

## ПОЛУЧЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ТЕРАНОСТИЧЕСКИХ НАНОКОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ И РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Баушева Д.К.<sup>1</sup>, Шилягина Н.Ю.<sup>1</sup>, Воденев В.А.<sup>1</sup>, Деев С.М.<sup>2,3</sup>, Звягин А.В.<sup>1,3,4</sup>  
Гурьев Е.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского  
пр. Гагарина, 23, г. Нижний Новгород, 603950, РФ; e-mail: [bausheva16@mail.ru](mailto:bausheva16@mail.ru)

<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> Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России  
ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4, г. Москва, 119435, РФ

<sup>4</sup> Университет Маккуори  
Балаклава-Роуд, Маккуори-Парк, Новый Южный Уэльс, Сидней, Австралия  
Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/tusjbpс.2022.0573

**Аннотация.** Тераностика – стремительно развивающаяся область биомедицины, направленная на разработку мультифункциональных агентов, обладающих диагностическими и терапевтическими свойствами одновременно. В данной работе описано получение HER2-специфичных тераностических наноконструктов на основе антистоксовых нанопосфоров и бифункциональных белков. В качестве платформы для сборки мультифункционального комплекса использовали неорганические нанокристаллы структуры ядро/оболочка  $\text{NaY}_{0,794}\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$ . Показано, что наноразмерные антистоксовые фосфоры (НАФ) обладают выраженными максимумами эмиссии фотолюминесценции в видимой и инфракрасной области спектра, что обеспечивает эффективную прижизненную визуализацию клеток и тканей методами оптического имиджинга. Покрытие НАФ дополнительными оболочками позволяет добиться их коллоидной устойчивости и присоединять к ним дополнительные внешние модули. В качестве терапевтического модуля наноконструктов был использован рекомбинантный адресный токсин DARPIn-LoPE, обладающий специфичной токсичностью в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор HER2. Показано, что тераностический комплекс НАФ-DARPIn-LoPE благодаря направляющему модулю DARPIn, входящему в состав, способен избирательно связываться с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими рецептор HER2.

**Ключевые слова:** наноразмерные антистоксовые фосфоры, НАФ, DARPIn-LoPE, тераностика, онкология.

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день разработка новых методов и подходов для диагностики и терапии рака – одна из наиболее актуальных и активно развивающихся областей медицины. Одним из таких направлений является тераностика — концепция, включающая создание мультифункциональных агентов, обладающих одновременно диагностическими и терапевтическими свойствами [1]. Перспективной платформой для создания тераностических агентов представляются люминесцентные наночастицы (НЧ), обладающие уникальными свойствами, такими как: программируемость физических и химических характеристик в зависимости от размеров, состава и способов получения; наличие химически активных функциональных групп на поверхности, позволяющих модифицировать частицы; большая площадь поверхности, позволяющая присоединять значительное количество функциональных направляющих модулей; оптимальный размер, способствующий, в частности, преимущественному накоплению наночастиц в опухолевой ткани за счет ее морфологических особенностей [2,3].

НЧ активно используются для создания мультифункциональных агентов, снабженных набором компонентов (модулей), способных реализовывать направляющую, диагностическую (визуализирующую) и терапевтическую функции. Для этих целей наиболее перспективными представляются люминесцентные наночастицы, такие как антистоксовые нанопосфоры (наноразмерные антистоксовые фосфоры, НАФ). НАФ – неорганические фотолюминесцентные наночастицы, способные к ап-конверсии света, то есть к преобразованию нескольких фотонов с более низкой энергией в один фотон с более высокой энергией [4]. Люминесцентные наночастицы не только играют роль платформы для сборки комплекса, но и одновременно являются диагностическим модулем. Благодаря различным направляющим модулям, входящим в состав тераностических комплексов, возможно добиться их специфичного взаимодействия с опухолевыми клетками, несущими определённые антигены.

В качестве адресных модулей могут быть присоединены: антитела, укороченные фрагменты антител, альтернативные каркасные белки. В роли терапевтических агентов могут играть радиофармацевтические препараты, фотосенсибилизаторы, агенты для фототермической терапии, агенты для генотерапии [5-7]. Но

особый интерес представляют иммунотоксины, объединяющие в себе характеристики адресных и терапевтических агентов. Примером HER2 иммунотоксинов является DARPIn-LoPE.

Целью данной работы является создание терностических наноконструкций НАФ-DARPIn-LoPE и исследование эффективности адресной доставки HER2-специфичных наноконструкций к целевым опухолевым клеткам SKOVip-kat.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Синтез и исследование фотофизических свойств НАФ.** В работе использовали НАФ структуры ядро/оболочка  $\text{NaY}_{0,794}\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$ , синтезированные методом сольватотермического разложения в ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Спектр эмиссии фотолуминесценции (ФЛ) НАФ получали с помощью спектрофлуориметра CM2203 (СОЛАР, Беларусь). ФЛ НАФ возбуждали с помощью внешнего полупроводникового лазера с длиной волны 980 нм (Полупроводниковые приборы, Россия).

**Покрывание НАФ оболочкой из СМАОД.** Для достижения коллоидной стабильности частиц НАФ покрывали полимером. Для этого к суспензии НАФ в хлороформе добавляли раствор сополимера малеинового ангидрида с 1-октадецином (СМАОД) в хлороформе, перемешивали и обрабатывали ультразвуком (УЗ). Раствор инкубировали при перемешивании с открытой крышкой до испарения 4/5 объёма. В пробирку с фосфатно-солевым буфером (PBS), в объёме 1 мл, добавляли смесь НАФ-СМАОД по 10 мкл, перемешивали, обрабатывали УЗ до полного испарения хлороформа. Суспензию центрифугировали 10 мин при 15000 g, после чего удаляли супернатант. Промывку повторяли дважды.

**Присоединение к НАФ-СМАОД молекул ПЭГ и рекомбинантного белка DARPIn-LoPE.** Для последовательного присоединения молекул ПЭГ суспензии НАФ-СМАОД центрифугировали в течение 10 мин при 15000g, удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок в буфере MES (100 mM MES pH 4,7), обрабатывали УЗ. Для превращения карбоксильных групп НАФ-СМАОД в аминокислоты, готовили 1M р-р этилендиамина в буфере MES (100 mM MES pH 4,7), добавляли 0,5 мл этого раствора к 0,5 мл суспензии НАФ-СМАОД. Добавляли 1-этил-3-карбодиимид гидрохлорида (EDC), инкубировали 2 ч при комнатной температуре (RT) при перемешивании. Суспензию НАФ-СМАОД трижды отмывали PBS.

Для дальнейших действий НАФ-СМАОД ресуспендировали в PBS. Готовили 10 mM раствор сшивающего реагента сукцинимидил 4-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) в диметилсульфоксиде (DMCO) (3,34 мг в 0,5 мл), добавляли 50 мкл этого раствора к суспензии НАФ-СМАОД, инкубировали 30 мин при RT при перемешивании. Отмывали в PBS. Готовили раствор ПЭГ в PBS (5 мг в 0,5 мл), добавляли к 0,5 мл суспензии НАФ-СМАОД, инкубировали 30 мин при RT при перемешивании. Суспензию НАФ-СМАОД-ПЭГ трижды отмывали PBS.

Далее НАФ-СМАОД-ПЭГ ресуспендировали в 0,95 мл PBS. Добавляли 50 мкл 10 mM раствора SMCC в DMCO к суспензии НАФ-СМАОД-ПЭГ. Инкубировали 30 мин при RT при перемешивании. Отмывали в PBS, ресуспендировали в 0,5 мл PBS. Добавили 0,5 мл раствора белка DARPIn-LoPE в PBS (3 мг/мл) к 0,5 мл суспензии НАФ-СМАОД-ПЭГ, инкубировали 30 мин при RT. Комплексы НАФ-СМАОД-ПЭГ-DARPIn-LoPE (НАФ-DARPIn-LoPE) трижды отмывали PBS.

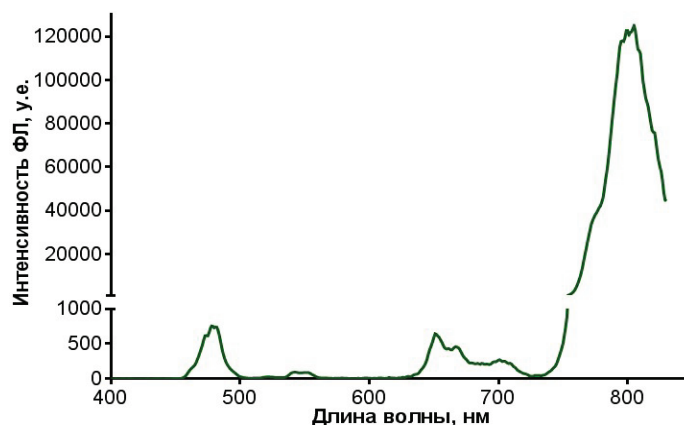
Рекомбинантный белок DARPIn-LoPE, использованный для сборки терностических комплексов, был получен в лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

**Измерение гидродинамического диаметра и дзета-потенциала НАФ и комплексов.** Гидродинамический диаметр НАФ измеряли методом динамического светорассеяния, дзета-потенциал – методом электрофоретического рассеяния света. Для измерения суспензию НАФ перемешивали на вортексе, обрабатывали УЗ, центрифугировали в течение 5 мин при 500g. Супернатант переносили в измерительную кювету, помещали в ячейку прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) и проводили измерение гидродинамического диаметра и дзета-потенциала согласно рекомендациям производителя.

**Исследование взаимодействия комплексов с опухолевыми клетками.** В качестве целевых клеток использовали клетки аденокарциномы яичника человека линии SKOVip-kat. Данная линия клеток характеризуется стабильной экспрессией дальнекрасного флуоресцентного белка TurboFP635 (Katushka) в цитоплазме ( $\lambda_{\text{ex}}=588$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=635$  нм) и гиперэкспрессией мембраноассоциированного HER2 рецептора. В качестве контроля были использованы клетки аденокарциномы протоков молочной железы человека линии MCF-7 с отсутствием экспрессии рецептора HER2.

Клетки выращивали в культуральных флаконах (Corning, США) объемом 50 мл. Клетки линии SKOVip-kat культивировали в среде McCoy's, клетки MCF-7 в ростовой среде DMEM (HyClone, США), содержащей 10 мкг/мл бычьего инсулина. Ростковые среды содержала 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для предотвращения ферментативного удаления поверхностных рецепторов при пассировании снятие клеток с подложки проводили раствором Версена (ПанЭко, Россия), без использования трипсина.

Для исследования эффективности адресной доставки терностических наноконструкций, суспензии клеток высевали на покровные стекла, помещенные в лунки шестилучного планшета (Corning, США), и культивировали на протяжении 24 ч. Через сутки в инкубационную среду вносили суспензию НАФ-СМАОД-ПЭГ или комплексов НАФ-DARPIn-LoPE до конечной концентрации в среде 0,5 мкг/мл. Затем клетки трижды отмывали в PBS и фиксировали 4% раствором формальдегида в течение 30 мин при 24°C в темноте.



**Рисунок 1.** Спектр эмиссии ФЛ НАФ состава  $\text{NaYF}_4:\text{Yb:Tm/NaYF}_4$  при возбуждении светом с длиной волны 980 нм

Формальдегид удаляли, клетки трижды отмывали PBS и один раз деионизованной водой. Покровные стекла вынимали из лунок планшета, подсушивали, помещали в каплю глицерина и запаивали.

Оценку связывания комплексов с поверхностью целевых клеток проводили методом конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии с помощью системы Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO (Carl Zeiss, Германия). Импульсное возбуждение образцов осуществляли титан-сапфировым лазером Chameleon Vision II (Coherent, США) на длине волны 980 нм с частотой повторения 80 МГц и длительностью импульсов ~140 фс. ФЛ сигнал НАФ регистрировали с помощью 32-канального фотодетектора в спектральных диапазонах 446–486 нм и 768–850 нм. ФЛ сигнал НАФ на изображениях клеток количественно оценивали с помощью программы ImageJ (Version 1,47v, National Institutes of Health, США).

**Статистика.** Выполнение однофакторного дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) для количественной зависимой переменной по единственной факторной переменной. Использование анализа One-Way ANOVA для исследования разницы значений ФЛ сигнала на изображениях клеток SKOVip-kat после инкубации с комплексами НАФ-DARPin-LoPE от остальных трёх групп.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами было показано, что НАФ, легированные ионами лантаноидов иттербия и тулия, обладают выраженными максимумами эмиссии ФЛ в видимой (в районе 474 нм) и ближней инфракрасной (ИК) области спектра (в районе 801 нм) при возбуждении светом с длиной волны 980 нм (рис. 1). Что позволяет рассчитывать на чувствительную регистрацию ФЛ сигнала в слое биоткани глубиной до 10 мм [8].

Синтезированные НАФ гидрофобны, так как на их поверхности находятся остатки олеиновой кислоты (ОК). Один из путей получения стабильных водных коллоидов состоит в покрытии НАФ амфифильными полимерами. Гидрофобные части их молекул соединяются с остатками олеиновой кислоты, а гидрофильные части оказываются обращенными к внешней среде, преобразуя частицу в гидрофильную. Покрытие НАФ СМАОД позволяет добиться их коллоидной устойчивости и присоединять к ним дополнительные внешние модули [9].

В результате покрытия СМАОД была получена суспензия гидрофильных НАФ в фосфатно-солевом буфере. Частицы имели на поверхности карбоксильные группы – продукт гидролиза ангидридных групп СМАОД. В качестве второго слоя оболочки было выбрано покрытие ПЭГ, что помогает увеличить время циркуляции частиц в кровеносном русле [10].

Гидродинамический диаметр образца НАФ-СМАОД-ПЭГ, составил  $181 \pm 11$  нм при индексе полидисперсности (PDI) 0,1 (рис. 2).

Для получения комплексов к частицам НАФ-СМАОД-ПЭГ присоединяли адресный токсин DARPin-LoPE, обладающий специфичностью к рецептору эпидермального фактора роста человека HER2 и специфичной токсичностью в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих рецептор HER2 [11]. В роли цитотоксичного модуля в составе адресного токсина используется токсин бактериального происхождения LoPE, в молекуле которого инактивировано большинство иммунодоминантных эпитопов В-клеток человека, вследствие чего он обладает сниженной иммуногенностью [12].

Белок DARPin-LoPE содержал единичный остаток цистеина на С-конце полипептидной цепи. Конъюгация сульфгидрильной группы белка DARPin с аминокетонами НАФ-СМАОД-ПЭГ позволяет получать комплексы со строго определённой ориентацией белковых модулей на поверхности частиц. Это в свою очередь помогает сохранить функциональную активность белков и комплексов в целом.

В результате были получены комплексы НАФ-СМАОД-ПЭГ-DARPin-LoPE (далее по тексту НАФ-DARPin-LoPE) со средним гидродинамическим диаметром  $234,1 \pm 28,8$  нм (рис. 2). Дзета-потенциал полученного образца комплексов составил  $-54 \pm 9$  мВ, что говорит об их коллоидной устойчивости.

**Исследование взаимодействия комплексов НАФ-DARPin-LoPE с опухолевыми клетками.** Комплексы

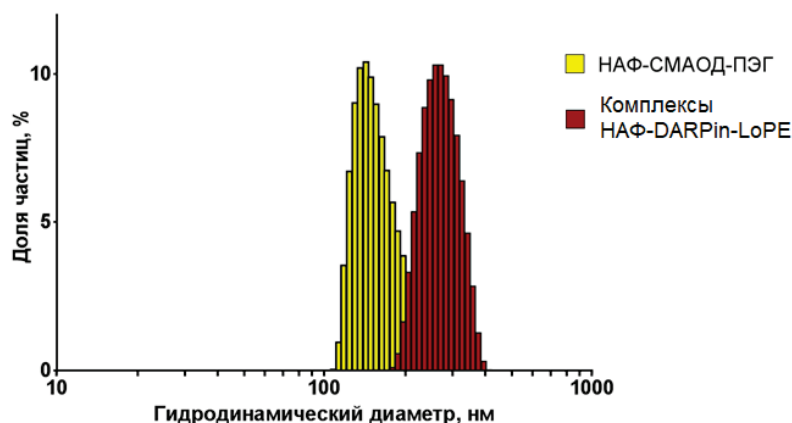


Рисунок 2. Распределение по размерам частиц HAФ-СМАОД-ПЭГ и комплексов HAФ-DARPin-LoPE

HAФ-DARPin-LoPE предназначены для таргетного воздействия на опухолевые клетки благодаря специфическому взаимодействию с молекулами-мишенями на их поверхности. В роли данных молекул выступает рецептор-онкомаркер HER2. Многие типы опухолей эпителиального происхождения имеют на своей поверхности гиперэкспрессированный рецептор HER2. Направляющий белок DARPin, входящей в состав комплекса и обладающей высокой аффинностью к рецептору эпидермального фактора роста, даёт возможность нацеливания комплекса на молекулу-мишень HER2 [12,13].

Для исследования специфичности связывания направленных комплексов HAФ-DARPin-LoPE с рецептором HER2 на поверхности клеток, в роли целевых клеток (HER2+) были использованы клетки аденокарциномы яичника человека SKOVip-kat, а в качестве контрольных (HER2-) использовали клетки аденокарциномы протоков молочной железы человека линии MCF-7.

На полученных микрофотографиях клеток SKOVip-kat (HER2+) после инкубации с комплексами хорошо видно накопление частиц на клетках (рис. 3). На микрофотографиях клеток MCF-7 (HER2-) после инкубации с комплексами накопление частиц в клетках не выражено, частицы располагаются хаотично (рис. 3). После инкубации клеток SKOVip-kat (HER2+) и MCF-7 (HER2-) с ненаправленными частицами HAФ-СМАОД-ПЭГ на поверхности клеток также не наблюдалось специфичного связывания частиц.

Для количественной оценки специфичности связывания комплексов HAФ-DARPin-LoPE с целевыми клетками был выполнен анализ интенсивности ФЛ сигнала HAФ в области расположения клеток на полученных микроскопических изображениях (рис. 4). На графике показано, что разница значений ФЛ сигнала на изображениях клеток SKOVip-kat после инкубации с комплексами HAФ-DARPin-LoPE отличается от остальных трёх групп ( $p=0,0033 < 0,05$ ), что подтверждает достоверность проведенного исследования.

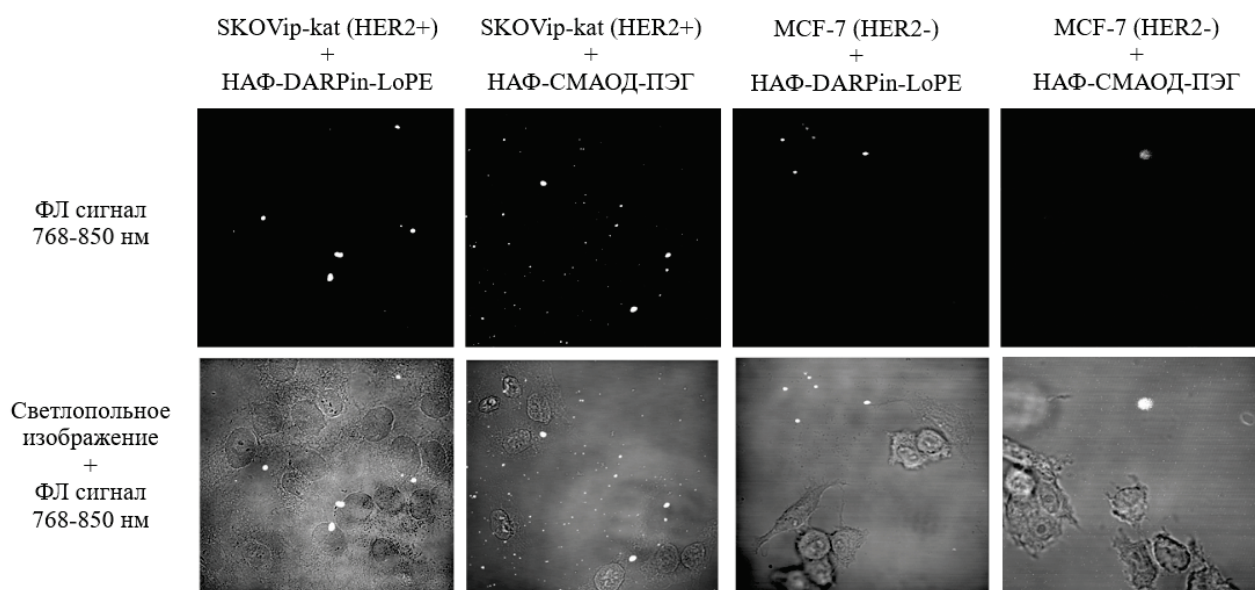
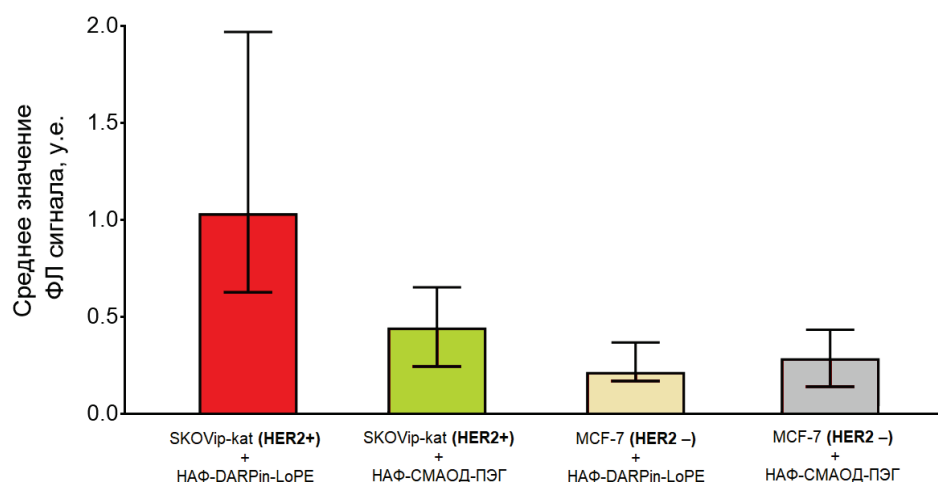


Рисунок 3. Микрофотографии, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии: клетки SKOVip-kat (HER2+) и MCF-7 (HER2-), инкубированные на протяжении 1 ч с комплексами HAФ-DARPin-LoPE и ненаправленными частицами HAФ-СМАОД-ПЭГ



**Рисунок 4.** Медианы значений интенсивности ФЛ сигнала НАФ в группах изображений клеток SKOVip и MCF-7 после инкубации с комплексами НАФ-DARPin-LoPE и ненаправленными частицами НАФ-СМАОД-ПЭГ. Планки погрешностей представлены интерквартильным размахом

Проведенное исследование показало специфичность накопления комплексов НАФ-DARPin-LoPE на клетках, характеризующихся гиперэкспрессией рецептора-онкомаркера HER2. Это достигается благодаря направляющему модулю DARPin, входящему в состав комплекса. Токсический модуль LoPE в свою очередь, позволит осуществлять направленное токсическое воздействие на целевые опухолевые клетки.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Путём последовательного ковалентного присоединения модулей были получены коллоидно стабильные тераностические наноконструкции НАФ-DARPin-LoPE, обладающие антистоксовой ФЛ и адресной направленностью в отношении HER2-гиперэкспрессирующих опухолевых клеток. Последующее исследование специфичности присоединения полученных комплексов к поверхности опухолевых клеток линии аденокарцинома яичника человека SKOVip-kat, гиперэкспрессирующих рецептор HER2, показали специфичное связывание НАФ-DARPin-LoPE с поверхностью HER2+ клеток SKOVip-kat. Связывание наноконструкций с HER2- клетками MCF-7 было выражено в значительно меньшей степени. Что позволяет заключить, что тераностические комплексы благодаря направляющему модулю DARPin способны избирательно связываться с опухолевыми клетками, гиперэкспрессирующими рецептор HER2. Полученные результаты позволяют рассчитывать на применение наноконструкций на основе НАФ и бифункциональных белков для задач тераностики.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» ННГУ (Проект № Н-418-99\_2022-2023).*

### Список литературы / References:

1. Jeelani S., Jagat Reddy R.C., Maheswaran T., Asokan G.S., Dany A., Anand B. Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2014, vol. 6, no. suppl. 1, pp. S6-8.
2. Aires A., Ocampo S.M., Cabrera D., Cueva L., Salas G., Teran F.J., Cortajarena A.L. BSA-Coated Magnetic 650 Nanoparticles for Improved Therapeutic Properties. *Journal of Materials Chemistry*, 2015, vol. 3, pp. 6239-6247.
3. Farokhzad O.C., Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 2009, vol. 3, no. 1, pp. 16-20.
4. Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry, and applications in Theranostics. *Chemical Reviews*, 2014, vol. 114, no. 10, pp. 5161-5214.
5. Binz H.K., Amstutz P., Pluckthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat. Biotechnology*, 2005, vol. 23, pp. 1257-1268.
6. Dickerson E.B., Dreaden E.C., Huang X.H., El-Sayed I.H., Chu H.H., Pushpanketh S., McDonald J.F., El-Sayed M.A. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Letters*, 2008, vol. 269, pp.57-66.
7. Huh M.S., Lee S.Y., Park S., Lee S., Chung H., Lee S., Choi Y., Oh Y.K., Park J.H., Jeong S.Y., Choi K., Kim K., Kwon I.C. Tumor-homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, 2010, vol. 144, pp. 134-143.
8. Chen G.Y., Shen J., Ohulchanskyy T.Y., Patel N.J., Kutikov A., Li Z.P., Song J., Pandey R.K., Agren H., Prasad P.N., Han G. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, pp. 8280-8287.
9. 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.

Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle biocomplexes. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, vol. 18, iss. 7, p. 76004.

10. Andreani T., Souza A.L., Kiill C.P., Lorenzon E.N., Fanqueiro J.F., Calpena A.C., Chaud M.V., Garcia M.L., Gremiao M.P., Silva A.M., Souto E.B. Preparation and characterization of PEG-coated silica nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, vol. 473, no. 1-2, pp. 627-635.

11. Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Лебеденко Г.М., Деев С.М. Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. *Молекулярная биология*, 2015, т. 7, № 3, с. 126-132. [Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko G.M., Deev S.M. Internalization and recirculation of HER2 receptor during interaction of targeted phototoxic protein DARPIn-miniSOG with human breast adenocarcinoma cells. *Russ. Molecular Biology*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 126-132. (In Russ.)]

12. Proshkina G.M., Kiseleva D.V., Shilova, O.N., Ryabova, A.V., Shramovaa, E.I., Stremovskiya, O.A., Deyev S.M. Bifunctional Toxin DARP-LoPE Based on the Her2-Specific Innovative Module of a Non-Immunoglobulin Scaffold as a Promising Agent for Theranostics. *Journal of Molecular Biology*, 2017, vol. 51, pp. 997-1007.

13. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. HER2-Specific Targeted Toxin DARPIn-LoPE: Immunogenicity and Antitumor Effect on Intraperitoneal Ovarian Cancer Xenograft Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, p. 2399.

### SYNTHESIS OF LUMINESCENT THERANOSTIC NANOCOMPLEXES BASED ON UPCONVERSION NANOPARTICLES AND RECOMBINANT PROTEINS

Bausheva D.K.<sup>1</sup>, Shilyagina N.Yu.<sup>1</sup>, Vodenev V.A.<sup>1</sup>, Deev S.M.<sup>2,3</sup>, Zvyagin A.V.<sup>1,3,4</sup>, Guryev E.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky University

Gagarin ave., 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia; e-mail: bausheva16@mail.ru

<sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS

Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

Bol'shaya Pirogovskaya st., 2/4, Moscow, Russia, 119435

<sup>4</sup>Macquarie University, Sydney, Australia

Balaclava Rd, Macquarie Park NSW 2109, Sydney, Australia

Received 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpbc.2022.0573

**Abstract.** Theranostics is a rapidly developing field of biomedicine, aimed at the development of multifunctional agents with diagnostic and therapeutic properties simultaneously. This work describes the production of HER2-specific theranostic nanocomplexes based on upconversion nanoparticles and bifunctional proteins. Inorganic nanocrystals of the  $\text{NaY}_{0.794}\text{Yb}_{0.2}\text{Tm}_{0.006}\text{F}_4/\text{NaYF}_4$  core/shell structure were used as a platform for the assembly of the multifunctional complex. Upconversion nanoparticles (UCNP) were shown to have pronounced maxima of photoluminescence emission in the visible and infrared regions of the spectrum, which provides effective in vivo imaging of cells and tissues by optical imaging methods. Covering UCNP with additional shells allows achieving their colloidal stability and attaching additional external modules to them. The recombinant targeting toxin DARPIn-LoPE, which has specific toxicity against tumor cells expressing the HER2 receptor, was used as a therapeutic module of the nanocomplexes. The theranostic complex NAF-DARPIn-LoPE was shown to be able to selectively bind to tumor cells hyperexpressing the HER2 receptor due to the DARPIn guide module included in its composition.

**Key words:** upconversion nanoparticles, DARPIn-LoPE, theranostic, oncology.