



## ДОСТАВКА БАРНАЗЫ К КЛЕТКАМ В СОСТАВЕ ЛИПОСОМ, ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ HER2-СПЕЦИФИЧНЫМ МОДУЛЕМ DARPIn

© 2020 г. В. О. Шипунова\*, Е. И. Шрамова\*, А. А. Шульга\*,  
М. В. Шилова\*, С. М. Деев\*, Г. М. Прошкина\*.\* #

\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 19.04.2020 г.

Принята к публикации 21.04.2020 г.

Впервые показана возможность липосомальной формы доставки рибонуклеазы барназы к HER2-положительным раковым клеткам человека с целью их селективного уничтожения. Принцип загрузки липосом рибонуклеазой основан на электростатическом взаимодействии белка с внутренней поверхностью липосом. Специфичность липосом к поверхностному клеточному рецептору HER2 определяется наличием анти-HER2-адресного модуля DARPIn на внешней мембране липосом. Показано, что специфическая в отношении HER2-положительных клеток цитотоксичность определяется именно наличием адресного HER2-специфичного модуля на поверхности липосом, а выраженность цитотоксического эффекта коррелирует с уровнем экспрессии рецептора HER2 на клеточной мембране.

*Ключевые слова:* адресная доставка, барназа, липосомы, DARPIn

DOI: 10.31857/S0132342320060305

### ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ, в структуре смертности населения планеты смерть от онкологических заболеваний занимает вторую строчку, являясь причиной каждой шестой смерти на земле. Именно поэтому, несмотря на большое количество подходов к терапии онкологических заболеваний, поиск новых форм цитотоксических агентов, обладающих минимальными побочными эффектами при максимальной цитотоксичности, равно как и поиск способов снижения вводимых доз цитотоксического агента, продолжает оставаться актуальной задачей.

В этом свете терапия, основанная на белковых препаратах (антителах, белковых токсинах, ферментах, цитокинах), приобретает ведущую роль в современных медико-биологических исследованиях [1]. Неразрывно с этим встает вопрос доставки белкового препарата к клетке-мишени, поскольку, находясь в кровотоке, препарат может проявлять низкую стабильность, подвергаться быстрому протеолизу в плазме, обладать ограниченной способностью проникать через клеточную

мембрану и т.д. Благодаря бурному развитию нанотехнологических подходов, для доставки белков к мишеням организма в руках ученых появились такие наноносители, как липосомы, полимерные наногели, наночастицы различного состава [2–6]. Несомненным лидером среди наноносителей по доставке лекарств являются липосомы. Способность липосом инкапсулировать белки, их высокая биосовместимость, низкая токсичность, регулируемый размер, определяют их уникальные свойства в качестве носителя для доставки биологически активных соединений. Кроме того, ковалентное присоединение лигандов (антител, белков, углеводов) к липосомной мембране обеспечивает специфическую доставку липидных везикул к клеткам-мишеням.

В качестве адресов, специфичных к определенным поверхностным рецепторам раковых клеток, сегодня все большее внимание уделяется инновационным рецептор-специфичным скаффолдным белкам неиммуноглобулиновой природы – аффибоди, авимеры, аднектины, антикалины, аптамеры и DARPins-белки [7]. DARPins-белки (Design Ankyrin Repeat Proteins) являются альтернативой антителам, не уступают им в аффинности, не содержат остатков цистеина в своей струк-

# Автор для связи: (тел.: + 7(495) 335-37-88; эл. почта: gmb@ibch.ru).

туре, отличаются высоким уровнем экспрессии в бактериальной системе, являются мономерами в растворе, не склонны к агрегации и характеризуются высокой устойчивостью к протеазам [8].

В качестве токсического компонента в противораковой терапии одними из наиболее перспективных средств на сегодняшний день являются белки различного происхождения, нарушающие метаболические процессы непосредственно внутри клетки-мишени, такие как рибонуклеазы, рибин, лектин и т.д. [9, 10]. Так, например, на основе рибонуклеазы барназы из *Bacillus amyloliquefaciens* получено большое количество адресных иммунотоксиков, эффективных *in vitro* и *in vivo* [11, 12].

В данной работе были получены липосомы, нагруженные рибонуклеазой барназой, обладающие специфичностью по отношению к поверхностному клеточному рецептору HER2 за счет наличия анти-HER2-адресного модуля DARPIn на внешней мембране липосом. На сегодняшний день это первая работа по доставке барназы к раковым клеткам в составе липосомального препарата.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы разработали методику синтеза мономерных липосомальных HER2-специфичных препаратов диаметром 100 нм, нагруженных цитотоксическим компонентом – фрагментом А псевдомонадного экзотоксина [3]. Данная методика позволяет включать в липосому большое количество молекул белка (порядка 2000) за счет электростатического взаимодействия между белком и внутренней поверхностью липосомы, а функционализация внешней поверхности липосомы HER2-специфичным модулем DARPIn обеспечивает избирательную цитотоксичность препарата.

Поверхностный клеточный рецептор HER2 сверхэкспрессируется в 20–30% опухолей молочной железы и яичников [13–15]. Как правило, сверхэкспрессия этого рецептора коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли и активным метастазированием [16, 17].

Сверхэкспрессия HER2 при злокачественной трансформации клетки делает его привлекательной мишенью для адресной терапии рака [18], поскольку в норме HER2 экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток в небольших количествах.

В данной работе было показано, что принцип загрузки липосом белком, основанный на электростатическом взаимодействии, эффективен, в частности, для рибонуклеазы барназы.

Гены белков DARPIn и барназы экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) по методу аутоиндукции. Аутоиндукционная среда, благодаря

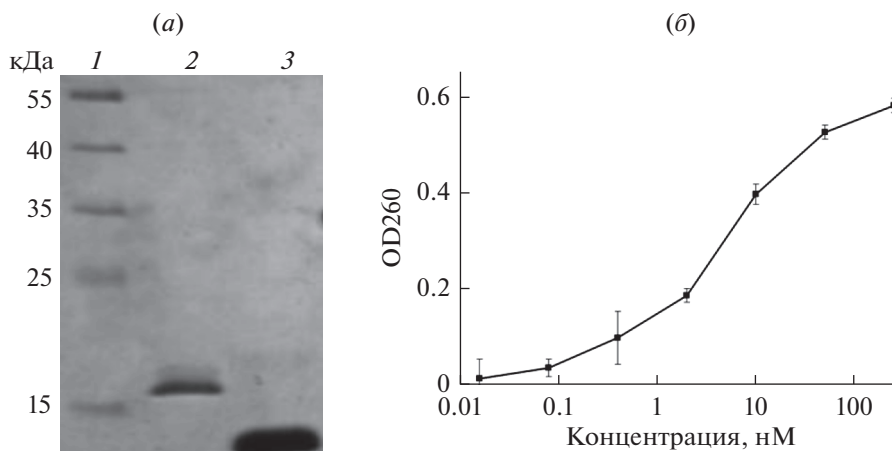
наличию эквимольных концентраций гидрофосфата натрия и дигидрофосфата калия, препятствует закислению культуральной среды в результате метаболизма бактерий и обеспечивает поддержание нейтрального pH даже при достижении культурой высоких плотностей ( $OD_{600} \sim 10$ ). Сбалансированные концентрации глюкозы, лактозы и глицерина, а также высокая интенсивность перемешивания культуры (~250 об./мин) позволяют индуцировать экспрессию гена целевого белка автоматически (при истощении в среде глюкозы), не прибегая к контролю плотности культуры.

Белки очищали с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, как описано в “Экспериментальной части”. Электрофоретический анализ очищенных белков показал, что их молекулярная масса соответствует расчетной (18 кДа для DARPIn и 12 кДа барназы), а чистота белка удовлетворяет требованиям работы с культурами клеток эукариот (рис. 1а).

Поскольку методика очистки барназы включает этап денатурации и рефолдинга (для разрушения комплекса барназа-барстар), о сохранении функциональной активности барназы судили по ее способности гидролизовать РНК. РНКазную активность барназы определяли методом кислотнорастворимого осадка РНК [19]. Согласно [19], 1 единица рибонуклеазной активности в исследуемой пробе вызывает приращение  $OD_{260}$  на 1 единицу. Таким образом, энзиматическая активность очищенного препарата барназы, определенная данным методом, составляет  $93.5 \times 10^6$  ед. акт./М.

Как отмечалось выше, принцип загрузки липосом белками основан на электростатическом взаимодействии положительно заряженного белка (для барназы pI 9.4, рабочий буфер для загрузки – pH 7.5) с отрицательно заряженной поверхностью мембраны липосомы. Метод инкапсуляции белка в липосому включал: электростатическое связывание белка с фосфолипидами, процедуру 5-кратного замораживания-оттаивания, экстракцию суспензии через 100-нм поликарбонатный фильтр, хроматографическую очистку протеолипосом от невключенного белка при умеренно щелочном pH и высокой ионной силе (pH 7.5, 200 mM NaCl). В этих условиях молекулы белка диссоциируют от внешней поверхности липосом.

Функционализацию протеолипосом адресным модулем DARPIn осуществляли в три стадии как описано в “Экспериментальной части”: 1. Введение с помощью реагента Траута (2-иминотиолан) SH-групп в липиды, содержащие первичные амины (фосфатидиламин); 2. Модификация аминок групп DARPIn кросс-сшивающим реагентом сульфо-EMCS (N-ε-малеимидокапроил-оксисульфосукцинимидный эфир); 3. Ковалентное присоедине-



**Рис. 1.** Характеристика белков DARPin и барназы. (а) результат электрофоретического разделения белков в 13.5% ПААГ после металл-хелатной аффинной хроматографии. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс Page Ruler Prestained Protein (“Thermo Fisher”, США), 2 – DARPin, 3 – барназа. (б) РНКазная активность барназы, определенная методом кислотно-нерастворимого осадка. Большим значениям оптической плотности ( $OD_{260}$ ) соответствует большая ферментативная активность белка.

ние Траут-модифицированных липосом к сульфо-EMCS-модифицированному белку.

Размер и поверхностный заряд адресных (DARPin-Lip-Bn) и безадресных (Lip-Bn) липосом, нагруженных барназой, определяли методом динамического и электрофоретического светорассеяния (рис. 2а–2в). Гидродинамический размер составил  $108 \pm 36$  нм для Lip-Bn и  $117 \pm 41$  нм для DARPin-Lip-Bn (рис. 2а, 2б),  $\zeta$ -потенциал:  $-35.9 \pm 0.3$  мВ для Lip-Bn и  $-49.5 \pm 2$  мВ для DARPin-Lip-Bn (рис. 2в). Эти данные однозначно доказывают высокую эффективность химической конъюгации адресного модуля DARPin с поверхностью липосом (незначительное увеличение размера и уменьшение  $\zeta$ -потенциала), а также свидетельствуют о сохранении коллоидной стабильности полученных конъюгатов в солевых растворах.

Способность моноламиллярных липосом, нагруженных барназой и функционализованных адресным модулем DARPin, селективно взаимодействовать с рецептором HER2 на поверхности HER2-положительных клеток и вызывать их гибель была изучена стандартным методом МТТ *in vitro* на двух клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека, характеризующихся различным уровнем экспрессии рецептора HER2: SK-BR-3 – высокий уровень экспрессии, MDA-MB-231 – низкий уровень экспрессии.

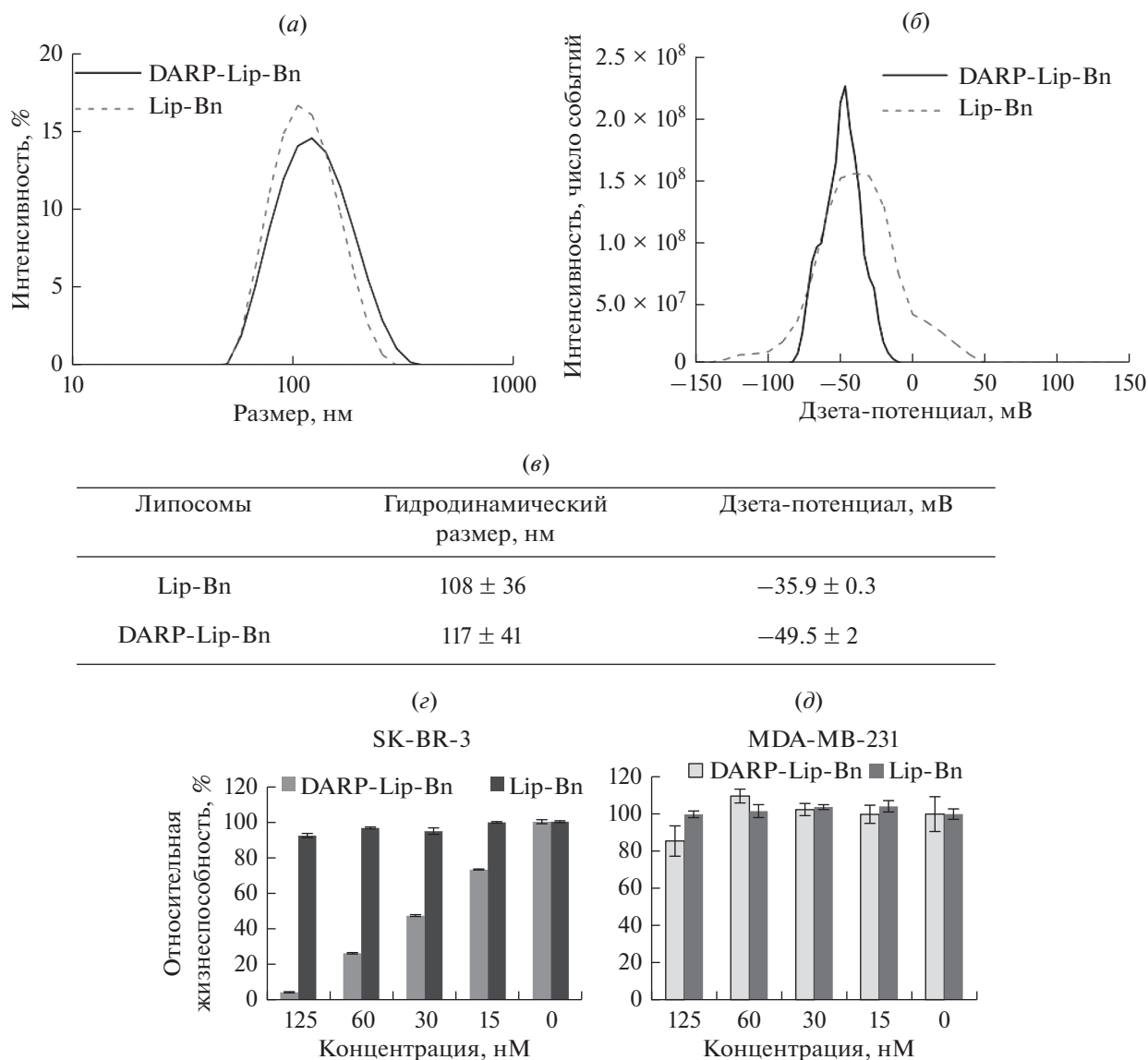
Показано, что адресные липосомы, нагруженные барназой, эффективно подавляют жизнеспособность HER2-положительных клеток SK-BR-3 ( $IC_{50} = 47.5$  нМ) (рис. 2г). Жизнеспособность клеток MDA-MB-231, характеризующихся нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2, в проанализированном диапазоне концентраций

отличается слабой чувствительностью к препарату (14.5% смертности при максимально использованной концентрации адресных липосом, нагруженных барназой). Отметим, что безадресные липосомы, нагруженные барназой, цитотоксичностью не обладают (рис. 2д). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что специфическая в отношении HER2-положительных клеток цитотоксичность определяется именно наличием адресного HER2-специфичного модуля на поверхности липосом, а выраженность цитотоксического эффекта коррелирует с уровнем экспрессии рецептора HER2 на клеточной мембране.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Экспрессия, выделение и очистка белков.** Экспрессию целевых белков DARPin и барназы проводили в штамме BL21(DE3) *E. coli* по методу аутоиндукции [20]. Свежие трансформанты (из расчета одна колония на 1 мл среды) инокулировали в 50 мл среды, содержащей 1% дрожжевого экстракта, 1% триптона, 25 мМ  $Na_2HPO_4$ , 25 мМ  $KH_2PO_4$ , 100 мМ NaCl, 2 мМ  $MgCl_2$  и 0.1 г/л ампициллина. Растили 24 ч при 25°C в условиях интенсивной аэрации. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 6000 g и 4°C. Для того, чтобы иметь возможность очистить белки с помощью металл-аффинной хелатной хроматографии, в последовательностях белков была предусмотрена гексагистидиновая метка.

Выделение барназы проводили следующим образом. Осадок клеток ресуспендировали в буфере Т2 (200 мМ NaCl, 30 мМ  $NaH_2PO_4$ , 2 мМ Tris-HCl, pH 8.3), клетки разрушали на ледяной бане с помо-



**Рис. 2.** Функциональная характеристика липосомных комплексов. (а) распределение по размерам адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, полученное методом динамического светорассеяния. (б) распределение по  $\zeta$ -потенциалам адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, полученное методом электрофоретического светорассеяния. (в) гидродинамический размер и  $\zeta$ -потенциал адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой. (е, д) относительная жизнеспособность клеток с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 после их обработки липосомальными препаратами в течение 72 ч.

стью ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин. Супернатант пропускали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм и наносили на колонку Ni<sup>2+</sup>-NTA Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) согласно протоколу производителя. Белки, не связавшиеся с сорбентом, удаляли при промывании колонки буфером T2. Ингибитор барназы барстар, сопутствующий всем рекомбинантным белкам, содержащим барназный модуль, удаляли раствором 6 M гуанидинхлорида в буфере T2. Ренатурацию проводили в нисходящем градиенте гуа-

нидинхлорида. После полного замещения буфера с гуанидинхлорида на буфер T2, белки элюировали буфером T2 с 150 mM имидазолом.

Для выделения DARPin клеточный осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 0.3 M NaCl, 20 mM Na-фосфат, 30 mM имидазол, 0.5 мг/мл лизоцим (pH 8.0). Клетки разрушали ультразвуком на ледяной бане. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 g, 25 мин, 4°C. Супернатант пропускали через 0.22-мкм фильтр и наносили на колонку Ni<sup>2+</sup>-NTA HisTrap column (GE Healthcare, USA), уравновешенную связы-

вающим буфером (0.3 М NaCl, 30 мМ имидазол, 20 мМ Na-фосфат, pH 8.0). Колонку промывали 20 объемами связывающего буфера, после чего проводили элюцию целевого белка градиентом имидазола от 0.1 до 0.5 М.

Аутентичность полученных белков доказывали с помощью электрофореза в ПААГ.

**Характеристика РНКазной активности барназы.** Энзиматическую активность барназы определяли методом кислотно-нерастворимого осадка РНК [19]. Исследуемую пробу белка растворяли в концентрации 1.25 мкМ в 0.125 М Tris-HCl, pH 8.5 и затем получали серию последовательных 5-кратных разведений образца в том же буфере. В качестве контрольного образца использовали раствор 0.125 М Tris-HCl, pH 8.5. К 40 мкл каждого образца добавляли 160 мкл раствора дрожжевой РНК (в концентрации 2 г/л) в 0.125 М Tris-HCl, pH 8.5 на льду. Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37°C. Если исследуемая проба обладала рибонуклеазной активностью, то в реакционной смеси образовывалась смесь фрагментов РНК различной длины: в образцах с высокой концентрацией РНКазы преобладали мононуклеотиды, в образцах с низкой концентрацией РНКазы – нерасщепленные полинуклеотиды. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл холодной 6% хлорной кислоты и инкубировали смесь 15 мин при 0°C. При инкубации с хлорной кислотой большие фрагменты РНК образуют осадок, который осаждали центрифугированием при 16000 g в течение 10 мин при 0°C. Супернатанты разбавляли в 10 раз и измеряли оптическую плотность при 260 нм ( $OD_{260}$ ) относительно контрольного образца. Большим значениям оптической плотности соответствовала большая рибонуклеазная активность.

**Получение липосом, нагруженных барназой и модифицированных адресным модулем DARPin по внешней поверхности липидной мембраны.** Для приготовления суспензии липидов 0.2 г L- $\alpha$ -фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, Soy 40%), содержащего 16% фосфатидилэтаноламина, растворяли в 10 мл воды и выдерживали 16–20 ч при комнатной температуре. Затем суспензию пропускали через 0.8 мкм фильтр и хранили при 4°C.

0.5 мл суспензии фосфолипидов смешивали с 0.5 мл барназы (40 мг/мл) в буфере 20 мМ Na-фосфат (pH 7.5). Белково-липидную суспензию подвергали пятикратной процедуре замораживания-оттаивания, после чего, используя экструдер Avanti Mini Extruder, 19 раз пропускали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм. Липосомы отделяли от избытка барназы на колонке Sepharose CL-2B (10 × 35 мм), уравновешенной 10 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5), содержащим 0.2 М NaCl.

**Ковалентное присоединение DARPin к внешней поверхности липосом.** Ковалентное присоединение DARPin к внешней поверхности мембраны липосом включало присоединение SH-групп к первичным аминам фосфатидилэтаноламина с использованием реагента Траута (2-иминотиолан) и последующую кросс-сшивку с адресным модулем DARPin, модифицированного по аминогруппам билинкером сульфо-EMCS (N- $\epsilon$ -малеимидокапроил-окисульфосукцинимидный эфир). Липосомы, нагруженные барназой, инкубировали с 6 М реагентом Траута в 100 мМ Na-фосфатном буфере (pH 8.0) в течение часа при комнатной температуре. Инкубационную смесь очищали от избытка реагента на колонке NAP-5 (GE Healthcare, USA), уравновешенной 100 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5).

DARPin (5 мг/мл) инкубировали с 3-кратным избытком сульфо-EMCS в течение 45 мин при комнатной температуре. От избытка сульфо-EMCS избавлялись, пропуская смесь через колонку NAP-5 (GE Healthcare, USA), уравновешенную 100 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5). DARPin, конъюгированный с сульфо-EMCS, смешивали с липосомами, модифицированными реагентом Траута, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. От не связавшегося с поверхностью липосом DARPin, смесь очищали с использованием колонки Sepharose CL-2B (10 × 35 мм), уравновешенной 20 мМ Na-фосфатным буфером (pH 7.5).

**Измерение размера и  $\zeta$ -потенциала липосом.** Гидродинамический размер и  $\zeta$ -потенциал адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, определяли с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) в 10 мМ KNO<sub>3</sub> при температуре 25°C. Измерения проводили в триплетах.

**Культивирование эукариотических линий.** В работе использовали следующие клеточные линии: SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека, номер по каталогу ATCC – HTB-30), MDA-MB-231 (карцинома молочной железы человека, номер по каталогу ATCC – HTB-26).

Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Изучение цитотоксичности HER2-специфичного токсина *in vitro*.** Для изучения цитотоксичности адресных и безадресных липосом, нагруженных барназой, клетки высевали по 100 мкл на лунку в 96-луночные планшеты (Eppendorf) из стока  $3.5 \times 10^4$  (SK-BR-3) или  $2 \times 10^4$  (MDA-MB-231) клеток/мл и культивировали в течение ночи. После этого ростовую среду в лунках заменяли на

свежую, содержащую различные концентрации липосомальных препаратов, клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч.

Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ [21]. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными клетками (контроль), выраженное в процентах. Расчет IC<sub>50</sub> (концентрация препарата, снижающая жизнеспособность клеток в 2 раза относительно контроля) определяли методом нелинейной регрессии с использованием программы Excel.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00112).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Leader B., Baca Q.J., Golan D.E.* // Nat. Rev. Drug Discov. 2008. V. 7. P. 21–39. <https://doi.org/10.1038/nrd2399>
2. *Gu Z., Biswas A., Zhao M., Tang Y.* // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 3638–3655. <https://doi.org/10.1039/c0cs00227e>
3. *Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A.* // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2018. V. 130. P. 296–305. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.026>
4. *Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babynyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P.* // Nanoscale. 2019. V. 11. P. 1636–1646. <https://doi.org/10.1039/c8nr07730d>
5. *Belogurov A.A., Jr., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., Boyko A.N., Dubina M.V., Friboulet A., Genkin D.D., Gabibov A.G.* // FASEB J. 2013. V. 27. P. 222–231. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213975>
6. *Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., Friboulet A., Gabibov A.G.* // Mol. Immunol. 2009 V. 47. P. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.020>
7. *Vazquez-Lombardi R., Phan T.G., Zimmermann C., Lowe D., Jermutus L., Christ D.* // Drug Discov. Today. 2015. V. 20. P. 1271–1283. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.09.004>
8. *Shilova O.N., Deyev S.M.* // Acta Naturae. 2019. V. 11. P. 42–53. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-42-53>
9. *Frankel A.E., Woo J.-H., Neville D.M.* // Principles of Cancer Biotherapy. 2009. P. 407–449. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2289-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2289-9_11)
10. *Шрамова Е.И., Деев С.М., Прошкина Г.М.* // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 664–668. [*Shramova E.I., Deyev S.M., Proshkina G.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 755–758.] <https://doi.org/10.1134/S0132342318060106>
11. *Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G.V., Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* // PLoS One. 2008. V. 3. P. e2434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002434>
12. *Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N.V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M.* // Invest New Drugs. 2011. V. 29. P. 22–32. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9329-2>
13. *Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L.* // Science. 1987. V. 235. P. 177–182. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>
14. *Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A., et al.* // Science. 1989. V. 244. P. 707–712. <https://doi.org/10.1126/science.2470152>
15. *Шрамова Е.И., Прошкина Г.М., Деев С.М.* // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. С. 267–277. [*Shramova E.I., Proshkina G.M., Deyev S.M.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2018. V. 44. P. 279–288.] <https://doi.org/10.7868/S0132342318030028>
16. *Holbro T., Hynes N.E.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. V. 44. P. 195–217. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440>
17. *Yan M., Schwaedeler M., Arguello D., Millis S.Z., Gatalica Z., Kurzrock R.* // Cancer Metastasis Rev. 2015. V. 34. P. 157–164. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9552-6>
18. *Kuzichkina E.O., Shilova O.N., Deyev S.M.* // Acta Naturae. 2018. V. 10. P. 87–94. <https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-87-94>
19. *Rushitzky G.W., Greco A.E., Hartley R.W., Sober H.A.* // Biochemistry. 1963. V. 2. P. 787–793. <https://doi.org/10.1021/bi00904a028>
20. *Studier F.W.* // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
21. *Mosmann T.* // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

## Delivery of Barnase to Cells in Liposomes Functionalized by HER2-Specific DARPIn Module

V. O. Shipunova\*, E. I. Shramova\*, A. A. Schulga\*,  
M. V. Shilova\*, S. M. Deyev\*, and G. M. Proshkina\*, #

#Phone: + 7(495) 335-37-88; e-mail: gmb@ibch.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

In this work for the first time we demonstrate the possibility of ribonuclease barnase delivery to HER2-positive human cancer cells in a liposomal form. The principle of loading liposomes with ribonuclease is based on the electrostatic interaction of the protein with the inner surface of the liposomes. The specificity of liposomes to the HER2-receptor is determined by the presence of the anti-HER2-address module DARPIn on the outer membrane of the liposome. It was shown that cytotoxicity specific for HER2-positive cells is determined precisely by the presence of an address HER2-specific module on the surface of liposomes, and the severity of the cytotoxic effect correlates with the level of expression of the HER2 receptor on the cell membrane.

*Keywords: targeted delivery, barnase, liposomes, DARPIn*