

## СОЗДАНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ HER2/neu-СПЕЦИФИЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ И НАПРАВЛЯЮЩИХ БЕЛКОВ

Смышляева А.С.<sup>1</sup>, Гурьев Е.Л.<sup>1</sup>, Костюк А.Б.<sup>1</sup>, Воденев В.А.<sup>1</sup>, Деев С.М.<sup>1,2</sup>,  
Звягин А.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: smysh.anita@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

<sup>3</sup> Университет Маккуори  
2109, Австралия, Сидней, Балаклава-роуд  
Поступила в редакцию: 15.07.2018.

**Аннотация.** В настоящее время активно разрабатываются новые стратегии и подходы для биомедицинской диагностики на основе биогибридных фотолюминесцентных наноматериалов. Одним из перспективных направлений является создание тераностических комплексов с целью их направленной доставки и высокочувствительной детекции опухолевых клеток. В настоящей работе были получены двухкомпонентные комплексы на основе антистоксовых нанофосфоров (НАФ), представляющих собой высокоэффективные контрастирующие агенты с уникальными фотолюминесцентными свойствами. В качестве направляющего модуля использован высокоафинный белок неиммуноглобулиновой природы DARPIn9-29, специфичный к онкомаркеру HER2/neu. Показано, что комплексы способны специфично связываться с клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. Полученные данные позволяют считать предложенную схему биоконъюгации перспективной платформой для создания тераностических агентов.

**Ключевые слова:** тераностика, антистоксовые нанофосфоры, HER2/neu, DARPIn9-29.

Современный уровень развития медицинской диагностики онкологических заболеваний подразумевает активную разработку методов адресной доставки агентов непосредственно в опухоль. Среди подходов по решению данной задачи выделяют два основных. В основе первого подхода лежит так называемый EPR-эффект (от англ. Enhanced permeability and retention – повышенная проницаемость и удержание), обеспечивающий проникновение и концентрирование наноразмерных объектов внутри опухоли за счёт несовершенства её кровеносного русла и нарушенного лимфатического оттока. Второй подход заключается в использовании направляющих модулей белковой природы, которые способны селективно связываться с определённым типом рецепторов, гиперэкспрессируемых на поверхности опухолевых клеток.

Одним из возможных путей реализации данных двух подходов является создание биогибридных комплексов посредством соединения неорганического наноматериала – наночастиц (НЧ) – с нацеливающими биомолекулами [1, 2]. Благодаря своим уникальным свойствам, таким как программируемость физических и химических характеристик, наличие реакционноспособных функциональных групп, большая удельная площадь поверхности и наноразмерность, НЧ являются высокоэффективной платформой для сборки мультифункциональных конструкций [3]. Модификация поверхности НЧ путем присоединения не только направляющих, но и терапевтических модулей позволит совместить терапию и диагностику в рамках единой концепции – тераностики [4-6].

Наиболее перспективным классом наночастиц для целей тераностики представляются антистоксовые нанофосфоры (НАФ) – фотолюминесцентные НЧ, обладающие специфической способностью к ап-конверсии света – преобразованию низкоэнергетических фотонов в фотоны более высокой энергии. Преимуществом в использовании НАФ является спектрально выгодное расположение источника накачки (975 нм) и люминесцентного отклика в окне прозрачности биологической ткани, которое обеспечивает глубокое проникновение света с минимальным поглощением и рассеиванием в живой ткани [7, 8]. НАФ имеют выраженные максимумы эмиссии люминесценции, что позволяет регистрировать сигнал, четко отличая его от автофлуоресценции ткани и рассеянного возбуждающего излучения. НАФ широко применяются в биоанализе, при оптической визуализации патологических тканей живого организма и терапии [9-11].

Синтез НАФ проводится в среде органических растворителей, в результате чего НАФ содержат на своей поверхности гидрофобные олеиновые группы и не являются биосовместимыми. Одним из эффективных способов гидрофилизации НАФ является покрытие их полиакриловой кислотой (ПАК). Покрытие НАФ ПАК позволяет получить стабильные НЧ с отрицательно заряженной поверхностью [12] и химически активными функциональными группами, обеспечивающими возможность дальнейшей конъюгации с биомолекулами [13].

Присоединение к НАФ внешних направляющих модулей [14], специфичных к определенным белкам – онкомаркерам – на поверхности целевых клеток обеспечивает наиболее чувствительную диагностику уже на ранних этапах развития заболевания. Одним из наиболее значимых онкомаркеров является HER2/neu – рецептор эпидермального фактора роста человека, гиперэкспрессия которого непосредственно связана с ростом

различного рода злокачественных опухолей и свидетельствует об их агрессивности и высоком метастатическом потенциале [15]. Известно, что 10-34 % опухолей молочной железы характеризуется повышенным уровнем экспрессии гена HER2/neu [16]. Поэтому создание HER2-специфичных комплексов является актуальным направлением в медицинской терапии и диагностике.

Целью настоящей работы было создание и оценка функциональности биосовместимых таргетных комплексов на основе НАФ, специфичных к рецептору HER2/neu, гиперэкспрессируемому опухолевыми клетками. В настоящей работе описано получение люминесцентных HER2/neu-специфичных комплексов на основе антистоксовых нанофосфоров, содержащих ионы  $\text{Yb}^{3+}$  и  $\text{Tm}^{3+}$ , и высокоаффинного белка неиммуноглобулиновой природы DARPin9-29. Показана высокая специфичность связывания полученных комплексов с клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. Предложенный подход позволит создавать тераностические комплексы для таргетной терапии и диагностики онкологических заболеваний.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Синтез и модификация поверхности НАФ.

Гидрофобные НАФ в форме кристаллов  $\text{NaYF}_4$ , легированных ионами  $\text{Yb}^{3+}$  (20 %) и  $\text{Tm}^{3+}$  (8 %) и имеющих на поверхности олеат-анион, были синтезированы методом сольватотермического разложения [17]. Перед модификацией НАФ путем покрытия ПАК лиганды олеиновой кислоты на поверхности НАФ были удалены с помощью  $\text{NOBF}_4$  [18]. Формирование оболочки ПАК на поверхности НАФ проводили как описано в [19].

### Выделение рекомбинантного белка DARPin9-29.

Белок DARPin9-29 экспрессировали в клетках *E.coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой pDARPin9-29 и выделяли с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap FF (GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя. Дополнительную очистку белка проводили гелефильтрацией с использованием сорбента Superdex 200 (GE Healthcare, США).

### Конъюгация белка с НАФ-ПАК.

Суспензию НАФ-ПАК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 17000g, ресуспендировали в буфере MES (100 мМ MES, 150 мМ NaCl, pH 6,0), обрабатывали ультразвуком в течение 30 минут, перемешивали на вортексе. Добавляли к суспензии НАФ-ПАК катализаторы конъюгации 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (EDC, Sigma-Aldrich Co. LLC, США) до концентрации 2 мМ и N-гидроксисульфосукцинимид (sulfo-NHS, Sigma-Aldrich Co. LLC, США) до концентрации 5 мМ, инкубировали 15 мин при комнатной температуре. НАФ-ПАК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 17000g, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Для удаления избытка линкеров отмывку повторяли. Полученную при 37 кГц суспензию НАФ-ПАК смешивали с раствором белка DARPin9-29 в фосфатно-солевом буфере, инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Собранные таким образом комплексы трижды отмывали от не связавшихся молекул белка фосфатно-солевым буфером при 4°C, как описано выше.

### Исследования свойств НАФ и комплексов.

Люминесцентные свойства НАФ исследовали с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (SOLAR, Беларусь) и внешнего полупроводникового лазерного модуля с длиной волны 978 нм. Измерения спектров эмиссии люминесценции в диапазоне от 400 до 850 нм, проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. Гидродинамический диаметр НАФ-ПАК/НАФ-ПАК-DARPin измеряли методом динамического светорассеяния с использованием системы Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Перед измерением суспензию частиц обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Для удаления возможных агрегатов суспензию центрифугировали в течение 5 мин на 500g.

Концентрацию комплексов НАФ-DARPin определяли по интенсивности флуоресценции НАФ с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (SOLAR, Беларусь) и внешнего полупроводникового лазерного модуля с длиной волны 978 нм. Концентрацию белка DARPin в составе комплексов определяли методом ВСА, в качестве бланка была использована суспензия с той же концентрацией НАФ.

### Оценка специфичности связывания.

Для исследования специфичности связывания направленных люминесцентных комплексов с рецептором HER2/neu на поверхности клеток использовали культуру клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих на поверхности рецептор HER2/neu. В качестве контрольных (HER2/neu-) клеток использовали клетки яичника китайского хомячка линии CHO. Клетки SK-BR-3 и CHO культивировали в среде McCoys (HyClone, США) с добавлением L-глутамина и 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США). Затем клетки рассевали на покровные стекла, помещенные в лунки 6-луночного планшета, в концентрации  $2,5 \times 10^5$  кл/мл и подрощивали в течение 24 ч при 37 °C в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (5 %  $\text{CO}_2$ ). После чего в инкубационную среду вносили суспензию комплексов НАФ-ПАК-DARPin до конечной концентрации в среде 1 мкг/мл. Для предотвращения эндоцитоза наночастиц клетки инкубировали в присутствии комплексов при 4 °C на протяжении 1 часа. Затем клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали 4 % раствором формальдегида в течение 30 мин при 24 °C в темноте. Формальдегид удаляли, клетки отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером и 1 раз деионизированной водой. Покровные стекла вынимали из лунок планшета, подсушивали, помещали в каплю глицерина на предметные стекла, после чего запаивали. Оценку связывания

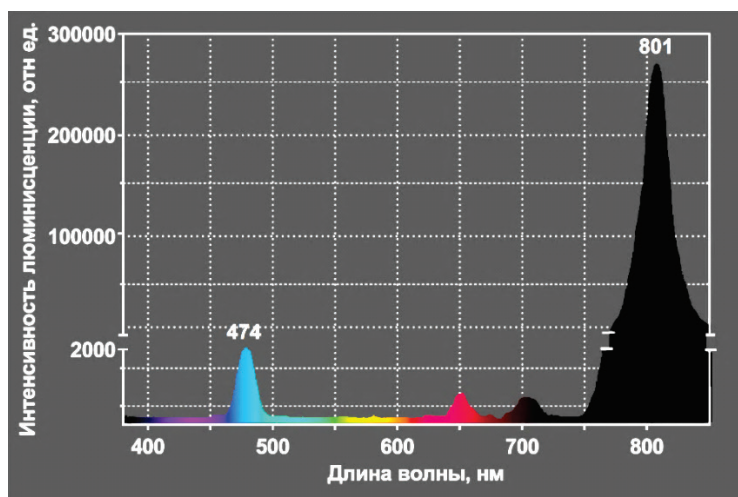


Рисунок 1. Спектр эмиссии люминесценции НАФ -  $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$

конъюгатов НАФ-ПАК-DARPin с поверхностью клеток производили методом широкопольной флуоресцентной микроскопии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антистоксовы нанофосфоры, представляющие собой кристаллические частицы  $\text{NaYF}_4$ , легированные элементами трёхвалентных лантаноидов – иттербием ( $\text{Yb}^{3+}$ ) и тулнием ( $\text{Tm}^{3+}$ ) –  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$ , были синтезированы в лаборатории отдела физики университета Макуори (Сидней, Австралия). В результате исследования люминесцентных свойств НАФ были зарегистрированы максимумы в синей области (на длине волны 474 нм) и инфракрасной области (на длине волны 801 нм):

Наибольшая интенсивность флуоресценции в инфракрасной области спектра даёт возможность эффективного применения данных НАФ для биомедицинского оптического имиджинга, позволяя с высокой чувствительностью зарегистрировать излучение на этой длине волны через слой биоткани толщиной до сантиметра.

Поскольку синтезированные НАФ содержат на своей поверхности гидрофобные олеиновые группы, то для придания им биосовместимости и стабильности в водных растворах НЧ покрываются полиакриловой кислотой (ПАК). Покрытие НАФ ПАК обеспечивает стабилизацию размеров частиц за счёт уменьшения реакционной способности лантаноидов из-за взаимодействия с фторидом и приводит к формированию однородных по размерам и форме частиц. Кроме того, модифицированные таким образом НЧ образуют стабильные водные дисперсии за счёт отталкивания друг от друга отрицательно заряженных поверхностных зарядов, формируемых ПАК [12].

Для придания адресности собранным комплексам в качестве направляющего модуля, специфичного к онкомаркеру HER2/неу, авторами был выбран белок из класса дарпинов (*DARPin*s – *Designed Ankyrin Repeat Proteins* – альтернативные каркасные белки с анкириновыми повторами) – DARPin9-29, «узнающий» рецептор HER2/неу с высокой аффинностью ( $KD = 3,8$  нМ) [20, 21]. Благодаря малому размеру молекул, высокой стабильности и эффективному фолдингу дарпины являются перспективными адресными компонентами [22-25].

Присоединение белка DARPin9-29 к концевым карбоксильным группам ПАК осуществляли методом химического перекрёстного связывания с использованием линкеров нулевой длины EDC и sulfo-NHS. Общая схема сборки комплексов НАФ-DARPin представлена на рисунке 2.

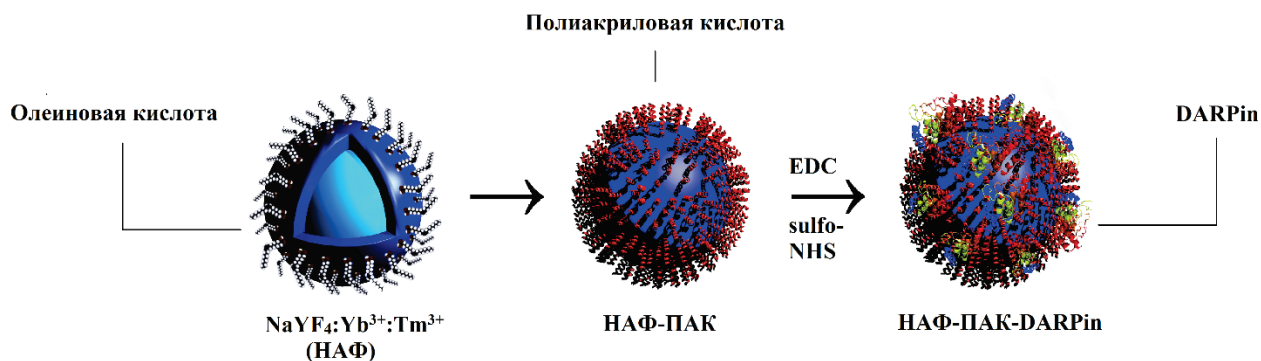


Рисунок 2. Схема модификации поверхности НАФ и сборки комплексов

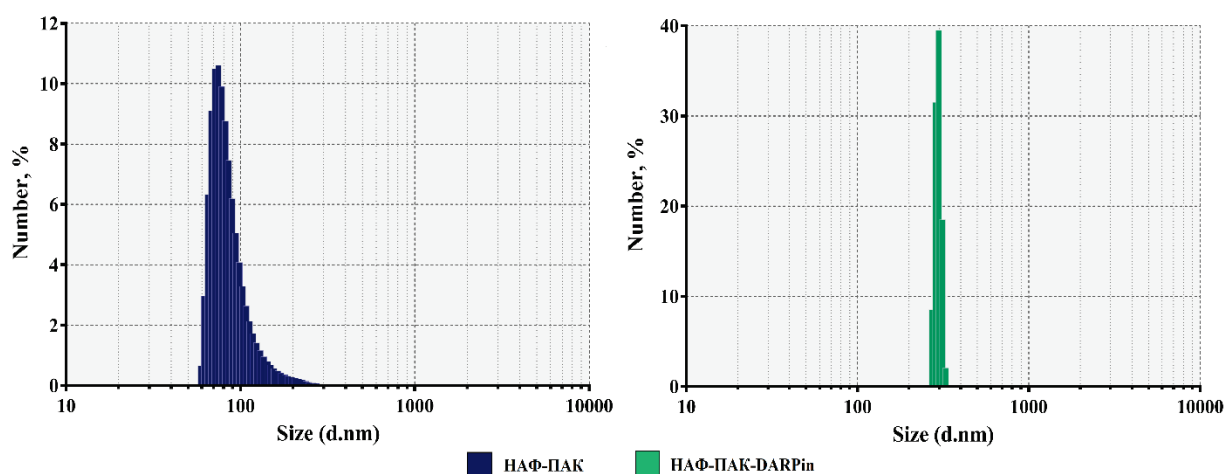


Рисунок 3. Распределение по размерам комплексов HAФ-ПАК и HAФ-ПАК-DARPin

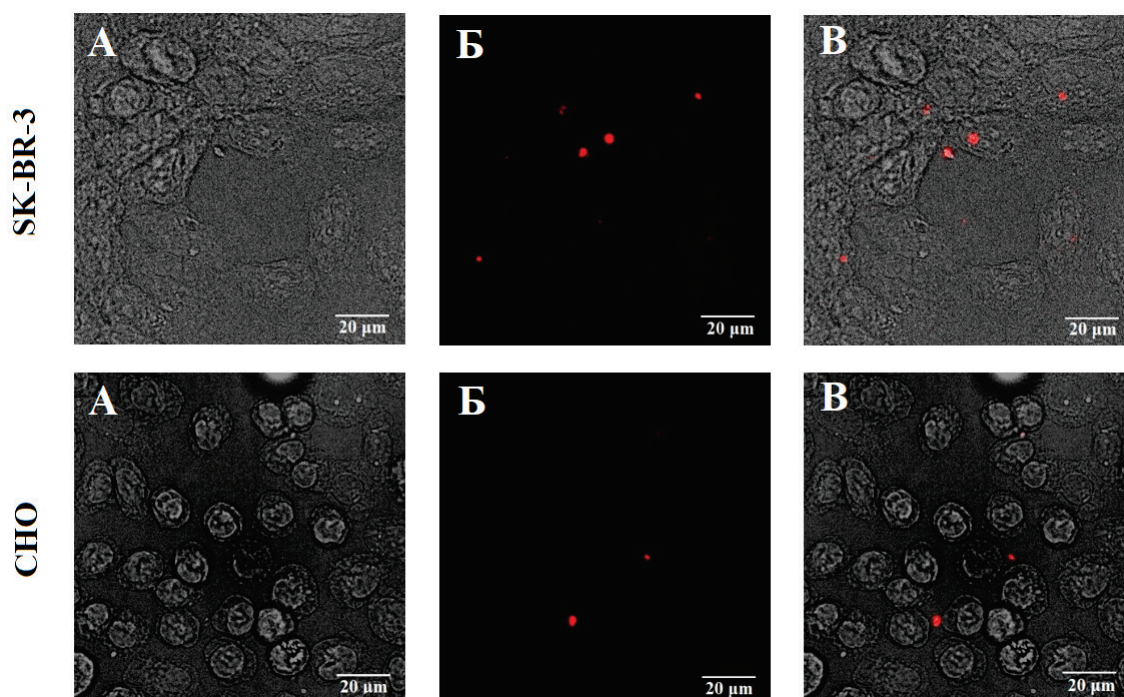
EDC – реагент для активации карбоксильных групп, к которым ковалентно «пришиваются» белковые молекулы. Являясь линкером нулевой длины, карбодимид исключает возможность внесения в состав конечного комплекса дополнительных структур [26]. В ходе реакции EDC взаимодействует с карбоксильной группой, формируя интермедиат, активно вступающий в реакцию с аминогруппой. Однако до образования пептидной связи существует риск гидролиза активированного интермедиата, который делает невозможным дальнейшую конъюгацию. Для того, чтобы этого избежать, в реакционную смесь добавляли sulfo-NHS, который образует более стабильный эфир и увеличивает растворимость в воде побочных продуктов реакции.

Средний размер HAФ-ПАК составил 89 нм с коэффициентом полидисперсности (PDI) – 0,143 (рис. 3). В результате конъюгации средний диаметр суспензии комплексов HAФ-ПАК-DARPin увеличился до ~300 нм. Концентрация белка DARPin в составе комплексов HAФ-ПАК-DARPin составила 8,34 мкг/мл при концентрации HAФ 1 мг/мл. Количество белка, приходящегося на 1 частицу, составило 34 молекулы.

Для исследования специфичности связывания многофункциональных люминесцентных комплексов с рецептором HER2/neu на поверхности клеток, использовали культуру клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующих на поверхности рецептор HER2/neu. В качестве контрольных (не экспрессирующих HER2/neu) клеток использовали клетки яичника китайского хомячка линии CHO. Препараты клеток, инкубированных с комплексами HAФ-ПАК-DARPin, исследовали с помощью широкопольной флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях клеток SK-BR-3 после инкубации с комплексами HAФ-ПАК-DARPin можно наблюдать накопление частиц на клетках (рис. 4), на микрофотографиях CHO накопление комплексов на клетках выражено значительно слабее. Данные микроскопии позволяют сделать вывод о специфическом связывании комплексов HAФ-ПАК-DARPin с поверхностью клеток, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе получены и охарактеризованы двухкомпонентные биогибридные комплексы на основе HAФ и направляющего белка DARPin9-29, специфично взаимодействующие с онкомаркером HER2/neu, характерным для целого ряда метастазирующих опухолей человека. Предложенная технология сборки комплексов позволяет создавать структуры с использованием различных функциональных модулей. Так, последующее включение в состав комплексов как бифункциональных – одновременно токсических и направляющих [22, 27], так и отдельных терапевтических модулей (напр., бета-излучатель  $^{90}\text{Y}$ ) позволит получать агенты не только для диагностики, но и терапевтического воздействия на опухолевые клетки одновременно с возможностью визуализации опухолевых очагов. Возможность управления физическими и химическими характеристиками HAФ за счёт варьирования легирующих ионов, а также присоединения различных белковых модулей позволяет рассматривать предложенную схему биоконъюгации как перспективную платформу для создания тераностических агентов.



**Рисунок 4.** Микрофотографии, полученные методом широкопольной флуоресцентной микроскопии: клетки SK-BR-3 и CHO, инкубированные с конъюгатами НАФ-DARPin-9-29. А – просветное изображение; Б – люминесцентный сигнал в диапазоне 420-840 нм; В – наложение каналов А и Б

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 17-00-00119 и 17-00-00121 КОМФИ) и Министерства образования и науки РФ (Госзадание №20.6515.2017/9.10).

#### Список литературы / References:

1. Гребеник Е.А., Генералова А.Н., Нечаев А.В., Хайдуков Е.В., Миронова К.Е., Стрёмовский О.А., Лебеденко Е.Н., Звягин А.В., Деев С.М. Специфическая визуализация опухолевых клеток с помощью антистоксовых нанофосфоров. *Acta naturae*, 2014, т. 6, № 4 (23), с. 51-57. [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. Specific visualization of tumor cells using upconversion nanophosphors. *Acta naturae*, 2014, vol. 6, no. 4 (23), pp. 51-57. (In Russ.)]
2. Friedman A.D., Claypool S.E., Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19, pp. 6315-6329.
3. Sreenivasan V.K. Luminescent nanoparticles and their applications in the life sciences. *Journal of physics. Condensed matter: An Institute of Physics journal*, 2013, vol. 25, iss. 19, pp. 1-23.
4. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. Upconversion nanoparticles and their hybrid assemblies for biomedical applications. *Russ. Chem. Rev.*, 2016, vol. 85, no. 12, pp. 1277-1296.
5. Kim J. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, vol. 38, no. 2, pp. 372-390.
6. Xie J., Lee S., Chen X. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, vol. 62, pp. 1064-1079.
7. Звягин А.В., Панченко В.Я., Нечаев А.В., Шехтер А.Б., Деев С.М., Ахманов А.С., Гулер А.Е., Ивукина Е.И., Генералова А.Н., Семчишен В.А., Хайдуков Е.В. Антистоксовы наноломинофоры: Перспективы применения в биологии и медицине. *Сборник материалов V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине»*, 2012, т. 2, с. 8-9. [Zvyagin A.V., Panchenko V.Ya., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Deyev S.M., Akhmatova A.S., Guler A.E., Ivukina E.I., Generalova A.N., Semchishen V.A., Khaydukov E.V. Anti-Stokes nanoluminescence; Perspectives of application in biology and medicine. *Sbornik materialov V Troickoj konferencii «Medicinskaya fizika i innovacii v medicine»*, 2012, vol. 2, pp. 8-9. (In Russ.)]
8. Chen J., Zhao J.X. Upconversion Nanomaterials: Synthesis, Mechanism, and Applications in Sensing. *Sensors*, 2012, vol. 12, pp. 2414-2435.
9. Генералова А.Н., Зубов В.П., Хайдуков Е.В. Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией на пути в медицину. *Природа*, 2016, т. 11, № 1215, с. 24-32. [Generalova A.N., Zubov V.P., Khaydukov E.V. Nanocrystals with Anti-Stokes Fluorescence on the Way to Medicine. *Nature*, 2016, vol. 11, no. 1215, pp. 24-32. (In Russ.)]
10. Kostyuk A.B., Guryev E.L., Vorotnov A.D., Sencha L.M., Peskova N.N., Sokolova E.A., Liang L., Vodenev V.A., Balalaeva I.V., Zvyagin A.V. Real-time tracking of Yb<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup> doped NaYF<sub>4</sub> nanoparticles in living cancer cells. *Sovremennyye tehnologii v medicine*, 2018, vol. 10, no. 1, pp. 57-63.

11. Хайдуков Е.В., Рочева В.В., Семчишен В.А., Семиногов В.Н., Соколов В.И., Звягин А.В., Ахманов А.С., Панченко В.Я., Нечаев А.В., Генералова А.Н., Шехтер А.Б. Оптическая визуализация опухолевых тканей с применением антистоксовых наночастиц. *Вестник российского фонда фундаментальных исследований*, 2014, т. 4, № 84, с. 7-17. [Khaydukov E.V., Rocheva V.V., Semchishen V.A., Seminogov V.N., Sokolov V.I., Zvyagin A.V., Akhmanov A.S., Panchenko V. Ya., Nechaev A.V., Generalova A.N., Shekhter A.B. Applications of Upconversion Nanoparticles in Optical Bioimaging of the Tumor Tissue. *Vestnik Rossiyskogo fonda fundamental'nykh issledovaniy [RFBR Journal]*, 2014, vol. 4, no. 84, pp. 7-17. (In Russ.)]
12. Naccache R., Vetrone F., Mahalingam V., Cuccia L.A., Capobianco J.A. Controlled Synthesis and Water Dispersibility of Hexagonal Phase NaGdF<sub>4</sub>:Ho<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 2009, vol. 21, no. 4, pp. 717-723.
13. Wang L.Y., Zhang Y., Zhu Y.Y. One-Pot Synthesis and Strong Near-Infrared Upconversion Luminescence of Poly(acrylic acid)-Functionalized YF<sub>3</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup> Nanocrystals. *Nano Research*, 2010, vol. 3, no. 5, pp. 317-325.
14. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Targeted Bifunctional Proteins and Hybrid Nanoconstructs for Cancer Diagnostics and Therapies. *Molecular Biology*, 2017, vol. 51, no. 6, pp. 788-803.
15. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987, vol. 235, no. 4785, pp. 177-182.
16. Ross J.S., Slodkowska E.A., Symmans W.F., Puzstai L., Ravdin P.M., Hortobagyi G.N. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, 2009, vol. 14, no. 4, pp. 320-368.
17. Mai H.-X., Zhang Y.-W., Sun L.-D., Yan C.-H. Size- and Phase-Controlled Synthesis of Monodisperse NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er Nanocrystals from a Unique Delayed Nucleation Pathway Monitored with Upconversion Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry*, 2007, vol. 111, no. 37, pp. 13730-13739.
18. Dong A., Ye X., Chen J., Kang Y., Gordon T., Kikkawa J. M., Murray C.B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, no. 4, pp. 998-1006.
19. Hu M., Zhao J., Ai X., Budanovic M., Mu J., Webster R.D., Cao Q., Mao Z., Xing B. Near infrared light-mediated photoactivation of cytotoxic Re(I) complexes by using lanthanide-doped upconversion nanoparticles. *Dalton Trans.*, 2016, vol. 45, pp. 14101-14108.
20. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J. Mol. Biol.*, 2008, vol. 382, no. 5, pp. 1211-1227.
21. Binz H.K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M.T., Briand C., Forrer P., Grutter M.G., Pluckthun A. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nature Biotechnology*, 2004, vol. 22, no. 5, pp. 575-582.
22. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPins possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 2016, vol. 233, pp. 48-56.
23. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering. *Russian Chemical Reviews*, 2015, vol. 84, no. 1, pp. 1-26.
24. Interlandi G., Wetzel S.K., Settanni G., Pluckthun A., Caflisch A. Characterization and further stabilization of designed ankyrin repeat proteins by combining molecular dynamics simulations and experiments. *Journal of Molecular Biology*, 2008, vol. 375, no. 3, pp. 837-854.
25. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., de Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., Plückthun A.A. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Research*, 2010, vol. 70, no. 4, pp. 1595-1605.
26. Hermanson G. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, 2008, 1200 p.
27. Sokolova E., Guryev E., Yudinsev A., Vodeneev V., Deyev S., Balalaeva I. HER2-specific recombinant immunotoxin 4D5scFv-PE40 passes through retrograde trafficking route and forces cells to enter apoptosis. *Oncotarget*, 2017, vol. 8, no. 13, pp. 22048-22058.

**SYNTHESIS OF LUMINESCENT HER2/neu-SPECIFIC COMPLEXES BASED ON UPCONVERSION NANOPARTICLES AND TARGET PROTEINS****Smyshlyaeva A.S.<sup>1</sup>, Guryev E.L.<sup>1</sup>, Kostyuk A.B.<sup>1</sup>, Vodeneev V.A.<sup>1</sup>, Deev S.M.<sup>1,2</sup>, Zvyagin A.V.<sup>1,3</sup>**<sup>1</sup> Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod*prosp. Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: smysh.anita@gmail.com*<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences*Miklukho-Maklaya St, 16/10, Moscow, 117997, Russia*<sup>3</sup> Macquarie University, 2109, Australia, Sydney, Balaclava Road

**Abstract.** Modern strategies and approaches for biomedical diagnostics based on biohybrid photoluminescent nanomaterials are being actively developed. One of the promising areas is the synthesis of theranostic complexes for their targeted delivery and highly sensitive detection of tumor cells. In the present work we have created two-component nanocomplexes based on upconversion nanoparticles, highly effective contrast agents with unique photoluminescence properties. A non-immunoglobulin targeting protein DARPIn9-29, which can selectively recognize the oncomarker HER2/neu, was used as a targeting module. A specifically binding of created complexes to the human breast adenocarcinoma SK-BR-3 cells overexpressing the HER2/neu-receptor has been shown. The obtained results allow to consider the proposed bioconjugation scheme as a promising platform for creating theranostic agents.

**Key words:** *theranostics, upconversion nanoparticles, HER2/neu, DARPIn9-29.*