*

"magic bullet"

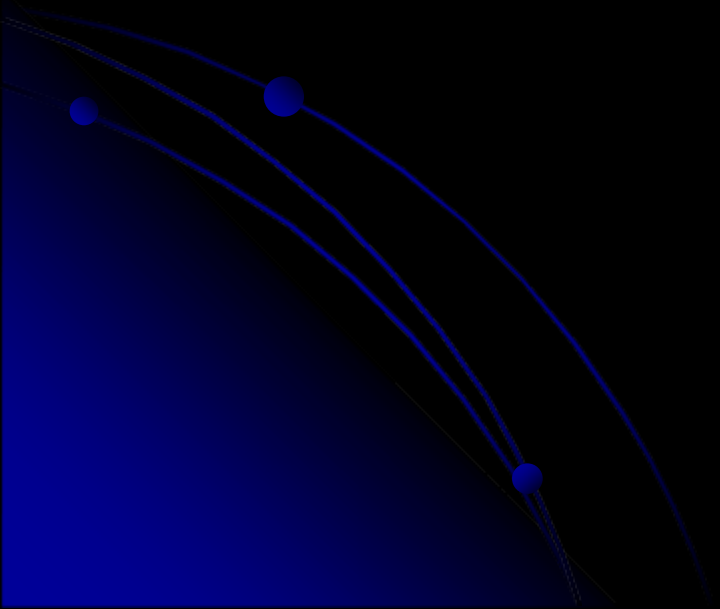


Paul Erlich, Нобелевская премия
по физиологии и медицине, 1908

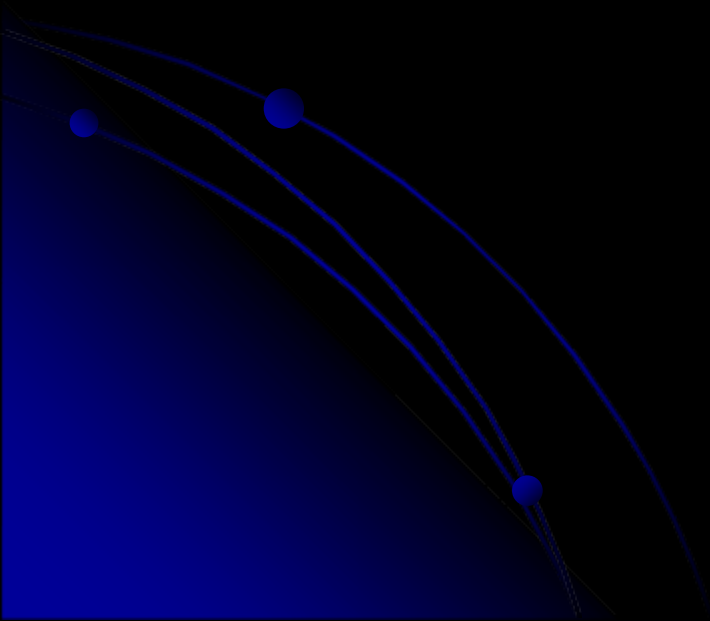


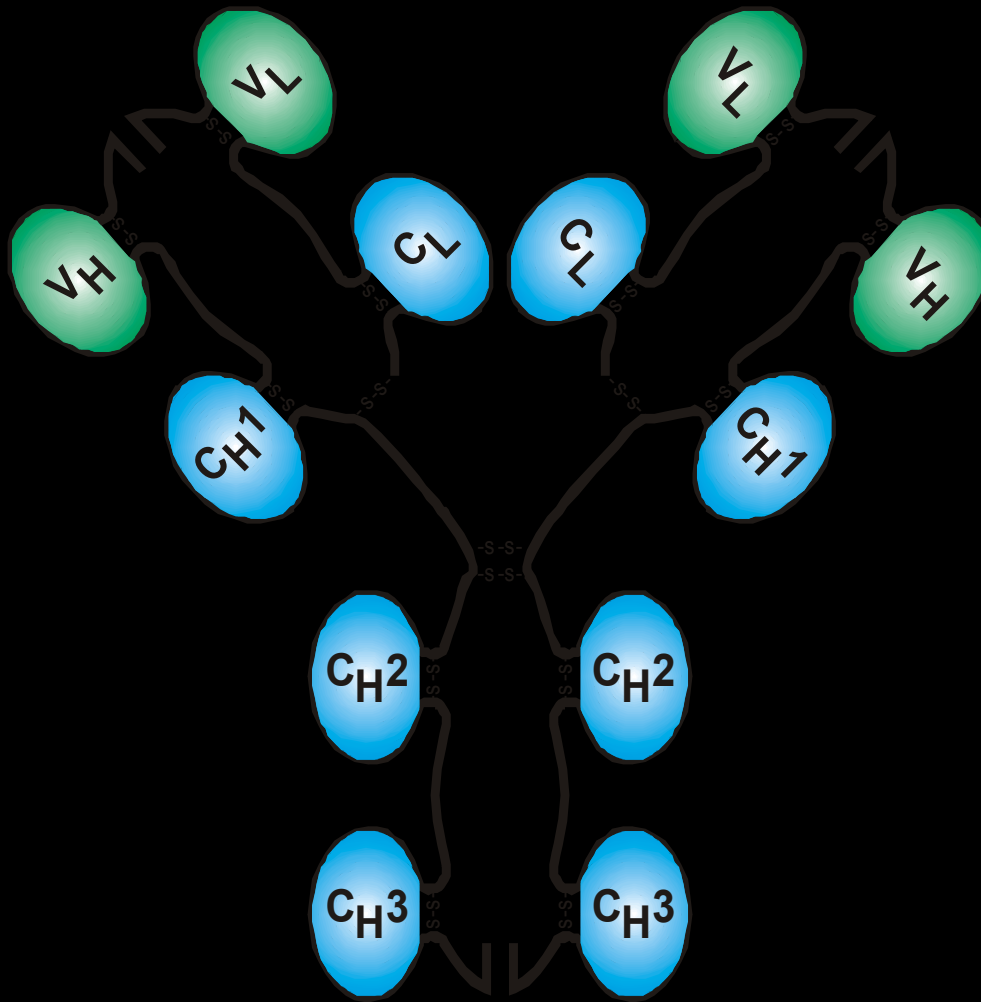


- Адресная доставка - воздействие на клетки с определенным «молекулярным портретом»



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





Georges Köhler & Cesar Milstein

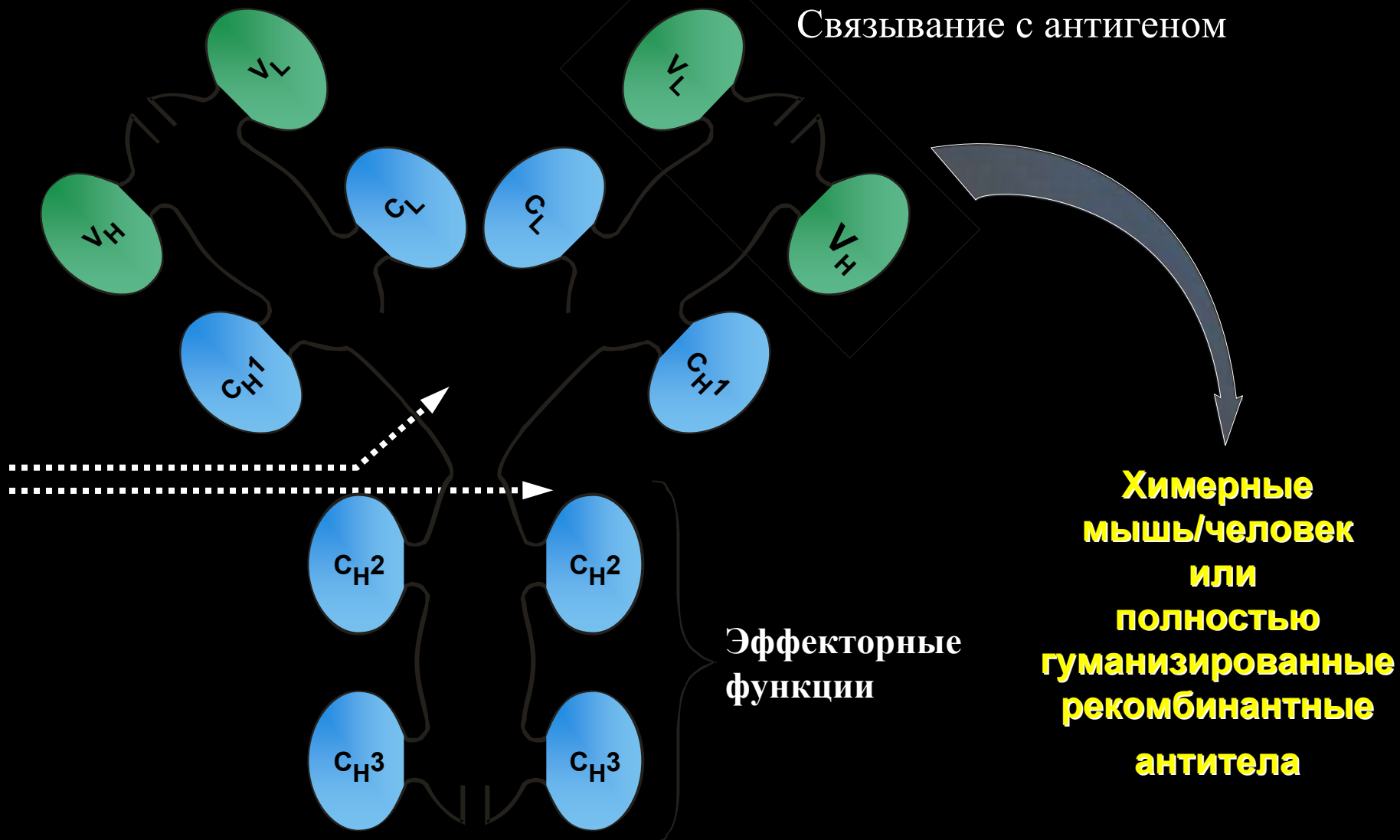
Нобелевская премия по физиологии и медицине

1984

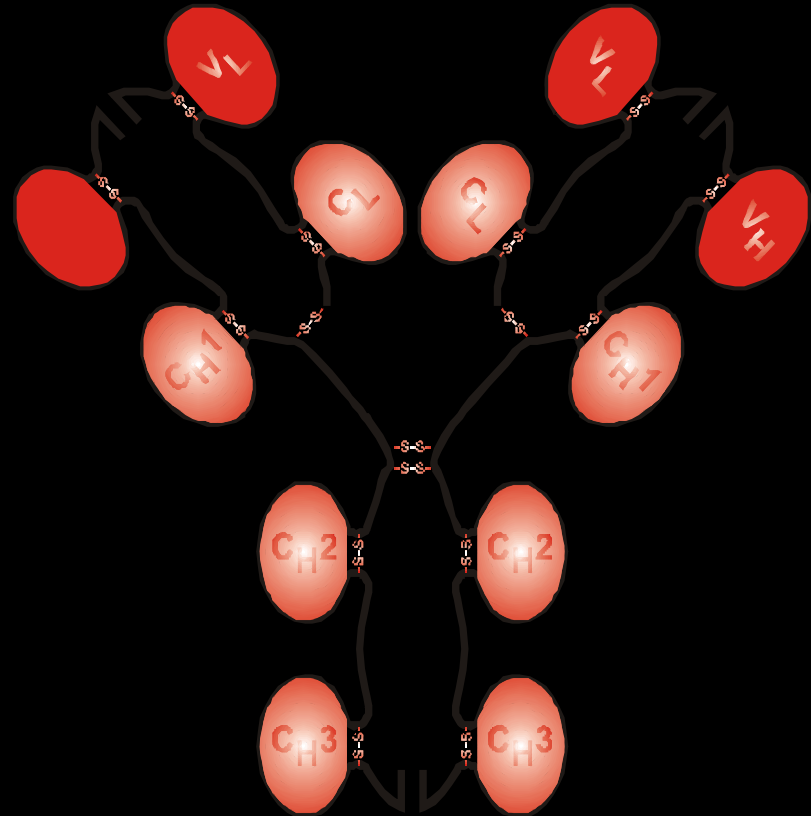
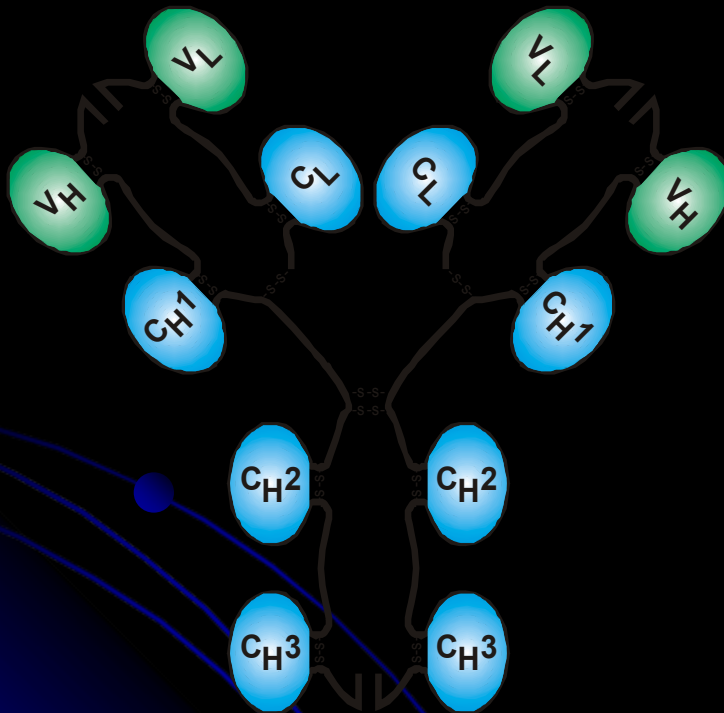
Инженерия антител

Полноразмерное моноклональное
мышинное антитело

Связывание с антигеном



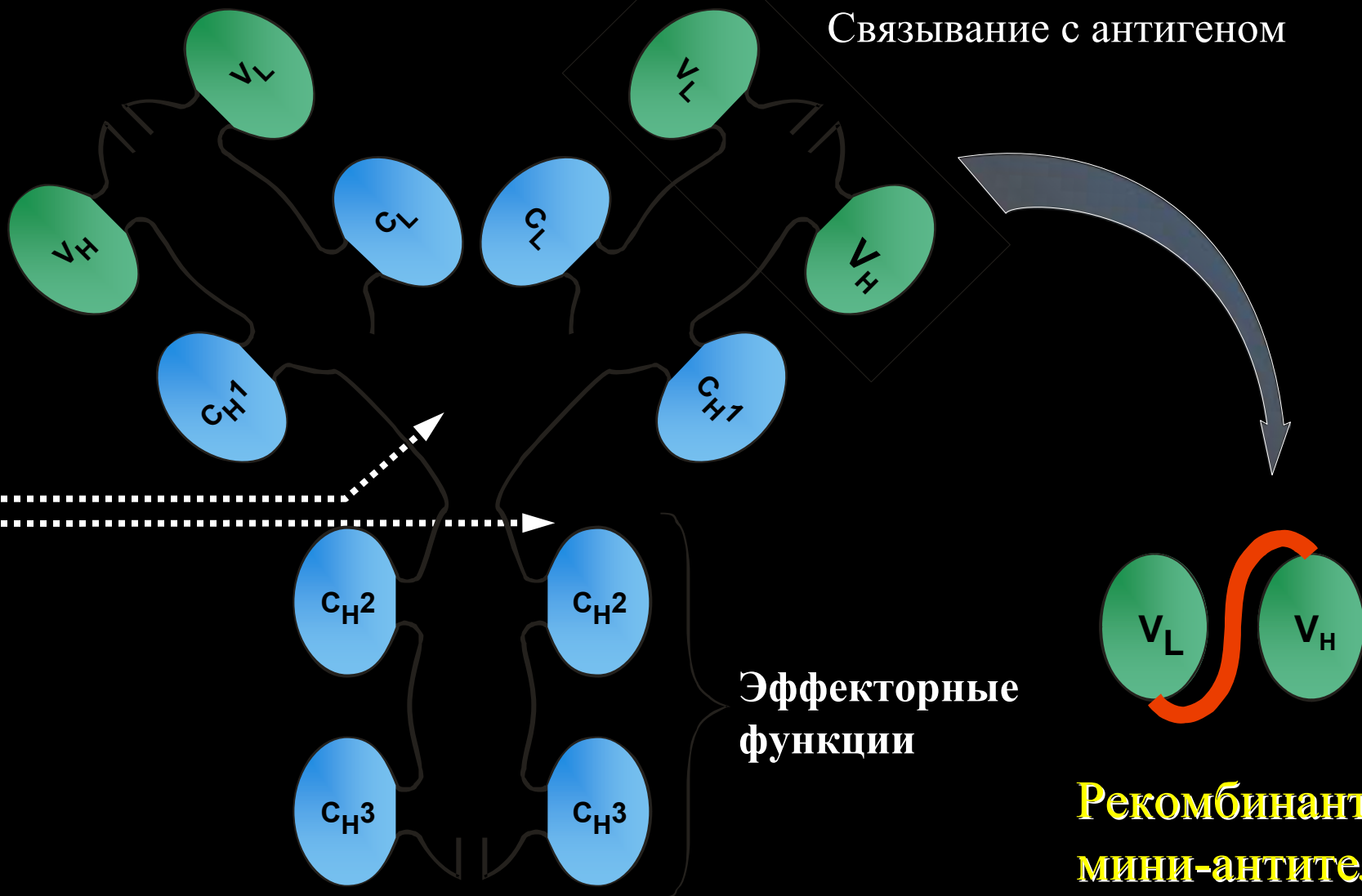
Гуманизированные («очеловеченные») антитела



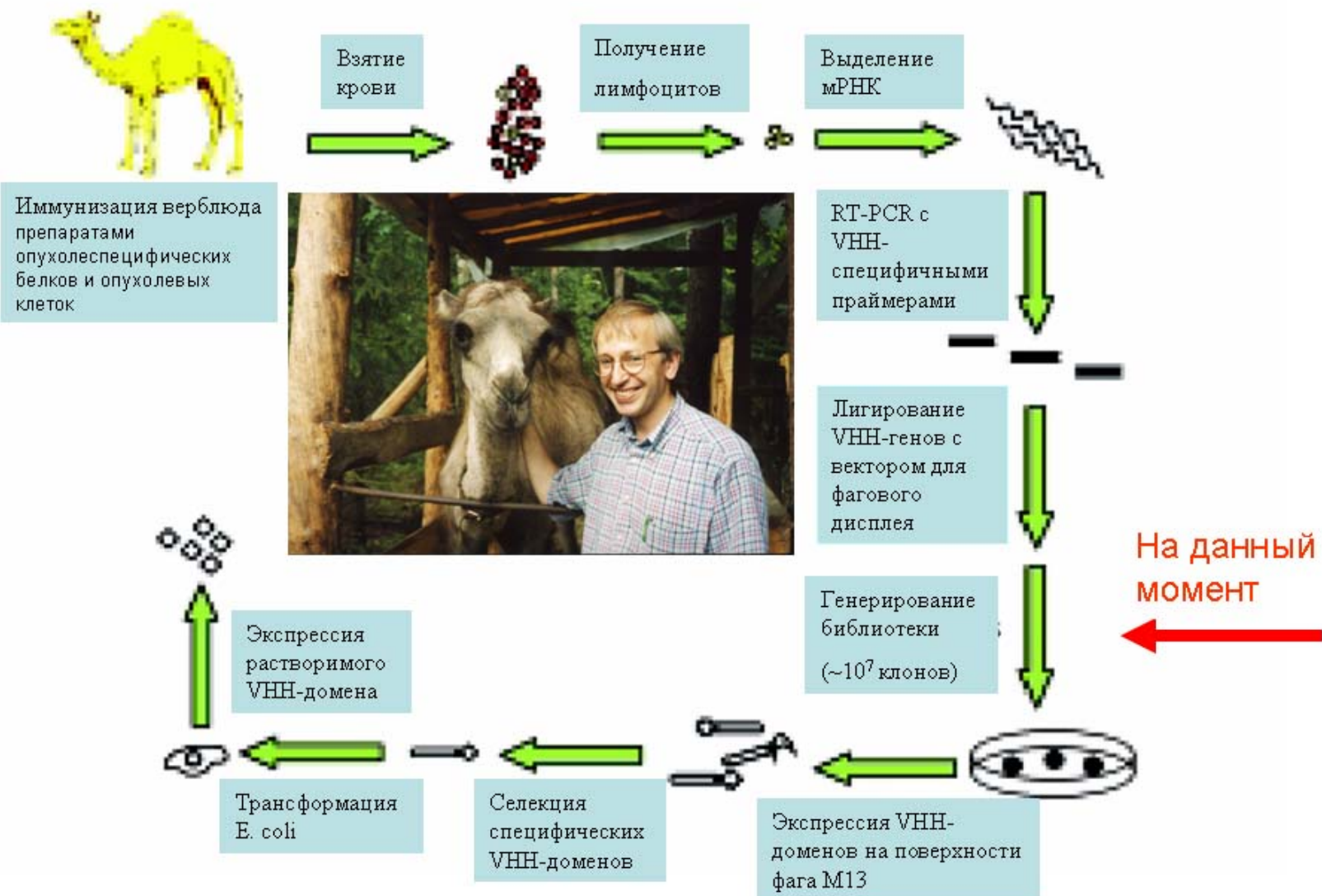
Инженерия антител

Полноразмерное моноклональное
мышинное антитело

Связывание с антигеном



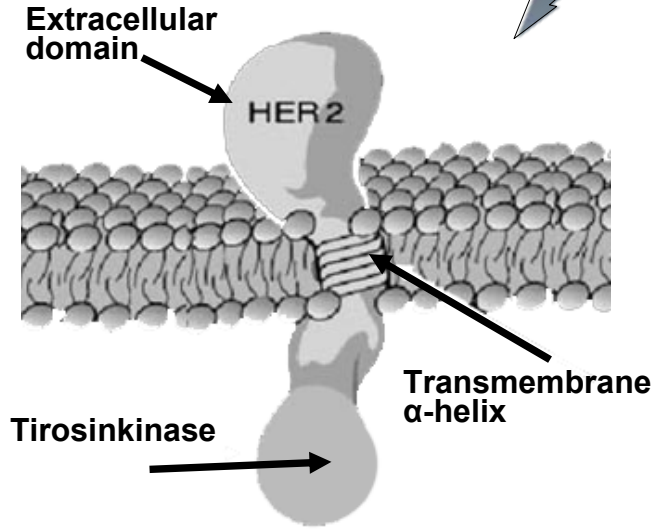
Процедура получения антиген-специфичных VHH-миниантител



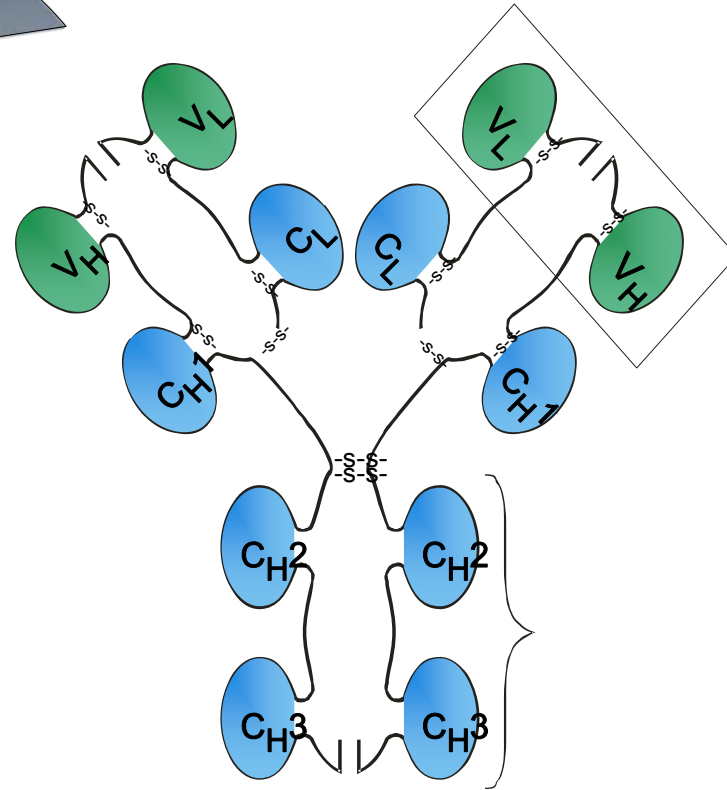
Преимущества рекомбинантных мини-антител

- 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

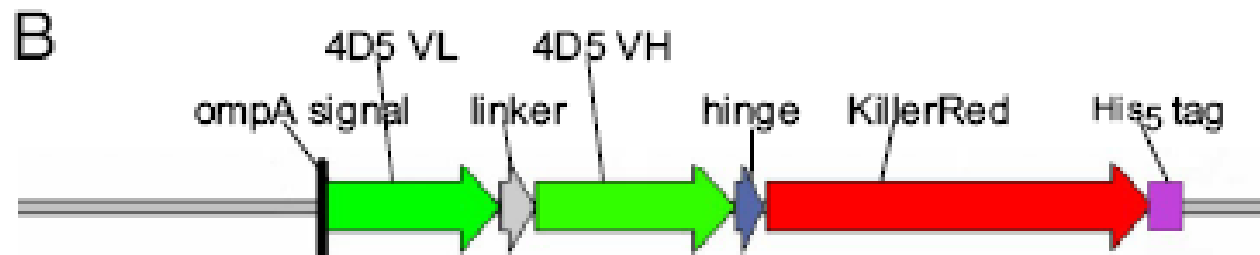
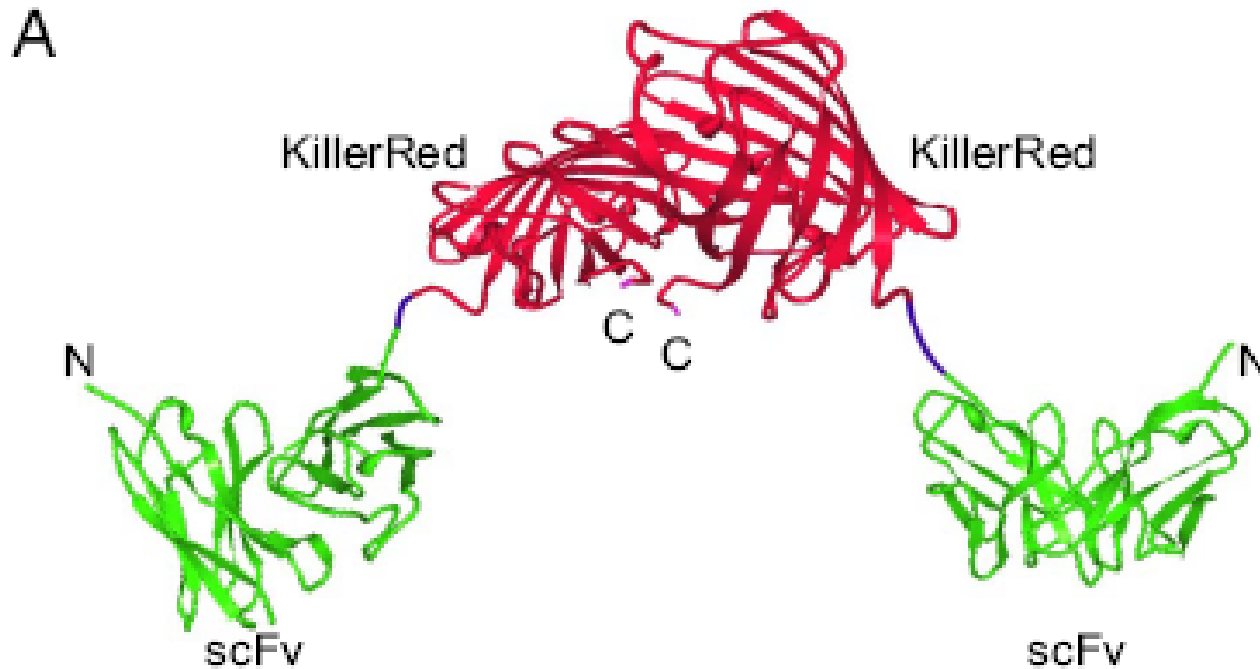


Monoclonal antibody

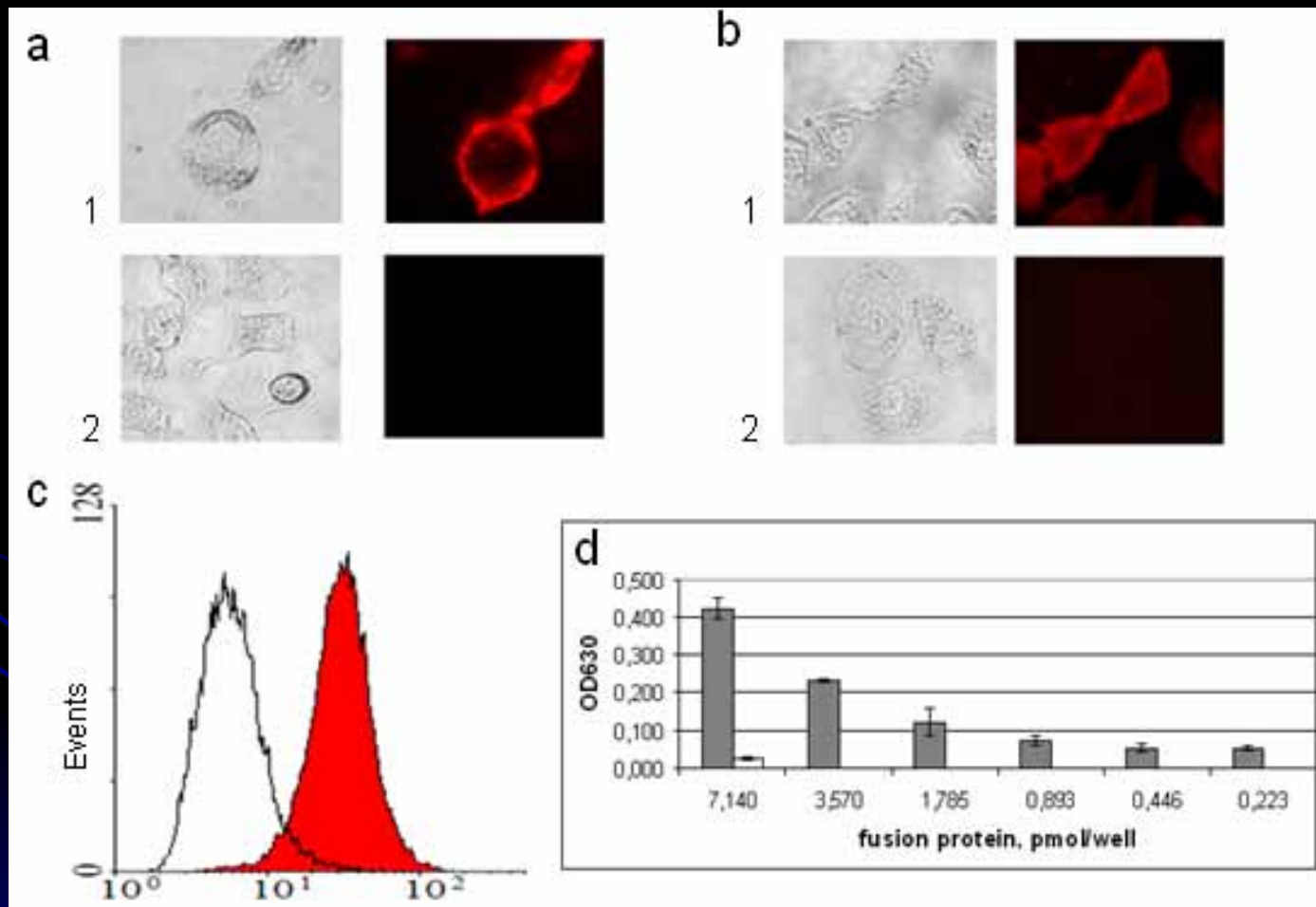


- breast cancer
- ovarian cancer
- stomach cancer
- lung cancer
- etc.

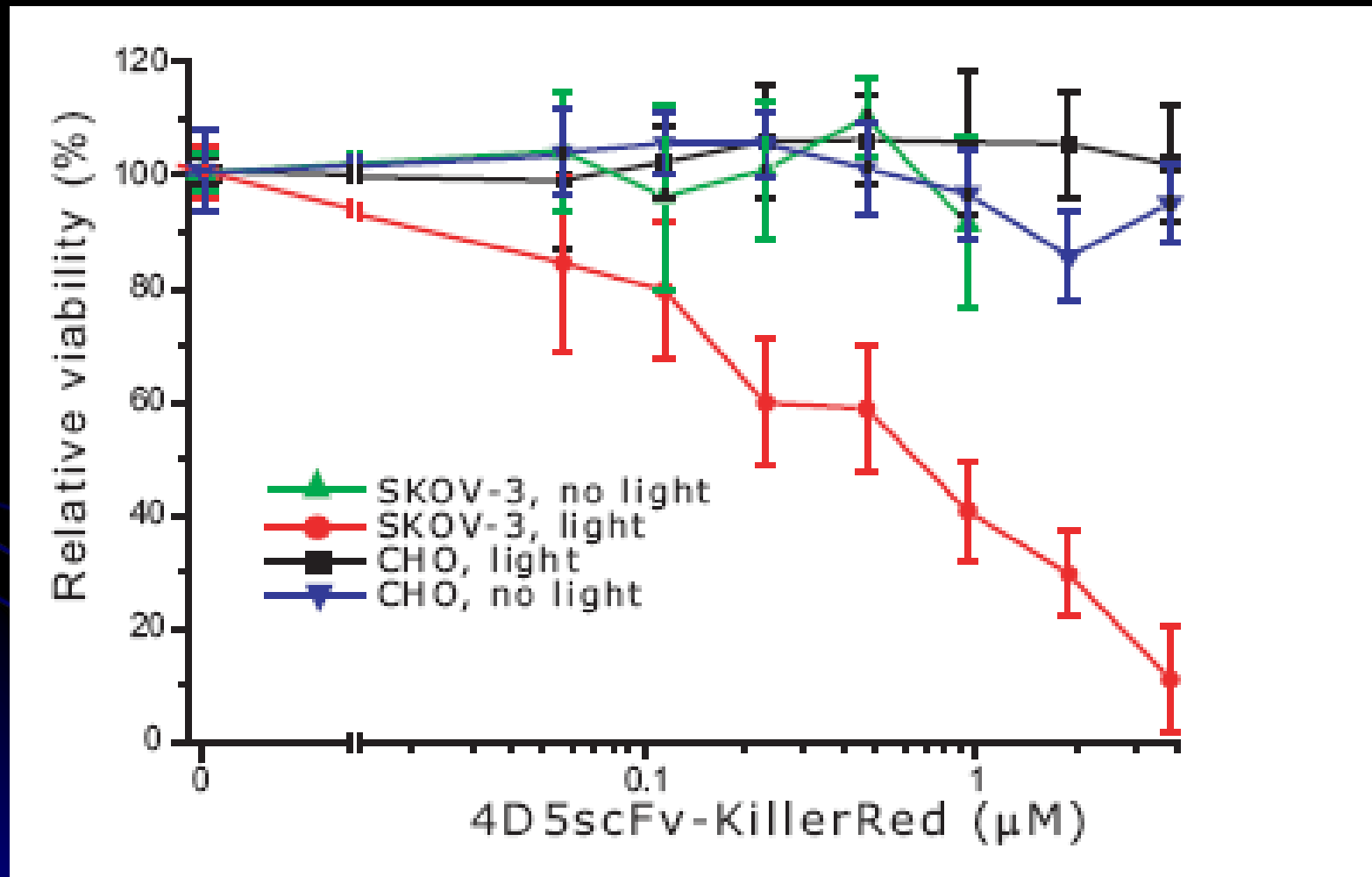
Design of fully genetically encoded miniantibody-Killer Red-photosensitizer



Miniantibody-Killer Red: fluorescent labeling of cancer cells

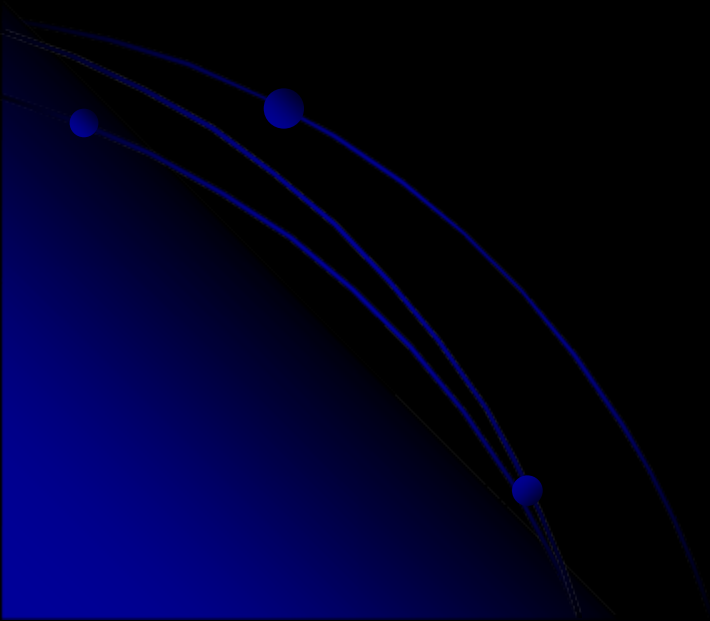


Miniantibody-Killer Red: specific cytotoxicity on HER2/neu-positive cancer cells



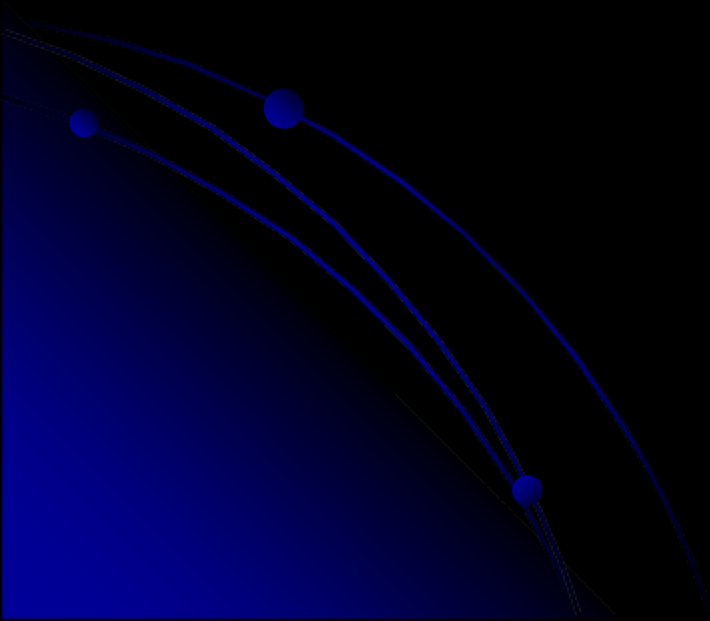
Miniantibody-Killer Red-photosensitizer:

- specific cytotoxicity on cancer cells



Miniantibody-Killer Red-photosensitizer:

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



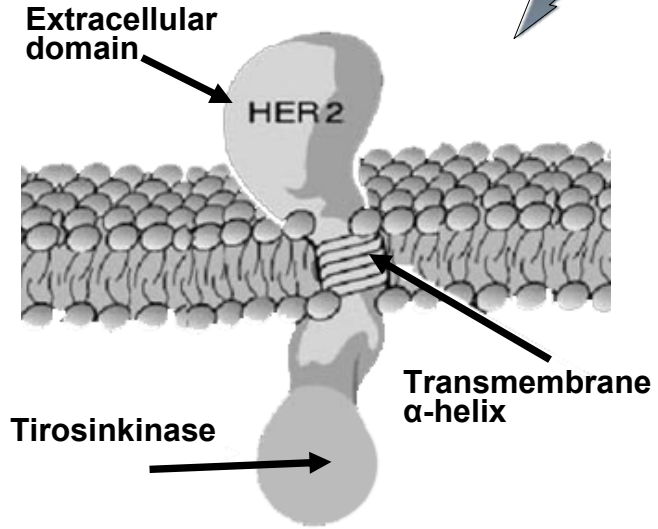
Miniantibody-Killer Red-photosensitizer:

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

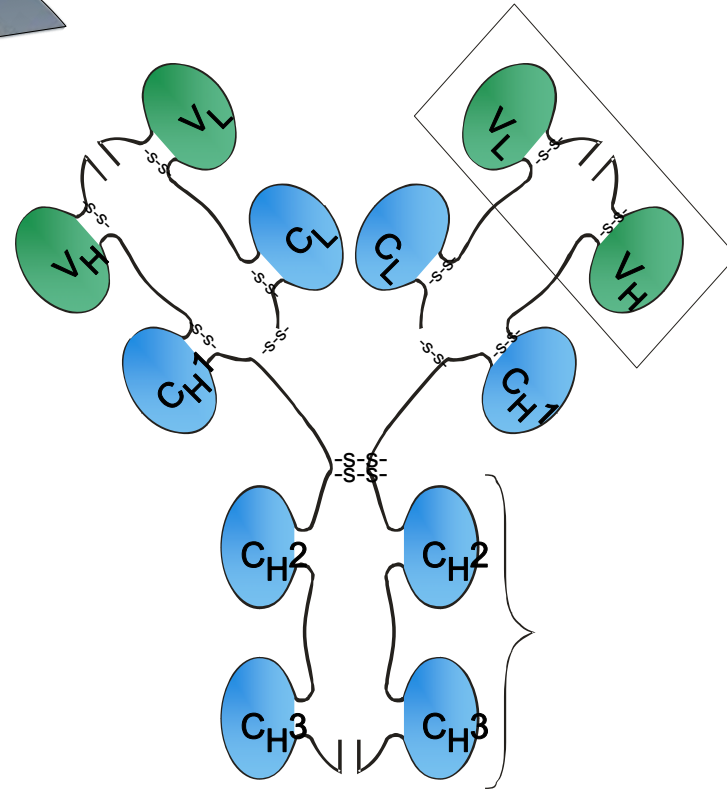
Theranostics = therapy + diagnostics



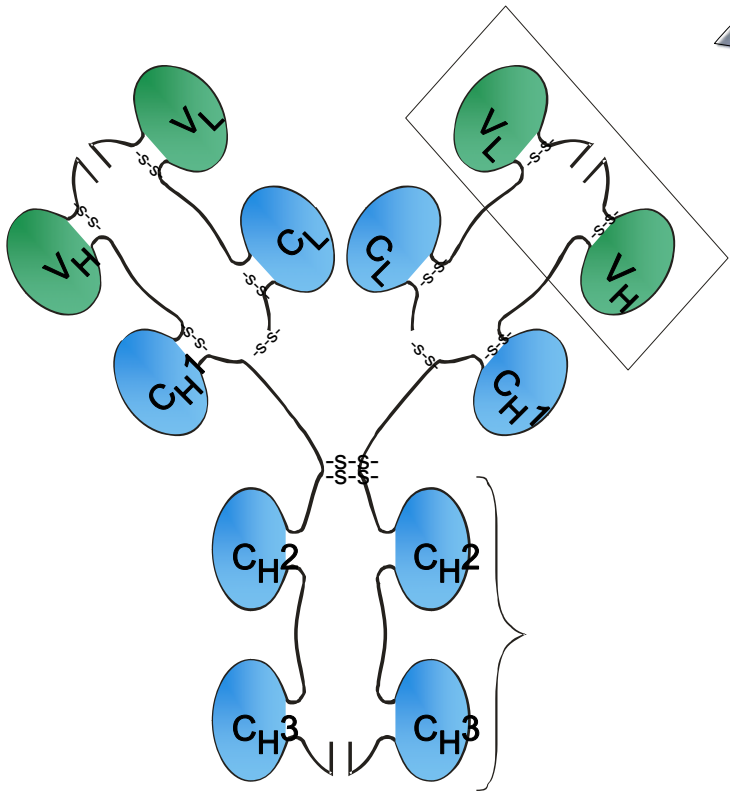
HER2/neu



Monoclonal antibody



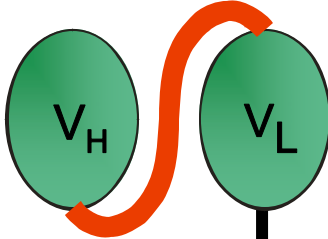
- breast cancer
- ovarian cancer
- stomach cancer
- lung cancer
- etc.



-S-S--S-S-

-S-S--S-S-

Miniantibody, scFv



barnase

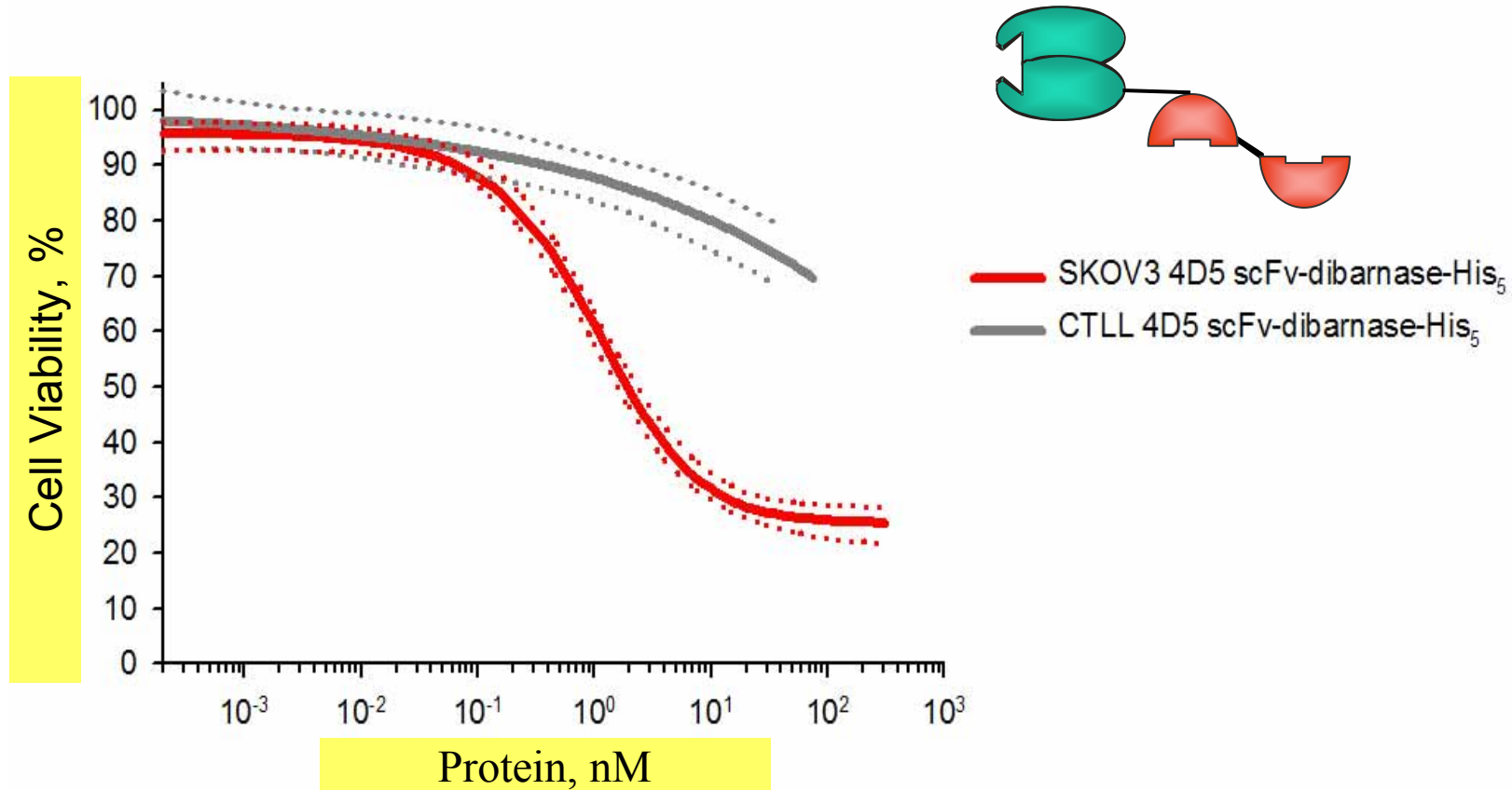


barnase



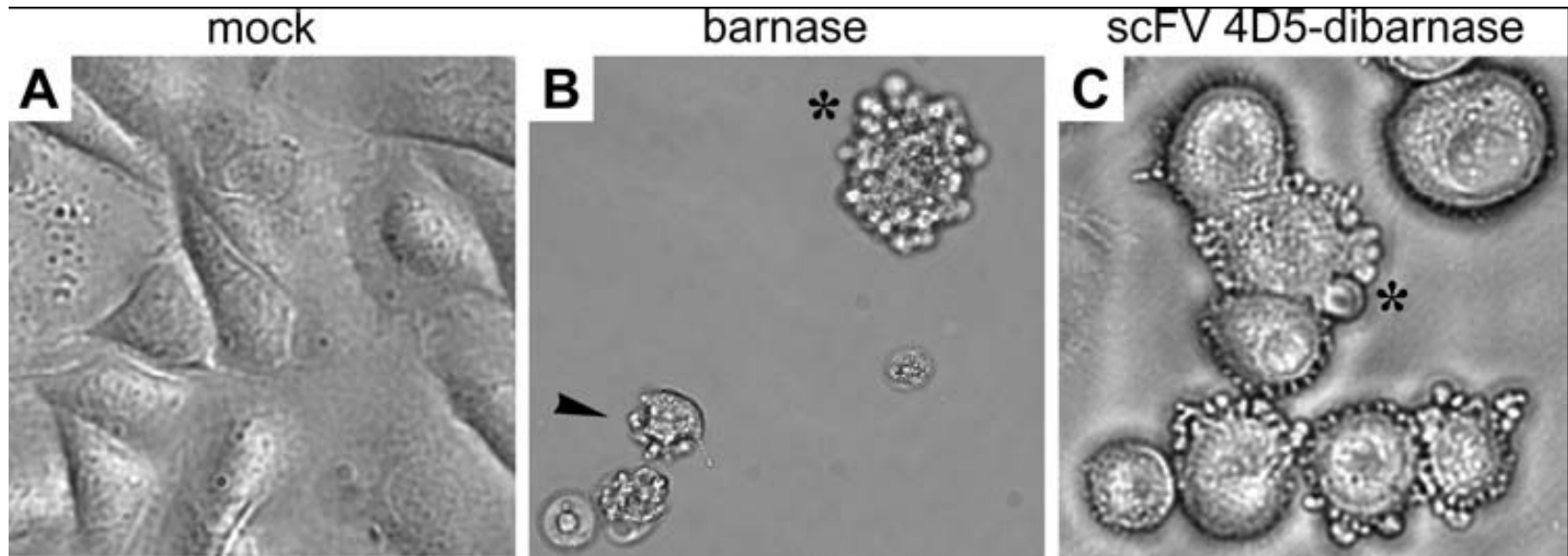
ImmunoRNase

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

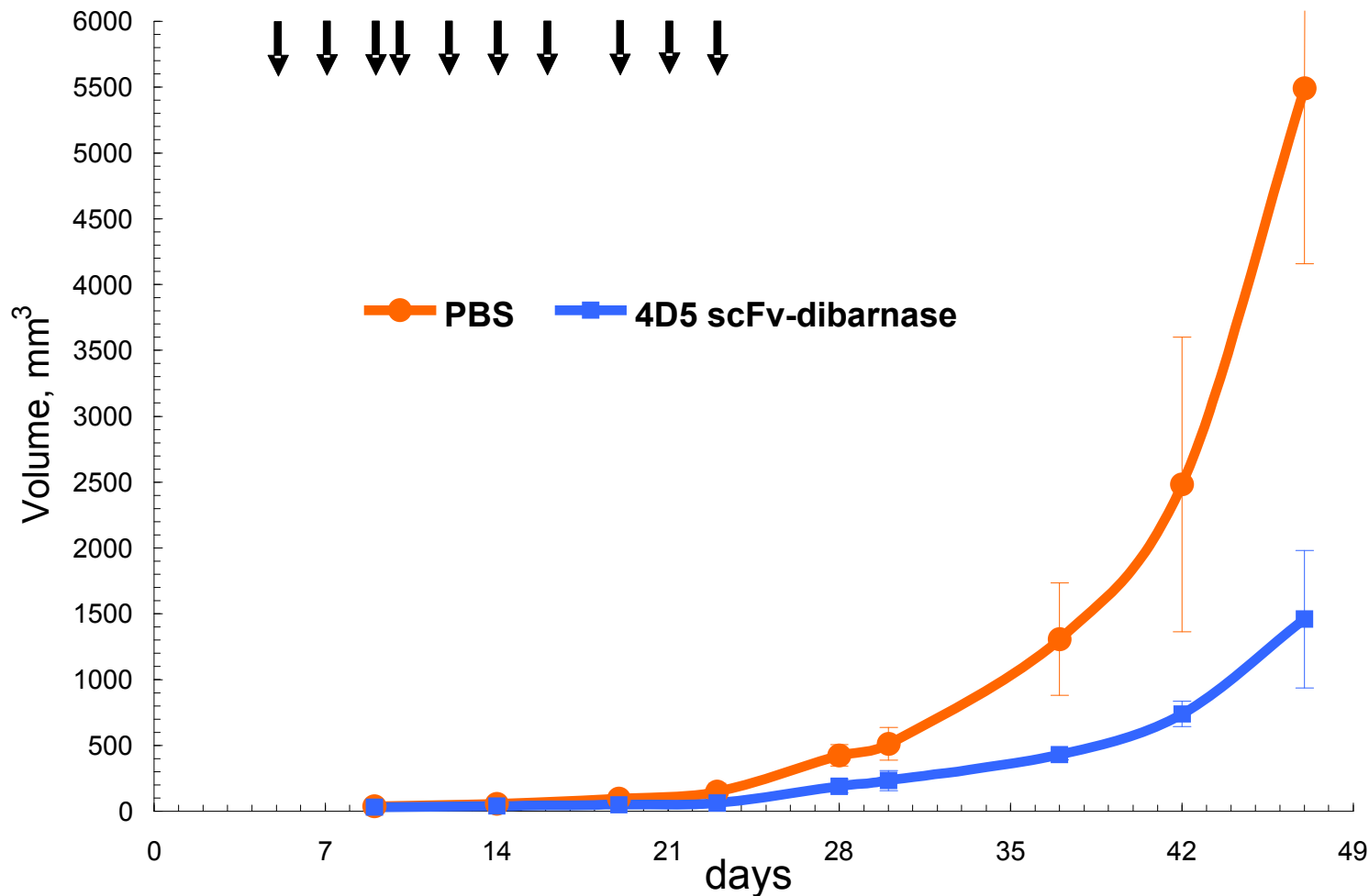


Concentration dependent cytotoxicity of immunoRNase for HER2/neu-positive (red) and HER2/neu-negative (grey) cells. 20 independent experiments.

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%

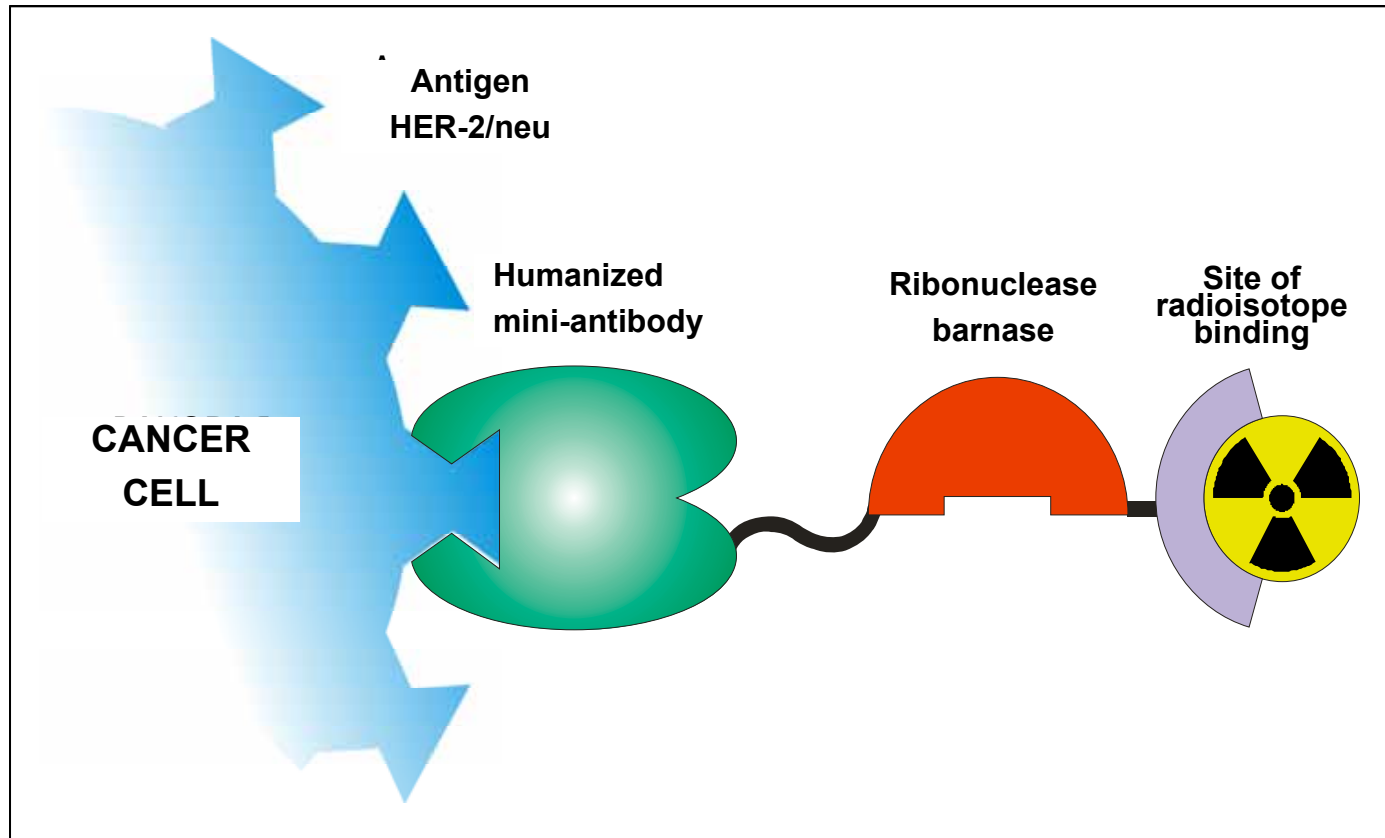


23 сутки, контрольная группа, опухоль 245 мм³.
В пересчете на вес тела человека (70кг)
такая опухоль весит **954 г**

Средний размер опухоли в контрольной группе мышей на 23 сутки составил 149 мм³ (А), максимальный размер - 245 мм³ у мыши весом 18 г (В). В опытной группе мышей средний размер опухоли 23 сутки составил 61,6 мм³(Б) максимальный размер-77 мм³ 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



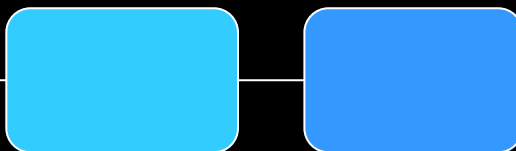
Producent 1



+



Producent 2



Димеризационный модуль барназа-барстар

Barnase

*

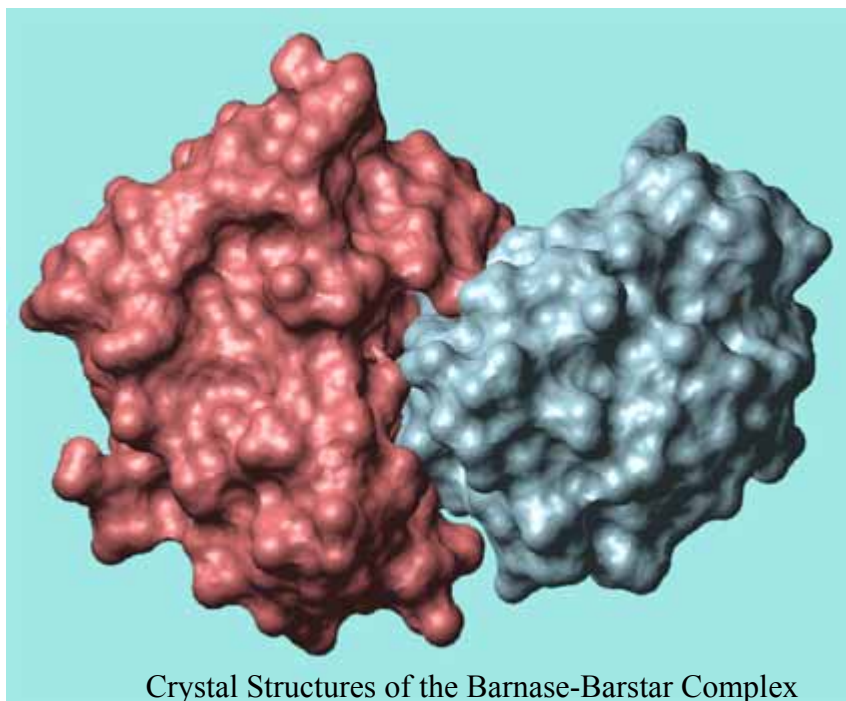
Barstar



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

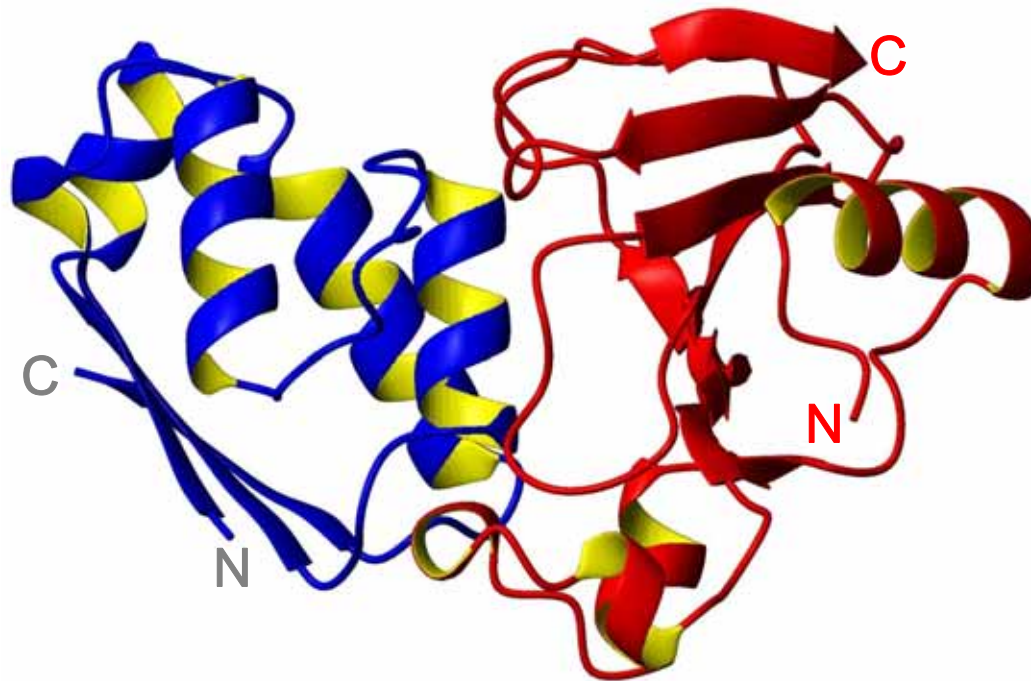
RNAse
Extracellular
110 residues
12 kDa
Cys free
H102,R83/87

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



Crystal Structures of the Barnase-Barstar Complex

Димеризационный модуль барназа-барстар



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

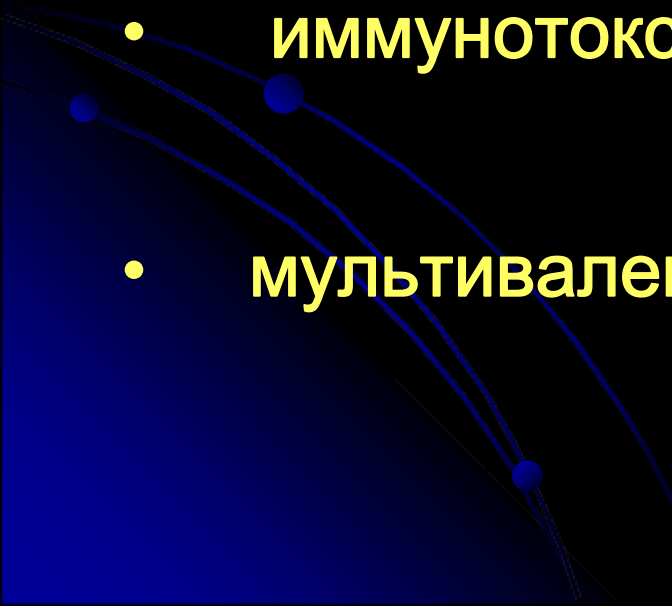
EFPKPSTPPGSSGGAP

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

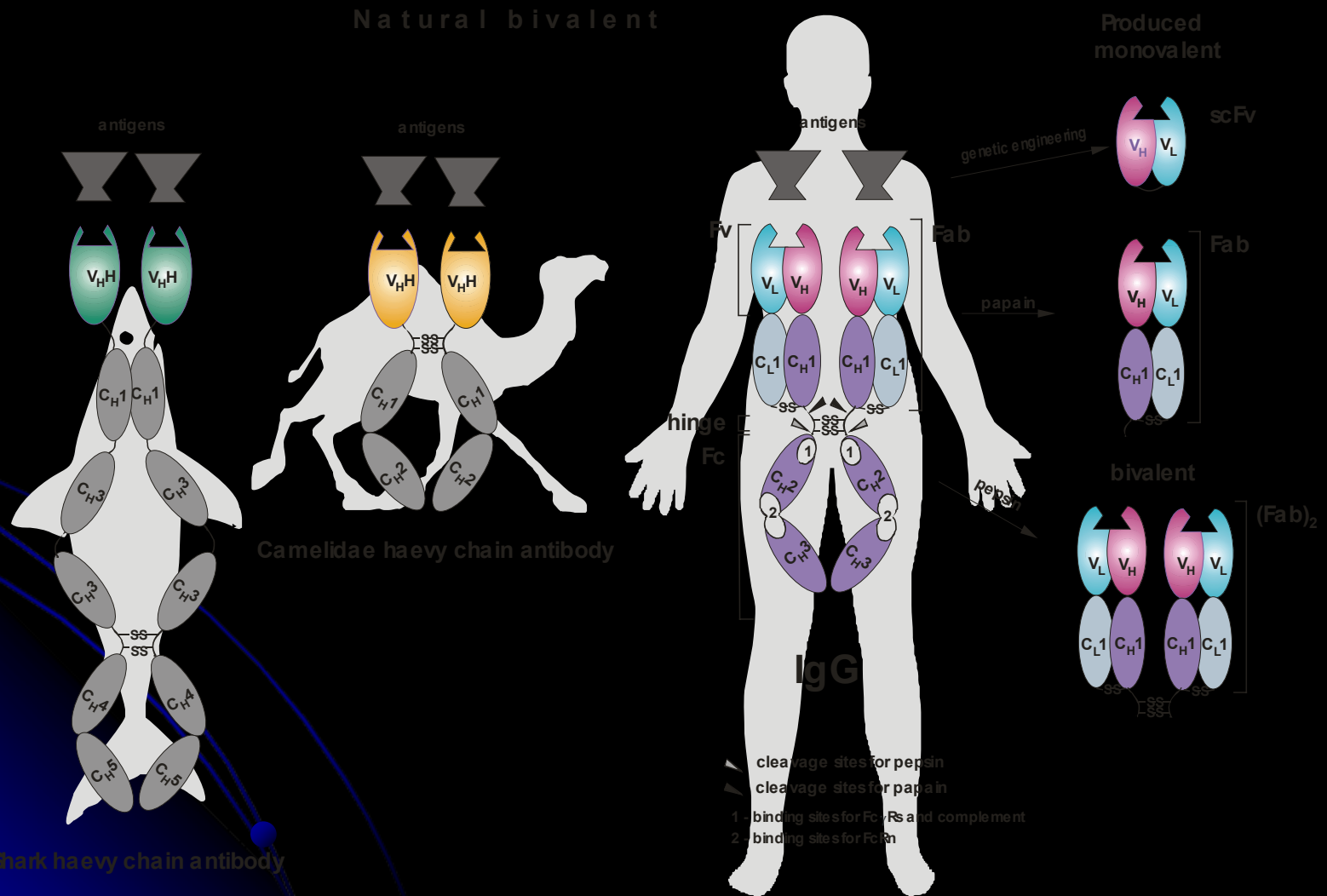
I. Конструирование
мультивалентных **моноспецифических** мини-антител

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



antigens

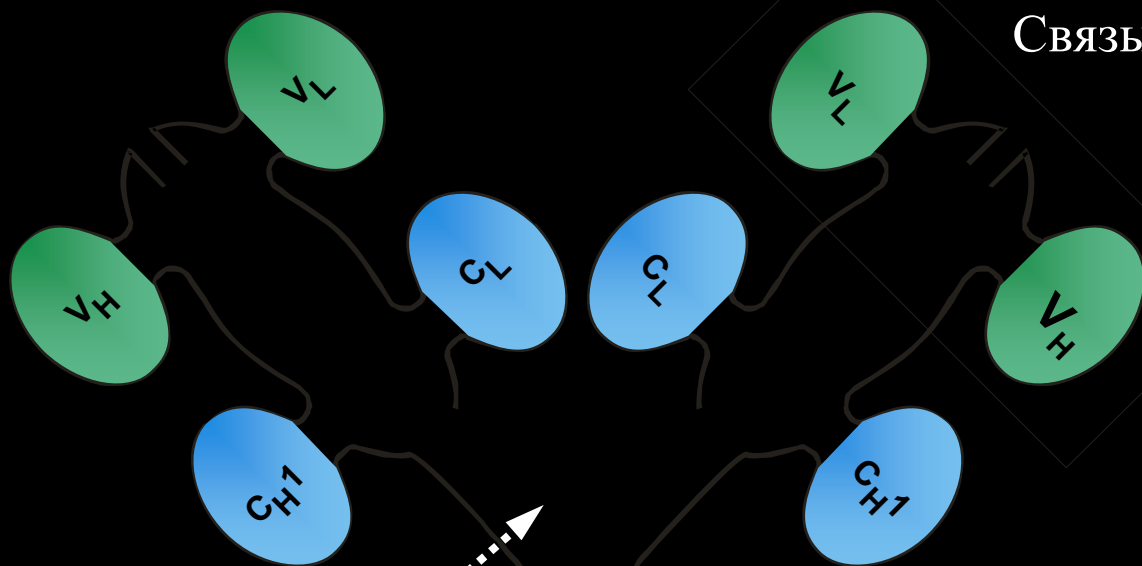
Мультивалентность - – характерное свойство природных антител



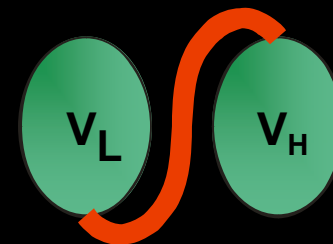
Инженерия антител

Полноразмерное моноклональное
мышинное антитело

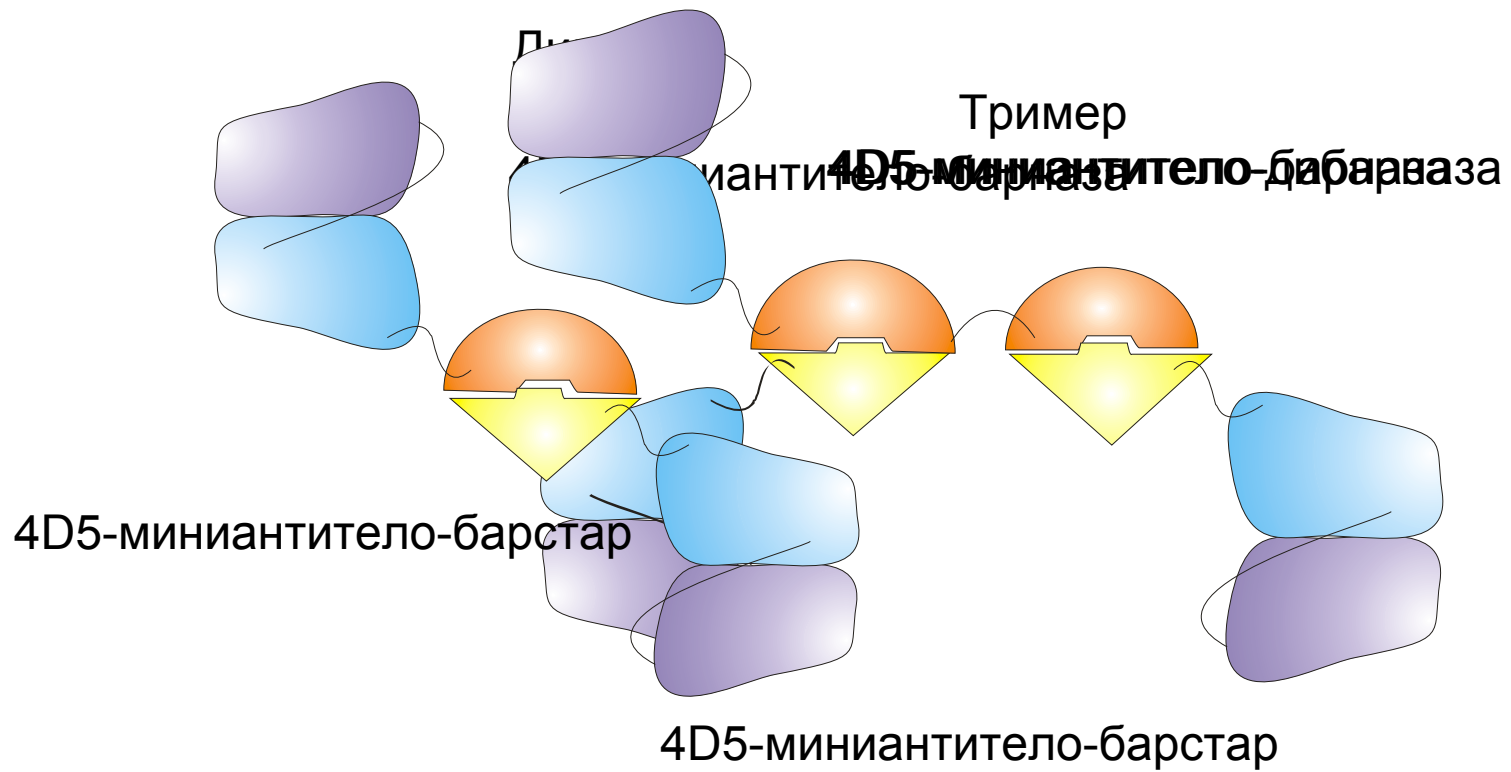
Связывание с антигеном



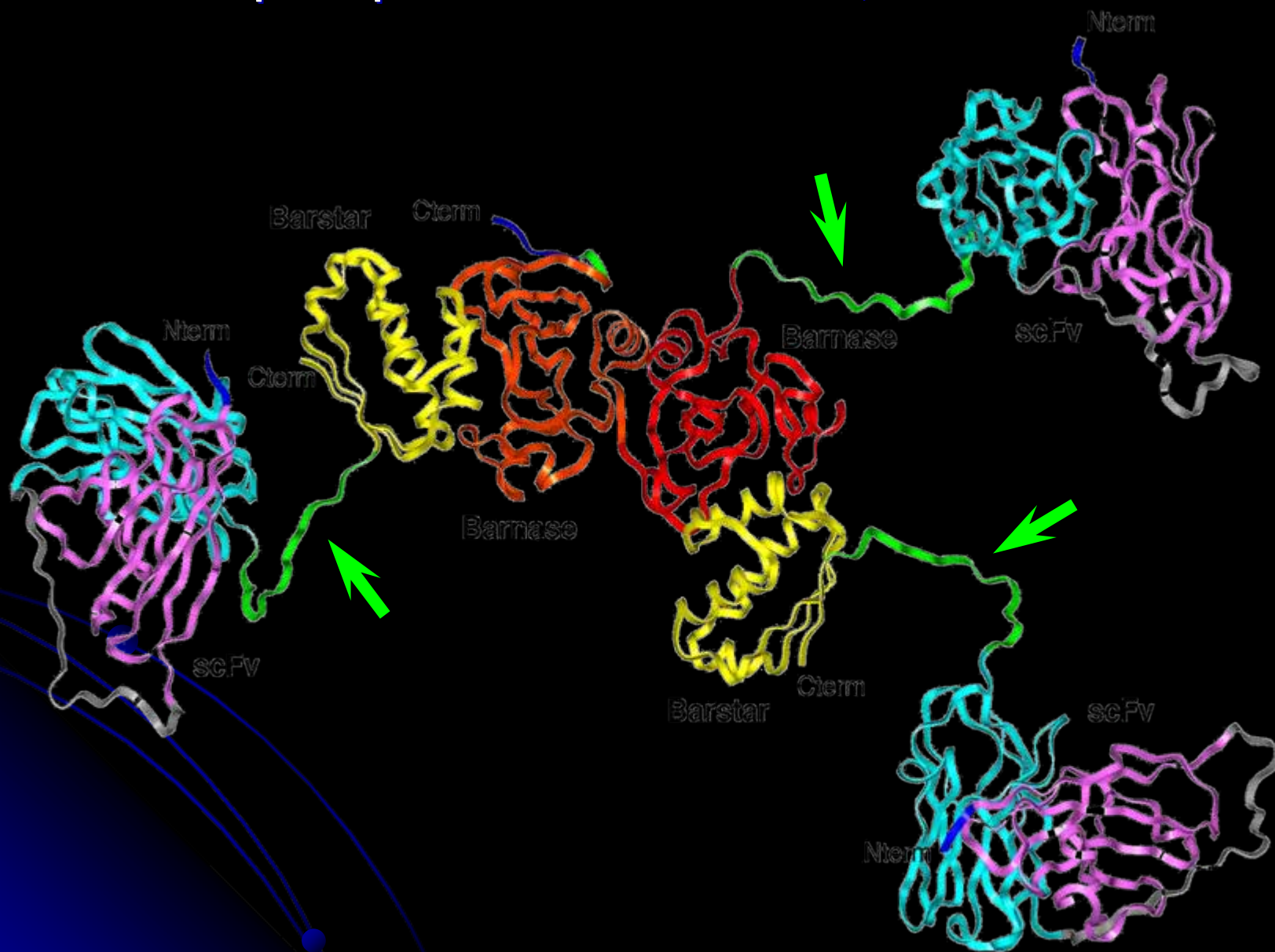
Эффекторные
функции



Рекомбинантное
мини-антитело

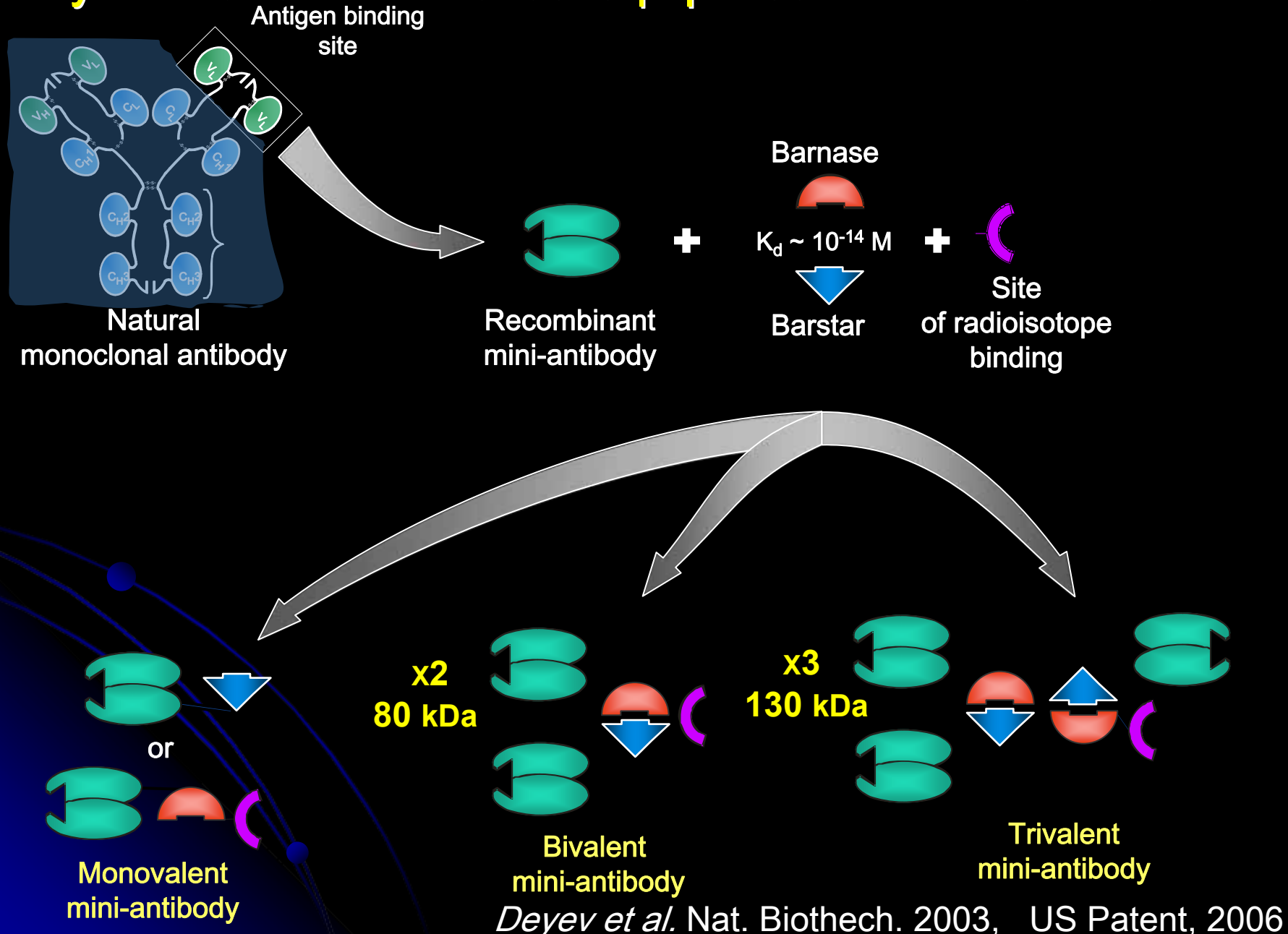


Тримерные мини-антитела, 132 kDa



Конструирование

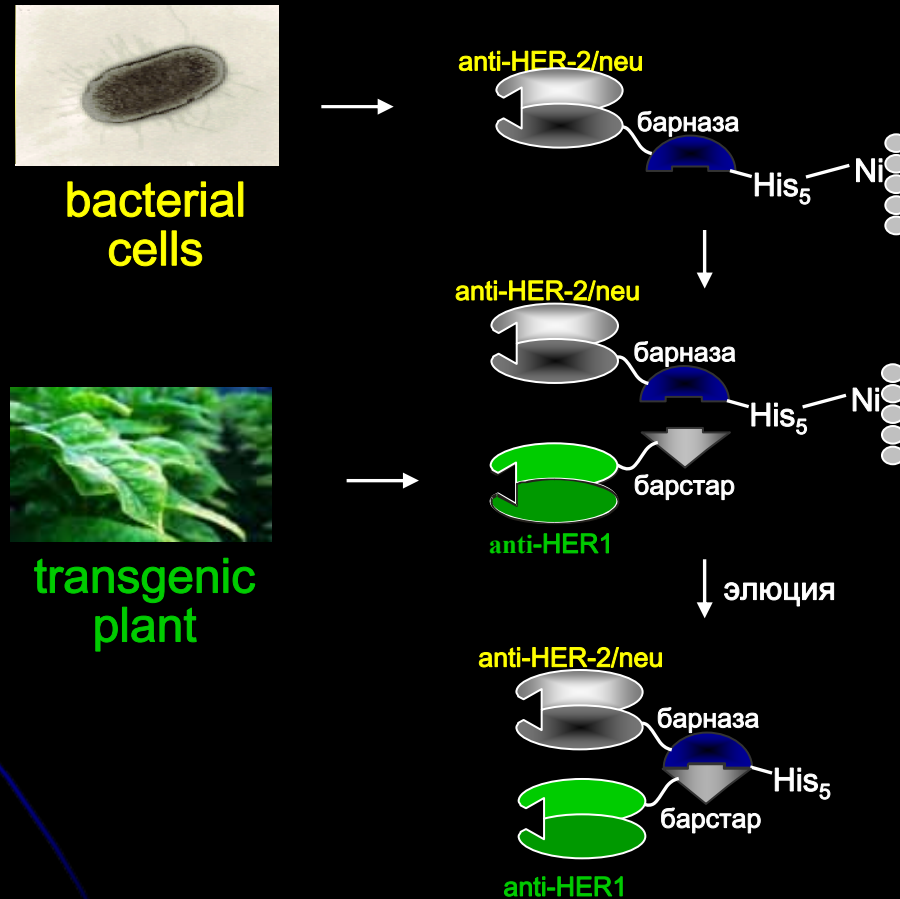
мультивалентных моноспецифических мини-антител



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.

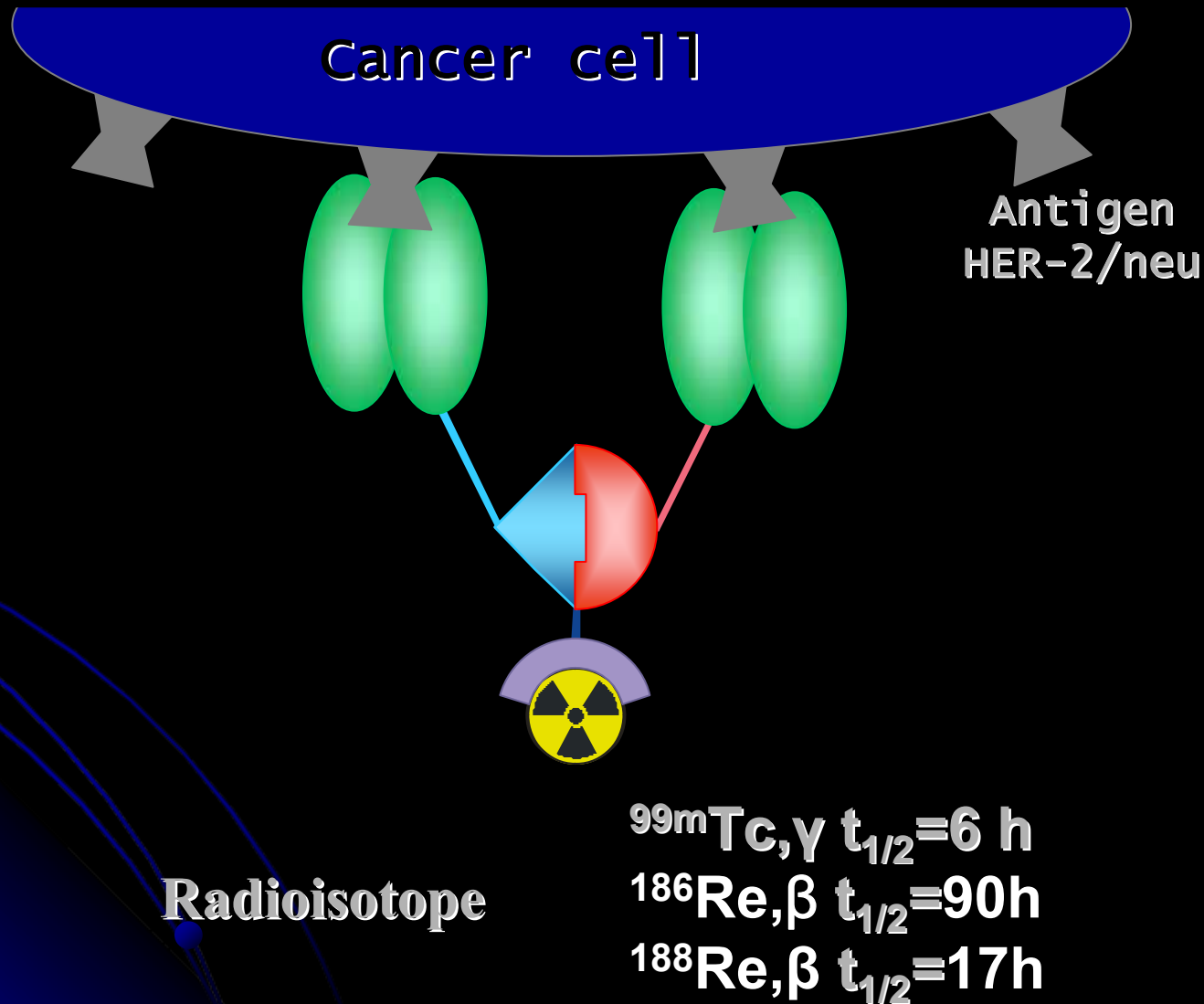


ИГХ анализ HER2/neu на срезах парафиновых блоков опухолевого материала, полученного при хирургических операциях больных раком молочной железы .

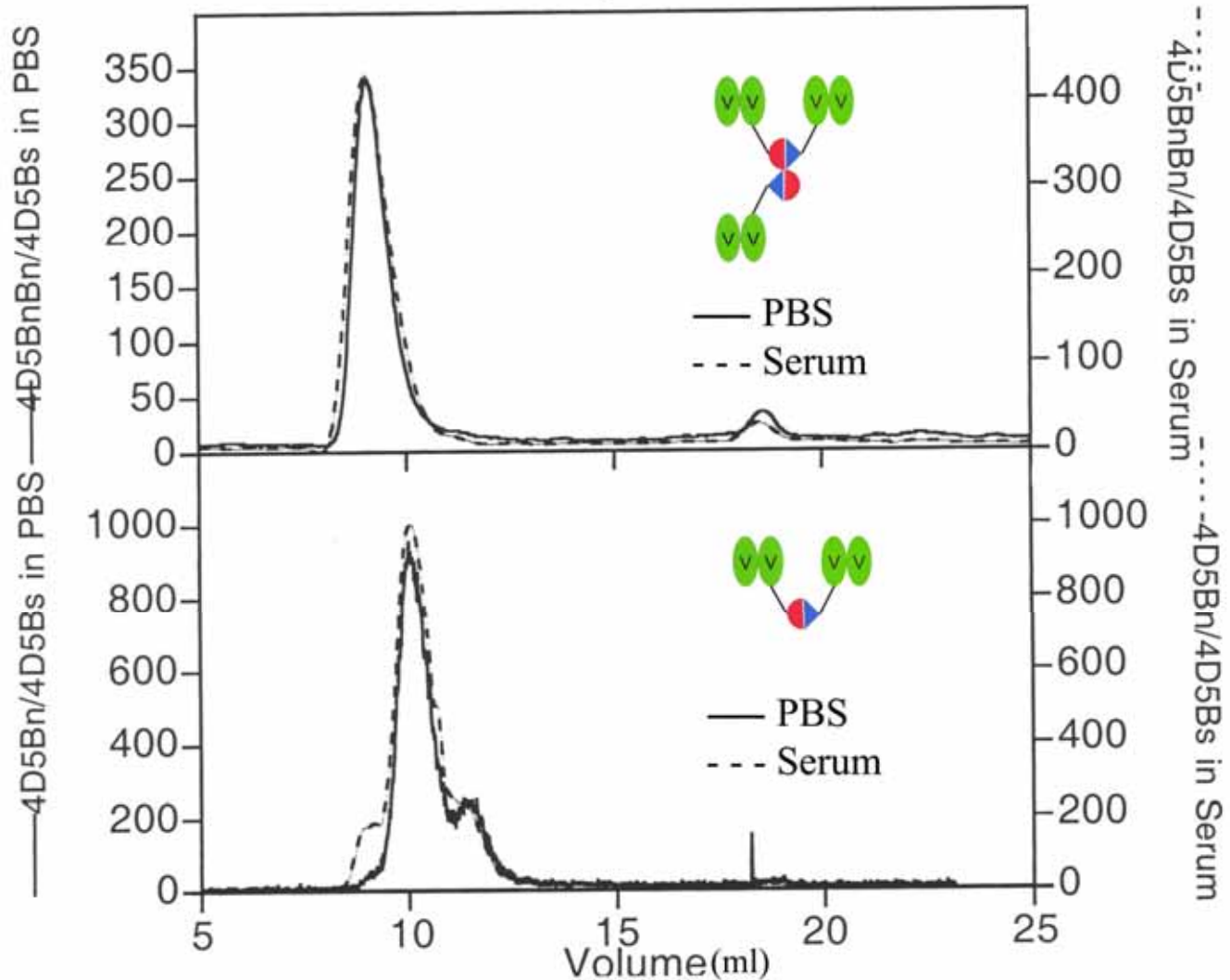


Пациент №3.
p185HER2/neu
статус 3+
А- опухолевые
клетки,
Б – клетки
соединительной
ткани
(фибробласты);
В – клетки
жировой ткани
(липоциты)
Ядра клеток
окрашены
гематоксилином

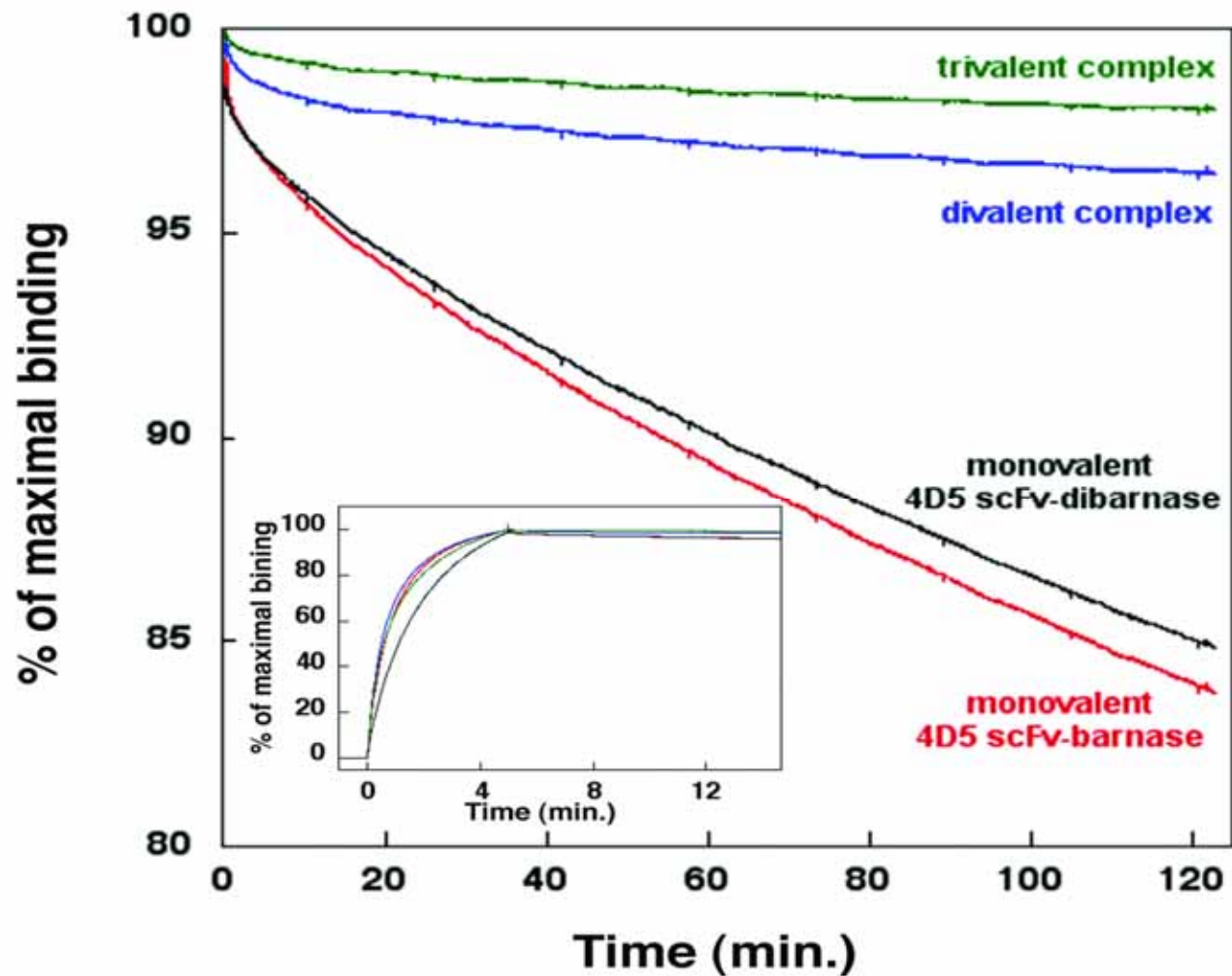
Направленная доставка радиоизотопов к опухолевым тканям



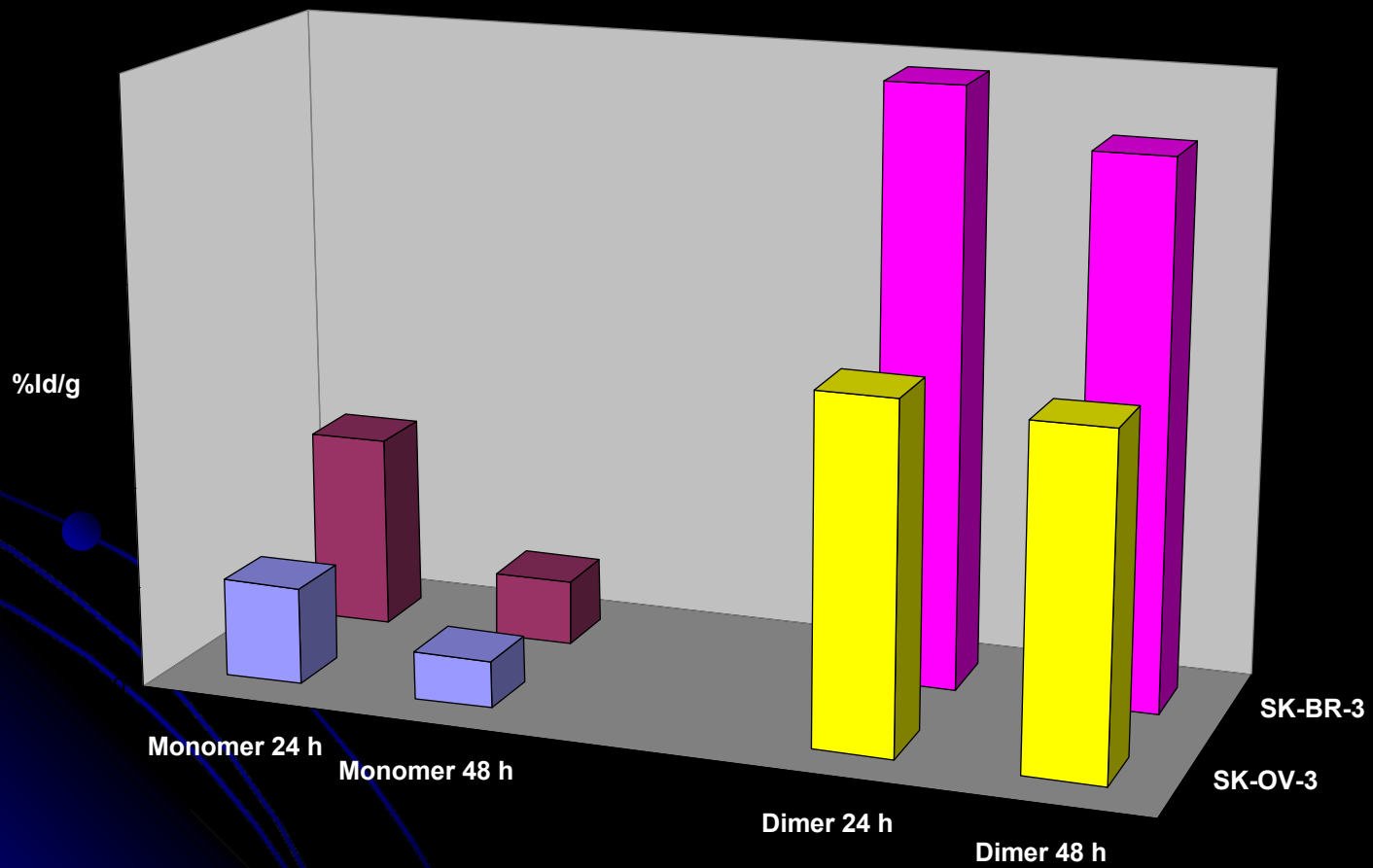
Serum stability, 24h at 37°C



Мультивалентность мини-антител увеличивает их связывающую активность (BIAcore)

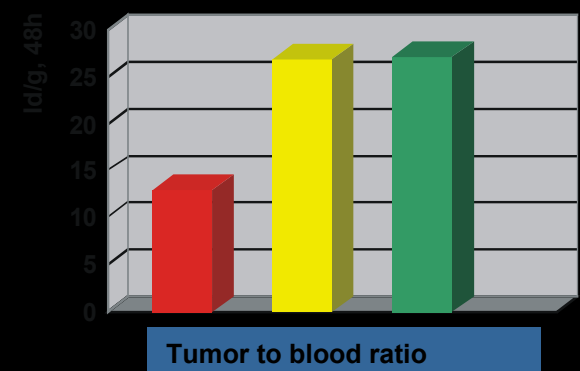
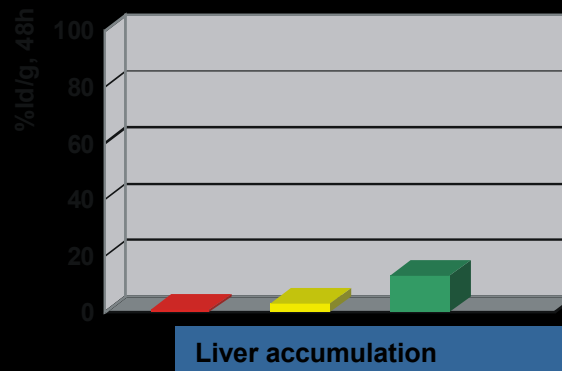
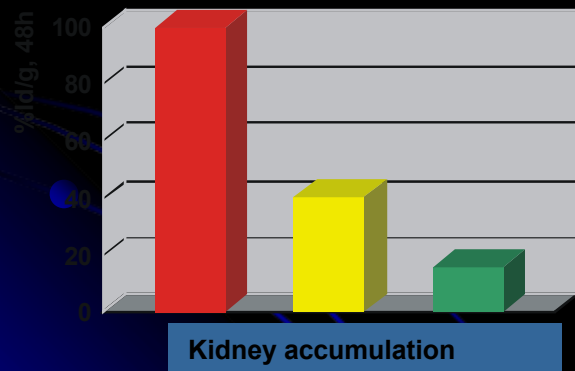


Накопление радиоизотопа в опухоли, %Id/g



Преимущества мультивалентных мини-антител

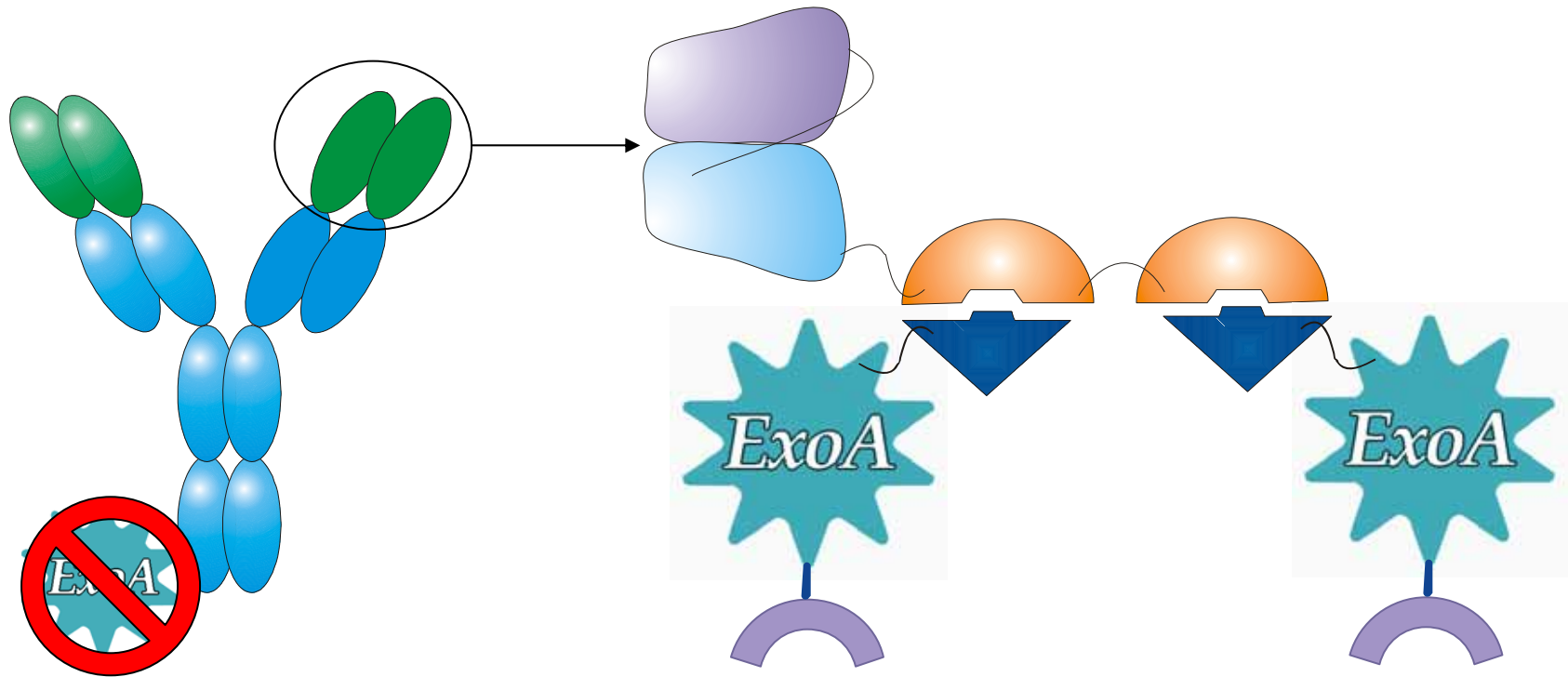
- Оптимальная молекулярная масса
- Соотношение опухоль/кровь = 27 : 1 (природные антитела – 2.5 : 1)
- Оптимальное время циркуляции в крови
- Невысокое накопление в печени и почках

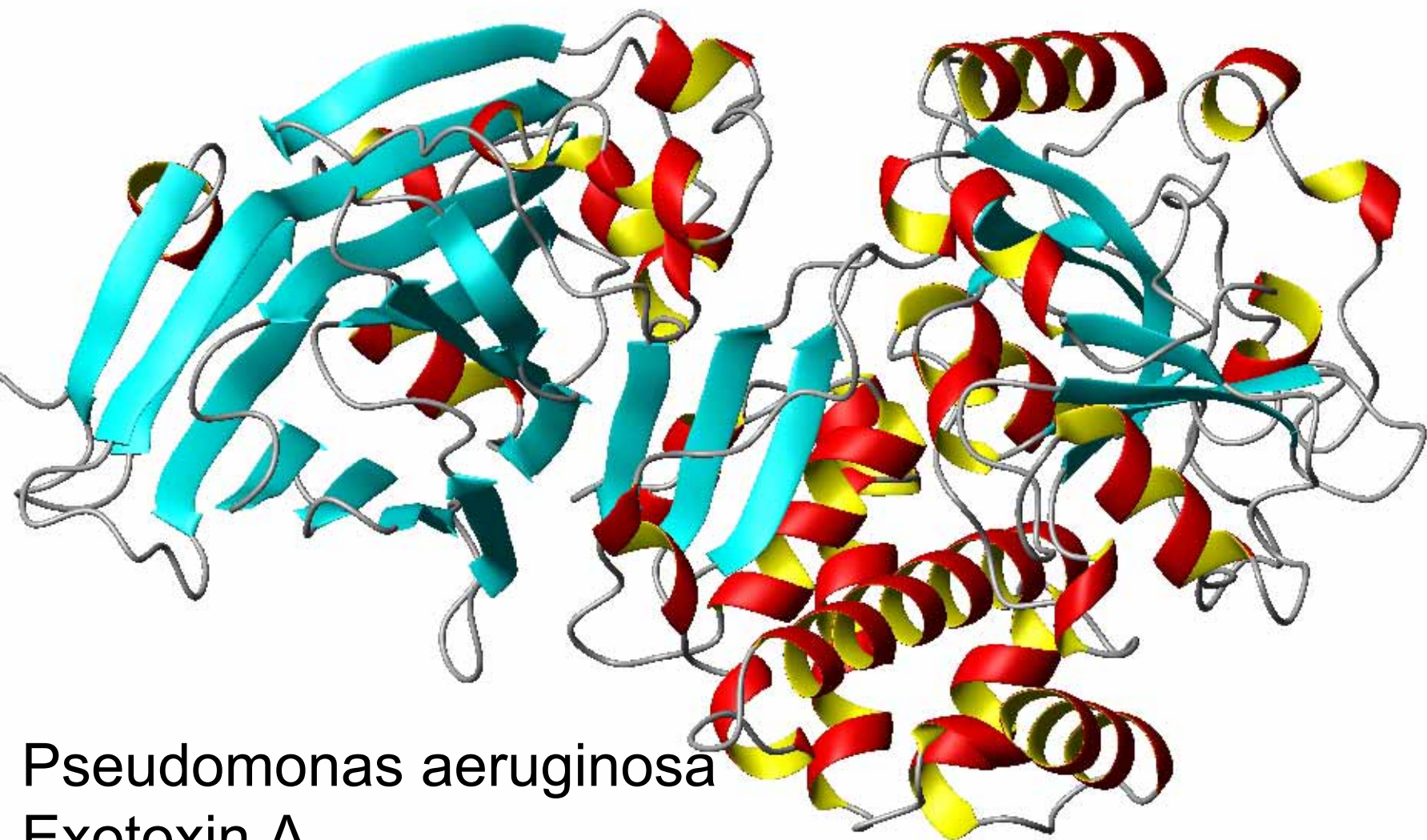


Monomer

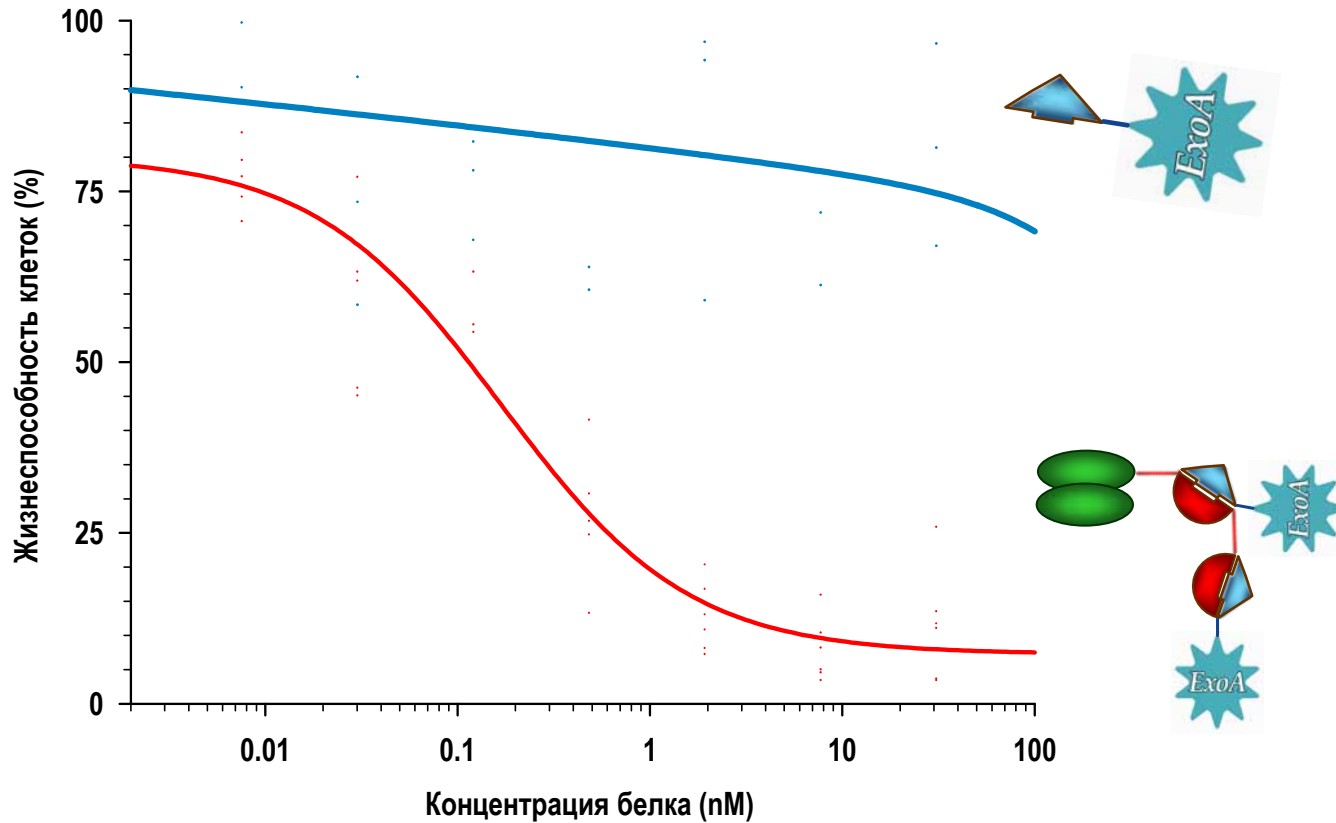
Dimer

Trimer



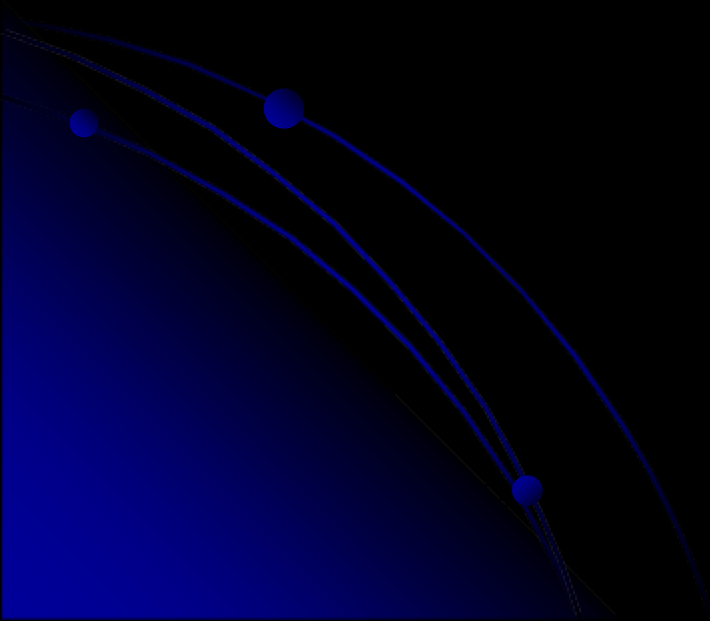


Подавление роста раковых клеток SKOV-3 надмолекулярным комплексом «анти-HER2/neu scFv-дибарназа/барстар-экзотоксин А»



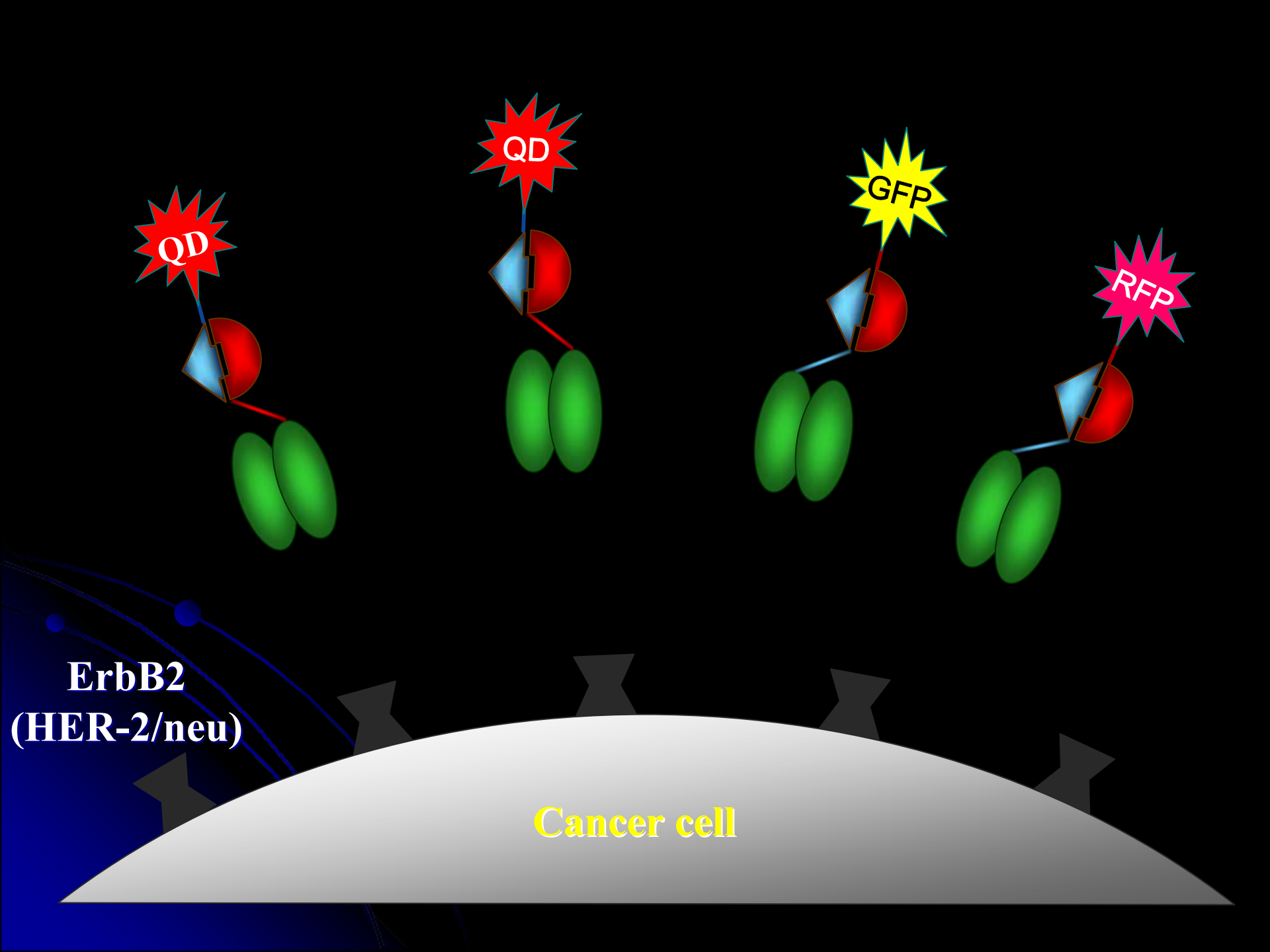
- 4D5 scFv-дибарназа * барстар-экзотоксин А
- барстар-экзотоксин А

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)

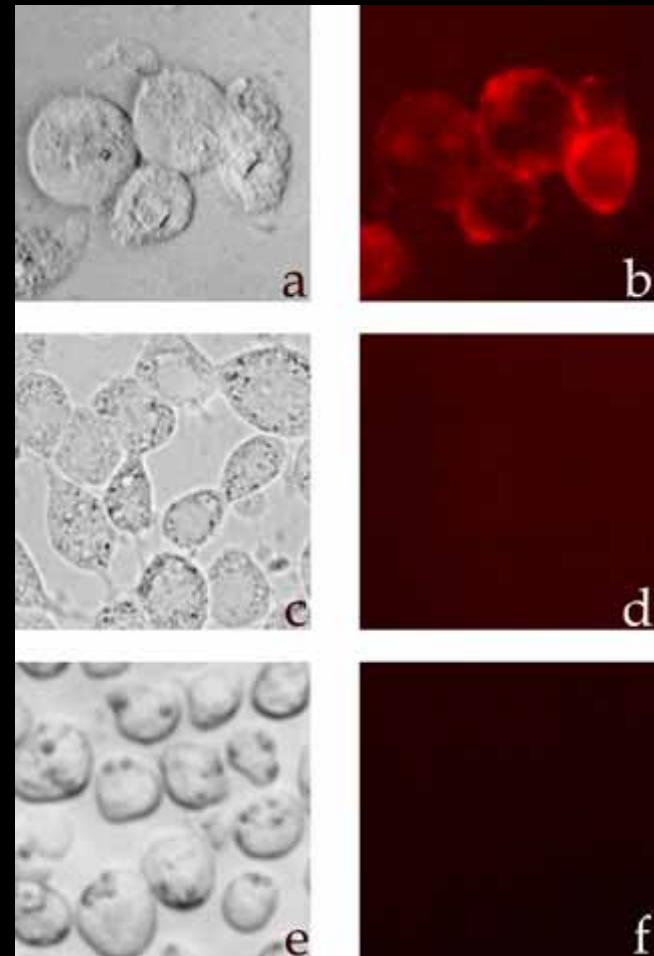
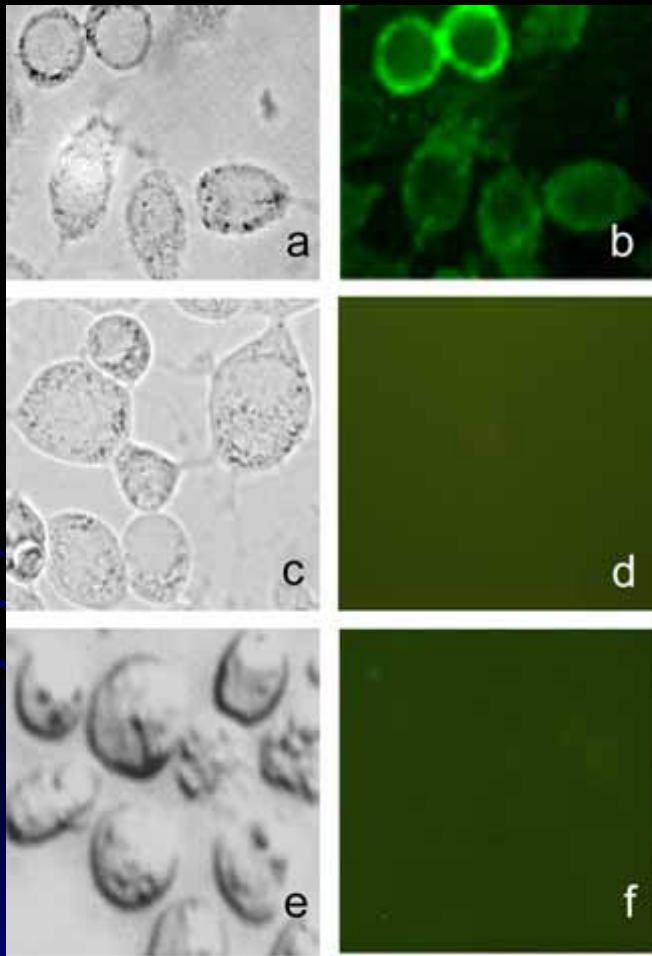
Cancer cell

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

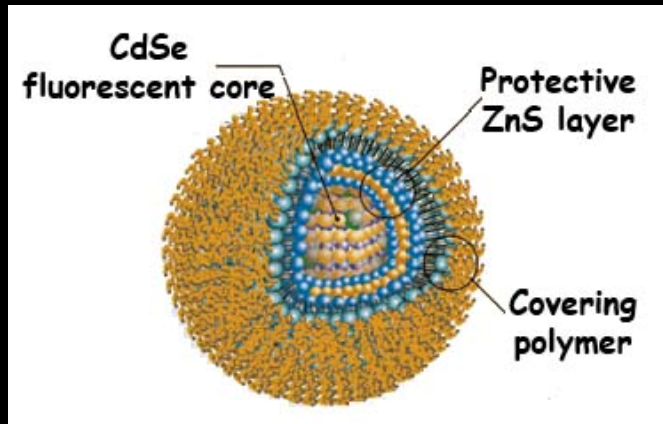
барстар-GFP

или

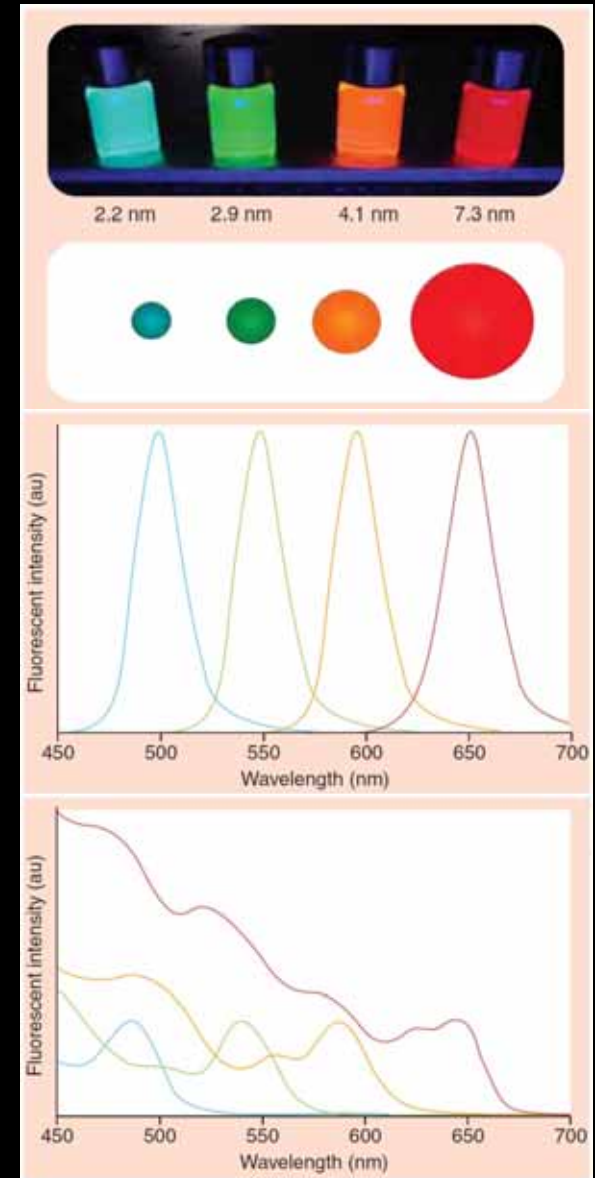
барстар-RFP



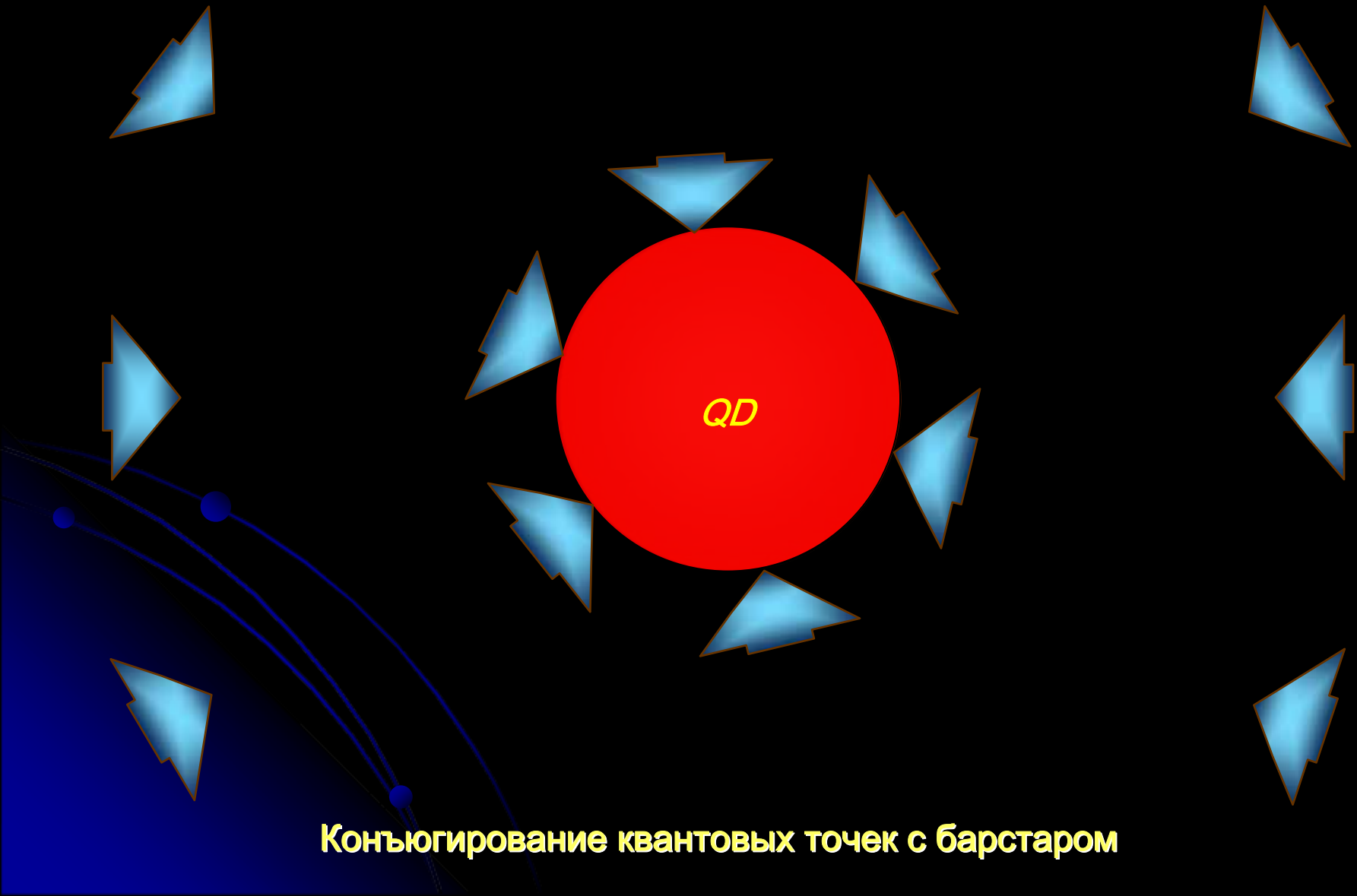
Quantum dots (QDs)



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

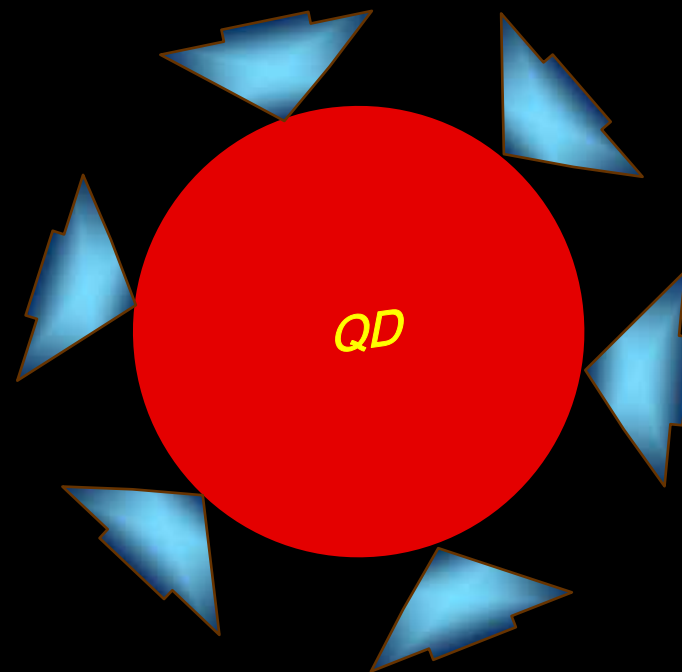
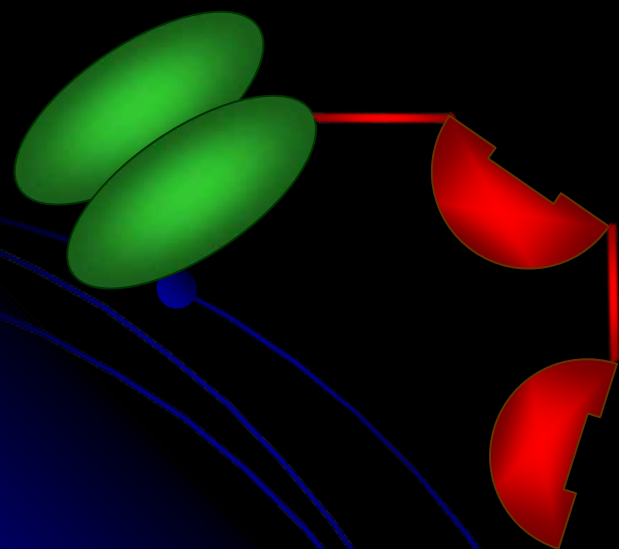


II.1. Визуализация ракового маркера HER2/neu с помощью флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов («квантовых точек»)



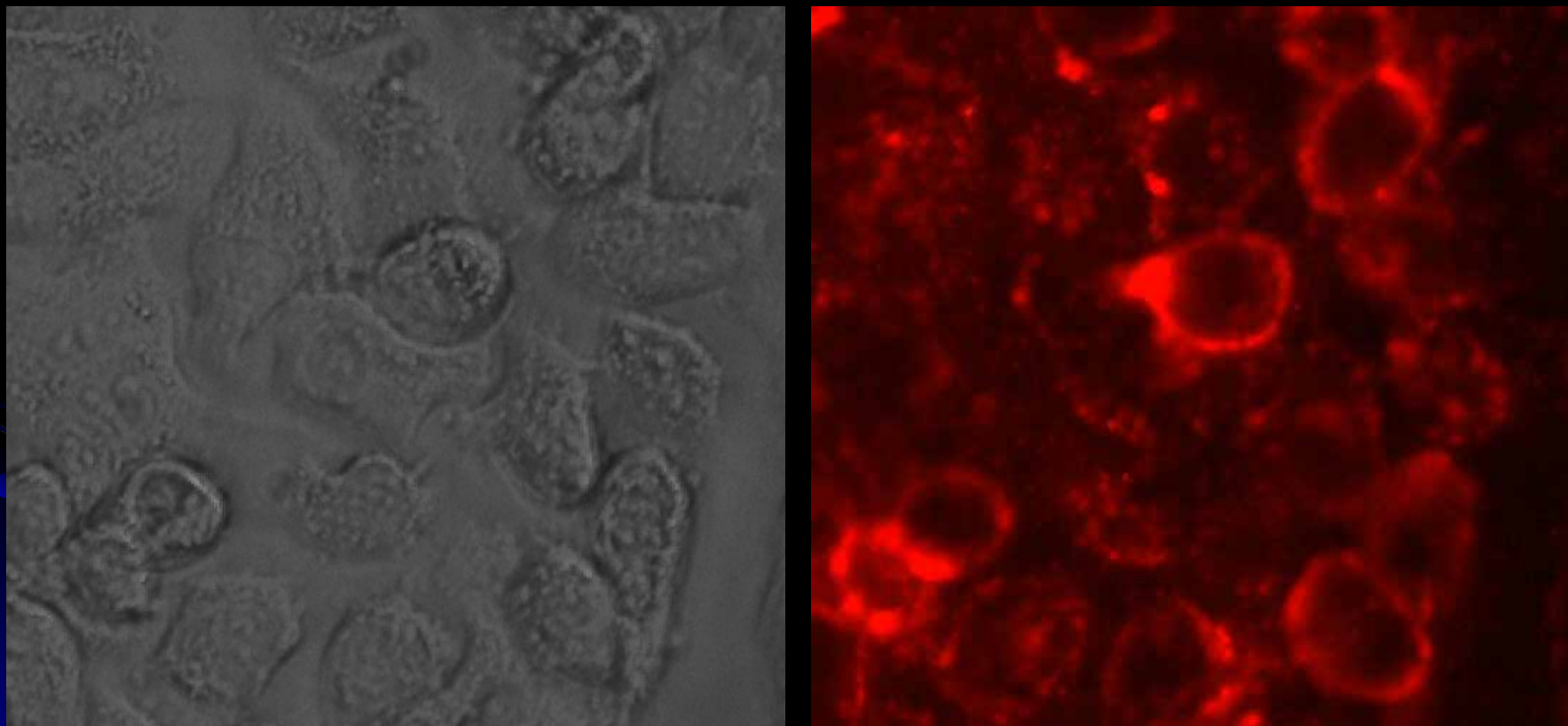
Конъюгирование квантовых точек с барстаром

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



Оснащение квантовых точек антителами с помощью модуля барназа:барстар

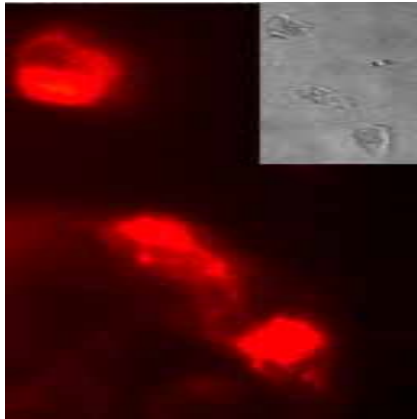
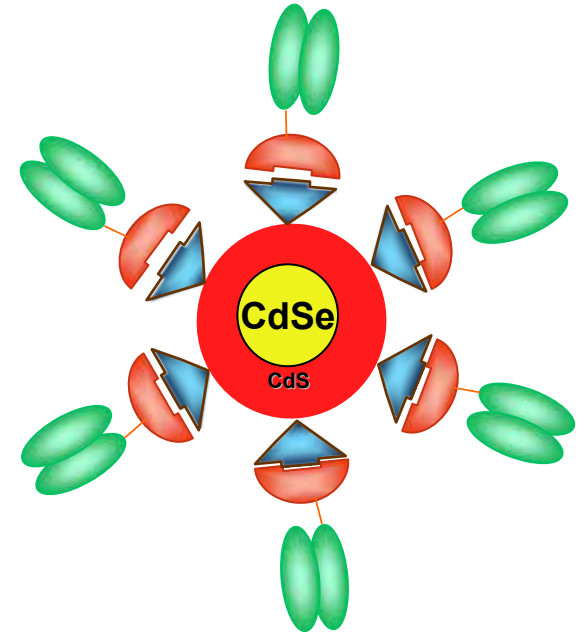
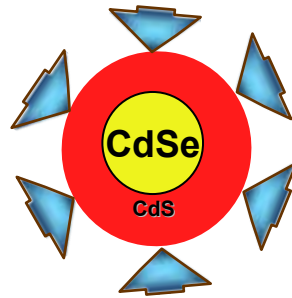
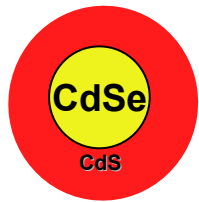
II.1. Визуализация ракового маркера HER2/неи с помощью флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов («квантовых точек»)



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.

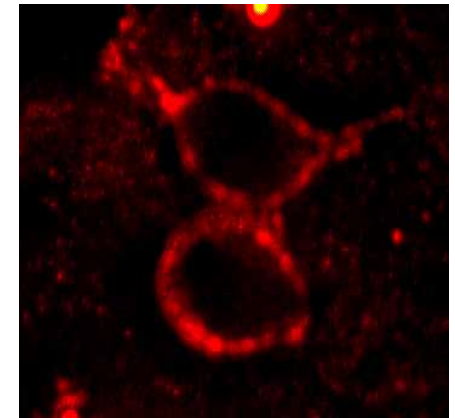
Функциональные свойства наноконструкций зависят от их строения



Неизбирательное
проникновение



Не проникают



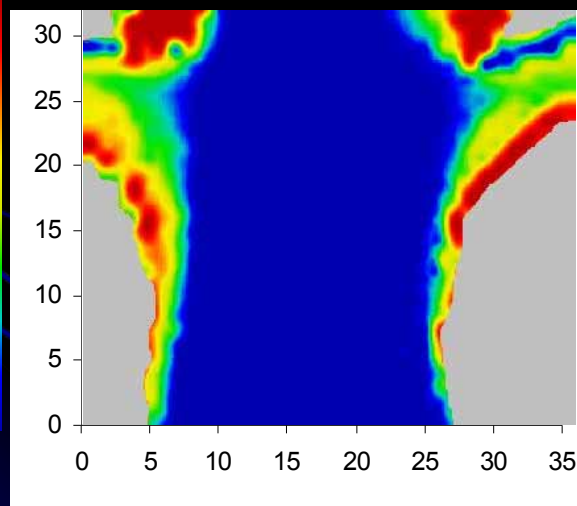
Избирательная доставка
к клеткам-мишеням

II.1. Прижизненное наблюдение опухоли, специфически меченной QDs

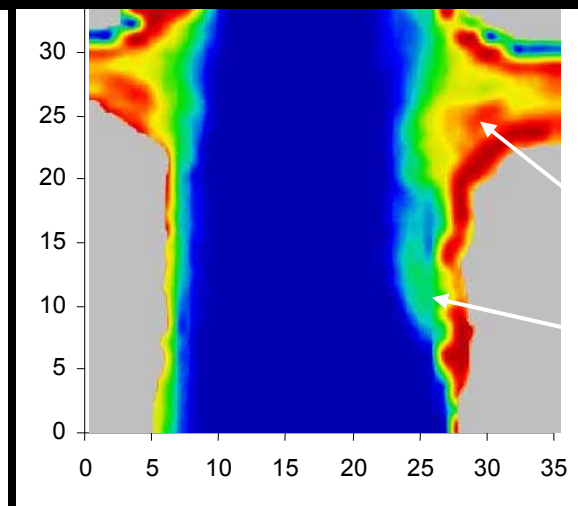
Иммунодефицитные мыши nude с перевитым раком молочной железы человека SKBR-3
Внутривенное введение квантовых точек Qdot 705 ИТК (максимум флуоресценции на 705 нм, Invitrogen Inc. USA),
конъюгированные с anti-HER2/neu мини-антителами 4D5 scFv
посредством белкового модуля барназа-барстар
(около 0.02 нМоль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

Усл. ед.
1500

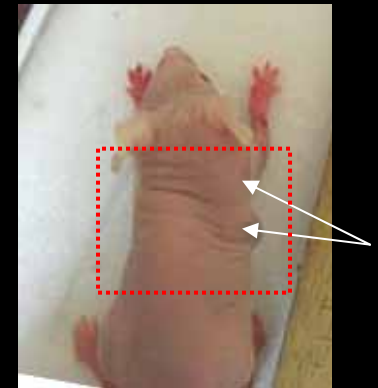
100



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

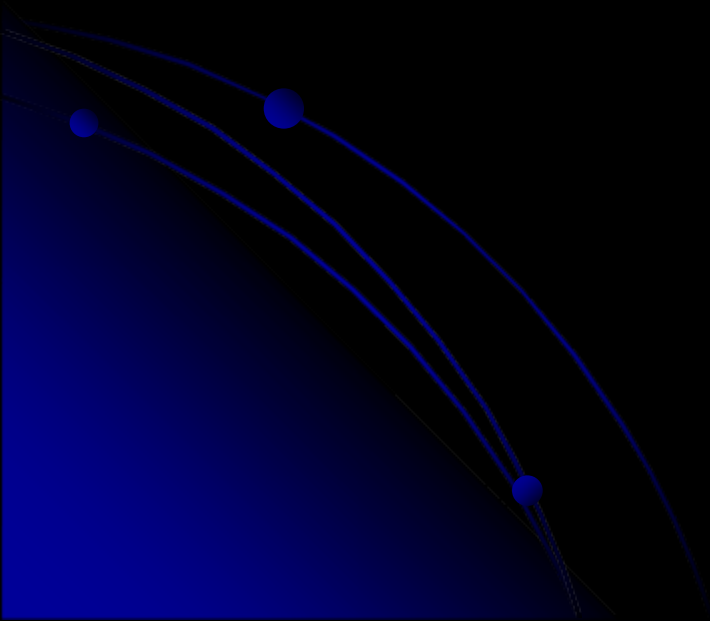
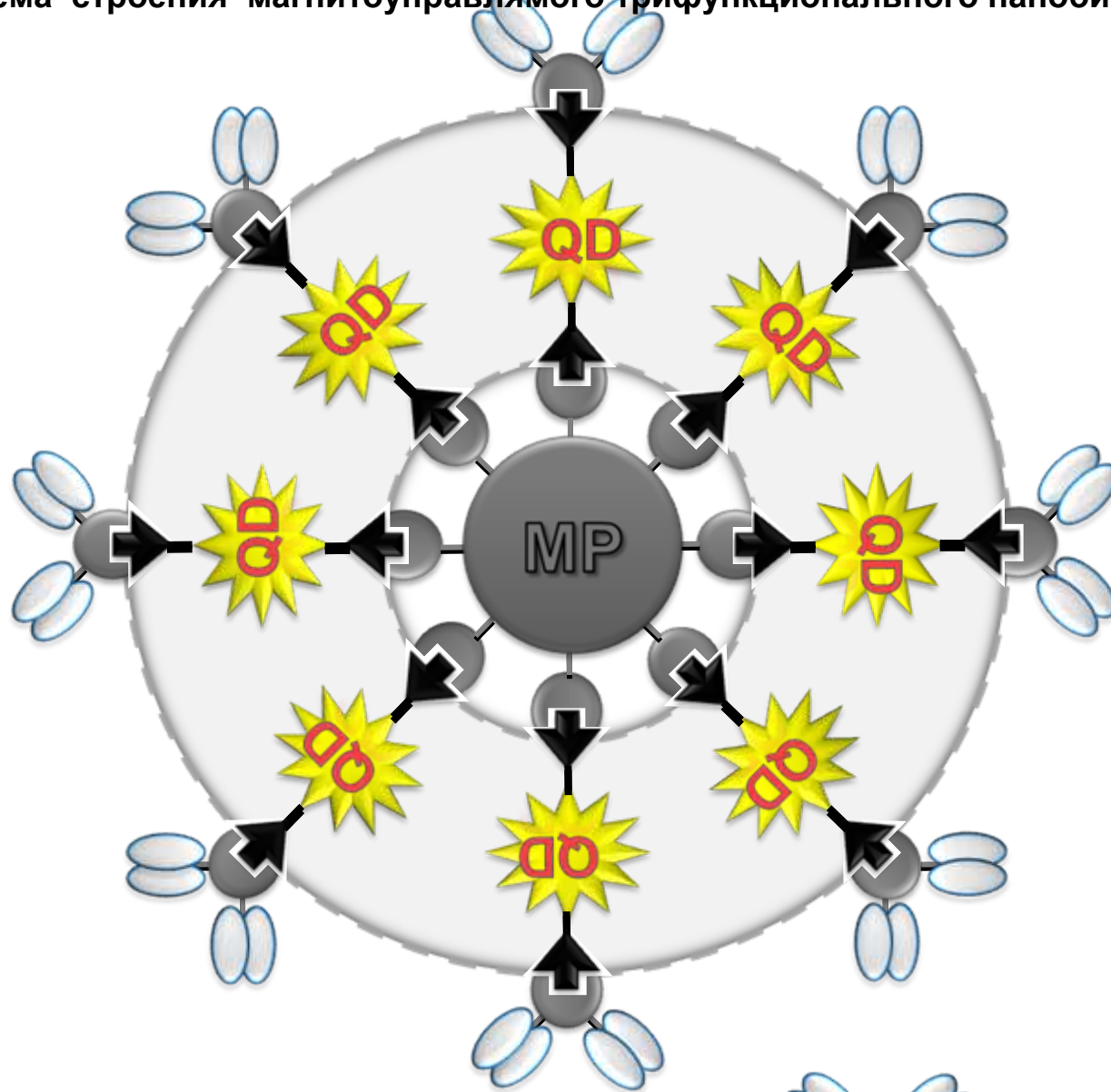
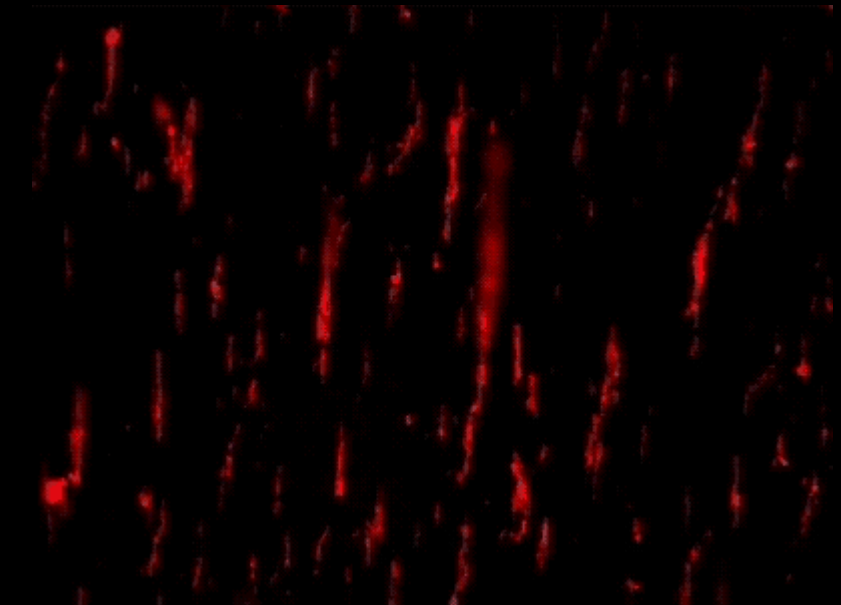


Схема строения магнитоуправляемого трифункционального нанобиоконъюгата

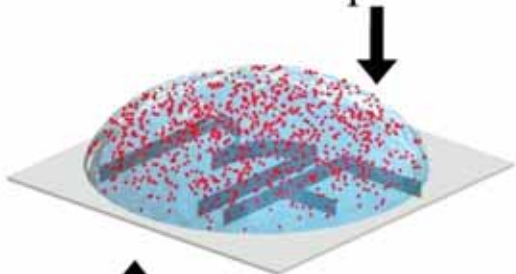


  
Barnase Barstar 4D5scFv-Barnase-4D5scFv

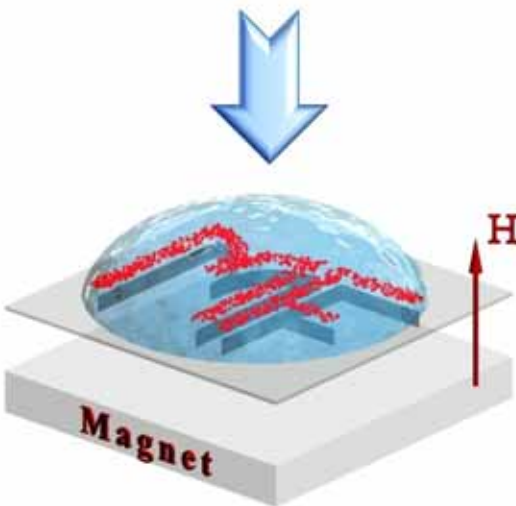


a

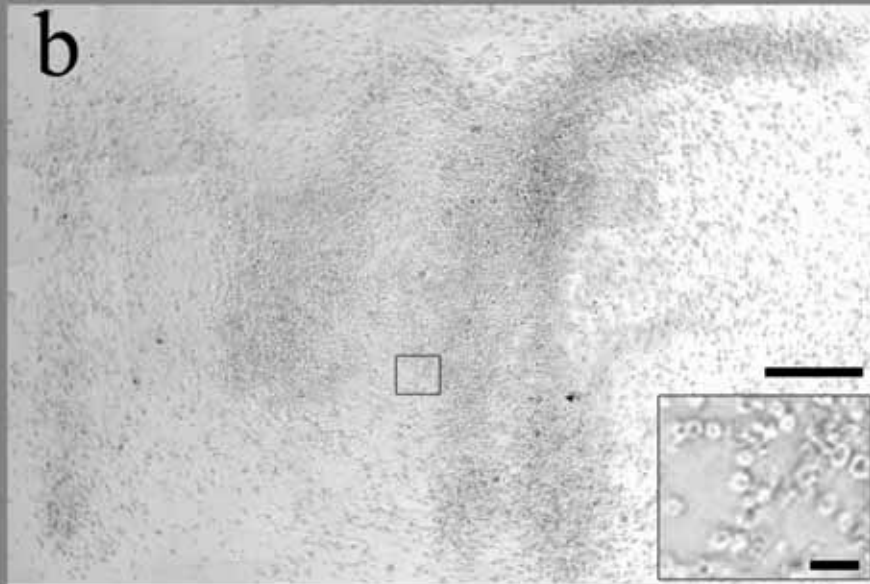
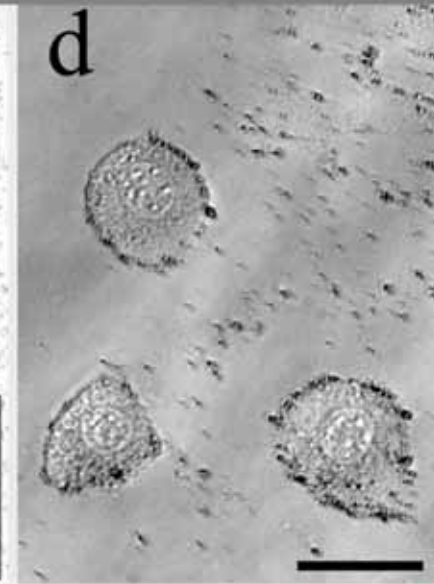
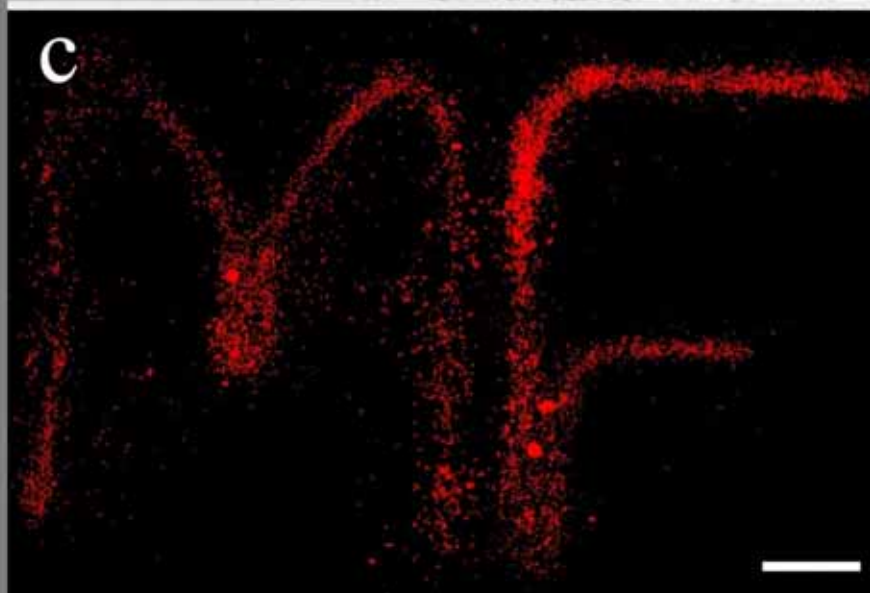
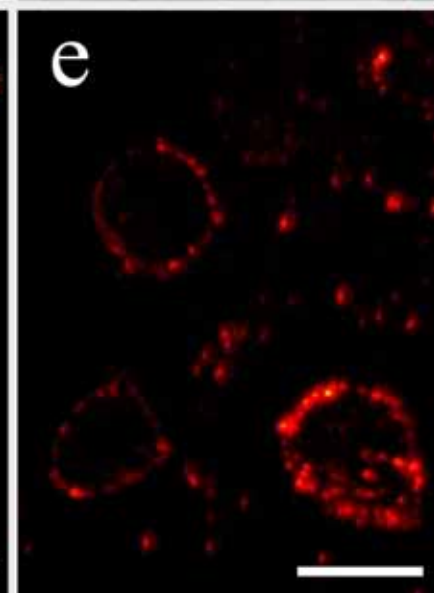
Labelled cell suspension



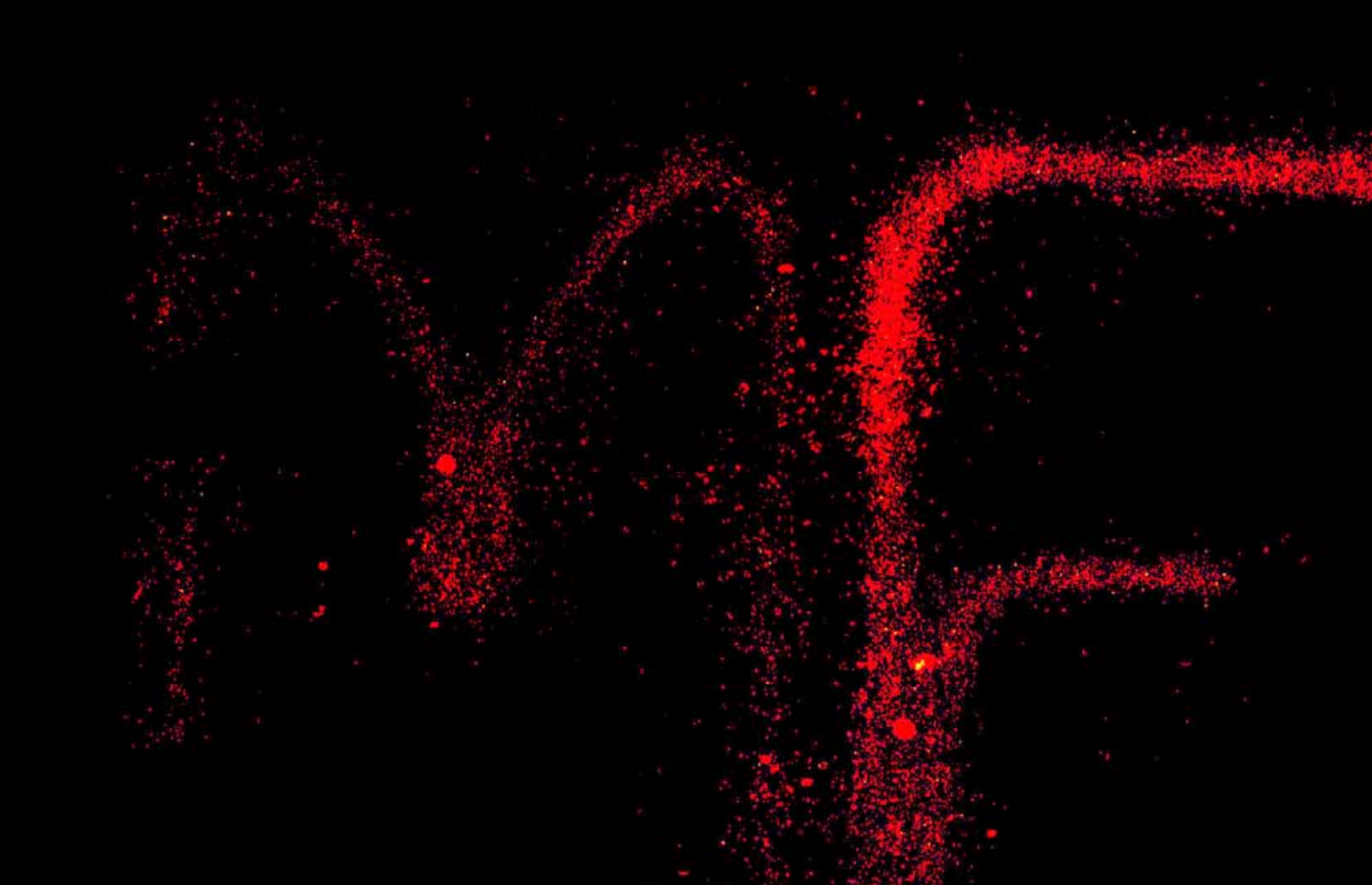
“MF” foil under cover slip



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

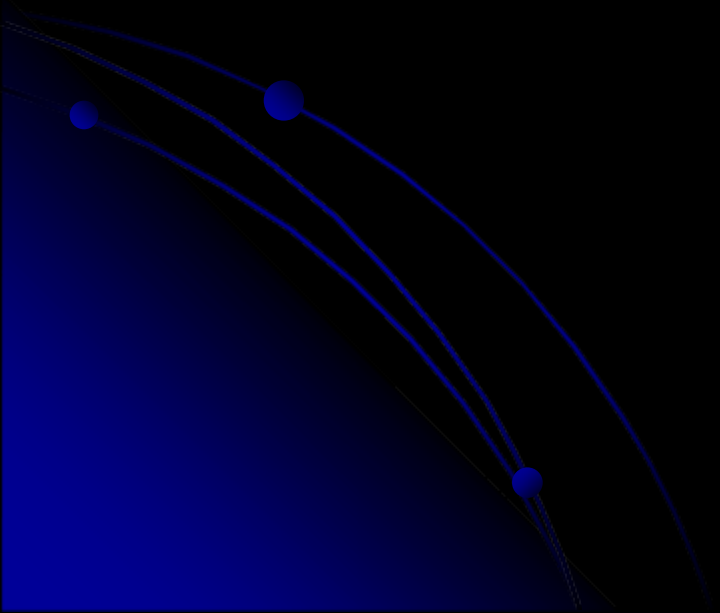


Распределение меченных трифункциональными нанобиконъюгатами раковых клеток при выстраивании магнитным полем по контуру букв «MF»

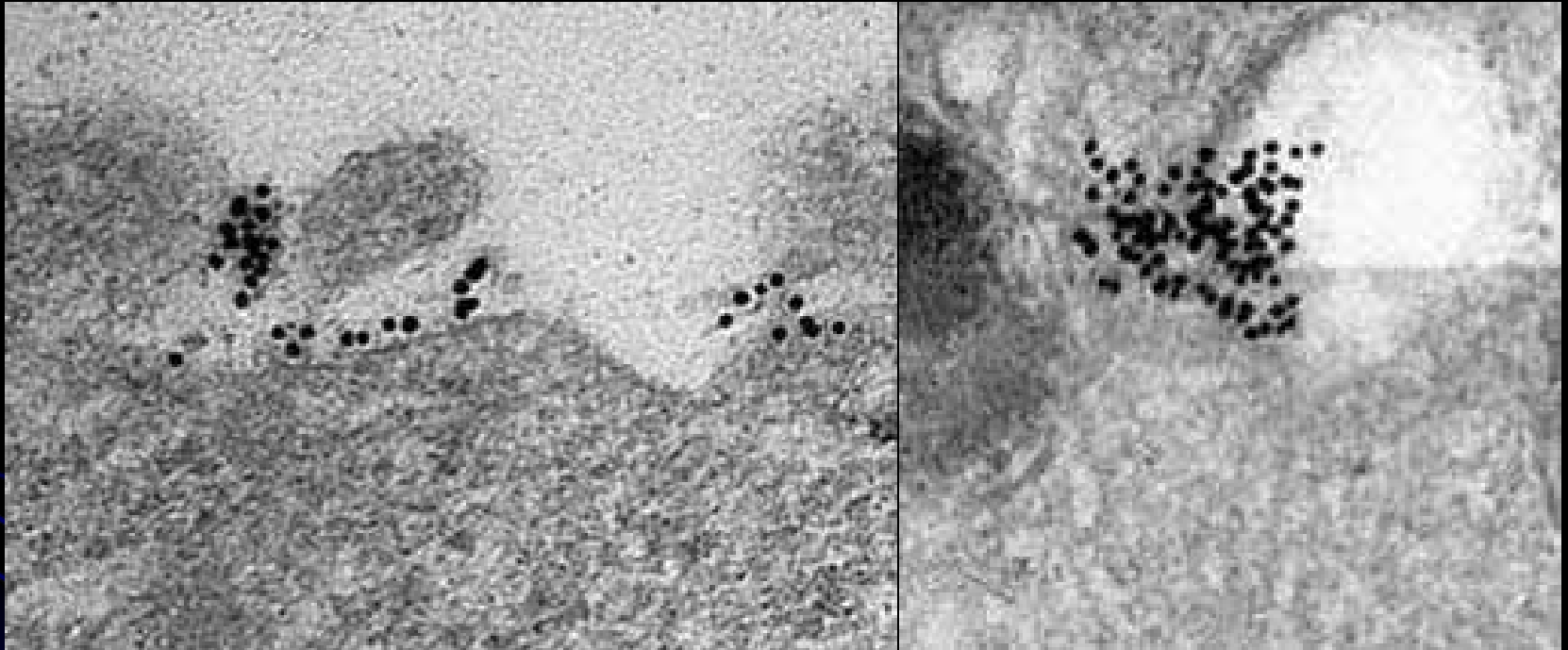
Nikitin, Deyev et al. PNAS USA. 2010.1

II. Гибридные биосовместимые наноконструкции

II.3. Синтез нанобиоконъюгатов с коллоидным золотом

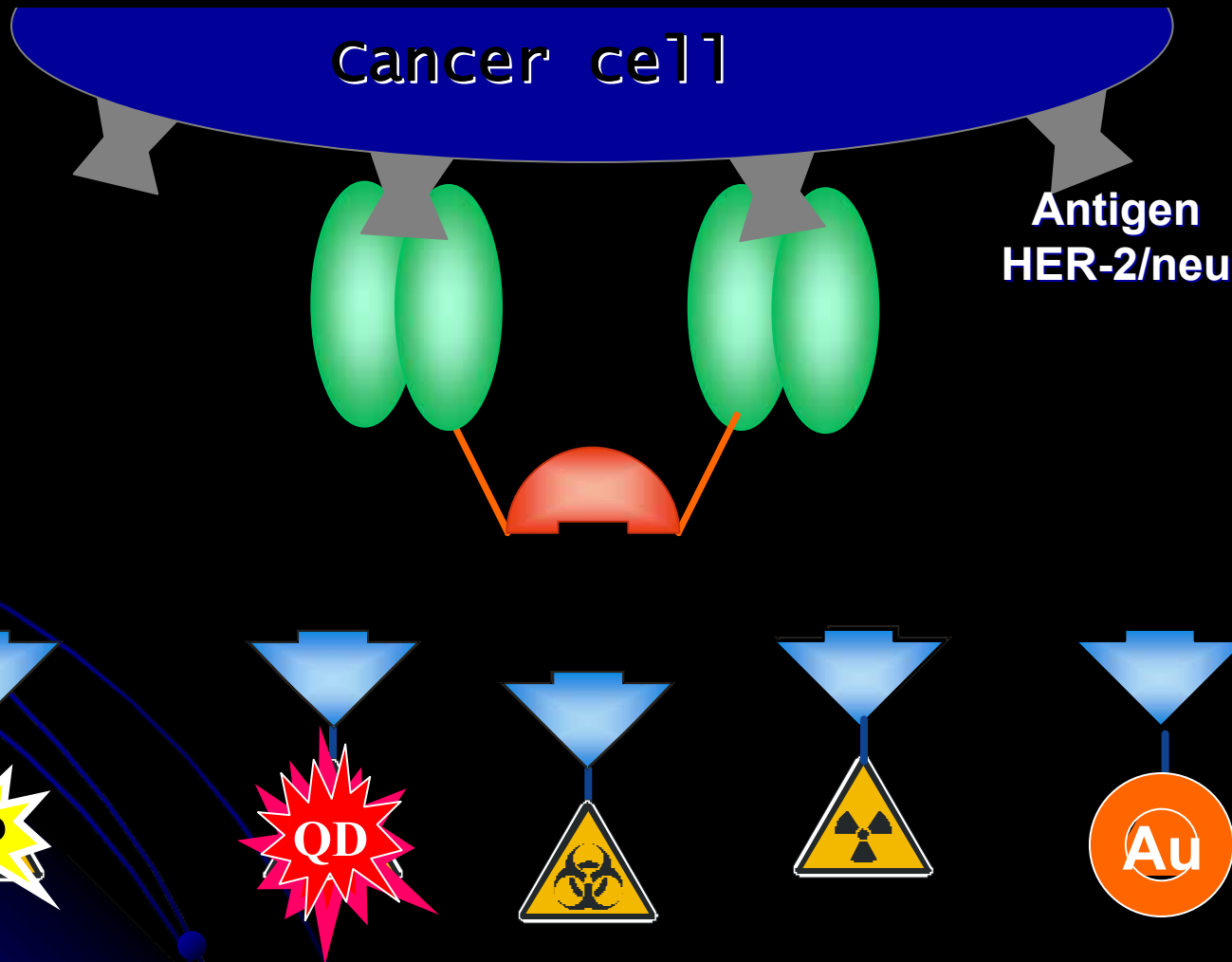


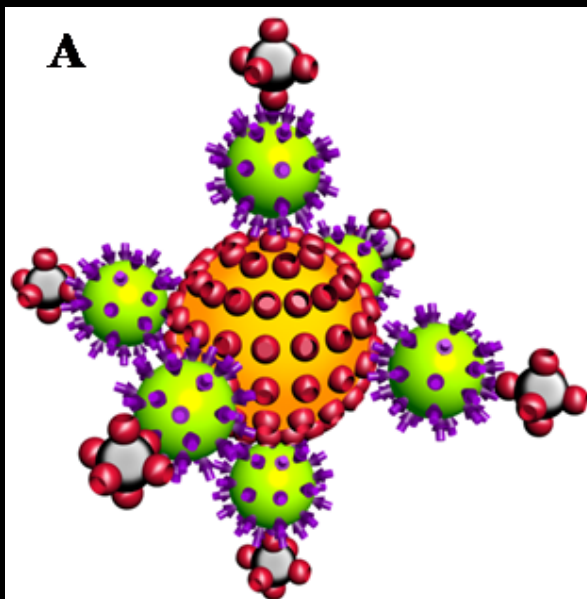
II.3. Направленная доставка и интернализация scFv-barnase/barstar-Au в раковые клетки (электронная микроскопия)



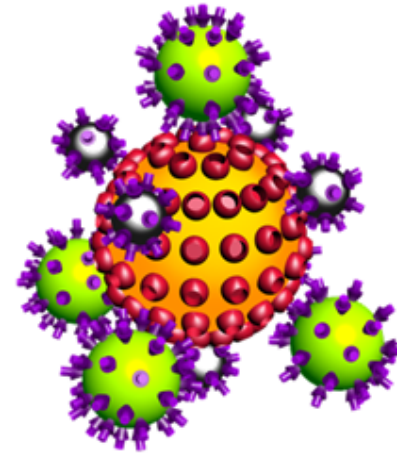
Adenocarcinoma SKOV-3 cells, 1 hr, 4°C, 4D5scFv-barnase/barstar-Au (10 nm).

Молекулярный наноконструктор на основе модуля «барназа-барстар»

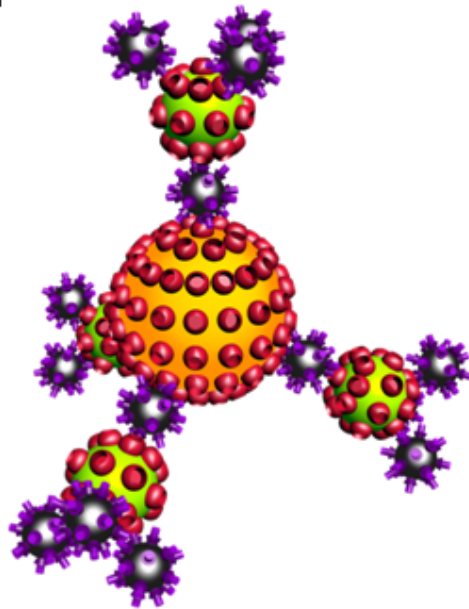









B



C



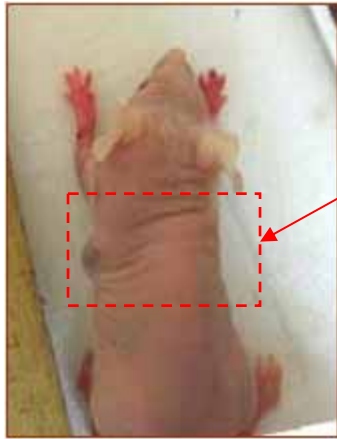
Green Particle		
Grey Particle	Barstar	Barnase
	Barstar	B
	Barnase	C
	Barnase	A
Orange particle is conjugated with barnase		

Theranostics = therapy + diagnostics

Transfectoma SKOV-3+katushka



Nude mice carrying human ovarian carcinoma SKOV-3 expressing Katushka



Scanning area

Control before tumor cells injection

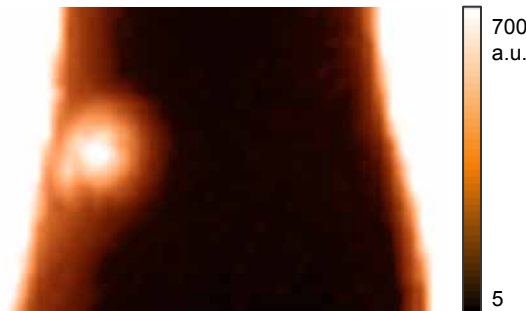


intravital monitoring of tumor growth

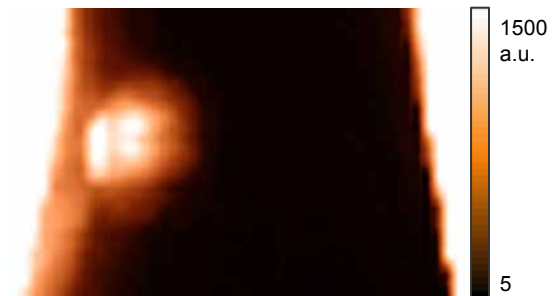
15 d



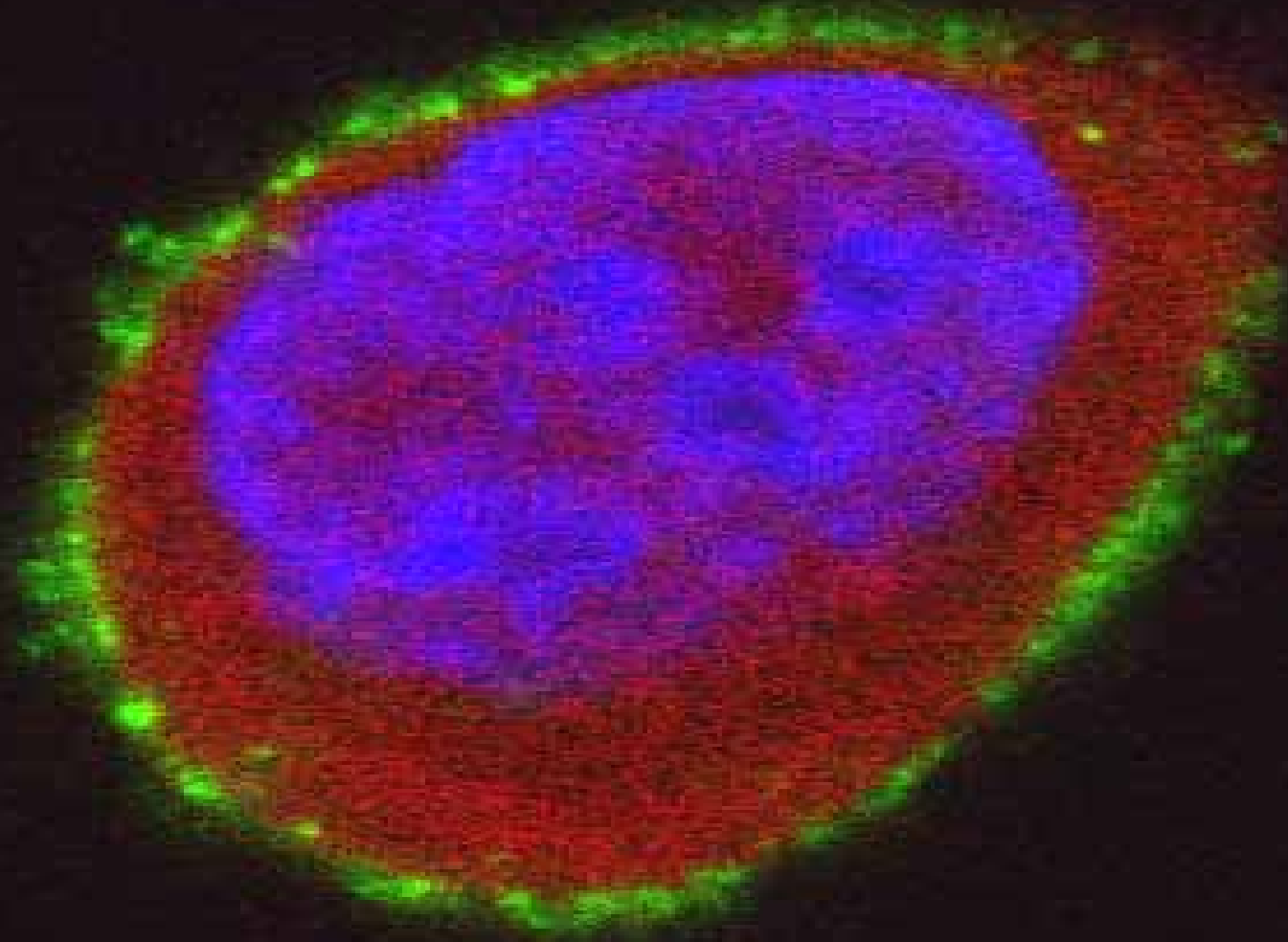
19 d



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

