

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Розенкранц Андрей Александрович**

**Многофункциональные наноконструкции для направленного  
внутриклеточного транспорта терапевтических средств в раковые  
клетки**

03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:

д.б.н., проф., чл.-корр. РАН А.С. Соболев

Москва, 2021 год

## Оглавление

Список сокращений.....	7
1. Введение.....	9
Основная часть.....	28
2. Обзор литературы.....	28
2.1. Типы терапевтических средств, нуждающихся во внутриклеточной адресной доставке .....	28
2.2. Пути проникновения в клеточные компартменты .....	33
2.3. Использование рецептор-опосредованного эндоцитоза: решение одних проблем и возникновение других.....	34
2.4. Меланокортиновый рецептор 1 типа.....	42
2.4.1. Эндоцитоз и внутриклеточное распределение MC1R.....	44
2.4.2. Взаимодействие MC1R с внутриклеточными регуляторами .....	45
2.4.3. Регуляция экспрессии MC1R.....	45
2.4.4. Экспрессия MC1R в тканях. ....	46
2.4.5. Роль MC1R в образовании, развитии и предотвращении появления меланом. ....	47
2.4.6. Природные лиганды меланокортиновых рецепторов. ....	50
2.4.7. Разработка диагностических и лекарственных средств на основе $\alpha$ -МСГ и его аналогов для лечения меланомы. ....	51
2.5. Рецептор эпидермального фактора роста.....	54
2.5.1. EGFR как компонент сигнальной сети .....	55
2.5.2. Природные лиганды EGFR .....	58
2.5.3. Эндоцитоз и внутриклеточный транспорт EGFR.....	60
2.5.4. Транспорт EGFR в ядро .....	64
2.5.5. Экспрессия EGFR при онкологических заболеваниях.....	65
2.5.6. Успехи и ограничения направленной блокировки сигнального пути EGFR.....	68
2.5.7. Использование EGFR для доставки .....	73
2.5.7.1. Наночастицы для доставки через EGFR .....	74
2.5.7.2. Радионуклидная терапия, направленная на EGFR.....	79
2.5.7.3. Иммунотоксины, направленные на EGFR.....	81
2.5.7.4. Доставка фотосенсибилизаторов с использованием EGFR .....	83
2.5.7.5. Генотерапевтические подходы с использованием EGFR.....	83
2.6. Рецептор фолата .....	84
2.6.1. Типы фолатных рецепторов.....	84
2.6.2. Экспрессия фолатных рецепторов при онкологических заболеваниях.....	85
2.7. Использование эндоцитоза и выход из эндосом .....	87
2.8. Доставка в ядро.....	93
2.8.1. Использование ядра в качестве мишени противоопухолевых средств .....	93
2.8.2. Комплекс ядерной поры.....	95

2.8.3.	Использование сигнала ядерной локализации для доставки в ядро.....	97
3.	Материалы и методы исследования .....	100
3.1.	Культуры клеток .....	100
3.2.	Синтез конъюгата (БСА)-(хлорин $e_6$ )-инсулин.....	100
3.3.	Синтез конъюгата БСА-(хлорин $e_6$ )-(СЯЛ Р11К)-инсулин .....	101
3.4.	Синтез конъюгатов БСА-(СЯЛ Р101К)-(хлорин $e_6$ )-инсулин и БСА-(СЯЛ Р101Т)-(хлорин $e_6$ )-инсулин. ....	102
3.5.	Синтез конъюгатов ( $\beta$ -галактозидаза-СЯЛ)-инсулин-(хлорин $e_6$ ) и ( $\beta$ -галактозидаза)-инсулин-(хлорин $e_6$ ) .....	102
3.6.	Присоединение $^{211}\text{At}$ к полипептидным конъюгатам.....	104
3.7.	Исследование цитотоксического действия астатинированного конъюгата Р10-инсулин.....	105
3.8.	Исследование влияния аденовирусов на целостность бислойных мембран.....	105
3.9.	Определение выживаемости клеток.....	105
3.10.	Конструирование модульных плазмид, кодирующих МНТ .....	106
3.11.	Определение биологической активности лигандов для меланокортинового рецептора первого типа (МС1R) .....	109
3.12.	Видеоинтенсификационная микроскопия (ВИМ).....	109
3.13.	Получение липосом.....	109
3.14.	Получение 2',7'-дихлордигидрофлуоресцина и 2',7'-дихлорфлуоресцеина .....	110
3.15.	Радиолигандный анализ.....	110
3.15.1.	Мечение белков $^{125}\text{I}$ .....	110
3.15.2.	Определение количества рецепторов к ЭФР и МНТ на поверхности клеток и констант сродства радиоактивно меченых ЭФР и МНТ к рецепторам .....	111
3.15.3.	Исследование конкурентного связывания лигандов с EGFR.....	112
3.16.	Определение мембранолитического действия рекомбинантных белков на липосомы .....	113
3.17.	Выделение импортинов .....	114
3.18.	Исследование сродства МНТ к комплексу импортинов с помощью иммуноферментного анализа .....	114
3.19.	Исследование сродства МНТ к комплексу импортинов с помощью поверхностного плазмонного резонанса .....	115
3.20.	Синтез и очистка конъюгатов МНТ с ФС.....	116
3.21.	Получение препаратов МНТ меченных $^{67}\text{Ga}$ .....	116
3.22.	Исследование кинетики поверхностного связывания, накопления и удержания [ $^{125}\text{I}$ ]-СГМИБ-МНТ и [ $^{67}\text{Ga}$ ]-НОТА-МНТ в клетках .....	118
3.23.	Исследование кинетики транспорта [ $^{125}\text{I}$ ]-СГМИБ-МНТ и [ $^{67}\text{Ga}$ ]-НОТА-МНТ в ядра клеток эпидермоидной карциномы человека А431 .....	119
3.24.	Синтез МНТ с фолатом в качестве лиганда .....	120
3.25.	Присоединение $^{111}\text{In}$ к МНТ .....	121

3.26.	Исследование распределения $^{111}\text{In}$ в организме мышей при помощи однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) совмещенной с компьютерной томографией (КТ).....	121
3.27.	Терапия мышинной меланомы при помощи $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ.....	122
3.28.	Синтез конъюгата инсулин-полилизин.....	122
3.29.	Формирование комплекса (Ins-pLys)-ДНК и трансфекция клеток .....	123
3.30.	Лазерная сканирующая микроскопия флуоресцентно меченых полиплексов на основе Ins-pLys .....	123
3.31.	Синтез конъюгата стрептавидин-полилизин.....	123
3.32.	Синтез конъюгата стрептавидин-полилизин и формирование полиплексов на основе Ins-pLys и аденовируса .....	124
3.33.	Секреторные формы люциферазы.....	124
3.34.	Трансфекция клеток эпителия молочной железы НС-11 полиплексами.....	125
3.35.	Трансфекция молочных желез .....	125
3.36.	Вестерн-блот.....	126
3.37.	Синтез блок-сополимеров на основе полиэтиленimina и полиэтиленгликоля.....	126
3.38.	Измерение активности люциферазы .....	127
3.39.	Формирование полиплексов. ....	128
3.40.	Исследование полиплексов с помощью динамического светорассеяния.....	128
3.41.	Измерение размеров полиплексов с помощью атомно-силовой микроскопии.....	129
3.42.	Трансфекция <i>in vitro</i> .....	130
3.43.	Получение флуоресцентно меченых полиплексов .....	130
3.44.	Исследование внутриклеточная локализация полиплексов.....	131
3.45.	Исследование противоопухолевой эффективности генно-терапевтических продуктов, доставляемых полиплексами на основе ПЭИ-ПЭГ-ТАТ.....	133
3.46.	Исследование противоопухолевой эффективности генотерапии с помощью полиплексов на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с.....	134
4.	Результаты.....	135
4.1.	Изменение эффективности фотосенсибилизаторов в результате присоединения к носителям, доставляющим их внутрь клетки .....	135
4.1.1.	Интернализуемые конструкции.....	135
4.1.2.	Интернализуемые конструкции с сигналом ядерной локализации .....	136
4.1.2.1.	Конструкции для доставки фотосенсибилизаторов.....	136
4.1.2.2.	Конструкции для доставки излучателей $\alpha$ -частиц.....	138
4.1.3.	Влияние эндосомолитических средств на эффективность действия интернализуемых конструкций с сигналом ядерной локализации .....	139
4.2.	Создание модульных рекомбинантных транспортеров для доставки лекарственных веществ в ядра опухолевых клеток-мишеней.....	142
4.2.1.	Исследование фотоцитотоксичности фотосенсибилизаторов, присоединенных к модульным нанотранспортерам .....	147

4.2.2. Модульные нанотранспортеры с эпидермальным фактором роста в качестве лигандного модуля .....	149
4.3. Фотодинамическая терапия экспериментальных опухолей с помощью фотосенсибилизаторов, присоединенных к модульным нанотранспортерам .....	153
4.4. Использование модульных нанотранспортеров для доставки $\alpha$ -эмиттеров .....	158
4.5. Использование модульных нанотранспортеров для доставки эмиттеров электронов Оже	160
4.5.1. Использование модульных нанотранспортеров для доставки $^{125}\text{I}$ .....	160
4.5.2. Использование МНТ для доставки $^{67}\text{Ga}$ .....	163
4.5.2.1. Мечение препаратов МНТ $^{67}\text{Ga}$ .....	163
4.5.2.2. Кинетика эндоцитоза и выхода из клеток $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР .....	164
4.5.2.3. Транспорт $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в ядра клеток A431 .....	164
4.5.2.4. Исследование цитотоксичности $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР .....	165
4.5.3. Разработка пригодного для терапии метода присоединения $^{111}\text{In}$ к МНТ и проверка возможности его использования для терапии .....	167
4.5.3.1. Метод присоединения $^{111}\text{In}$ к макромолекулам .....	167
4.5.3.2. Проверка цитотоксичности препаратов МНТ, меченных $^{111}\text{In}$ .....	169
4.5.3.4. Радионуклидная терапия мышью меланомы .....	173
4.6. Создание и исследование свойств МНТ с присоединенным фолатом .....	174
4.6.1. Синтез МНТ с присоединенным фолатом .....	174
4.6.2. Исследование интернализации МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф) .....	175
4.6.3. Внутриклеточное распределение МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф) .....	176
4.6.4. Цитотоксичность $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф) .....	177
4.6.5. Распределение $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф) после внутриопухолевого введения .....	179
4.6.6. Терапия ксенографтов аденокарциномы человека HeLa .....	180
4.7. Применение $^{111}\text{In}$ -МНТ для лечения ксенотрансплантатов мочевого пузыря со сверхэкспрессией EGFR .....	182
4.7.1. Экспрессия EGFR на клеточных линиях рака мочевого пузыря .....	182
4.7.2. Исследования цитотоксичности $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР .....	184
4.7.3. Исследование распределения $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в организме мышей .....	186
4.7.4. Терапия подкожных ксенотрансплантатов EJ .....	187
4.8. Создание многофункциональных конструкций для доставки ДНК на основе полилизина в клетки-мишени .....	189
4.8.1. Синтез конъюгата инсулин-полилизин и проверки возможности специфической трансфекции клеток с его помощью .....	189
4.8.2. Синтез конъюгата инсулин-полилизин и проверки возможности специфической трансфекции клеток с его помощью .....	191
4.8.3. Трансфекция эпителия молочной железы <i>in vivo</i> .....	192
4.9. Полиплексные конструкции для доставки генетического материала в клетки на основе полиэтиленimina и пептида для проникновения в клетку .....	196

4.9.1. Оптимизация полиплексов на основе полиэтиленimina для доставки ДНК в клетки	197
4.9.2. Анализ внутриклеточного транспорта и распаковки полиплексов	205
4.9.3. Оценка противоопухолевой эффективности генно-терапевтических продуктов, доставляемых в составе полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ	205
4.10. Полиплексные конструкции для доставки генетического материала в клетки-мишени на основе полиэтиленimina и лиганда для MC1R	210
4.10.1. Создание полиплексов на основе полиэтиленimina для рецептор-опосредованной доставки ДНК в клетки меланомы	211
4.10.2. Оценка противоопухолевой эффективности генно-терапевтических продуктов, доставляемых в составе полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ	215
5. Обсуждение результатов	218
6. Выводы	228
Заключение	230
Приложение 1	231
Список литературы	237
Благодарности	297

## Список сокращений

АСМ –	атомно-силовая микроскопия
АФК –	активные формы кислорода
БСА –	бычий сывороточный альбумин
ВИМ –	видеоинтенсификационная микроскопия
ДМСО –	диметилсульфоксид
ДТТ –	дитиотреитол
КЛСМ –	конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
КТ –	компьютерная томография
ЛПЭ –	линейная передача энергии
МСГ –	меланоцитстимулирующий гормон
МБС –	малеимидобензоилгидроксисукцинимидный эфир
миРНК -	микроРНК
МНТ –	модульный нанотранспортер
МНТ <sub>МСГ</sub> –	модульный нанотранспортер с $\alpha$ -меланоцитстимулирующим гормоном в качестве лиганда
МНТ-ПЭГ <sub>Ф</sub>	контрольный безлигандный модульный нанотранспортер с присоединенным полиэтиленгликолем
МНТ-ПЭГ <sub>Ф</sub>	модульный нанотранспортер с фолатом в качестве лиганда, присоединенным через полиэтиленгликолевую вставку
МНТ <sub>Ф</sub>	модульный нанотранспортер с фолатом в качестве лиганда
МНТ <sub>ЭФР</sub>	модульный нанотранспортер с эпидермальным фактором роста в качестве лиганда
ОФЭКТ –	однофотонная эмиссионная компьютерная томография
ПААГ –	полиакриламидный гель
ПЭГ –	полиэтиленгликоль
ПЭИ –	полиэтиленимин
СЯЛ –	сигнал ядерной локализации
ТАТ –	пептид из трансактиватора транскрипции вируса иммунодефицита
ТРО –	торможение роста опухоли
ФДТ –	фотодинамическая терапия
ФМСФ	фенилметилсульфонилфторид
ФС –	фотосенсибилизатор
ЦМКД –	циклогексил-3(2-морфолиноэтил)карбодимид мето-4-толуенсульфонат

ЭДТА –	этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭО –	электроны Оже
ЭР –	эндоплазматический ретикулум
ЭФ –	электрофорез
ЭФР –	эпидермальный фактор роста
CPP –	пептиды, проникающие в клетку (cell penetrating peptides)
EGFR –	рецептор эпидермального фактора роста
FRET –	флуоресцентный (Фёрстеровский) резонансный перенос энергии
HEPES –	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
pLys –	поли-L-лизин
Ins-pLys –	конъюгат инсулин-полилизин
IMEM –	улучшенная среда MEM с добавлением цинка (Improved MEM Zinc Option)
LA –	$\alpha$ -лактальбумин
mAb –	моноклональные антитела
MES –	2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота
SDS –	додецилсульфат натрия
SPDP –	сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат
Str-pLys –	конъюгат стрептавидин-полилизин



## 1. Введение

Механизмы межмолекулярных взаимодействий макромолекул, определяющих процессы узнавания, докинга белков, транспорта на клеточном уровне, являются важной проблемой биофизики. Знание этих механизмов служит основой для создания искусственных транспортных систем биологически активных веществ для медицинских целей. Одной из наиболее востребованных областей их потенциального применения является создание эффективных и специфичных систем для уничтожения опухолевых, в частности, раковых клеток. По данным ВОЗ онкологические заболевания являются второй по частоте причиной смертности в мире, а в некоторых странах – первой из причин преждевременной смертности (Мировая статистика здравоохранения, 2020). Статистические данные показывают продолжающийся рост числа онкологических заболеваний в Российской Федерации. Так, в 2019 году было зарегистрировано более 640 тысяч новых случаев злокачественных новообразований. Это на 26,8 % больше, чем десятилетием ранее, и смертность от этих заболеваний продолжает расти, несмотря на распространение новых методов лечения (Каприн с соавт., 2020). Помимо совершенствования диагностических и организационных подходов медицина остро нуждается в новых эффективных персонализированных подходах, основанных на повышении эффективности и селективности лечения. Поэтому поиск новых селективных по отношению к разным видам злокачественных новообразований эффективных средств воздействия и расширения средств воздействия на них находится в фокусе внимания биологии и медицины. Эффективность таких перспективных для уничтожения опухолевых клеток средств, как фотосенсибилизаторы (ФС), радионуклиды, испускающие частицы с коротким пробегом, ДНК, принципиальным образом зависит от транспорта в опухолевые клетки-мишени и внутри клеток-мишеней в ядро. Разработка систем транспорта этих веществ в ядро злокачественной клетки является актуальным направлением медицинской биофизики.

**Проблема увеличения селективности в терапии онкологических заболеваний и возможные пути ее решения.** Основной проблемой лекарственной терапии злокачественных новообразований при использовании химиотерапии, радиотерапии, фотодинамической терапии (ФДТ) и других терапевтических подходов является наличие серьезных побочных эффектов, вызванных токсичностью применяемых средств для нормальных клеток. Эта токсичность обусловлена отсутствием или же недостаточностью селективности воздействия на злокачественные клетки, у которых есть множество общих свойств с исходными нормальными клетками. Положение осложняется также высокой

изменчивостью клеток опухоли (Burrell et al., 2013; Gerlinger et al., 2012; Greaves and Maley, 2012; Meacham and Morrison, 2013). Такая изменчивость приводит к отбору устойчивых к лечению вариантов клеток и потере эффективности лечения. Устойчивость к проводимой терапии возникает как при использовании традиционной химиотерапии, так и при таргетной терапии, основанной на блокировке измененных относительно нормальных клеток регуляторных процессов (Dagogo-Jack and Shaw, 2018). **Поэтому селективность воздействия лекарства по отношению к опухолевой клетке сама по себе не является достаточным условием для положительного результата лечения.** Увеличивающаяся с течением времени гетерогенность клеток требует их эффективного уничтожения для успешности терапии. Способствовать этому может применение воздействий, с высокой вероятностью приводящих к гибели клеток – таких, например физических воздействий, как применение заряженных частиц с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) или индукции появления большого количества синглетного кислорода и свободных радикалов в чувствительных к повреждению местах клетки. Упомянутые воздействия являются неспецифическими по своей природе, что мешает их применению для уничтожения злокачественных клеток, поскольку происходит и повреждение здоровых клеток. Сочетание высокой поражающей способности и специфичности потенциально способно привести появлению эффективных противоопухолевых средств.

Поиск баланса между токсичностью воздействия и его специфичностью проводимый множеством лабораторий использует присоединение традиционных химиотерапевтических лекарств, к субстанции, способной обеспечить направленное таргетное воздействие. В таком качестве используют моноклональные антитела как моноклональные антитела (mAb), так и различные природные лиганды. Для реализации этого подхода действующее начало, наряду с соответствующим лигандом, опознающим клетку-мишень, включается в состав новой структуры за счет ковалентного присоединения, использования высокоаффинных нековалентных взаимодействий или же образования надмолекулярной структуры. Однако опознавания опухолевой клетки (связывания с ее поверхностью) в большинстве случаев недостаточно для проявления действия доставляемых веществ – как минимум требуется также и транспорт внутрь клетки, где доставляемый терапевтический агент может оказать свое действие. В случае использования для доставки распознающих клетку-мишень, но не интернализуемых антител, эффект будет далеким от оптимального, поскольку проявлению действия терапевтического вещества будет препятствовать включение его в состав доставляющей структуры, остающейся вне клетки (Sapra and Allen, 2002). Поэтому внимание

исследователей, создающих системы селективной доставки лекарств, привлекают естественные системы специфического транспорта молекул и, в первую очередь, системы транспорта макромолекул внутрь клетки-мишени, что позволяет доставлять не только макромолекулы, но и наночастицы (Ju et al., 2020; Watson et al., 2005). Специфический по отношению к рецептору транспорт макромолекул внутрь клетки обеспечивает рецептор-опосредуемый эндоцитоз, в процессе которого связавшиеся с рецептором молекулы попадают внутрь замкнутых липидных структур – эндосом, – содержание которых закисляется за счет работы протонной помпы. Дальнейшая судьба подавляющей части содержимого эндосом состоит в поступлении в лизосомы и обработке его гидролитическими ферментами, либо в транспорте обратно на поверхность клетки. Эндоцитируемые макромолекулы в цитозоль клетки практически не поступают.

Таким образом, транспорт макромолекул внутрь клетки осуществляется главным образом при помощи различных видов эндоцитоза в составе замкнутых мембранных образований и дальнейшая судьба эндоцитированной молекулы в значительной мере зависит от системы везикулярного транспорта клетки и наличия соответствующих сигнальных последовательностей на доставляющей структуре или же на тех молекулах клетки, с которыми она взаимодействует. Понимание этого приводит к мысли, что селективности, основанной на опознавании клетки-мишени и даже на транспорте действующего начала внутрь клетки в общем случае недостаточно для его попадания в те компартменты клетки, где может эффективно осуществляться его действие, т. е. необходимы также и некие дополнительные компоненты, несущие сигналы внутриклеточного транспорта. В некоторых случаях, при сигналах, задействующих везикулярный транспорт между эндосомами и такими органеллами, как эндоплазматический ретикулум (ЭР), или же при транспорте из эндосом в цитозоль, может оказаться достаточным одного добавочного компонента. В других случаях, например, при транспорте в ядро клетки или же в митохондрии, единственного добавочного компонента в доставляющей структуре может оказаться недостаточно. **Таким образом, в общем виде система транспорта в заданные компартменты клеток-мишеней должна включать в себя несколько компонентов с различными транспортными сигналами.** Необходимо отметить, что подобную многокомпонентную стратегию доставки с собственной, присущей им специфичностью, используют многие вирусы, а также ряд бактериальных токсинов (Robinson et al., 2018; Williams and Tsai, 2016).

**Биологически активные вещества для доставки при помощи многофункциональных наночастиц.** Понятно, что среди потенциальных

терапевтических агентов в таком типе доставки в первую очередь нуждаются различные высокомолекулярные соединения: ДНК, при генетической терапии рака, или белки, например, бактериальные токсины или же их компоненты. Однако и эффективность многих низкомолекулярных противоопухолевых средств, как химиотерапевтических, так и использующих физические средства для уничтожения злокачественных новообразований может быть увеличена при специфической доставке в определенные компартменты клеток-мишеней. Необходимо также учитывать, что при разработке многокомпонентных систем доставки и оптимизации их свойств привлекательными для лечения онкологических заболеваний представляются такие цитотоксические агенты, которые способны оказывать интенсивное воздействие на любые клетки. Это дает основание полагать, что созданные подходы могут быть применены для достаточного широкого круга вариантов и будут меньше зависеть от особенностей их метаболизма клеток-мишеней. Кроме того, система доставки не должна терять своей функции при присоединении к действующему агенту, а он, в свою очередь, должен сохранять свое действие после присоединения. К таким противоопухолевым средствам можно отнести, например, ФС, применяемые при ФДТ, а также радионуклиды, испускающие частицы с малым пробегом и высокой линейной передачей энергии –  $\alpha$ -частицы или же электроны Оже. Появившиеся в последние десятилетия конкретные сведения о молекулярных механизмах транспорта в клетку и внутри клетки позволяют как исследовать распределение доставляемых веществ, так и пытаться создавать новые методы лечения, основанные на этих знаниях. В частности, при облучении ФС происходит локальное образование активных форм кислорода (АФК) – синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ), и свободных радикалов, таких как  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{O}^{2-}$ , а также перекиси водорода, – способных повреждать мембраны, ДНК и другие клеточные структуры и макромолекулы, находящиеся в непосредственной близости (на расстоянии десятков нанометров) от мест генерации АФК. Это явление лежит в основе перспективного подхода к лечению злокачественных новообразований, интенсивно развивающегося в последнее время, – фотодинамической терапии (Agostinis et al., 2011; Dolmans et al., 2003; van Straten D. et al., 2017). Одним из вариантов успешной реализации такого подхода состоит в избирательном накоплении ФС в опухолевых клетках с последующим облучением опухоли светом в одном из максимумов поглощения ФС. ФДТ является реальной альтернативой лечения опухолей, устойчивых к химио- и радиотерапии, однако имеет ряд собственных ограничений, сдерживающих применение метода. В частности, нормальные клетки также могут накапливать ФС, что приводит к длительной повышенной фоточувствительности кожи и другим побочным эффектам, ограничивающим применение ФДТ (Borgia et al.,

2018; Yanovsky et al., 2019). Причинами побочных эффектов при ФДТ являются недостаточная специфичность ФС и связанная с ней недостаточная эффективность фотодинамического воздействия на опухоль, что приводит к необходимости использования повышенных доз ФС.

Одним из широко используемых путей увеличения эффективности ФС является присоединение его к различным веществам, способным изменить его распределение (использование «носителя»). Увеличение специфичности действия ФС может быть достигнуто при помощи присоединения их к молекулам, имеющим повышенное сродство к клеткам опухоли, например, к лигандам для рецепторов, сверхэкспрессированных на клетках опухоли, или к соответствующим моноклональным антителам, которые способны «доставить» ФС к клеткам-мишеням. Однако одного только присоединения ФС к носителям, способным «узнавать» злокачественные клетки-мишени, недостаточно для обеспечения эффективности действия ФС, поскольку плазматическая мембрана не является высокочувствительным к действию АФК объектом. Как минимум, необходима доставка ФС внутрь клетки – различные внутриклеточные структуры намного более чувствительны к фотоповреждению, чем клеточная поверхность (Liang et al., 2000b).

Клеточные компартменты различаются по своей чувствительности к фотодинамическому повреждению. ФС, добавленные к клеткам, могут накапливаться в различных клеточных структурах: в плазматических мембранах, митохондриях, лизосомах, ЭР и других, где и оказывают свое фотодинамическое действие. Известно, что ФС, представляющие терапевтический интерес, не способны накапливаться в ядрах клеток (Agostinis et al., 2011). В то же время клеточное ядро является одной из наиболее чувствительных, если не самой чувствительной мишенью для АФК (Liang et al., 2000b; Wiseman and Halliwell, 1996). Поэтому, можно полагать, что в эффективности действия ФС существует значительный резерв, который может быть использован путем изменения внутриклеточной локализации ФС. Для использования этого резерва необходимо решение двоякой задачи: обеспечение специфичности на уровне клетки, и, кроме того, специфичности на субклеточном уровне. Перераспределение ФС в более чувствительные к повреждению компартменты клеток-мишеней способно уменьшить используемые дозы ФС за счет увеличения их эффективности и снижения побочных эффектов ФДТ. Таким образом, ФДТ представляется полем для использования многокомпонентных систем доставки в заданные компартменты опухолевых клеток-мишеней: эффективность действия ФС зависит от его локализации в клетке, увеличение специфичности по отношению к клетке-мишени способно уменьшить побочные явления при ФДТ.

Другим вариантом интенсивно воздействующего начала для лечения онкологических заболеваний являются радионуклиды, испускающие частицы с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ). В настоящее время для лечения и диагностики новообразований используют  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$  и другие (Ambrosini et al., 2011; Chatalic et al., 2015; Sun et al., 2017). При разработке методов радионуклидной терапии помимо эффективности воздействия на клетки опухоли стоит также задача максимального снижения воздействия на окружающие опухоль нормальные ткани. Для решения этой задачи предпочтительно использование радионуклидов, обладающих мощным локальным поражающим эффектом. К радионуклидам с высокой ЛПЭ относятся в первую очередь  $\alpha$ -эмиттеры, такие как, например,  $^{211}\text{At}$  или  $^{225}\text{Ac}$ , а также эмиттеры электронов Оже, такие как, например,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ . При альфа-распаде помимо испускания  $\alpha$ -частицы происходит и образование ядра отдачи, которое также можно рассматривать в качестве высокоэнергетической частицы с высоким локальным повреждающим действием. При этом, по сравнению с другими продуктами радиационного распада, такими, как  $\gamma$ -кванты и  $\beta$ -частицы,  $\alpha$ -частицы и электроны Оже (ЭО) обладают наименьшим пробегом в биологических тканях. Так, например, пробег  $\alpha$ -частиц астата-211 в тканях не превышает 70-80 микрон, а для ЭО лежит обычно в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких сотен нанометров. Понятно, что это снижает цитотоксический эффект таких радионуклидов на окружающие здоровые ткани.

Самым уязвимым местом для воздействия ионизирующего излучения, в особенности для частиц с высоким значением ЛПЭ, является клеточное ядро (Hartman et al., 2000; Raju et al., 1991; Sgouros et al., 2010; Walicka et al., 1998; Zalutsky and Vaidyanathan, 2000). Достаточно нескольких (от 2 до 6) попаданий  $\alpha$ -частиц в клеточное ядро, для того чтобы вызвать гибель клетки (Raju et al., 1991). Очевидно, что не всякая  $\alpha$ -частица, испущенная с поверхности клетки-мишени (например, в результате доставки с помощью специфических антител), будет столь же эффективна, как  $\alpha$ -частица, испущенная радионуклидами в ядре клетки. Кроме того, в случае внутриядерной доставки  $\alpha$ -излучателей, может быть использовано цитотоксическое действие ядер отдачи, у которых пробег намного короче, чем у  $\alpha$ -частиц (меньше 100 нм), а ЛПЭ значительно выше (Zidenberg-Cherr et al., 1987). Длина пробега ионизирующей частицы определяет как принципиально возможную достижимую специфичность при ее использовании, так и неспецифическое поражение окружающих клеток, что в случае противоопухолевой терапии может оказывать как отрицательное влияние на терапии при поражении нормальных клеток и тканей, так и

положительное при уничтожении соседних опухолевых клеток, в которые радионуклид не был доставлен.

Еще одним доставляемым терапевтическим началом, для которого может быть необходима внутриклеточная доставка, как уже было упомянуто, является ДНК, которая, в силу заряда и размера, не может легко проникать к месту реализации своего действия. В настоящее время генотерапия онкологических заболеваний из области исследовательских проектов перешла в разряд коммерчески применяемых методов лечения: уже было одобрено более двадцати генотерапевтических препаратов (Ma et al., 2020), большинство из которых основано на применении вирусов. Вирусные векторы, имеющие на высокую эффективность трансфекции, однако, имеют свои недостатки, в числе которых ограниченный размер переносимого гена, развитие иммунного ответа, вероятность появления лихорадочных состояний, потенциальный риск возникновения неожиданных вариантов при одновременной инфекции с вирусами дикого типа и другие (Huang and Kamihira, 2013; Mancheno-Corvo and Martin-Duque, 2006). Поэтому, создание более простого, но столь же эффективного доставляющего генетический материал средства представляется важной и актуальной задачей. Достаточно давно стало понятным, что для специфической доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени необходимы такие компоненты, как интернализуемый лиганд, способный к рецептор-опосредованному эндоцитозу в клетки-мишени и часть, способная присоединяться к отрицательно заряженным нуклеиновым кислотам (Wu and Wu, 1987). Те конструкции, в состав которых входят положительно заряженные полимеры получили название полиплексов, в отличие от липоплексов, в состав которых входят катионные амфифильные молекулы, способные образовывать мицеллы и липосомы, а также различного рода сложные структуры при смешивании с отрицательно заряженными полимерами нуклеиновых кислот. Полиплексы, в силу своей природы, более устойчивы в биологических средах, чем липоплексы, и, кроме того, представляют собой наночастицы меньшего размера, поэтому попытки использовать их для переноса генов *in vivo*, выглядят достаточно обоснованными. Необходимо, впрочем, отметить, что деление на полиплексные и липоплексные частицы представляется в значительной мере условным, поскольку возможны (и были исследованы в ряде работ) различные смешанные варианты – как поликатионы, модифицированные гидрофобными добавками, так и липоплексы в состав которых включают прекомпактизованные с поликатионом нуклеиновые кислоты (Hanzlikova et al., 2009; Liu et al., 2010; Nelson et al., 2013). Способом, который позволяет значительно улучшить доставку ДНК или РНК, и увеличить трансфекцию клеток, является включение в состав транспортной конструкции компонента, обеспечивающего выход переносимого

генетического материала из эндосом, в которые он попадает в результате эндоцитоза (Berg et al., 2004; Curiel, 1994). Опухолевые клетки часто делятся, при этом происходит разборка ядерной оболочки, поэтому во многих случаях для доставки ДНК дополнительного компонента, определяющего цитоплазмнно-ядерный транспорт в такие клетки, не требуется, однако такой компонент может оказаться полезен при трансфекции покоящихся клеток.

Понятно, специфическая генотерапия может быть полезна при лечении моногенетических наследственных заболеваний, однако попытка корректировать таким образом генетические дефекты опухолей малоперспективна. В этом случае больший эффект можно ожидать от доставки в клетки опухоли гена, образующего токсический продукт (Karjoo et al., 2016). К таким генам относятся, например, бактериальная цитозиндезаминаза, преобразующая 5-фторцитозин в токсичный 5-фторурацил и тимидинкиназа вируса герпеса человека, способная фосфорилировать ганцикловир. Важным аспектом такого подхода лечения злокачественных новообразований является способность образующегося токсического воздействовать на соседние клетки. Таким образом, для доставки ДНК в опухолевые клетки также нужны компоненты обеспечивающие ряд разных функций – узнавание клеточной поверхности, интернализацию, выход из эндосом и, возможно, цитоплазмнно-ядерный транспорт.

Вышеизложенное позволяет заключить, что эффективность ряда перспективных терапевтических противоопухолевых средств зависит от их локализации в опухоли и клетке. Такие терапевтические средства как, например, ФС и радионуклиды-излучатели частиц с высокой ЛПЭ, наиболее эффективны в ядре клетки, куда они либо не проникают, либо попадают неспецифически независимо от типа клеток (т. е. как в трансформированные, так и в нормальные клетки). Это справедливо и для таких молекул, как ДНК, которая способна осуществлять свои функции только находясь внутри ядра, но неспособна проникать в ядра клеток в силу размера и заряженности. В общем виде для осуществления транспорта таких веществ в ядра клеток заданного типа (в данном случае, в опухолевые клетки) необходимо обеспечить наличие у лекарства нескольких функций:

- узнавания типа клетки, что может быть осуществлено за счет взаимодействия с рецептором, характерным для данного типа клетки;
- транспорта внутрь клетки, что может происходить за счет естественного процесса рецептор-опосредуемого эндоцитоза;
- транспорта из эндосом в цитозоль клетки, что способны осуществлять некоторые токсины и вирусы;



- транспорта из цитозоля клетки в ее ядро через ядерную пору.

Природные белки реализуют эти функции при помощи соответствующих последовательностей. В некоторых случаях эта последовательность занимает весь или большую часть белка, в других организована в отдельный домен или его часть. Таким образом, необходимый набор последовательностей может быть представлен в виде отдельных блоков или отдельных функциональных модулей. Часть этих модулей, например, модулей, обеспечивающих транспорт в ядро или же выход из эндосом необходимы для любой конструкции, доставляющей действующее вещество в ядро. Другие являются уникальными и определяют тип клетки и рецептор-опосредуемый эндоцитоз. Эти соображения приводят к мысли, что для доставки лекарственного средства в ядро опухолевой клетки-мишени, необходима конструкция, которая состояла бы из отдельных функциональных блоков – модулей, обеспечивающих разные этапы транспорта этого лекарственного средства. Кроме того, все эти модули должны быть способны осуществлять свои транспортные функции в составе единого целого, к которому присоединяется действующее начало, обеспечивающее терапевтический эффект. Реализации последнего может способствовать включение в состав конструкции отдельного модуля, способствующего пространственному разнесению транспортных модулей. Функции каждого из транспортных модулей осуществляются путем молекулярных взаимодействий с соответствующими клеточными структурами. Для создания средства, с помощью которого можно многократно увеличить эффективность действия активного начала и его специфичность необходимы:

- доказательство работоспособности каждой части транспортной конструкции на молекулярном уровне;
- демонстрация необходимых этапов транспорта конструкции в клетке;
- увеличение цитотоксичности доставляемого агента в результате его присоединения к транспортной конструкции;
- доказательство возможности применения конструкции с присоединенным агентом для терапии экспериментальных опухолей.

Исходя из этих посылок:

**Целью настоящей работы является разработка многофункциональных транспортных наноконструкций, обеспечивающих за счет совокупности молекулярных взаимодействий доставку биологически активных средств в ядра опухолевых клеток-мишеней.**

Для достижения поставленной цели необходимо решить было следующие задачи:

К первой из них относится: изучение молекулярных взаимодействий, способных обеспечить действие компонентов создаваемых конструкций для направленного транспорта в ядра клеток-мишеней:

1. Провести исследование молекулярных взаимодействий, обеспечивающих взаимодействие компонентов конструкций для направленного транспорта в ядра клеток-мишеней с биологическими структурами, определяющими отдельные этапы доставки в ядро.
1. Изучить механизмы транспорта конструкций в ядра опухолевых клеток.
2. Доказать увеличение эффективности противоопухолевых средств в результате их включения в конструкции для транспорта в ядра клеток-мишеней на клеточных культурах.
3. Провести терапию экспериментальных опухолей лабораторных животных при помощи биологически активных агентов, доставляемых созданными конструкциями.

#### **Объект и предмет исследования**

Объектом настоящей работы являются искусственные многофункциональные конструкции для направленного транспорта различных активных агентов в клетки с использованием естественных процессов внутриклеточного транспорта макромолекул. Предметом исследования является изучение взаимодействия этих конструкций с компонентами клетки, обеспечивающими транспорт в клеточное ядро, клеток, и изучение механизмов транспорта конструкций в клетке, а также изменения эффективности доставляемых агентов в результате включения в эти конструкции.

#### **Научная новизна работы**

Впервые разработан ряд конструкций, доставляющих за счет молекулярных взаимодействий различные биологически активные вещества в ядра опухолевых, в частности, раковых клеток. Показано, что эти конструкции доставляют радионуклиды, испускающие частицы с малым пробегом, и фотосенсибилизаторы, а также ДНК с терапевтическим геном в ядра опухолевых клеток. Доказана эффективность разработанных конструкций для уничтожения опухолевых клеток в культуре. Выявлен терапевтический эффект разработанных конструкций при лечении экспериментальных опухолей лабораторных животных.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенные работы показали возможность создания модульных конструкций, способных доставлять за счет последовательного ряда молекулярных взаимодействий

биологически активные агенты в ядра опухолевых клеток. Показано, что все модули сохраняют свою функциональную транспортную активность в составе единой конструкции. Выявлены особенности взаимодействий молекулярных конструкций, сочетающих несколько транспортных функций с компонентами клетки, обеспечивающих этот транспорт, за счет природных внутриклеточных процессов. Показано, что присоединение биологически активных агентов: фотосенсибилизаторов и радионуклидов, испускающие частицы коротким пробегом, а также ДНК, несущей цитотоксический ген многократно усиливает действие этих агентов на клетках в культуре. Присоединение этих агентов к многофункциональным наноконструкциям для направленного внутриклеточного транспорта выявило значительное увеличение эффективности терапии экспериментальных опухолей лабораторных животных. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах разрабатываемого подхода доставки фотосенсибилизаторов, эмиттеров электронов Оже (ЭО), а также ДНК, несущей терапевтический ген, для терапии злокачественных новообразований и открывают практические возможности для создания высокоэффективных методов лечения онкологических заболеваний.

#### **Методология и методы исследования**

Стратегия исследования предполагала выбор адекватных поставленным задачам методов исследования. Для изучения молекулярных взаимодействий был привлечен комплекс биофизических, молекулярно-биологических, химических и биохимических методов: физико-химические методы (радиолигандный анализ, динамическое светорассеяние, определение электрофоретической подвижности, поверхностный плазмонный резонанс и другие), спектрофотометрические, спектрофлуориметрические, люминесцентные методы. Для изучения транспорта в клетках-мишенях были привлечены работы с культурами клеток, трансфекция клеток, видеоинтенсификационная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (ВИМ и КЛСМ), исследование цитотоксичности. Для исследования на организменном уровне была использована однофотонная компьютерная томография (ОФЭКТ), рентгеновская компьютерная томография (КТ), фотодинамическая и радионуклидная терапия экспериментальных опухолей лабораторных животных и другие.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

- Искусственные модульные конструкции – модульные нанотранспортеры – способны взаимодействовать с интернализуемым целевым рецептором на поверхности клеток-мишеней, вызывать рН-зависимое образование пор в липидном бислое в диапазоне рН

5-6, а также взаимодействовать с комплексом белков, импортин- $\alpha/\beta$ , обеспечивающих транспорт через ядерную пору.

- Модульные нанотранспортеры обеспечивают за счет ряда последовательных взаимодействий с клеточными структурами эффективный транспорт доставляемых агентов в ядра опухолевых клеток.
- Присоединение фотосенсибилизаторов к модульным нанотранспортерам для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней приводит к многократному увеличению их эффекта на культурах опухолевых клеток и *in vivo*.
- Присоединение радионуклидов, испускающих частицы с малым пробегом, к модульным нанотранспортерам для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней приводит к многократному увеличению их эффекта на культурах опухолевых клеток и *in vivo*.

### **Достоверность и апробация работы**

Достоверность полученных результатов обеспечивается их публикацией в рецензируемых журналах международного уровня. Результаты находятся в соответствии с результатами, полученными другими авторами. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на 67 Всероссийских и международных съездах и конференциях, включая:

IV Всероссийский научно-образовательный Конгресс с международным участием «Онкорadiология, лучевая диагностика и терапия», Россия, 12-13 февраля 2021; Второй международный форум онкологии и радиологии, Москва, Россия, 23-27 сентября 2019; VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019), г. Сочи, Россия, 16-21 сентября 2019; II Всероссийский научно-образовательный конгресс с международным участием «Онкорadiология лучевая диагностика и терапия» 15 – 16 февраля 2019 г., Москва, Россия, 15-16 февраля 2019; Bit's 8th Annual International Symposium of Drug Delivery Systems-2018, Saint Petersburg, Россия, 19-21 июля 2018; 12th International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017; V Съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, Россия, 4-10 октября 2015; «РАДИОФАРМА-2015», Москва, Россия, 17-19 июня 2015.

### **Публикации**

Соискатель имеет 113 опубликованных работ (по данным РИНЦ), в том числе по теме диссертации 38 работ, из них 38 статей, опубликованных в рецензируемых научных

изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, SCOPUS, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 – «Биофизика». Зарегистрированы 11 патентов, относящихся к теме диссертации, соавтором которых является автор. Кроме того в более чем 20 работах в рецензируемых журналах описаны отдельные темы, связанные с настоящей работой, или развиваются родственные подходы, основанные на созданных и исследованных конструкциях с доказанной эффективностью.

**Публикации автора по теме диссертации.** В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

- A1. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Durymanov M.O., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Exploiting active nuclear import for efficient delivery of Auger electron emitters into the cell nucleus // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2020. – P. 1-11. – DOI:10.1080/09553002.2020.1815889. **Q1 WoS IF 2.368.** (1,7/1).
- A2. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A. Epidermal Growth Factor Receptor: Key to Selective Intracellular Delivery // *Biochemistry (Moscow)* – 2020. – V. 85. – P. 967-1092. – DOI:10.1134/S0006297920090011. **WoS IF 1.978.** (3,9/3,3).
- A3. Rosenkranz A.A., Salomone S., Sobolev A.S. Editorial: Delivery of Locally-Acting Agents to Intracellular Targets // *Front. Pharmacol.* – 2020. – V. 11. – № 593064. DOI:10.3389/fphar.2020.593064. **Q1 WoS IF 4.225.** (0,2/0,07).
- A4. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters // *Nucl. Med. Biol.* – 2020. – V. 80-81. – P. 45-56. – DOI:10.1016/j.nucmedbio.2019.11.005. **WoS IF 2.396.** (2,6/1).
- A5. Karyagina T.S., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Targeted Delivery of <sup>111</sup>In Into the Nuclei of EGFR Overexpressing Cells via Modular Nanotransporters With Anti-EGFR Affibody // *Front. Pharmacol.* – 2020. – V. 11. – №. 176. **Q1 WoS IF 4.225.** (2,5/0,3).
- A6. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Karmakova T.A., Vorontsova M.S., Morozova N.B., Petriev V.M., Abrosimov A.S., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Ulasov A.V., Yakubovskaya R.I., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Antitumor Activity of Auger Electron Emitter <sup>111</sup>In Delivered by Modular Nanotransporter for Treatment of Bladder Cancer With EGFR Overexpression // *Front. Pharmacol.* – 2018. – V. 9. – № 1331. DOI:10.3389/fphar.2018.01331. **Q1 WoS IF 4.225.** (2,5/1,0).

- A7. Slastnikova T.A., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. Targeted Intracellular Delivery of Antibodies: The State of the Art // *Front. Pharmacol.* – 2018. – V. 9. – P. 1208. DOI:10.3389/fphar.2018.01208. **Q1 WoS IF 4.225.** (2,5/0,4).
- A8. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Antitumor efficacy of Auger electron emitter <sup>111</sup>In delivered by modular nanotransporter into the nuclei of cells with folate receptor overexpression // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2017. – V. 473. – P. 85-87. DOI:10.1134/S1607672917020016. **WoS IF 0.672** (0,3/0,1).
- A9. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Ovechko S.A., Sobolev A.S. Development and evaluation of a new modular nanotransporter for drug delivery into nuclei of pathological cells expressing folate receptors // *Drug Des. Dev. Ther.* – 2017. – V. 11. – P. 1315-1334. DOI:10.2147/DDDT.S127270. **WoS IF 3.216** (2,6/0,8).
- A10. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Morozova N.B., Vorontsova M.S., Petriev V.M., Lupanova T.N., Ulasov A.V., Zalutsky M.R., Yakubovskaya R.I., Sobolev A.S. Preparation, cytotoxicity, and in vivo antitumor efficacy of <sup>111</sup>In-labeled modular nanotransporters // *Int. J. Nanomed.* – 2017. – V. 12. – P. 395-410. DOI:10.2147/IJN.S125359. **Q1 WoS IF 5.115** (2,0/0,7).
- A11. Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rodichenko N., and Sobolev A.S. Intracellular Transport and Unpacking of Polyplex Nanoparticles // In: *Handbook of Clinical Nanomedicine*. R. Bawa, G.F. Audette, B. Reese Eds. Taylor & Francis Group. N-Y. DOI: 10.1201/b19910 2016. – P. 823-843. **WoS Indexed.** (1,0/0,3).
- A12. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Modular nanotransporters for targeted intracellular delivery of drugs: folate receptors as potential targets // *Curr. Pharm. Des* – 2015. – V. 21. – P. 1227-1238. – DOI:10.2174/1381612820666141013121032. **WoS IF 2.208** (2,1/0,6).
- A13. Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Khramtsov Y.V., Sobolev A.S. Use of intracellular transport processes for targeted drug delivery into a specified cellular compartment // *Biochemistry (Moscow)* – 2014. – V. 79. – P. 928-946. DOI:10.1134/S0006297914090090. **WoS IF 1.978** – (2,7/1,0).
- A14. Koumarianou E., Slastnikova T.A., Pruszynski M., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. Radiolabeling and in vitro evaluation of <sup>67</sup>Ga-NOTA-modular nanotransporter--a potential Auger electron emitting EGFR-targeted radiotherapeutic // *Nucl. Med. Biol.* – 2014. – V. 41. – P. 441-449. DOI:10.1016/j.nucmedbio.2014.03.026. **WoS IF 2.396.** (1,4/0,2).

- A15. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Durymanov M.O., Sobolev A.S. Malignant melanoma and melanocortin 1 receptor // *Biochemistry (Moscow)* – 2013. – V. 78. – P. 1228-1237. DOI:10.1134/S0006297913110035. – **WoS IF 1.978**. (1,6/1,4).
- A16. Slastnikova T.A., Koumarianou E., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Lupanova T.N., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. Modular nanotransporters: a versatile approach for enhancing nuclear delivery and cytotoxicity of Auger electron-emitting <sup>125</sup>I // *EJNMMI. Res.* – 2012. – V. 2. – № 59. DOI:10.1186/2191-219X-2-59. **WoS IF 2.64**. (1,4/0,2).
- A17. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Schiffelers R.M., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Modular nanotransporters: a multipurpose in vivo working platform for targeted drug delivery // *Int. J. Nanomedicine*. – 2012. – V. 7. – P. 467-482. DOI:10.2147/IJN.S28249. **Q1 WoS IF 5.115**. (2,2/0,5).
- A18. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Lupanova T.N., Gulak P.V., Gnuchev N.V., Sobolev A.S. Study of efficiency of the modular nanotransporter for targeted delivery of photosensitizers to melanoma cell nuclei in vivo // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2012. – V. 446. – P. 235-237. DOI:10.1134/S1607672912050146. **WoS IF 0.672**. (0,3/0,1).
- A19. Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy // *Mol. Ther.* – 2011. – V. 19. – P. 103-112. DOI:10.1038/mt.2010.233. **Q1 WoS IF 8.986**. (1,7/0,3).
- A20. Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Pozzi O.R., Lunin V.G., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Engineered modular recombinant transporters: application of new platform for targeted radiotherapeutic agents to alpha-particle emitting <sup>211</sup>At // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2008. – V. 72. – P. 193-200. DOI:10.1016/j.ijrobp.2008.05.055. **Q1 WoS IF 5.859**. (1,0/0,6).
- A21. Khramtsov Y.V., Rokitskaya T.I., Rosenkranz A.A., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Antonenko Y.N., Sobolev A.S. Modular drug transporters with diphtheria toxin translocation domain form edged holes in lipid membranes // *J. Control. Release* – 2008. – V. 128. – P. 241-247. DOI:10.1016/j.jconrel.2008.03.011. **Q1 WoS IF 7.727**. (1,3/0,2).
- A22. Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Sobolev A.S. A study of pore formation in lipid bilayers by modular nanotransporters containing the diphtheria toxin translocation domain // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2008. – V. 421. – P. 244-246. DOI:10.1134/s1607672908040200. **WoS IF 0.672**. (0,3/0,1).
- A23. Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., Sergienko O.V., Khramtsov Y.V., Timofeyev K.N., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66. – P. 10534-10540. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-06-2393. **Q1 WoS IF 9.727**. (1,2/0,3).

- A24. Sobolev A.S., Rozenkrants A.A., Giliyazova D.G. [Approaches to the targeted intracellular delivery of photosensitizers in order to enhance their efficacy and cell specificity]. *Biofizika*. – 2004. – V. 49. – № 2. – P. 51-79. PMID:15129633. **WoS IF 0.43**. (3,5/1,0).
- A25. Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., Jans D.A., Sobolev A.S. Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity // *FASEB J.* – 2003. – V. 17. – P. 1121-1123. DOI:10.1096/fj.02-0888fje (full version). **Q1 WoS IF 4.966**. (1,3/0,6).
- A26. Rozenkrants A.A., Lunin V.G., Sergienko O.V., Giliyazova D.G., Voronina O.L., Jans D.E., Kofner A.A., Shumiantseva M.A., Mironov A.F., Sobolev A.S. [Targeted intracellular site-specific drug delivery: photosensitizer targeting to melanoma cell nuclei] // *Genetika* – 2003. – V. 39. – P. 259-268. DOI:10.1023/a:1022488027391. **WoS IF 0.466**. (1,1/0,3).
- A27. Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency // *Immunol. Cell Biol.* – 2000. – V. 78. – P. 452-464. DOI:10.1046/j.1440-1711.2000.00925.x. **WoS IF 3.764** (2,1/0,6).
- A28. Sobolev A.S., Jans D.A., Rosenkranz A.A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* – 2000. – V. 73. – P. 51-90. DOI:10.1016/s0079-6107(00)00002-x. **WoS IF 2.175**. (3,7/1,2).
- A29. Akhlynina T.V., Jans D.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rosenkranz A.A., Naroditsky B.S., Sobolev A.S. Adenoviruses synergize with nuclear localization signals to enhance nuclear delivery and photodynamic action of internalizable conjugates containing chlorin e<sub>6</sub> // *Int. J. Cancer* – 1999. – V. 81. – P. 734-740. DOI:10.1002/(sici)1097-0215(19990531)81:5<734::aid-ijc12>3.0.co;2-j. **Q1 WoS IF 5.141**. (1,3/0,2).
- A30. Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. Receptor-mediated transport of foreign DNA into preimplantation mammalian embryos // *Mol. Reprod. Dev.* – 1999. – V. 54. – P. 112-120. DOI:10.1002/(SICI)1098-2795(199910)54:2<112::AID-MRD2>3.0.CO;2-U. **WoS IF 2.823** (1,2/0,2).
- A31. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 7928-7933. DOI: 10.1074/jbc.273.14.7928. **WoS IF 4.238**. (1,2/0,3).
- A32. Akhlynina T.V., Jans D.A., Rosenkranz A.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., Sobolev A.S. Nuclear targeting of chlorin e<sub>6</sub> enhances its



photosensitizing activity // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272. – P. 20328-20331. **WoS IF 4.238** (1,2/0,2).

- A33. Rosenkranz A.A., Antonenko Y.N., Smirnova O.A., Yurov G.K., Naroditsky B.S., Sobolev A.S. Avian adenovirus induces ion channels in model bilayer lipid membranes // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – V. 236. – P. 750-753. DOI:10.1006/bbrc.1997.7040. **WoS IF 2.985**. (1,2/0,4).
- A34. Zakharova O.M., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. Modification of fluid lipid and mobile protein fractions of reticulocyte plasma membranes affects agonist-stimulated adenylate cyclase. Application of the percolation theory // Biochim. Biophys. Acta – 1995. – V. 1236. – P. 177-184. DOI:10.1016/0005-2736(95)00047-7. **WoS IF 3.411** (1,1/0,3).
- A35. Akhlynina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic activity of chlorin e6 // Cancer Res. – 1995. – V. 55. – P. 1014-1019. PMID:7866984. **Q1 WoS IF 9.727**. (1,3/0,3).
- A36. Akhlynina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Gulak P.V., Serebryakova N.V., Sobolev A.S. The use of internalizable derivatives of chlorin E6 for increasing its photosensitizing activity // Photochem. Photobiol. – 1993. – V. 58. – P. 45-48. DOI:10.1111/j.1751-1097.1993.tb04901.x. **WoS IF 2.721**. (0,7/0,2).
- A37. Rosenkranz A.A., Yachmenev S.V., Jans D.A., Serebryakova N.V., Murav'ev V.I., Peters R., Sobolev A.S. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct // Exp. Cell Res. – 1992. – V. 199. – P. 323-329. DOI:10.1016/0014-4827(92)90441-a. **WoS IF 3.383**. (0,8/0,3).
- A38. Rozenkrants AA, Iachmenev SV, Sobolev AS. The use of artificial structures for selective transfer of genetic material into human cells via receptor-mediated endocytosis. Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 1990. – V. 312 – № 2 – P. 493-494. **WoS IF 0.672** (0,2/0,08).

#### **Зарегистрированные патенты:**

1. Российский патент № 2 719 418. 17.04.2020. Композиция для присоединения радиоизотопа к полипептидам и способ присоединения радиоизотопа к полипептидам. Розенкранц А.А., Сладникова Т.А., Уласов А.В., Соболев А.С.
2. Российский патент № 2 639 501. 21.12.2017. Штамм *Escherichia coli* – продуцент модульного нанотранспортера для доставки фармацевтических агентов в ядра клеток-мишеней. Сладникова Т.А., Уласов А.В., Розенкранц А.А., Успенская Н.Я., Соболев А.С.
3. US Patent # 9 095 624. 4 августа 2015. Modular transport platform for targeted delivery of therapeutic agents. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Lunin V.G.
4. Российский патент № 2 575 077. 10.02.2016. Фармакологическая комбинация поликатионного носителя ПЭГ-ПЭИ-ТАТ с заключенной в нем плазмидой, несущей

терапевтические гены HSVtk и GM-CSF для генотерапии опухолевых заболеваний. Алексеенко И.В., Виноградова Т.В., Зиновьева М.В., Копанцев Е.П., Монастырская Г.С., Костина М.Б., Плешкан В.В., Костров С.В., Потапов В.К., Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Успенская Н.Я., Розенкранц А.А., Соболев А.С., Уласов А.В., Храмов Ю.В., Свердлов Е.Д.

5. Российский патент № 2 476 596. 27.02.2013. Многопрофильный промотор, экспрессирующий вектор и способ избирательного убийства раковых клеток с их использованием. Алексеенко И.В., Виноградова Т.В., Демидюк И.В., Костров С.В., Плешкан В.В., Чернов И.П., Митяев М.В., Зиновьева М.В., Георгиев Г.П., Соболев А.С., Розенкранц А.А., Уласов А.В., Кузьмин Д.В., Храмов Ю.В., Копанцев Е.П., Успенская Н.Я., Костина М.Б., Монастырская Г.С., Свердлов Е.Д.
6. Российский патент № 2 265 055. 10.06.2005. Рекомбинантная плазида, экспрессирующая модульный полипептид для доставки фотосенсибилизатора, и штамм-продуцент модульного полипептида Escherichia coli ВКПМ В-8356. Лунин В.Г., Сергиенко О.В., Воронина О.Л., Рязанова Е.М., Розенкранц А.А., Соболев А.С.
7. US Patent # 6 500 800. 31.12.2002. Composition and method for causing photodynamic damage to target cells. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Jans D.A. Akhlylina T.V.
8. Российский патент № 2 218 938. 23.05.2002. Цитотоксическая композиция для повреждения клеток-мишеней. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Янс Д.Э., Набатников П.А.
9. Российский патент № 2 108 714. 20.04.1998. Способ получения трансгенных животных. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Иванова М.М., Смирнова О.А., Никитин В.А., Народицкий Б.С., Эрнст Л.К.
10. Российский патент № 2 066 552. 20.09.1996. Композиция для фотодинамического повреждения клеток-мишеней и способ фотодинамического повреждения клеток-мишеней. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Янс Д.А., Ахлынина Т.В.
11. Российский патент № 2 025 487. 30.12.1994. Способ генетической трансформации молочной железы животного и устройство для введения генетического материала в молочный проток молочной железы животного. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Никитин В.А.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 297 страницах и состоит из следующих частей: **введение** (включая цели и задачи исследования), **основная часть**, состоящая из разделов: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы, **заключение** и список литературы. Диссертация содержит 71 рисунок и 22 таблицы, одно приложение. Библиография включает 651 литературный источник.

**Личный вклад автора** заключается в проведении экспериментальной работы, сборе и анализе литературных данных, постановке цели и путей решения поставленных задач, разработке и выборе методов исследования, анализе экспериментальных данных, интерпретации результатов, подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы. Коллеги, принимавшие участие в проведении описанных работ, перечислены по ходу изложения материалов в диссертации.

## Основная часть

### 2. Обзор литературы

#### 2.1. Типы терапевтических средств, нуждающихся во внутриклеточной адресной доставке<sup>1</sup>

В последние десятилетия достигнуты заметные успехи в создании новых терапевтических подходов, однако для многих широко распространенных заболеваний до сих пор нет эффективных методов лечения. Отчасти это объясняется ограничениями применяемых способов лечения, при которых высокие дозы применяемых средств оказываются токсичными, а низкие дозы малоэффективны или совсем не оказывают действия. Постоянно увеличивающееся количество данных по регуляции генов, регуляторным путям, вовлеченным в развитие заболеваний, выявляет новые возможные варианты терапии. Это приводит к возможности разработки новых препаратов направленных на определенный тип клеток-мишеней и, даже, на их определенный компартмент. Такой тип использования действующего начала можно считать адресной доставкой, которая способна как придать специфичность лекарству, изначально ее не имеющей, так и увеличивает эффективность его действия за счет нахождения в том компартменте клетки, в котором его активность будет максимальной.

Используемые в терапии лекарственные средства можно грубо разделить по способам распределения в организме на две части. К одной из них относятся, в основном, низкомолекулярные вещества, распространяющиеся в организме за счет процессов диффузии и конвекции. Действие таких лекарств оказывается эффективным, как правило, при насыщении тканей до такой степени, что его концентрация оказывается достаточной для влияния на некий биохимический или регуляторный процесс в необходимом месте, как правило, внутри клетки. Ко второй части лекарств относятся вещества не способные к пассивной диффузии в клетки в силу своего заряда и/или размера. Они оказывают свое действие путем связывания с рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Такое связывание активирует или, наоборот, блокирует определенные цепочки регуляторных биохимических реакций напрямую. В более сложном варианте системы доставки с использованием лиганда к заданному эндоцитируемому рецептору и высвобождение низкомолекулярного действующего начала после эндоцитоза внутри клетки.

Биологически активные вещества, нуждающиеся в адресной доставке в определенный внутриклеточный компартмент, представляют собой гетерогенную группу

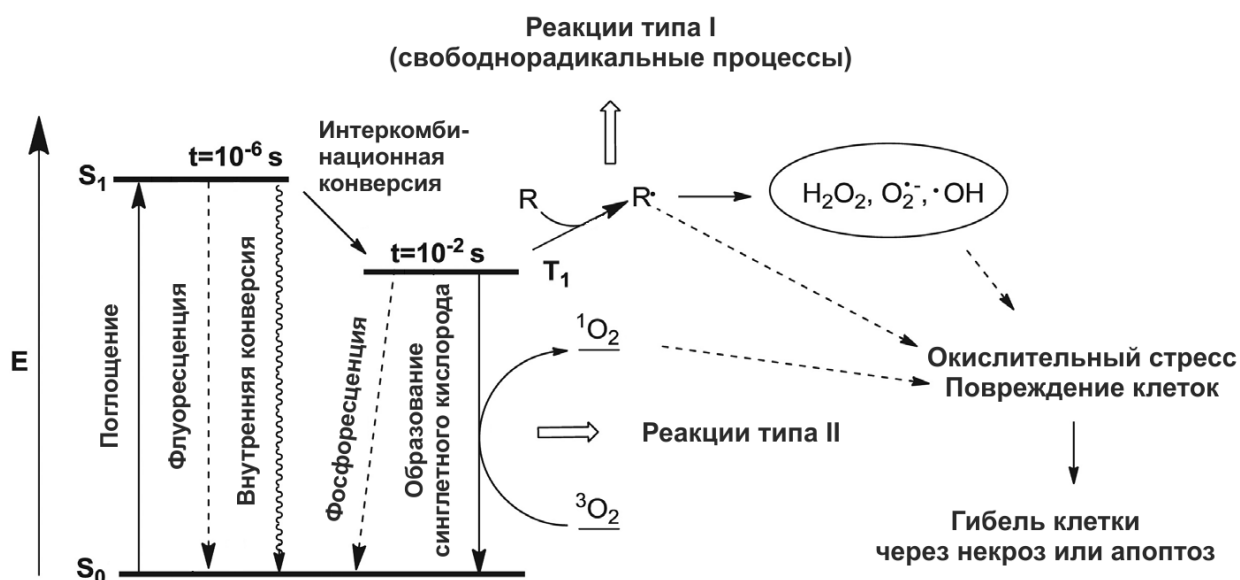
---

<sup>1</sup> Раздел написан по статье автора и его соавторов: Розенкранц А.А., Уласов А.В., Слестникова Т.А., Храмов Ю.В., Соболев А.С. (2014) Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки. *Биохимия*, **79**(9): 1148-1168.

соединений: низкомолекулярные активаторы и ингибиторы различных внутриклеточных процессов, фотосенсибилизаторы, изотопы с малой длиной пробега испускаемых частиц, белки и короткие пептиды, взаимодействующие с различными внутриклеточными компонентами, нуклеиновые кислоты (ДНК, siRNA, miRNA, shRNA, антисмысловые олигонуклеотиды). Пассивный транспорт в клетку для основной части этих веществ в клетку недостаточно эффективен или сопряжен с токсичностью для нецелевых клеток. Часть этих биологически активных веществ характеризуется тем, что их действие может происходить только в строго определенном компартменте клеток. К ним можно отнести, генотерапевтические препараты (например, ДНК, несущая терапевтический ген), проникновение которых в клеточное ядро затруднено. Другая часть представляет собой биологически активные агенты, действие которых наиболее эффективно в определенном компартменте, например, ФС и радионуклиды, излучающие частиц с малой длиной пробега или же ФС (Sobolev, 2013).

Как уже было упомянуто, ДНК, несущая терапевтический ген, для достижения эффекта должна обязательно попасть в ядро. К настоящему моменту разработан ряд подходов доставки генетической информации для терапии, включая использование вирусов и различных синтетических конструкций (Ibraheem et al., 2014). Вирусные системы доставки генетического материала имеют высокую эффективность трансфекции, однако имеют и целый ряд недостатков: не слишком большой размер переносимого генетического материала, их специфичность по отношению к клеткам зависит от собственных свойств вируса и не обязана совпадать с желаемой для терапии, возможность реверсии к дикому типу вируса в результате рекомбинации или мутаций, высокая иммуногенность и связанная с ней токсичность. Ряд вирусов, например, ретровирусы, используемые для доставки генов, встраиваются в геном клетки-хозяина, что может приводить к онкологической трансформации вследствие активации онкогенов. Альтернативой вирусным векторам являются синтетические системы доставки: комплексы нуклеиновых кислот с катионными полимерами (полиплексы) и комплексы нуклеиновых кислот с катионными липидами (липоплексы), а также более сложные системы на их основе (Xu and Anchordoquy, 2011). Системы доставки генетического материала на основе синтетических компонентов в целом требуют доставки большего, чем для вирусов, количества ДНК для того, чтобы привести к аналогичному эффекту, и, как правило, характеризуются более коротким временем экспрессии доставленной ДНК. С другой стороны липоплексы и полиплексы имеют незначительную иммуногенность и токсичностью, лишены ограничений по размерами переносимой ДНК, а также требуют меньших затрат при производстве.

ФС представляют собой биологически активные агенты, образующие АФК при облучении светом соответствующей длины волны. Генерируемые в результате этого короткоживущие продукты с небольшим пробегом: синглетный кислород (Egorov et al., 1989) и свободные радикалы (Ochsner, 1997) способны повреждать клеточные мембраны и различные макромолекулы, включая ДНК (Рис. 2.1).

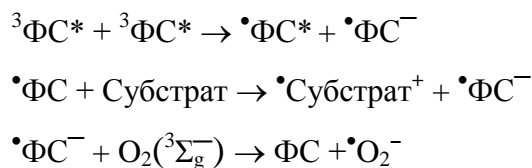


**Рисунок 2.1. Схема фотофизических процессов, вовлеченных в фотодинамическую терапию, представленная в виде модифицированной диаграммы Яблонского (Yoon et al., 2013).  $S_0$  и  $S_1$  – основное и возбужденное синглетные состояния ФС,  $T_1$  – триплетное состояние ФС.**

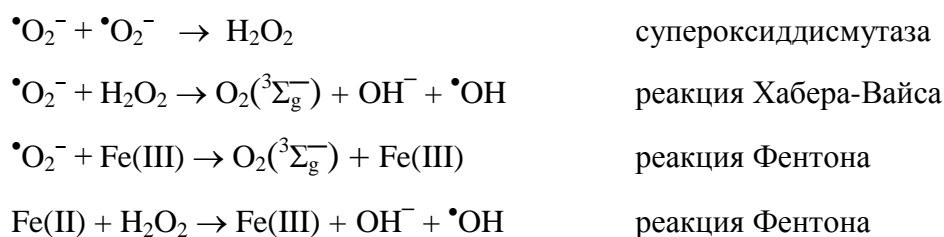
Молекула ФС с минимальной энергией находится в основном синглетном состоянии ( $S_0$ ) и характеризуется парными электронами с полным спином  $S = 0$ . При поглощении кванта света с соответствующей длиной волны один из этих электронов переходит на незанятую орбиталь с более высокой энергией. В результате ФС переходит в возбужденное синглетное состояние  $S_x$  ( $x = 1, 2, 3, \dots$ , в порядке возрастания энергии колебательных уровней). Поскольку любое возбужденное состояние энергетически менее предпочтительно, чем основное состояние, молекула возвращается к  $S_0$  через короткий промежуток времени, что может происходить по нескольким механизмам (Рис. 2.1). Релаксация молекулы до  $S_0$  будет происходить либо за счет испускания вторичного фотона (то есть флуоресцентного излучения), либо за счет рассеивания тепла. Из состояния  $S_1$  молекула ФС может также перейти в результате интеркомбинационной конверсии на изоэнергетический уровень триплетного состояния,  $T_1$ , где два электрона и имеют один и тот же спин. Большинство ФС обладают высокой квантовой эффективностью для такого перехода. После быстрой колебательной релаксации в пределах энергетического уровня  $T_1$  может происходить излучение в виде

фосфоресценции. При этом происходит еще одно изменение спина электрона. Триpletные состояния характеризуются обычно относительно длительным временем жизни (до нескольких секунд).

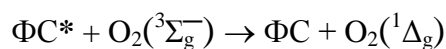
ФС, находящийся в возбужденном триpletном состоянии, может индуцировать фотохимические реакции типа I и II (Foote, 1991). Первичные фотохимические реакции I типа характеризуются переносом электронов (или протонов) на кислород в основном триpletном состоянии ( $^3\Sigma_g^-$ ) или другие соседние молекулы с образованием анион-радикала или катиона соответственно.



Фотохимические реакции I типа часто приводят к образованию супероксидных анионов путем переноса электрона от ФС на молекулярный кислород. Эти радикалы могут вступать в реакцию с молекулярным кислородом, образуя АФК.



Перенос энергии (не электронов) на молекулярный кислород называют фотохимической реакцией II типа. Молекулярный кислород отличается тем, что триpletная конфигурация ( $^3\text{O}_2$ ) представляет основное состояние молекулы. При передаче энергии от ФС в фотохимической реакции II типа образуется очень реакционноспособный синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ).



Фотохимические реакции I и II типа протекают параллельно, их соотношение зависит от нескольких параметров, причем наиболее важными являются используемый ФС и концентрация кислорода. Для большинства ФС, используемых при ФДТ, доминирующим путем является фотохимическая реакция II типа (Plaetzer et al., 2009).

Для того чтобы достичь избирательности по отношению к злокачественным клеткам ФС присоединяют к различным молекулам, специфически взаимодействующим с этими клетками. Подавляющая часть АФК, образующихся при облучении ФС, преодолевают расстояния, измеряемые несколькими десятками нанометров, прежде чем прореагирует с окружающими молекулами. Это приводит к неоптимальному для

наилучшего эффекта распределению ФС в клетке, поскольку наиболее чувствительной мишенью для ФС является клеточное ядро (Liang et al., 2000b), куда находящиеся в свободном состоянии ФС практически не попадают. Доставка в ядро опухолевой клетки-мишени повысить эффективность ФС и уменьшить побочные эффекты за счет снижения используемых доз.

Хорошо известно, что самой чувствительной к действию ионизирующей радиации частью клетки является ее ядро. Эмиттеры  $\alpha$ -частиц и электронов Оже представляют собой радионуклиды, испускающие частицы с высокой ЛПЭ и малой длиной пробега испускаемых частиц. Это делает их действие зависимым от расположения внутри клетки. В частности, вероятность прохождения трека  $\alpha$ -частицы через ядро принципиальным образом зависит от места распада. При нахождении внутри клеточного ядра свой вклад в повреждения будут вносить также образующиеся при  $\alpha$ -распаде ядра отдачи, обладающие ЛПЭ на порядок большей, чем у  $\alpha$ -частиц и коротким, менее 100 нм пробегом. Для использования ядер отдачи радионуклид, испускающий  $\alpha$ -частицы, должен находиться в непосредственной близости от ядра клетки или в нем (Boswell and Brechbiel, 2005). Эмиттеров ЭО малоэффективны вне клеточного ядра (Boswell and Brechbiel, 2005), однако обладают высокой цитотоксичностью в случае нахождения вблизи ядерной ДНК (Buchegger et al., 2006). Длина пробега подавляющей части ЭО в клетке исчисляется несколькими десятками нанометров, поэтому их цитотоксическое действие ограничено местом распада. Поэтому эмиттеры ЭО можно использовать для создания высокоспецифичных и эффективных противоопухолевых агентов при доставке внутрь ядер злокачественных клеток-мишеней. Список некоторых радионуклидов – эмиттеров ЭО, применяемых в медицине в основном для диагностики или рассматриваемых в качестве перспективных вариантов для терапии приведен в таблице 2.1.



**Таблица 2.1. Свойства некоторых эмиттеров ЭО.**

Радионуклид	$t_{1/2}$	ЭО на распад	Энергия ЭО на распад (кэВ)	Доля энергии ЭО в распаде
$^{67}\text{Ga}$	3,26 дня	5,0	6,6	0,034
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,0 часа	4,4	0,9	0,0066
$^{111}\text{In}$	2,80 дня	7,4	6,9	0,016
$^{117\text{m}}\text{Sn}$	13,8 дня	14,2	6,3	0,020
$^{119}\text{Sb}$	38,2 часа	23,7	8,9	0,180
$^{123}\text{I}$	13,3 часа	13,7	7,2	0,036
$^{125}\text{I}$	59,4 дня	23,0	12,0	0,192
$^{191}\text{Pt}$	2,80 дня	13,3	17,8	0,048
$^{193\text{m}}\text{Pt}$	4,33 дня	27,4	10,9	0,072
$^{195\text{m}}\text{Pt}$	4,0 дня	36,6	23,1	0,088
$^{201}\text{Tl}$	3,04 дня	20,9	14,8	0.107

Свойства радионуклидов даны на основании работы Эккермана и Эндо (Eckerman and Endo, 2007)

## 2.2. Пути проникновения в клеточные компартменты<sup>2</sup>

Биологически активное вещество, которое не способно проникать сквозь мембраны, может оказаться внутри клетки неспецифически за счет пиноцитоза, либо за счет присоединения к специально разработанным транспортерам, приспособленным для прямого проникновения через плазматическую мембрану, или же к использованию естественных механизмов эндоцитоза и фагоцитоза, что позволяет достигать специфического проникновения в клетку. Пиноцитоз не может обеспечить внутриклеточного накопления вводимых веществ концентрации большей, чем имеется во внешней среде, также как не может и обеспечить и сколь-либо эффективного проникновения этих веществ в цитозоль. Для прямого проникновения через клеточную мембрану предложены конструкции, содержащие так называемые пептиды, проникающие в клетку (cell penetrating peptides, CPP) (Guidotti et al., 2017). Как показали проведенные исследования прямое проникновение CPP в цитозоль не слишком эффективно. Конструкции с CPP демонстрируют также выраженный неспецифический эндоцитоз с последующим более или менее эффективным проникновением через мембраны эндосом и выходом в цитозоль (Richard et al., 2003). Такой вариант доставки неспецифичен по

<sup>2</sup> Раздел написан по статье автора и его соавторов: Розенкранц А.А., Уласов А.В., Слестникова Т.А., Храмов Ю.В., Соболев А.С. (2014) Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки. *Биохимия*, **79**(9): 1148-1168.

отношению к типу клетки и требует для достижения эффекта насыщения всего организма доставляющей конструкцией с присоединенным. Специфичный тип доставки может обеспечить использование активного транспорта внутрь нужного типа клеток с использованием интернализуемых поверхностных рецепторов и последующего внутриклеточного транспорта. Это приводит к необходимости включения в состав доставляющей конструкции (транспортера) компонента, обладающего функцией узнавания необходимой клетки, обладающего свойствами интернализуемого лиганда. Поглощенная за счет рецептор-опосредуемого эндоцитоза конструкция, может, в зависимости от рецептора и типа эндоцитоза быть возвращена на поверхность клетки за счет естественного процесса рециркуляции, или, продвигаясь по эндоцитозному пути попасть в поздние эндосомы и в лизосомы, которые являются конечным пунктом утилизации интернализуемых веществ. За счет сортировки и внутриклеточного везикулярного транспорта конструкция с присоединенным действующим началом может быть направлена в ЭР или аппарат Гольджи. Для реализации такого варианта необходим добавочный компонент (модуль), обладающий соответствующей функцией. При этом не происходит переноса через мембрану и доставляемое вещество остается топологически по ту же сторону от плазматической мембраны, что и внеклеточное пространство. Для транспорта в другие клеточные компартменты (цитозоль, ядро, митохондрии) необходим перенос через одинарную (выход из эндосом или ЭР) или двойную (вход в ядро через комплекс ядерной поры (Alber et al., 2007) мембраны. Для проникновения во внутреннее пространство митохондрий также необходимо преодолеть двойную мембрану, что может быть осуществлено с использованием транслокационных комплексов TOM и TIM23 (Becker et al., 2012). Таким образом, транспорт извне в ядро или митохондрии требует наличия не только компонента, обладающий транспорта в них функцией, но и компонента для эффективного проникновения в цитозоль. Включения сигнала ядерной локализации, обеспечивающего транспорт через ядерную пору, в состав доставляющей конструкции, содержащий интернализуемый лиганд, будет недостаточно для эффективного транспорта в ядро клетки.

### **2.3. Использование рецептор-опосредованного эндоцитоза: решение одних проблем и возникновение других<sup>3</sup>**

Терапевтические молекулы, обладающие превалирующим действием в определенном клеточном компартменте (ФС, эмиттеры электронов Оже, эмиттеры  $\alpha$ -

---

<sup>3</sup> Раздел написан по статье автора и его соавторов: Розенкранц А.А., Уласов А.В., Слестникова Т.А., Храмов Ю.В., Соболев А.С. (2014) Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки. *Биохимия*, **79**(9): 1148-1168.

частиц, нуклеиновые кислоты, белки, другие макромолекулы и наночастицы), для максимальной эффективности оказаться в этом компартменте. Локализация внутриклеточных мишеней для биологически активных агентов различается. Примерами можно назвать ядро для ДНК, митохондрии для проапоптотических молекул, лизосомы для лизосомных ферментов. Необходимым этапом доставки в соответствующий внутриклеточный компартмент является обязательное проникновение внутрь клетки. Большинство используемых в клинике лекарств способны сами по себе проникать через клеточную мембрану посредством пассивной диффузии (Allen and Cullis, 2013) или, используя мембранные транспортеры (Giacomini et al., 2010). Значительная часть терапевтических веществ, для которых необходима внутриклеточная доставка, не способна проникать через клеточную мембрану ни самостоятельно, ни с помощью мембранных транспортеров. По этой причине направленная доставка таких лекарств должна включать в себя не только процесс распознавания клеток-мишеней, но и процесс проникновения в них, как правило, путем рецептор-опосредованного эндоцитоза или, реже, за счет включения в состав носителя мембранно-активных пептидов, способных образовывать поры непосредственно в плазматической мембране.

Возможность доставки лекарственных средств в опухолевые клетки при помощи эндоцитируемых рецепторов считается перспективной в течение нескольких десятилетий. Интенсивные работы в этом направлении начались в 1980х годах, когда изучение биологии опухолевых клеток выявило наличие ряда поверхностных рецепторов, сверхэкспрессированных на них, и, отсутствующих или имеющих в многократно меньшем количестве на поверхности нормальных клеток. Такие рецепторы являются маркерами для распознавания при помощи специфичных для данного рецептора лиганда, например, природных регуляторных молекул, антител, антителомиметиков или аптамеров (Burne et al., 2008). В том случае, когда такие рецепторы не только имеются в большом количестве на опухолевых клетках, но и интернализуются в них, их можно использовать в качестве средства доставки терапевтических средств непосредственно внутрь клеток рецептор-зависимым образом (Migo, 2012). К настоящему времени известны многочисленные примеры увеличения экспрессии эндоцитируемых рецепторов факторов роста при онкологических заболеваниях. Во многих из этих случаев поверхностные рецепторы являются не только маркерами злокачественной трансформации, но и их причиной (или причиной перехода заболевания в более продвинутую стадию). Экспрессия многих поверхностных рецепторов существенно различается в разных типах нормальных клеток организма, поэтому рецептор-опосредуемый эндоцитоз может также быть использован для доставки лекарств в клетку и при лечении других заболеваний. Помимо

этого, имеются также потенциальные мишени для терапии заболеваний, отличающихся повышенной экспрессией наружных рецепторов. К ним относятся сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, воспалительные заболевания, ВИЧ и другие. Список потенциальных лигандов для интернализуемых рецепторов с измененными свойствами, которые позволяют отличить клетку-мишень от популяций клеток, не являющихся целевыми, включает мутировавшие онкогены и сверхэкспрессированные белки на поверхности злокачественных клеток, а также рецепторы, подходящие для доставки в определенные типы клеток. (Табл. 2.2).

Для таких биологически активных веществ, как ФС и излучатели частиц с высокой ЛПЭ доставка при помощи рецептор-опосредуемого эндоцитоза в клетку способна заметно увеличить эффективность, поскольку для них становятся доступными более чувствительные внутриклеточные мишени. Тем не менее, для тех лекарств, местом действия которых является цитозоль, ядро и митохондрии, внутриклеточное распределение после эндоцитоза остается неоптимальным. Наиболее вероятным результатом эндоцитоза является транспорт в лизосомы, содержимое которых подвергается действию гидролитических ферментов. Помимо этого, естественные пути внутриклеточного везикулярного транспорта проходят через рециркуляционный эндоцитозный компартмент, откуда многие эндоцитированные молекулы выводятся из клетки. Для того чтобы миновать стандартные варианты эндоцитозных путей, доставляющая активный агент конструкция должна содержать дополнительные компоненты, обладающие возможностью переноса через мембрану.

Важная подгруппа онкогенных генетических изменений вызвана мутациями, делециями и транслокациями в генах, кодирующих поверхностные рецепторы факторов роста и гормонов. Эти изменения могут привести к появлению новых уникальных аминокислотных последовательностей в рецепторе, которые являются привлекательными мишенями для противоопухолевой терапии (Binder et al., 2018; Frederick et al., 2000; Greulich and Pollock, 2011; Kan et al., 2002; Lux et al., 2000; Matsumura et al., 2008; Melnick, 2007; Robertson et al., 1998; Wikstrand et al., 1995; Ymer et al., 2011), а также к сверхэкспрессии соответствующего рецептора за счет амплификации, транслокации или изменений в регуляторных последовательностях.

Создание антител или антителомиметиков для множества терапевтических случаев все еще является вопросом будущего. Подходящей первоочередной целью для оптимизации сложных носителей лекарственных средств должны быть часто встречающиеся аномалии, например, сверхэкспрессия меланокортинового рецептора

первого типа (MC1R) при меланоме, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) при многих типах рака.

**Таблица 2.2. Примеры интернализуемых поверхностных рецепторов с измененной структурой или сверхэкспрессией при различных патологиях.**<sup>4</sup>

Название	Код*	Природные лиганды	Основные нарушения	Патологии	Ссылки
Киназа анапластической лимфомы (Ki-1; тирозинкиназный рецептор ALK; CD246)	Q9UM73	Плейотропин, мидкайн	Сверхэкспрессия, транслокация, мутации	Нейробластома, анапластическая крупноклеточная лимфома, НМРЛ	(Passoni et al., 2009; Preusser et al., 2013; Wellstein, 2012)
Рецептор тимусного стромального лимфопоэтина (TSLPR; CRLF2, cytokine receptor-like factor 2)	Q9HC73	Тимусный стромальный лимфопоэтин	Сверхэкспрессия, перестройка, мутации	Острый лимфобластный лейкоз, астма, носовые полипы	(Mullighan, 2011; Russell et al., 2009; Tal et al., 2014; Zhong et al., 2014)
Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR; ErbB1; HER1)	P00533	Эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста $\alpha$ и др.	Сверхэкспрессия, амплификация, мутации	Рак головы и шеи, мочевого пузыря, яичников, толстого кишечника, НМЛР, глиобластома и др.	(Arteaga and Engelman, 2014; Goffin and Zbuk, 2013; Yewale et al., 2013)
Гомолог 2 вирусного онкогена эритробластного лейкоза (erbB2, HER2)	P04626	нет	Сверхэкспрессия, мутации	Рак молочной железы, мочевого пузыря, яичников, желудка, НМЛР.	(Arteaga and Engelman, 2014; Ocana and Pandiella, 2013)
Рецептор фактора роста фибробластов 1 (FGFR1, рецептор основного фактора роста фибробластов, BFGFR; Fms-like tyrosine kinase 2; FLT-2; CD331)	P11362	Факторы роста фибробластов	Amplification, mutations, overexpression	Миелопролиферативные заболевания, неходжкинская лимфома, плоскоклеточный рак легкого, краниосиностоз, синдромы Каллмана и Антли-Бикстера и др.	(Kelleher et al., 2013; Lim et al., 2013; Savage et al., 2013)
Рецептор фактора роста фибробластов 2 (FGFR2, рецептор фактора роста кератиноцитов; KGFR; CD332)	P21802	Факторы роста фибробластов	Amplification, mutations	Рак желудка, груди, эндометрия и др.; угри и другие кожные заболевания,	(Hong et al., 2013; Katoh, 2009; Kelleher et al., 2013)

<sup>4</sup> Таблица опубликована в статье автора и его соавторов: Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. (2015) Modular Nanotransporters for Targeted Intracellular Delivery of Drugs: Folate Receptors as Potential Targets. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 9, 1227-1238.

				краниосиностоз	
Рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGFR3, CD333)	P22607	Факторы роста фибробластов	Мутации	Рак мочевого пузыря, шейки матки, множественная миелома, скелетная дисплазия	(Kelleher et al., 2013; Krejci, 2014)
Рецептор фактора роста фибробластов 4 (FGFR4, CD334)	P22455	Факторы роста фибробластов	Мутации, сверхэкспрессия	Рак толстого кишечника, молочной железы, рабдомиосаркома	(Kelleher et al., 2013)
fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3)	P36888	FLT3LG или лиганд FLT3	Тандемная дупликация	Острый лимфолейкоз, острый миелоидный лейкоз	(Swords et al., 2012)
Рецептор фолиевой кислоты $\alpha$ (FR- $\alpha$ )	P15328	Фолат	Сверхэкспрессия	Ovary, brain, kidney, breast, lung cancers, etc.	(Elnakat and Ratnam, 2004; Lu and Low, 2012)
Рецептор фолиевой кислоты $\beta$ (FR- $\beta$ )	P14207	Фолат	Сверхэкспрессия	Лейкемии, саркомы, активированные моноциты / макрофаги при воспалениях, включая ревматоидный артрит, атеросклероз и псориаз.	(Elnakat and Ratnam, 2004; Lu and Low, 2012)
Рецептор фактора роста гепатоцитов (met, протоонкоген; MET, рецептор фактора рассеяния гепатоцитов)	P08581	Фактор роста гепатоцитов	Мутации, амплификация генов, активация транскрипции	Папиллярный почечный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, стволовые клетки глиобластомы и др.	(Boccaccio and Comoglio, 2013; Goetsch et al., 2012; Perez-Vargas et al., 2013)
Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R; CD221)	P08069	Инсулин, IGF1, IGF2	Сверхэкспрессия	Эпителиальные опухоли, саркомы, множественная миелома и др.	(Werner and Bruchim, 2009)
Рецептор инсулина (CD220)	P06213	Инсулин, IGF1, IGF2	Сверхэкспрессия	Рак груди, щитовидной железы, толстой кишки, яичников, простаты, саркома	(Belfiore and Malaguarnera, 2011)

Рецептор интерлейкина 3 $\alpha$ (IL-3R $\alpha$ ; CD123)	P26951	Интерлейкин 3	Сверхэкспрессия	Острый миелоидный лейкоз	(Testa et al., 2004)
Рецептор интерлейкина 21 (IL21R, CD360)	Q9HBE5	Интерлейкин 21	Транслокация	Лимфомы	(Wood et al., 2013)
Рецептор надсемейства иммуноглобулинов Immunoglobulin superfamily receptor translocation associated (IRTA1, Fc receptor-like protein 4, FcRL4, CD307d)	Q96PJ5		Транслокация	В-клеточные лимфомы	(Falini et al., 2012)
Рецептор фактора роста тучных / стволовых клеток KIT (SCFR; c-KIT; CD117)	P10721	Фактор стволовых клеток	Сверхэкспрессия, mutations	Опухоли стромы желудочно-кишечного тракта, острый миелоидный лейкоз, меланома, эпителиомы, мастоцитоз	(Ashman and Griffith, 2013; De Vogelaere et al., 2013; Liang et al., 2013; Smalley et al., 2009)
Рецептор меланоцитстимулирующего гормона (MSH-R; меланокортиновый рецептор 1, MC1-R)	Q01726	Меланоцит-стимулирующий гормон	Сверхэкспрессия	Меланома	(Salazar-Onfray et al., 2002)
Рецептор фактора роста нервов, (рецептор нейротрофической тирозинкиназы, NTRK1, рецептор тирозинкиназы A, TRKA)	P04629	Факторы роста нервов	Транслокация	Рак щитовидной железы, молочной железы и др.	(Greco et al., 2010; Hondermarck, 2012)
NT-3 рецептор фактора роста нервов (рецептор нейротрофической тирозинкиназы 3, NTRK3)	Q16288	Факторы роста нервов	Транслокация	Врожденная фибросаркома, молочной железы	(Euhus et al., 2002; van Grotel et al., 2014)
Рецептор тромбоцитарного фактора роста $\alpha$ (PDGFR- $\alpha$ , CD140a)	P16234	Тромбоцитарные факторы роста	Транслокация, мутации, амплификация	Опухоли стромы желудочно-кишечного тракта, идиопатический гиперэозинофильный синдром, детская мультиформная глиобластома, фиброз, атеросклероз и др..	(Andrae et al., 2008; De Vogelaere et al., 2013; Heldin, 2013; Liu et al., 2011; Savage et al., 2013)
Рецептор тромбоцитарного фактора роста $\alpha$ (PDGFR- $\beta$ , CD140b)					



			амплификация	саркома, атеросклероз и др.	and Cross, 2004; Savage et al., 2013)
Протоонкоген тирозин-протеинкиназный рецептор Ret (протоонкоген c-Ret)	P07949	Glial cell derived neurotrophic factors	Мутации, транслокация,	Рак щитовидной железы, Феохромоцитома, НМРЛ и др.	(Mulligan, 2014; Takeuchi et al., 2012)
Рецептор соматостатина 2 (SSR2, SSTR2)	P30874	Somatostatin	Сверхэкспрессия	Нейроэндокринные опухоли	(Korner et al., 2012)
Рецептор тромбопоэтина (ТРО-R, белок миелопролиферативного лейкоза, c-Mpl, CD110)	P40238	Тромбопоэтин	Сверхэкспрессия	Миелопролиферативные новообразования	(Vainchenker and Constantinescu, 2012)
Рецептор тиреотропного гормона (TSHR)	P16473	Тиреоид-стимулирующий гормон	Мутации	Аденома щитовидной железы, болезнь Грейвса и др.	(Davies et al., 2005; Davies et al., 2010)
Рецептор гастрин-высвобождающего пептида (GRPR)	P30550	Гастрин-высвобождающий пептид, бомбезин	Сверхэкспрессия	Рак простаты	(Markwalder and Reubi, 1999)
Рецептор трансферрина (p90, CD71)	P02786	Трансферрин	Сверхэкспрессия, транслокация	Плоскоклеточный рак пищевода, неходжкинская лимфома и т. Д.	(Chan et al., 2014; Habeshaw et al., 1983; Tortorella and Karagiannis, 2014)
Тирозин-протеинкиназа Тес (рецептор ангиопоэтина-1; киназа эндотелиальных клеток внутренней оболочки, TIE 2, CD202b)	Q02763	Ангиопоэтины	Сверхэкспрессия	Миелоидные лейкозы, рак желудка, глиома	(Huang et al., 2010; Martin et al., 2008)
Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3 (Fms-подобная тирозинкиназа 4, рецептор фактора проницаемости сосудов, FLT4, VEGFR3, VPF)	P35916	VEGF-C, VEGF-D	Мутации	Ангиосаркома, болезнь Милроя	(Butler et al., 2007; Park et al., 2010)

\* – код белка по базе UniProt. НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого.

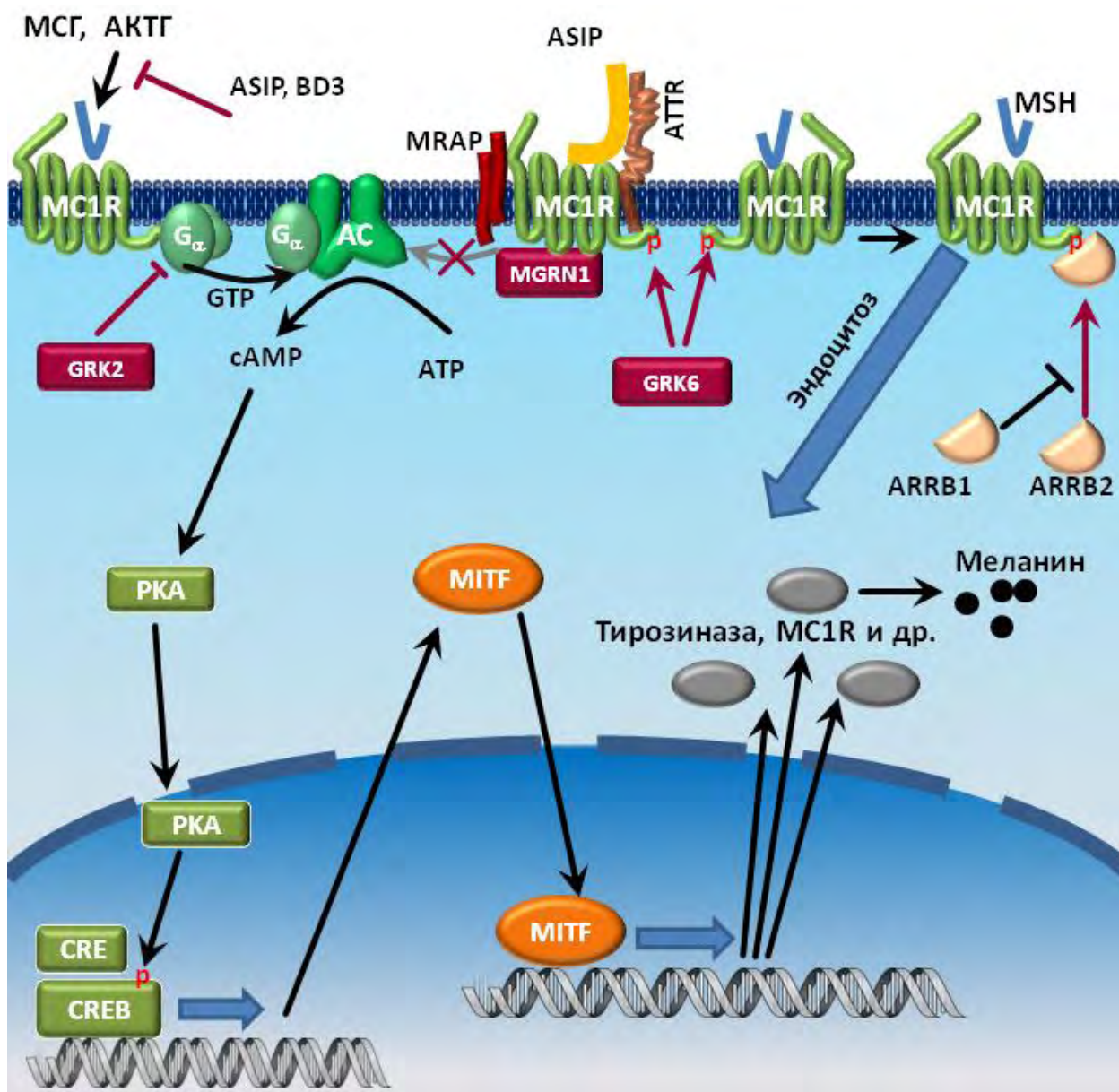
## 2.4. Меланокортиновый рецептор 1 типа<sup>5</sup>

Рецептор  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона ( $\alpha$ -МСГ) или меланокортиновый рецептор первого типа (MC1R), принадлежит к группе меланокортиновых рецепторов, которая насчитывает еще 4 рецептора с гомологией от 40 до 60%. Все эти рецепторы способны связывать адrenокортикотропный гормон (АКТГ) и все, кроме одного (MC2R),  $\alpha$ -МСГ. Другие меланоцитстимулирующие пептиды ( $\beta$ - и  $\gamma$ -МСГ) также способны связываться с MC1R и MC(3-5)R и вызывать биологический эффект, однако их сродство к этим рецепторам существенно ниже. MC2R является специфическим рецептором для АКТГ (Eves and Hauck, 2010). Меланокортиновые рецепторы, полипептидная цепь которых пронизывает мембрану 7 раз, принадлежат к огромному семейству GPCR-рецепторов (G-protein coupled receptors), взаимодействующих с G-белками. Меланокортиновые рецепторы являются наименьшими из GPCR, с короткими N- и C-концами и второй внеклеточной петлей. Все пять MCR функционально сопряжены с аденилатциклазой и их действие опосредовано, в первую очередь, активацией цАМФ-зависимого сигнального пути (Eves and Hauck, 2010). При активации этого сигнального пути через MC1R в меланоцитах происходит стимуляция активности тирозиназы, которая является скоростью-лимитирующим ферментом при образовании меланина (Scherer and Kumar, 2010) (рис. 2.2). Меланин накапливается в специализированных клеточных органеллах – меланосомах, которые вдоль дендритных выростов транспортируются во внеклеточное пространство, где их захватывают окружающие кератиноциты. Один меланоцит контактирует и обеспечивает меланином примерно 35 кератиноцитов (Li and Herlyn, 2000). В коже активация MC1R при облучении ультрафиолетом происходит за счет увеличения синтеза и высвобождения меланокортиновых пептидов меланоцитами и кератиноцитами (Chakraborty et al., 1999; Chakraborty et al., 1996; D'Orazio et al., 2006). Под действием ультрафиолета на кератиноциты происходит также увеличение ими продукции эндотелина 1, который является паракринным митогеном для меланоцитов и увеличивает экспрессию MC1R в них (Scott et al., 2002; Tada et al., 1998). Ответ меланоцитов на  $\alpha$ -МСГ продолжается долгое время, поскольку гормон вызывает увеличение синтеза мРНК рецептора, по всей вероятности через повышение уровня цАМФ (Scott et al., 2002), в результате чего экспрессия MC1R увеличивается (Rouzaud et al., 2003; Rouzaud et al., 2005; Suzuki et al., 1996). Аналогичные эффекты, по-видимому, могут наблюдаться в ряде случаев и в меланомных клетках (Rouzaud et al., 2005; Siegrist et al., 1994). Более того,

---

<sup>5</sup> Весь раздел 2.4 является большей частью обзора автора и его соавторов с незначительными изменениями: Розенкранц А.А., Слестникова Т.А., Дурыманов М.О., Соболев А.С. (2013) Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома. *Биохимия*, **78**, 1564-1575.

появление меланомы может заметно увеличить экспрессию MC1R в окружающих клетках (Xia et al., 1995).



**Рисунок. 2.2<sup>6</sup>.** Схема участия MC1R в регуляции меланогенеза. Связывание АКТГ или  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -меланоцитстимулирующих гормонов вызывает увеличение уровня цАМФ за счет активации аденилатциклазы (AC), индукцию MITF, который, в свою очередь, приводит к экспрессии ряда белков, в том числе тирозиназы и продукции меланина. Этот путь ингибируется как внеклеточными регуляторами, ASIP через связывание с MC1R и аттрактином (ATTR), а также  $\beta$ -дефензином 3 (BD3), так и рядом внутриклеточных регуляторных белков (MRAP, MGRN1, GRK2). Кроме этого, активированный MC1R подвергается эндоцитозу за счет фосфорилирования GRK6 и последующего связывания ARR1 и ARR2. В свою очередь, влияние GRK6 контролируется конкуренцией с ARR1, который тоже связывается с MC1R, но не вызывает эндоцитоза.

<sup>6</sup> По: Розенкранц А.А., Сланикова Т.А., Дуриманов М.О., Соболев А.С. (2013) Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома. *Биохимия*, **78**, 1564-1575.

#### 2.4.1. Эндоцитоз и внутриклеточное распределение MC1R

Как и другие GPCR, вновь синтезированный MC1R транспортируется на поверхность экспрессирующих его клеток. Интересно, что на поверхности клеток меланокортиновые рецепторы существуют в виде предсуществующих гомо- и гетеродимеров, причем димеризация эта не зависит от связывания лигандов с рецепторами (Mandrika et al., 2005). Димеризация MC1R обусловлена как нековалентными взаимодействиями, так и образованием дисульфидных связей между мономерами (Zanna et al., 2008). По-видимому, гетеродимеризация мутантных и нормальных форм MC1R может быть причиной проявления доминантно-негативного действия ряда аллелей MC1R (Beaumont et al., 2009).

Инкубация клеток с агонистами MC1R приводит к интернализации лиганд-рецепторных комплексов (Wong and Minchin, 1996), что является одним из путей снижения активности запускаемых при стимулировании агонистами рецептора процессов. В случае MC1R десенсибилизация ответа реализуется через две киназы семейства GPCR киназ (GRK – GPCR kinase), GRK2 и GRK6 (Sanchez-Laorden et al., 2007; Sanchez-Mas et al., 2005). Связывание агонистов с MC1R приводит не только к его активации, но и к активации этих киназ, из-за чего увеличение уровня цАМФ в клетках под воздействием гормонов после достижения максимума начинает снижаться. Одна из этих киназ (GRK2) способна уменьшать постоянную, не зависящую от активации агонистами активность MC1R (Sanchez-Mas et al., 2005), в то время как GRK6 опосредует агонист-зависимую интернализацию рецептора путем фосфорилирования аминокислот в С-концевой цитоплазматической части белка (Sanchez-Laorden et al., 2007). Эта интернализация регулируется связыванием аррестинов с цитоплазматической частью рецептора (Abrisqueta et al., 2013). В процессе участвуют  $\beta$ -аррестин-1 и  $\beta$ -аррестин-2, или ARRB1 и ARRB2 (arrestin-beta-1 и arrestin-beta-2). ARRB2 стимулирует эндоцитоз MC1R и ингибирует агонист-зависимую продукцию цАМФ, в то время как ARRB1 не влияет на эти процессы, но конкурирует с ARRB2 за связывание с MC1R (Abrisqueta et al., 2013) (рис. 2.2).

Иммунохимическое окрашивание меланомных клеток также показывает околядерное расположение MC1R в них и у кератиноцитов соседствующих с меланомной опухолью (Xia et al., 1996; Xia et al., 1995), что свидетельствует об эндоцитозе комплексов  $\alpha$ -МСГ–рецептор. Интересно отметить, что иммуноцитохимическое окрашивание трофобластов плаценты на MC1R показывает в основном внутриядерное

окрашивание (Thornwall et al., 1997), т.е. при соответствующих условиях MC1R может активно транспортироваться в ядро.

#### **2.4.2. Взаимодействие MC1R с внутриклеточными регуляторами**

Помимо взаимодействия с  $G_{s\alpha}$  и последующей активации аденилатциклазы MC1R взаимодействует также с рядом других внутриклеточных белков. MC1R, подобно другим меланокортиновым рецепторам, способен взаимодействовать с небольшим вспомогательным регуляторным белком MRAP (melanocortin-2-receptor accessory protein) и его гомологом MRAP2. Взаимодействие с этими трансмембранными белками снижает продукцию цАМФ в ответ на меланоцитстимулирующие лиганды, но, в отличие от некоторых других меланокортиновых рецепторов (в первую очередь, MC2R), не влияет на транспорт MC1R к плазматической мембране после его синтеза (Chan et al., 2009).

Кроме этого, MC1R может взаимодействовать еще с несколькими регуляторными клеточными белками, влияющими на прохождение сигнала от рецептора. Один из них – аттрактин, который является со-рецептором при взаимодействии ASIP (agouti signal protein), антагониста,  $\alpha$ -МСГ с MC1R (He et al., 2001). Другим является убиквитин E3 лигаза с RING-доменом (real interesting new gene) MGRN1 (Mahogunin RING finger-1). Этот внутриклеточный белок способен снижать активацию рецептора агонистами за счет конкуренции с эффектором MC1R –  $G_{s\alpha}$ , опосредующим активацию аденилатциклазы (Perez-Oliva et al., 2009) (рис. 2.2).

#### **2.4.3. Регуляция экспрессии MC1R.**

Экспрессия MC1R в клетках меланомы мыши и человека регулируется по-разному. Эндоцитоз рецептора после связывания агониста приводит к появлению меченого агониста в лизосомной фракции в клетках меланомы мыши B16, что становится заметным уже через 30 минут после добавления пептида (Wong and Minchin, 1996). Интернализированный рецептор не возвращается на поверхность клетки этих клеток, при этом происходит долговременное снижение выработки его мРНК. Уменьшение экспрессии поверхностных MC1R под действием агонистов заметно выражено на линиях меланомы мыши (B16 и ее производные, меланома Клаудмана S91). Добавление агонистов MC1R к клеткам меланомы человека в культуре в большинстве случаев слабо сказывается на количестве рецепторов или приводит, в конечном счете, к заметному увеличению их количества на их поверхности клеток за счет увеличения MC1R (Eberle et al., 1993; Siegrist et al., 1994).

Общая схема регуляции экспрессии гена MC1R в меланоцитах и клетках меланомы включает, по-видимому, следующие этапы: меланокортиновые пептиды стимулируют при

связывании  $G\alpha_s$ -сопряженный MC1R, что приводит к активации аденилатциклазы, увеличению продукции цАМФ, активации протеинкиназы А и фосфорилированию белка CREB (cAMP-responsive element-binding protein). Фосфорилированный CREB связывает цАМФ-отвечающий элемент CRE (cAMP-responsive element) промотора транскрипционного фактора микрофтальмии, что вызывает появление белка MITF (microphthalmia transcription factor). MITF в свою очередь взаимодействует с М-боксами ряда других промоторных областей, что приводит к активации синтеза MC1R, тирозиназы, белков 1 и 2, родственных тирозиназе и, возможно, других белков. В свою очередь, увеличение уровня MC1R в клетке способно усиливать описанный выше каскад событий. Активация экспрессии генов фактором MITF приводит к образованию пигмента, пролиферации и ингибированию апоптоза меланоцитов (Garcia-Borron et al., 2005; Wikberg et al., 2000). Еще одним фактором, обеспечивающим положительную обратную связь при активации меланоцитов через MC1R, может являться выброс меланокортиновых пептидов, поскольку меланосомы меланоцитов человека содержат прогормонконвертазы, необходимые для расщепления проопиомеланокортина и сами продукты этого расщепления – МСГ и АКТГ (Peters et al., 2000).

Кроме этого, имеются также сведения об еще одном механизме регуляции MC1R на транскрипционном уровне за счет межгенного сплайсинга (Dalziel et al., 2011). Как отмечают авторы этой работы, ген MC1R человека имеет сложный нестандартный сайт полиаденилирования, что делает возможным межгенный сплайсинг между MC1R и расположенным ниже в непосредственной близости геном к  $\beta$ -III-тубулина (TUBB3). В результате, кроме обычного MC1R образуются два варианта MC1R-TUBB3, но только один из них выявляется на поверхности клетки. Добавление  $\alpha$ -МСГ приводит к смещению экспрессии в пользу MC1R-TUBB3, который имеет значительно сниженную способность активации аденилатциклазы.

#### **2.4.4. Экспрессия MC1R в тканях.**

Экспрессия MC1R, как и экспрессия всех меланокортиновых рецепторов в нормальных тканях, невелика и наиболее выражена в меланоцитах. Экспрессия остальных меланокортиновых рецепторов наиболее выражена в центральной нервной системе (MC3R, MC4R), коре надпочечников (MC2R), желудочно-кишечном тракте (MC3R), лимфоцитах и экзокринных железах (MC5R) (Ramachandrapa et al., 2013).

В нормальной коже человека MC1R иммуногистохимически выявляется в меланоцитах волосяных фолликулов, потовых и сальных желез, но не в кератиноцитах и большинстве меланоцитов межфолликулярного эпидермиса. При появлении опухоли

кератиноциты, окружающие первичные меланомы, интенсивно прокрашиваются антителами на MC1R (Bohm et al., 1999; Xia et al., 1995) с градиентом иммуноцитохимического прокрашивания, увеличивающимся по направлению к опухоли (Xia et al., 1995).

Среди клеток кожи, с которыми в первую очередь соседствует меланома, экспрессия MC1R отмечена в нормальных меланоцитах, кератиноцитах (Wikberg, 1999), а также на клетках сосудистого эндотелия кожи (Hartmeyer et al., 1997; Luger et al., 2003). Необходимо отметить, что в большинстве случаев экспрессия MC1R в клетках нормальной кожи как минимум на порядок ниже, чем в меланоцитах и, скорее всего, физиологически не значима (Roberts et al., 2006). Более того, в большинстве тех случаев, когда экспрессия MC1R определяется только по RT-PCR, проверка тех же объектов радиолигандным методом не способна выявить меланокортиновый рецептор (Roberts et al., 2006). В других тканях MC1R был обнаружен в рассеянных нейронах серой субстанции мозга, на макрофагах и моноцитах, клетках Лейдига в семенниках, лютеиновых клетках, трофобластах плаценты, а также на астроцитах (Wikberg, 1999). Иммуногистохимическое окрашивание показывает, что экспрессия MC1R в меланомах во много раз выше, чем во всех нормальных тканях (Salazar-Onfray et al., 2002). Относительно высокое, но много меньшее, чем в меланомах, прокрашивание было обнаружено в мозговом слое надпочечников. Экспрессия MC1R в моноцитах способна увеличиваться под действием различных цитокинов, но при этом остается много ниже экспрессии этого рецептора на клетках меланом (Salazar-Onfray et al., 2002). Совокупность имеющихся данных (Funasaka et al., 1999; Loir et al., 1999; Lopez et al., 2007; Ogbah et al., 2012; Salazar-Onfray et al., 2002; Tatro et al., 1990; Tatro et al., 1992) ясно показывает, что MC1R может рассматриваться в качестве маркера меланом, а учитывая, что он является эндцитируемым поверхностным рецептором и перспективным средством доставки лекарственных веществ в клетки меланом. Значительный интерес представляет собой выяснение взаимосвязей экспрессии MC1R с образованием меланом.

#### **2.4.5. Роль MC1R в образовании, развитии и предотвращении появления меланом.**

MC1R является ключевым звеном в защите кожи от ультрафиолета и, соответственно этому, играет несколько ролей при трансформации меланоцитов. С одной стороны, как уже было отмечено, активация MC1R, по всей вероятности, задействована в пролиферации клеток меланомы, с другой стороны, эта же активация, так же как и увеличение продукции  $\alpha$ -МСГ, являются факторами, защищающими меланоциты и другие клетки от воздействия ультрафиолета за счет индукции синтеза поглощающего

свет и обладающего антиоксидантными свойствами пигмента меланина (Abdel-Malek et al., 2008). Нормальное функционирование такого пути является основным фактором, препятствующим возникновению меланом. Изменение этого функционирования приводит, в частности, к изменению выработки черного или коричневого варианта меланина – эумеланина – меланоцитами и соотношения уровней эумеланина и желтого или красноватого варианта пигмента (феомеланин) в меланосомах, что определяет, в частности, цвет кожи. Полиморфизм гена MC1R, по-видимому, является одним из основных факторов, определяющих разнообразие пигментации людей (Sturm, 2009). В настоящее время известно не менее 85 аллельных вариантов этого гена (Demenais et al., 2010; Ibrahim and Haluska, 2009a). Некоторые из этих мутаций, в особенности, определяющие появление рыжего цвета волос, сопряжены со значительным увеличением риска развития меланомы (Beaumont et al., 2009; Beaumont et al., 2011; Demenais et al., 2010).

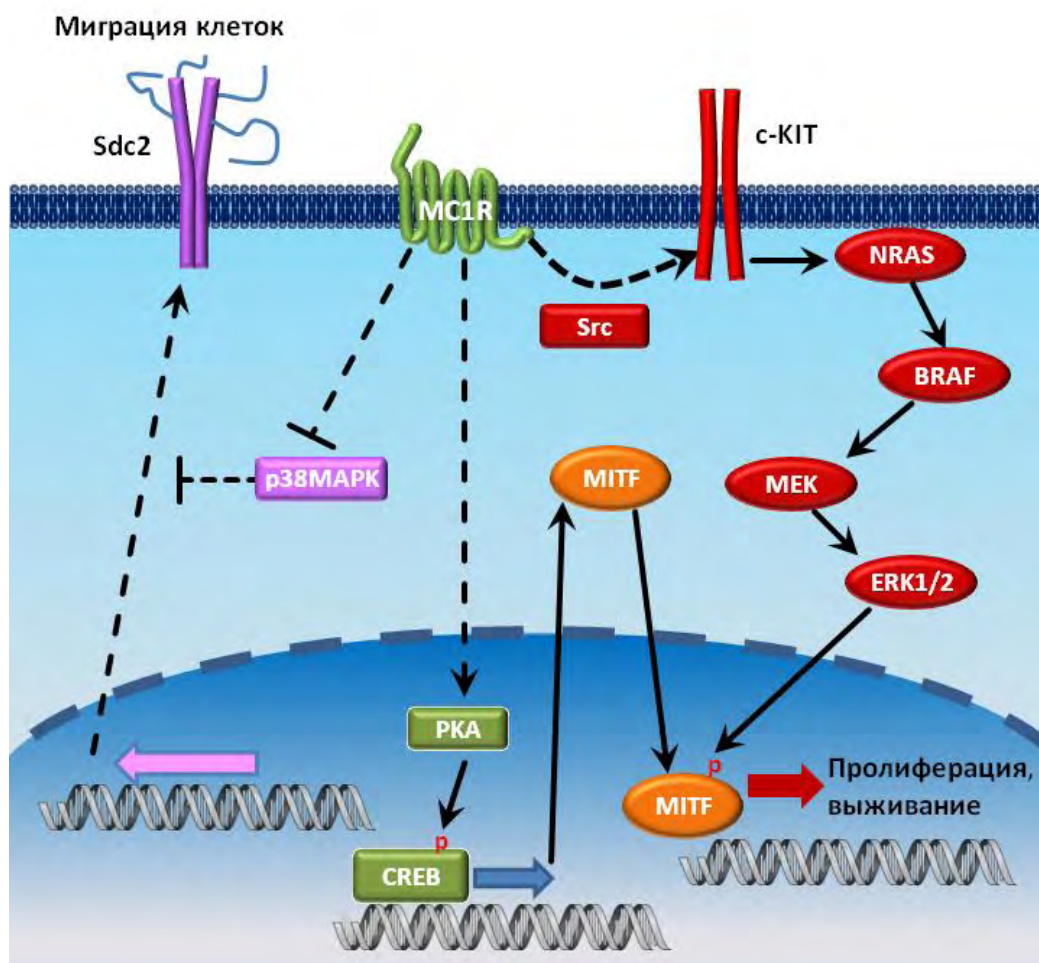
Уровень экспрессии MC1R сопряжен с миграцией клеток меланомы – чем он выше, тем выше способность к миграции (Chung et al., 2012). MC1R вызывает уменьшение активности киназы стрессового ответа p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), что приводит к увеличению экспрессии синдекана-2, который, в свою очередь, вовлечен в увеличение подвижности клеток меланомы. Добавление к клеткам меланомы  $\alpha$ -MSP, напротив, снижает их подвижность (рис. 2.3).

Кроме этого, активация MC1R, как уже было отмечено, вызывает в меланоцитах увеличение экспрессии MITF, который является звеном в реализации действия RAS/RAF/MEK/ERK сигнального пути, приводит к пролиферации и способствует выживанию клеток (Flaherty et al., 2012; Ibrahim and Haluska, 2009b). Необходимо отметить, что MC1R и RAS/RAF/MEK/ERK путь также связаны и более прямым образом (рис. 2.3). Активация MC1R может приводить не только к повышению уровня цАМФ, но также к транс-активации рецептора фактора роста стволовых клеток c-KIT, по-видимому, через тирозинкиназу Src (Herraiz et al., 2011), что, в свою очередь, приводит к активации киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (extracellular-signal-regulated kinase) ERK1 и ERK2 (Herraiz et al., 2009; Herraiz et al., 2011). Ряд вариантов MC1R с мутациями, обеспечивающих рыжий цвет волос, теряют способность повышать уровень цАМФ в ответ на гормон, но сохраняют способность к активации ERK (Herraiz et al., 2009; Herraiz et al., 2012).

Совокупность накопленных к настоящему моменту данных позволяет сделать вывод, что экспрессия MC1R на клетках меланомы является не только особенностью,



связанной с происхождением данного типа опухолей, но напрямую связана с активацией деления клеток и способностью к метастазированию. Чем выше экспрессия этого рецептора на клетках меланомы, тем чаще происходит их деление, способствуя накоплению в опухоли клеток с повышенным содержанием MC1R. Лиганды для этого рецептора, поэтому, могут рассматриваться в качестве удобных компонентов для создания диагностических средств и систем специфической доставки в клетки меланомы. Меланокортиновые рецепторы и, в частности, MC1R отличаются наличием целого ряда природных агонистов и антагонистов, которые регулируют работу эффекторных систем, связанных с этими рецепторами.



**Рисунок 2.3<sup>7</sup>.** Схема влияния MC1R на развитие меланомы. MC1R может воздействовать на активность фактора микрофтальмии как через протеинкиназу А (PKA), так и через онкогенный сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK через Src-зависимую активацию c-KIT (Herraiz et al., 2011). Кроме этого, MC1R увеличивает миграцию клеток меланомы за счет увеличения экспрессии синдекана-2 (Sdc2) (Chung et al., 2012).

<sup>7</sup> По: Розенкранц А.А., Сланикова Т.А., Дуриманов М.О., Соболев А.С. (2013) Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланома. *Биохимия*, **78**, 1564-1575.

#### 2.4.6. Природные лиганды меланокортиновых рецепторов.

Известно четыре природных лиганда, которые могут связываться с меланокортиновыми рецепторами и инициировать соответствующие внутриклеточные события (АКТГ,  $\alpha$ -,  $\beta$ -, и  $\gamma$ -МСГ). Все они являются производными проопиомеланокортина, единого полипептида-предшественника размером более 30 кД (Abdel-Malek, 2001). Посттрансляционное расщепление этого пептида приводит к появлению целого ряда биологически активных пептидов – меланокортинов,  $\beta$ -липотрофного гормона и  $\beta$ -эндорфина. Образование различных производных проопиомеланокортина тканеспецифично и происходит под действием прогормонконвертаз. Под действием прогормонконвертазы 1 происходит образование АКТГ и  $\beta$ -липотрофина, а также N-концевого пептида. Прогормонконвертаза 2 производит расщепление АКТГ, следствием чего является к появлению  $\alpha$ -МСГ. Расщепление  $\beta$ -липотрофина приводит к появлению  $\gamma$ -липотрофина, расщепляющегося в дальнейшем с образованием  $\beta$ -МСГ и  $\beta$ -эндорфина. Расщепление N-концевого фрагмента проопиомеланокортина приводит к образованию  $\gamma$ -МСГ (Eves and Haусock, 2010). Все меланокортиновые пептиды содержат одну и ту же консервативную последовательность His-Phe-Arg-Trp. Несколько более длинный пептид Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, который входит в состав  $\alpha$ - и  $\beta$ -МСГ, а также АКТГ, важен, по-видимому, для активации меланогенеза. С-концевой трипептид  $\alpha$ -МСГ определяет его противовоспалительное и иммуносупрессорное действие (Abdel-Malek, 2001; Wikberg et al., 2000). При этом рецепторы, определяющие эти эффекты  $\alpha$ -МСГ, отличаются от тех, которые индуцируют меланогенез в меланоцитах как по диапазону концентраций, в которых проявляется эффект  $\alpha$ -МСГ, так и по аминокислотным последовательностям, необходимым для проявления эффекта (Abdel-Malek, 2001; Wikberg et al., 2000). Возможным внутриклеточным путем реализации этого эффекта  $\alpha$ -МСГ является ингибирование ядерной транслокации NF- $\kappa$ B через ингибирование фосфорилирования I- $\kappa$ B его киназой с последующим предотвращением деградации I- $\kappa$ B протеасомой (Wikberg et al., 2000).

Наиболее интенсивна продукция меланокортиновых пептидов в передней доле гипофиза, однако продукция этих пептидов достаточно широко представлена и в других тканях организма (надпочечники, нейроны кишечника, кожа), где они выполняют скорее паракринную, чем эндокринную функцию (Wikberg et al., 2000). Меланомы обладают повышенной экспрессией проопиомеланокортина, что возможно объясняется повышенной экспрессией кортикотропин-рилизинг гормона и его рецептора в этих опухолях (Funasaka et al., 1999). Однако, возможно, что такое объяснение не является единственным,

поскольку экспрессия проопиомеланокортина регулируется и другими путями, например, через JAK2/STAT3 регуляторный путь, активируемый фактором ингибирования лейкемии (Bousquet and Melmed, 1999).

Наибольшим сродством к MC1R обладает  $\alpha$ -МСГ, короткий пептид, состоящий из 13 аминокислот, последовательность которого одинакова у ряда видов млекопитающих, в том числе человека, мыши, крупного рогатого скота. Это делает его удобным модельным лигандом для создания систем доставки в клетки меланомы.  $\alpha$ -МСГ может взаимодействовать с четырьмя из пяти меланокортиновых рецепторов (кроме MC2R) и наиболее специфичен к MC1R. Его сродство к MC3R ниже в 260 раз, к MC4R – в 5500 раз и к MC5R в 47500.  $\alpha$ -МСГ активирует MC1R человека в более низких концентрациях MC1Rмыши (Suzuki et al., 1996).

Система меланокортиновых рецепторов отличается наличием двусторонней внеклеточной регуляции, что обеспечивается природными антагонистами меланокортиновых рецепторов – сигнальным белком агутти (ASIP - agouti signaling protein) и белком, родственным сигнальному белку агутти (AGRP – agouti-related protein). Первый из этих белков способен связываться с MC1R и MC4R, а второй является антагонистом активации MC3R – MC5R. ASIP является конкурентным ингибитором  $\alpha$ -МСГ на меланоцитах, а также усиливает острые воспалительные реакции (Abdel-Malek, 2001). Как уже было отмечено выше, этот лиганд имеет еще один рецептор – аттрактин, связывание с которым также влияет на окраску кожных покровов (Voisey and Van Daal, 2002). Другим антагонистом  $\alpha$ -МСГ, способным связываться с MC1R и препятствовать увеличению уровня цАМФ в меланоцитах и дальнейшим биологическим эффектам, является  $\beta$ -дефензин 3 (BD3) (Beaumont et al., 2011; Swope et al., 2012).

#### **2.4.7. Разработка диагностических и лекарственных средств на основе $\alpha$ -МСГ и его аналогов для лечения меланомы.**

Одним из преимуществ использования  $\alpha$ -МСГ для создания терапевтических средств является идентичность последовательности этого гормона (Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH<sub>2</sub>) у человека и мыши, а также у ряда других млекопитающих. Поэтому  $\alpha$ -МСГ является удобным модельным и перспективным для последующего терапевтического использования вариантом для направленной доставки лекарственных средств в злокачественные клетки-мишени. К настоящему времени данный лиганд был неоднократно использован для создания различных конструкций, специфичных для доставки в клетки меланомы (табл. 2.3).

**Таблица 2.3. Примеры конструкций для доставки внутрь клеток меланомы на основе природного  $\alpha$ -МСГ.**

Название, состав	Тип	Действующее начало	Источник
DAB <sub>389</sub> -MSH	Рекомбинантный	АДФ-рибозилтрансфераза дифтерийного токсина	(Murphy et al., 1986; Tatro et al., 1992; Wen et al., 1991a)
$\alpha$ -MSH-melphalan	Синтетический	Мелфалан	(Ghanem et al., 1991; Lejeune and Ghanem, 1993)
$\alpha$ -MSH-HPMA-copolymer-doxorubicin	Синтетический	Доксорубицин	(O'Hare et al., 1993)
Липосомы с липопептидом MSH-C4A2	Синтетический	Возможны разные	(Ogawa et al., 1999)
HGM-pCH110-17m-pLyP101	Рекомбинантный/ синтетический	Доставляемый ген	(Chan and Jans, 2001)
Наночастицы, содержащие PLL и PGA-MSH	Синтетический	Доставляемый ген	(Zhang et al., 2010)
HFt-MSH	Рекомбинантный/ синтетический	Флуорофоры для диагностики	(Vannucci et al., 2012)
$\alpha$ -MSH-PE38KDEL	Рекомбинантный/ синтетический	Псевдомонадный экзотоксин	(Hui et al., 2014; Liu et al., 2020)

DAB<sub>389</sub>-MSH – рекомбинантный белок, в котором лигандный домен дифтерийного токсина заменен на  $\alpha$ -МСГ; MSH –  $\alpha$ -МСГ; HPMA – N-(2-гидрокипропил)метакриламид; HGM – химерный белок ДНК-связывающего домена GAL4 с  $\alpha$ -МСГ, pCH110-17m – плазида с участком связывания GAL4, pLyP101 – конъюгат полилизина с пептидом с сигналом ядерной локализации; PLL – полилизин, PGA – полигликолевая кислота; HFt – ферритин человека.

Количество MC1R на культивируемых клетках меланом человека и мыши варьирует от нескольких сотен до нескольких десятков тысяч (Kameyama et al., 1988; Miao et al., 2003; Siegrist et al., 1989), причем на клетках меланом человека – до нескольких тысяч (Miao et al., 2003; Siegrist et al., 1989), что значительно меньше содержания многих поверхностных белков, поэтому при использовании этого рецептора селективность доставки и эффективность воздействия на внутриклеточные мишени являются залогом успешной терапии меланомы *in vivo*. Примером увеличения эффективности может

служить доставка ФС, способного при облучении образовывать большое количество активных форм кислорода в наиболее чувствительный к окислительному повреждению компартмент клеток – клеточное ядро.

Необходимо отметить, что наличия сродства к рецептору (в данном случае, к MC1R) может оказаться недостаточным для эффективного воздействия на клетки опухоли *in vivo*. Так, наночастицы золота, покрытые полиэтиленгликолем с присоединенными пептидами, способными связываться с MC1R, по-разному взаимодействовали с привитой меланомой B16-F10 в зависимости от того, способны ли были эти пептиды вызывать рецептор-опосредованный эндоцитоз (Lu et al., 2012). Наночастицы с присоединенным пептидом-агонистом MC1R, аналогом  $\alpha$ -МСГ, лучше удерживались в опухоли за счет рецептор-зависимой интернализации, чем аналогичные наночастицы, с пептидом из белка, родственного ASIP, который приводил к связыванию, но не к интернализации наночастиц. Частицы, покрытые агонистом, не только поступали в клетки, но и были способны к трансцитозу и лучшему проникновению в ткани, что приводило к двукратному увеличению их накопления в опухоли.

Учитывая, что наиболее опасной формой меланомы является метастазирующая, одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений разработки средств диагностики этой опухоли является синтез аналогов  $\alpha$ -МСГ и, на их основе, синтез радиофармпрепаратов. Этой теме был посвящен целый ряд обзоров (Abdel-Malek, 2010; Eberle et al., 2010; Graham and Menda, 2011; Quinn et al., 2010; Zhang et al., 2017). К настоящему времени было синтезировано около 70 вариантов, основанных на последовательности  $\alpha$ -МСГ и его устойчивого в биологических средах синтетического аналога Ac-[Nle<sup>4</sup>,Dphe<sup>7</sup>]- $\alpha$ -МСГ (NDP-МСГ), который взаимодействует со всеми меланокортиновыми рецепторами, кроме MC2R, с близким сродством (Haskell-Luevano et al., 1997). Среди них – линейные и циклизованные для фиксации наиболее выгодной для связывания с рецептором конформации пептиды с присоединенными хелаторами для <sup>111</sup>In (Bapst and Eberle, 2017; Chen et al., 2002; Chen et al., 2001; Cheng et al., 2002; Guo et al., 2009a; Guo et al., 2010; Guo et al., 2011; Guo et al., 2009b; Miao et al., 2007; Miao et al., 2008; Wei et al., 2009), <sup>99m</sup>Tc (Клементьева с соавт., 2020; Chen et al., 2002; Miao et al., 2007; Morais et al., 2013; Raposinho et al., 2008; Yang et al., 2009; Yang et al., 2010; Yang and Miao, 2012), <sup>67</sup>Ga (Guo et al., 2009c) для диагностики при помощи однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), а также <sup>18</sup>F (Cheng et al., 2007; Ren et al., 2009; Vaidyanathan and Zalutsky, 1997), <sup>68</sup>Ga (Cantorias et al., 2009; Guo et al., 2009c; Martin et al., 2013; Wei et al., 2009; Zhang et al., 2018; Zhang et al., 2019), <sup>64</sup>Cu (Gao et al., 2019; McQuade

et al., 2005; Wei et al., 2007a) и  $^{86}\text{Y}$  (McQuade et al., 2005) для позитронной эмиссионной томографии.

Анализ имеющихся сведений о функционировании MC1R приводит к заключению, что лиганды, взаимодействующие с этим рецептором, представляются перспективным вариантом для доставки лекарственных средств в клетки меланомы. В ряде лабораторий ведутся интенсивные работы по созданию эффективных средств диагностики и лечения меланомы. Большое внимание уделяется получению лигандов с присоединенными диагностическими и терапевтическими радионуклидами, что показывает перспективность внутриклеточной доставки в ядра меланомных клеток средств, способных с высокой вероятностью их уничтожить. К таким средствам относятся радионуклиды, испускающие частицы с высокой ЛПЭ и ФС, генерирующие при освещении АФК.

## **2.5. Рецептор эпидермального фактора роста<sup>8</sup>**

Рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) принадлежит к числу наиболее изучаемых белков. К настоящему моменту в PubMed насчитывается около ста тысяч публикаций, посвященных его изучению. Несмотря на это, многие аспекты его участия в регуляции организма остаются до сих пор недостаточно изученными, а постоянно увеличивающийся список создаваемых для воздействия на него веществ и оценка их действия требуют систематического анализа с целью наметить наиболее перспективные направления исследования и разработки новых лекарственных препаратов. Являясь интегральным поверхностным рецептором, EGFR опосредует внешние сигналы целого семейства регуляторных факторов, наиболее известными из которых являются эпидермальный фактор роста (ЭФР) и трансформирующий фактор роста альфа (TGF $\alpha$ ) (Jorissen et al., 2003). Взаимодействие этих внеклеточных сигнальных молекул с EGFR приводит к активации нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов: RAS/MAPK(ERK), PI3K/AKT/mTOR и JAK/STAT, что способствует пролиферации, ингибированию апоптоза и выживаемости клеток (Roskoski, Jr., 2014; Yarden and Pines, 2012). Особое внимание привлекает участие EGFR в канцерогенезе и возможности использования этого рецептора для лечения онкологических заболеваний. Активация EGFR является одним из факторов, способствующих эпителиально-мезенхимальному переходу, который приводит к появлению фенотипа раковых стволовых клеток (Lamouille et al., 2014). Его мутации и увеличение экспрессии часто приводят к

---

<sup>8</sup> Весь раздел 2.5 является частью работы автора и Т.А. Сластниковой с небольшими изменениями: Розенкранц А.А., & Сластникова Т.А. (2020). Рецептор эпидермального фактора роста: ключ для селективной доставки в клетки. *Биохимия*, **85**, 9, 1159-1188.

возникновению и прогрессии злокачественных новообразований (Sigismund et al., 2018). Увеличение количества EGFR в клетке встречается при многих онкологических заболеваниях. Поэтому естественно, что EGFR является одним из значимых объектов таргетной терапии. Такие препараты как цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб и нецитумумаб, представляющие собой моноклональные антитела к EGFR, предотвращающие активацию EGFR природными лигандами, уже широко применяются в клинике. Другим вариантом таргетной терапии, направленной на EGFR, является использование специфических ингибиторов автофосфорилирования и кросс-фосфорилирования, к которым относятся гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, афатиниб и ряд других. К сожалению, далеко не все варианты опухолей с повышенной экспрессией EGFR или его мутациями с конститутивной активацией фосфорилирования отвечают на воздействие вышеупомянутых антител и ингибиторов из-за независимой активации нижележащих звеньев сигнальных цепей (киназ семейств RAS BRAF), прежде всего, KRAS и BRAF, что делает применяемую терапию, направленную на EGFR, неэффективной в таких случаях.

### **2.5.1. EGFR как компонент сигнальной сети**

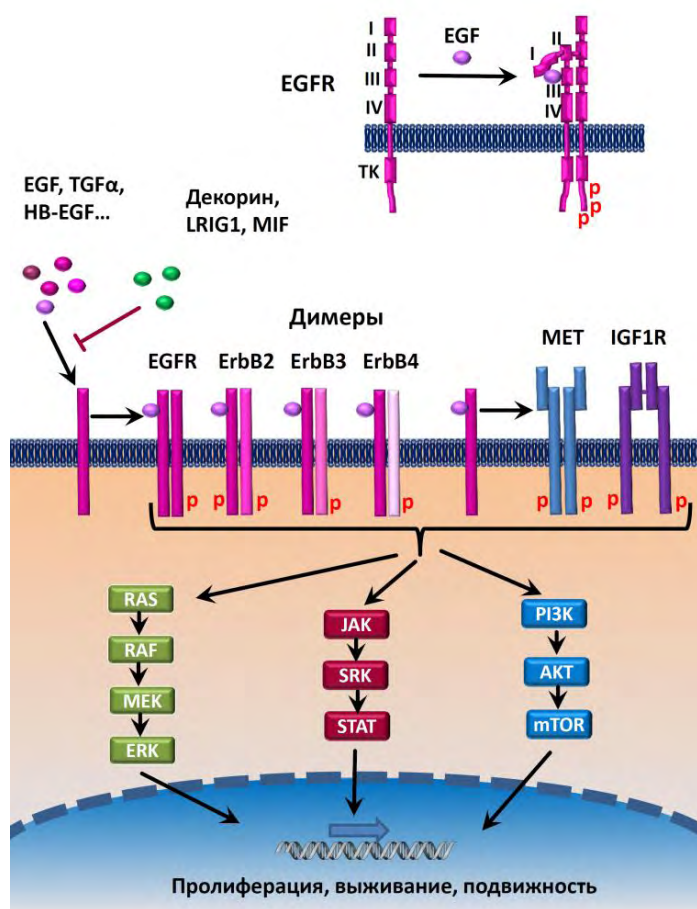
Вариантом преодоления неэффективности в таких случаях является использование рецептор-опосредуемого эндоцитоза EGFR для специфической таргетной доставки в раковые клетки с повышенной экспрессией этого рецептора различных терапевтических, прежде всего, цитотоксических агентов, что позволяет уничтожать раковые клетки независимо от активации нижележащих сигнальных цепей. Для этой цели создаются, как конъюгаты цитотоксических веществ с лигандами EGFR (как с природными, так и с синтетическими), так и более сложные молекулярные и надмолекулярные конструкции. К ним можно отнести наночастицы, как с твердым ядром, так и липосомы, мицеллы и им подобные варианты, несущие цитотоксические вещества. Еще одним возможным вариантом является использование EGFR для транспорта в опухолевые клетки с помощью, например, вирусов или синтетических систем доставки, генов, кодирующих фермент, превращающий пролекарство в цитотоксический продукт.

Активация рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) приводит к целому ряду биологических реакций, включая пролиферацию клеток, миграцию и выживание, которые в норме призваны обеспечивать сохранность и регенерацию эпителия. Именно эти свойства делают нарушение регуляции EGFR важным и часто необходимым звеном развития многих видов онкологических заболеваний. Этот рецептор принадлежит к одному из семейств тирозинкиназ (ErbB или HER), состоящему из 4 близкородственных мембранных рецепторов: EGFR/ErbB1/HER1, Neu/ErbB2/HER2, ErbB3/HER3,

ErbB4/HER4. Все ErbB рецепторы (от avian erythroblastic leukemia viral oncogene B homolog – гомолог B вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц) человека являются крупными трансмембранными белками, содержат богатую цистеинами внеклеточную часть, единственный трансмембранный участок и внутриклеточную цитоплазматическую часть, содержащую примембранный, тирозинкиназный и С-концевой домены (Lemmon et al., 2014). Внеклеточную часть EGFR, как и других ErbB, подразделяют на четыре домена, причем для связывания лиганда требуются его контакты с доменами I и III. При этом происходит изменение конформации рецептора, которое обеспечивает появление выступающей «ручки» в домене II внеклеточной части рецептора. Выступающая «ручка» получает возможность взаимодействовать с соответствующей структурой другого ErbB. В обычном неактивированном состоянии появлению этой димеризационной «ручки» препятствует взаимодействие домена II с IV доменом рецептора. Лиганд, взаимодействуя с I и III доменом рецептора, высвобождает ее для взаимодействия с соседним рецептором (Arkhipov et al., 2013). Неактивные молекулы EGFR существуют на поверхности клеток в основном в виде мономеров неактивных димеров и некоторой доли олигомеров, которые находятся в равновесии друг с другом (Purba et al., 2017). Активация EGFR контролируется извне клетки соответствующими лигандами и приводит к образованию его гомодимеров и гетеродимеров с другими ErbB. Связывание активирующего лиганда приводит к сдвигу равновесия в сторону димеризации с образованием активных димеров и активации предсуществующих димеров. Это приводит к активации тирозинкиназного домена и специфическому фосфорилированию остатков тирозина цитоплазматической части рецептора-партнера в димере. К последовательностям с фосфорилированными тирозинами присоединяются соответствующие внутриклеточные сигнальные молекулы, что обеспечивает активацию сети взаимодействующих внутриклеточных сигнальных путей (Holbro and Hynes, 2004). Реализация сигнала от связывания внеклеточного регуляторного лиганда с рецептором, таким образом, происходит с помощью фосфорилирования не только самого EGFR в результате гомодимеризации, но и его партнеров, в первую очередь, ErbB2, не имеющего собственного внеклеточного регуляторного лиганда (Jorissen et al., 2003). В существенно меньшей степени прохождение сигнала от EGFR в клетку обеспечивается остальными рецепторами этого семейства ErbB3 (Frolov et al., 2007; Zhu et al., 2011) и ErbB4 (Huang et al., 2012), которые являются тканеспецифичными, и экспрессируются в основном в нервной ткани. Известно также, что кроме родственных ErbB рецепторов, EGFR может образовывать димеры в мембране с другими рецепторными тирозинкиназами. Взаимодействие активированного EGFR с рецепторами тромбоцитарного фактора роста



бета (Black et al., 2011; Saito et al., 2001), рецепторами фактора роста гепатоцитов (mesenchymal-epithelial transition factor receptor, MET) (Tanizaki et al., 2011) и родственного ему RON (Peace et al., 2003), а также рецептором инсулиноподобного фактора роста 1 (Morgillo et al., 2006), приводит к их фосфорилированию и к физиологически и терапевтически значимым результатам в активируемых через эти рецепторы регуляторных внутриклеточных путях (рис. 2.4). Это означает, что ответ клетки на связывание лиганда с EGFR определяется не только наличием и количеством этого рецептора, но зависит также от набора и количества рецепторов-партнеров на клеточной поверхности. Кроме этого, ответ клетки на внешний сигнал зависит еще и от свойств связывающегося с EGFR фактора роста.



**Рисунок 2.4<sup>9</sup>. Принципиальная схема основных сигнальных путей сети, активируемых EGFR. I – IV – внеклеточные домены EGFR, ТК – тирозинкиназный домен, P – фосфорилированные тирозины, MET – рецептор фактора мезинхимального-эпителиального перехода, IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1.**

Дополнительный уровень регуляции прохождения сигнала обеспечивает необходимость встречи с другим рецептором, что зависит от диффузионных свойств рецептора и его микрораспределения в плазматической мембране. Часть EGFR

находится в олигомеризованном состоянии, что обеспечивает возможность фосфорилирования нескольких рецепторов в ответ на один связанный лиганд при низкой концентрации добавленного лиганда (Needham et al., 2016). Как показывают наблюдения за единичными молекулами, подвижность EGFR сменяется несколькими разными короткоживущими состояниями: свободным, ограниченным в перемещении и

<sup>9</sup> По: Розенкранц А.А., & Слостникова Т.А. (2020). Рецептор эпидермального фактора роста: ключ для селективной доставки в клетки. *Биохимия*, **85**, 9, 1159-1188.

неподвижным. В неподвижном состоянии EGFR имеет тенденцию олигомеризоваться в покрытых клатрином ямках, перекрестное фосфорилирование в которых дополнительно усиливает проходящий сигнал (Ibach et al., 2015). По-видимому, олигомеры могут быть сопряжены и с другими структурами, обеспечивающими эндоцитоз (Clarke and Martin-Fernandez, 2019).

Фосфорилирование EGFR и его часто сверхэкспрессированного при ряде видов рака партнера ErbB2 стимулирует такие внутриклеточные регуляторные пути, как RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/TOR, Src-киназы и факторы транскрипции STAT (Roskoski, Jr., 2014). Эти регуляторные пути можно рассматривать в качестве компонентов сложной регуляторной сети, с большим количеством положительных и отрицательных обратных связей. Сигнальная сеть, на которую оказывает влияние EGFR, насчитывает более 300 компонентов, связанных более чем двумя сотнями реакций (Lemmon and Schlessinger, 2010). Сигнализация EGFR тонко настраивается в клетках с помощью множества координированных механизмов, включая регуляцию фосфатазами, обратными связями нижележащих звеньев сигнальной цепи, эндоцитозом и внутриклеточным транспортом (Lemmon and Schlessinger, 2010). Специфичность, направление и величина клеточного ответа определяются экспрессией положительных и отрицательных регуляторов, активирующим лигандом, компонентами димеров рецепторов и набором белков, взаимодействующих с фосфорилированными тирозинами C-концевых доменов тирозинкиназных рецепторов.

### **2.5.2. Природные лиганды EGFR**

В нормальных клетках активация тирозинкиназной функции EGFR строго регулируется извне достаточно большим набором природных полипептидных лигандов. Эта регуляция концентрационно зависима, сродство ЭФР к мономерному рецептору существенно выше, чем к димеру, с которым уже связана одна молекула ЭФР, что может быть интерпретировано как наличие отрицательной кооперативности (Macdonald and Pike, 2008). Наиболее известным лигандом EGFR является ЭФР. Другие природные лиганды подобны ему по структуре: основной особенностью этих молекул является наличие трех дисульфидных мостиков, которые определяют жесткую трехмерную структуру белка (EGF-подобный домен). Именно эта трехмерная структура в значительной мере, наряду с конкретными аминокислотными последовательностями, взаимодействующими с I и III внеклеточными доменами, определяет, по-видимому, взаимодействие с центром связывания рецептора (Riese and Stern, 1998). Большинство лигандов ErbB рецепторов образуется из больших трансмембранных предшественников, протеолитическое расщепление которых приводит к образованию растворимого фактора роста. В настоящее

время известно уже более дюжины природных полипептидов, которые могут с разной эффективностью и результатом взаимодействовать с внеклеточной частью EGFR. ЭФР, TGF $\alpha$ , амфирегулин связываются с EGFR, тогда как бетацеллюлин, гепарин-связывающий фактор роста и эпирегулин помимо EGFR могут также могут активировать ErbB4 (Holbro and Hynes, 2004). Недавно было показано, что EGFR активируется путем связывания с ним с достаточно высоким сродством, также одним из ключевых регуляторов ангиогенеза – ангиогенином, белком который помимо регуляторной функции обладает также слабой РНКазной активностью, что отражает его другое название – RNase 5 (Wang et al., 2018a; Wang et al., 2018b). Два фактора роста, неурегулины 2 $\alpha$  и 2 $\beta$ , основными рецепторами которых являются ErbB3 и ErbB4, могут также связываться и активировать EGFR (Gilmore et al., 2006; Pinkas-Kramarski et al., 1998). Кроме агонистов у EGFR имеются также естественные антагонисты. Протеогликан декорин связывается с EGFR с наномолярным сродством (Santra et al., 2002) и приводит к уменьшению количества рецептора на поверхности клетки за счет кавеолинового эндоцитоза и последующей деградации рецептора (Zhu et al., 2005). Гомолог декорина – отщепленный растворимый внеклеточный домен LRIG1 (Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1) также способен взаимодействовать с EGFR с наномолярным сродством и конкурировать с ЭФР за связывание (Goldoni et al., 2007). Фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF), известный регулятор врожденного иммунитета может блокировать активацию EGFR за счет связывания с внеклеточным доменом рецептора (Zheng et al., 2015).

В последнее время стало ясно, что разные природные лиганды EGFR стабилизируют различающиеся по структуре димеры рецепторов, что приводит к разным физиологическим последствиям (Freed et al., 2017). Эпирегулин и эпиген, которые можно рассматривать как частичные агонисты EGFR, индуцируют образование менее стабильных, чем при связывании ЭФР и TGF $\alpha$  короткоживущих димеров. Тем не менее, эта ослабленная димеризация рецепторов приводит к более длительной устойчивой сигнализации, вызывая дифференцировку клеток рака молочной железы, и не приводя к пролиферации клеток, как это делает ЭФР (Freed et al., 2017). Природные лиганды EGFR могут различаться также по способности индуцировать образование димеров семейства ErbB, что также может вызывать разные биологические эффекты при активации через EGFR разными лигандами в одной и той же клетке. Радиолигандный анализ показал, что сродство ЭФР и TGF $\alpha$  к гетеродимерам EGFR:ErbB2 выше, чем сродство к с гомодимерам EGFR, в то время как бетацеллюлин и амфирегулин показали одинаковое сродство к обоим димерам. Амфирегулин проявляет свойства частичного агониста, что отражается в более низком уровне фосфорилирования рецепторов, индуцируемого им по сравнению с

ЭФР, TGF $\alpha$  и бетацеллюлином (Macdonald-Obermann and Pike, 2014). В отличие от других лигандов, амфирегулин показывает двухфазную кинетику образования димеров, что позволяет предположить, что его путь активации EGFR включает связывание как с мономерами, так и с предсуществующими неактивными димерами. В отличие от него, ЭФР, TGF $\alpha$  и бетацеллюлин, по-видимому, в основном активируют рецептор через связывание с мономерами рецептора и его димеризацию (Macdonald-Obermann and Pike, 2014). Таким образом, отличия в биологическом ответе на различные лиганды EGFR могут быть результатом нескольких процессов: полного или частичного агонизма в отношении образования димеров, различий в кинетическом пути генерации димеров активированных рецепторов, и доле образования гетеродимеров ErbB по сравнению с гомодимерами.

Еще один путь регуляции сродства лигандов к EGFR осуществляется с помощью метилирования внеклеточной части рецептора аргинин-метилтрансферазой PRMT1, что обеспечивает высокоаффинное связывание лигандов с EGFR (Liao et al., 2015). Нокдаун PRMT1 или отсутствие соответствующих аргининов (R198 и R200) уменьшают сродство к EGFR как ЭФР и TGF $\alpha$  (Liao et al., 2015), так и ангиогенина/RNase 5 (Wang et al., 2019b). Метилирование этих аргининов дестабилизирует взаимодействие между II и IV доменами внеклеточной части EGFR, что облегчает взаимодействие лигандов с I и III доменами, вызывает изменение конформации и димеризацию рецепторов. Экзогенная экспрессия PRMT1 повышает связывание высокоаффинного лиганда с EGFR, а также опосредованные рецептором дальнейшие сигнальные события (Liao et al., 2015).

Имеющаяся к настоящему моменту сумма сведений о связывании факторов роста и других природных лигандов с EGFR вряд ли полно описывается в терминах изотермы адсорбции Ленгмюра с единственным значением константы диссоциации и количеством мест связывания на клетку, что является усредненной и огрубленной моделью реального процесса. Об этом свидетельствует наличие отрицательной кооперативности, образование димеров с рецепторами-партнерами, уже известные ковалентные модификации, влияющие на связывание, гетерогенность клеток, динамический процесс изменения доступных для связывания рецепторов на поверхности клетки. Более уверенно можно говорить об интервале связывания, который, например, для ЭФР находится в диапазоне от долей до единиц наномолей на литр.

### **2.5.3. Эндоцитоз и внутриклеточный транспорт EGFR**

Для EGFR, как и для множества поверхностных клеточных рецепторов, опосредующих ответ на внешние регуляторные сигналы, эндоцитоз служит обычным способом снижения ответа путем отрицательной обратной связи. Дополнительная

регуляция обеспечивается сортировкой интернализованного рецептора, который может быть направлен обратно на плазматическую мембрану, на деградацию в лизосомы или в другие клеточные компартменты, в которых он дополнительно регулирует клеточные процессы (Caldieri et al., 2018). В отсутствие лигандов EGFR интернализуется медленно: культуры клеток, экспрессирующих умеренное количество EGFR (<200 000 рецепторов на клетку), показывают время полуобновления количества рецепторов на поверхности ( $t_{1/2}$ ) в диапазоне 6-10 ч, тогда как в клетках с аномально высокой экспрессией EGFR, таких, как эпидермоидная карцинома человека A431,  $t_{1/2}$  может достигать суток и более. Связывание лиганда и активация тирозинкиназы приводит к быстрому эндоцитозу и многократно увеличивают константу скорости эндоцитоза EGFR (Sorkin and Goh, 2008). В цитоплазматической части EGFR находятся несколько сигналов интернализации, которые демаскируются при связывании лиганда. К ним относятся два разных мотива распознавания субъединиц адапторного белка 2 (AP2), который связывает мембранные белки с клатриновой решеткой (Goh and Sorkin, 2013). Некоторые фосфотирозины в цитоплазматическом хвосте EGFR после фосфорилирования также обеспечивают присоединение E3 убиквитин-лигазы Cbl как напрямую (Waterman et al., 1999), так и через еще один адапторный белок Grb2 (Jiang et al., 2003), который связывает фосфорилированный рецептор с E3 убиквитин-лигазой Cbl. Это обеспечивает активацию сигнального каскада RAS / MAPK и эндоцитоз EGFR. Такое дублированное взаимодействие между Cbl и EGFR необходимо для стабильного привлечения Cbl и эффективного убиквитинирования рецепторов (Sigismund et al., 2013). Необходимо отметить, что множественное убиквитинирование является не единственным фактором, влияющим на эндоцитоз EGFR. Даже замена 15 остатков лизина в его киназной части, приводящая к почти полному подавлению убиквитинирования, может не приводить к существенному подавлению интернализации (Huang et al., 2007). Клатрин-зависимый эндоцитоз активированного EGFR регулируется несколькими механизмами, функционирующими избыточным и кооперативным образом, включая убиквитинирование киназного домена рецептора и C-концевых остатков лизина, а также адапторных белков AP-2 и Grb2 (Goh et al., 2010). Сложность регуляции эндоцитоза EGFR подчеркивает наличие еще одного механизма ковалентной модификации рецептора помимо убиквитинирования. EGFR также модифицируется убиквитин-подобной молекулой Nedd8 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 8) (Oved et al., 2006). Эта модификация катализируется Cbl в комплексе с Nedd8-специфической лигазой E2 (Ubc12) и облегчает присоединение остатков убиквитина с помощью Cbl и лигазы UbcH7. Такая сложность и многократное дублирование

механизмов, вовлеченных в интернализацию активированного EGFR, делают этот процесс устойчивым к возмущениям (например, мутациям или изменению экспрессии компонентов механизма эндоцитоза) (Goh and Sorokin, 2013). В частности, для того чтобы существенно подавить клатриновый эндоцитоз EGFR необходимо одновременное предотвращение (например, за счет мутирования) работы мотивов, связывающих AP2, множественного убиквитинирования и ацетилирования EGFR (Goh et al., 2010). Возможным объяснением устойчивости процесса эндоцитоза EGFR является также существование дублирующих друг друга клатрин-зависимых и клатрин-независимых процессов. Клетки могут убирать активированный EGFR с поверхности несколькими разными путями: при помощи клатрин-зависимого, клатрин-независимого, эндофилин-зависимого эндоцитоза и макропиноцитоза (Boucrot et al., 2015). Во всех типах клеток, экспрессирующих рецептор, в ответ на добавление лиганда EGFR интернализуется с помощью быстрого клатрин-зависимого эндоцитоза при всех физиологических концентрациях ЭФР (Caldieri et al., 2018). Заметная часть EGFR, поступающего в клетку таким путем, является его возвращение обратно на плазматическую мембрану (Sigismund et al., 2008), которое может осуществляться двумя путями с разным временным интервалом (Sorokin et al., 1991). Клатрин-зависимый эндоцитоз, по-видимому, является насыщаемым, что становится заметным при высокой экспрессии рецептора, и при более высоких концентрациях добавленного ЭФР во многих типах клеток подключаются более медленные клатрин-независимые виды эндоцитоза (Caldieri et al., 2018). Кроме того, при достаточно высоких концентрациях лиганда, превышающих в несколько раз значение константы диссоциации комплекса лиганд-рецептор, на эндоцитозе начинает сказываться и насыщение рецептора лигандом. Это делает дальнейшее увеличение концентрации лиганда малоэффективным с точки зрения его транспорта в клетку при помощи рецептор-опосредуемого эндоцитоза.

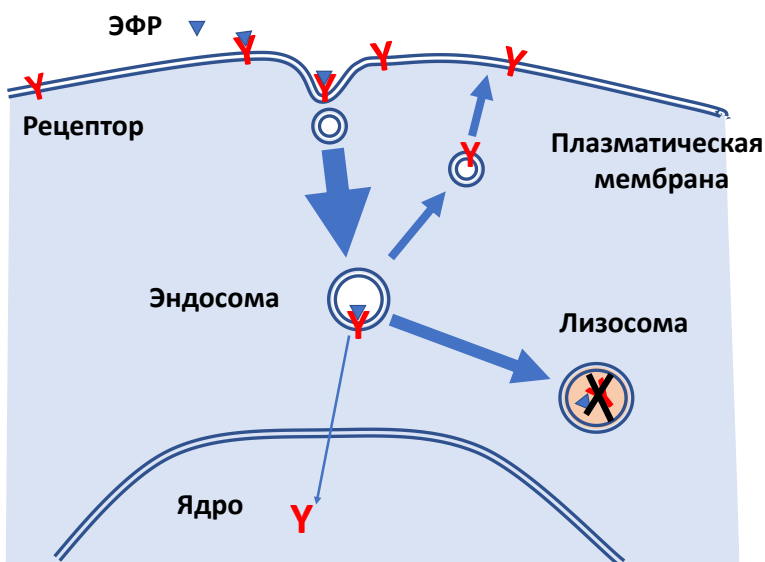
Кроме клатрин-зависимого эндоцитоза существует также быстрый эндофилин-зависимый эндоцитоз EGFR, который активен, по-видимому, на переднем крае мигрирующей клетки, и необходим для пространственно ограниченной EGF-зависимой передачи сигналов (Boucrot et al., 2015). Данный вариант поглощения EGFR опосредуется CBL, адапторным белком CIN85 и зависит, как и клатрин-зависимый эндоцитоз, также от наличия динамина (Boucrot et al., 2015; Soubeyran et al., 2002).

Тип эндоцитоза EGFR может также зависеть и от лиганда, связавшегося с рецептором. Так, например, активация EGFR в результате связывания ЭФР или TGF $\alpha$ , приводила в клетках HeLa только к клатрин-зависимому эндоцитозу, тогда как гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF) и бетацеллюлин стимулировали как

клатрин-опосредованные, так и клатрин-независимые варианты поглощения (Henriksen et al., 2013). Поглощение EGFR может осуществляться и с помощью макропиноцитоза, что наблюдается в ответ на стимуляцию ЭФР в клетках A431 (West et al., 1989; Yamazaki et al., 2002), или через формирующиеся из дорзальных складок клеточной мембраны везикулярно-трубчатые структуры, образование которых зависит от динамина и фосфоинозитид киназы PI3, происходящих из дорзальных складок плазматической мембраны (Orth et al., 2006; Yamazaki et al., 2002). Необходимо отметить, что для клатрин-независимого эндоцитоза необходимо убиквитинирование EGFR, поскольку мутации, препятствующие присоединению убиквитина ингибируют и эндоцитоз (Sigismund et al., 2013). Этот вариант эндоцитоза EGFR зависит от обогащенных холестерином доменов плазматической мембраны, но не зависит от кавеолина (Caldieri et al., 2018).

Независимо от пути интернализации, EGFR поступает в ранние эндосомы, где происходит их сортировка для регуляции ответа на связывание лиганда с EGFR. Пути дальнейшего транспорта EGFR оказывают существенное влияние на регуляторные процессы в клетке (рис. 2.5), способствуя сбалансированности ответа на поступивший сигнал, что подробно рассмотрено в нескольких обзорах (Caldieri et al., 2018; Tomas et al., 2014). Как уже было отмечено, двумя основными направлениями транспорта EGFR являются путь в лизосомы для деградации EGFR, что приводит к снижению ответа на

стимуляцию рецептора, и его возвращение обратно на плазматическую мембрану для продолжения ответа на поступивший сигнал.



**Рисунок 2.5. Упрощенная схема эндоцитоза и основных путей внутриклеточного транспорта EGFR.**

Некоторая небольшая часть рецепторов через COP1-зависимый везикулярный транспорт попадает из эндосом в ЭР (Wang et al., 2010). Кроме этого известны и дополнительные варианты транспорта EGFR в ядро (обсуждается ниже) и митохондрии. Транспорт активированного EGFR в митохондрии зависит от c-Src и может приводить к

фосфорилированию субъединицы COXII цитохром С оксидазы в клетках рака молочной железы, что было показано при помощи добавления c-Src и EGFR к иммунопреципитатам COXII или к очищенному фрагменту COXII (Demory et al., 2009). Такое перемещение EGFR увеличивает устойчивость клеток к апоптозу (Cao et al., 2011). Обнаружено также, что транспорт EGFR в митохондриях клеток немелкоклеточного рака легких приводит к увеличению инвазивности и появлению метастазов (Che et al., 2015; Wang et al., 2017d). Доля рецептора, оказывающегося в митохондриях, однако, крайне невелика, около 2% фосфорилированного EGFR оказываются в митохондриях (Wang et al., 2017d).

#### **2.5.4. Транспорт EGFR в ядро**

Внутриклеточная примембранная часть EGFR содержит трехчастный сигнал ядерной локализации (RRRHIVRKRTLRR), который опосредует появление небольшой доли полноразмерного рецептора в ядре клетки после активации рецептора (Hsu and Hung, 2007). Похожие трехчастные сигналы есть и в остальных ErbB. Транспорт EGFR от плазматической мембраны в ядро не является систематическим постоянным ответом на связывание лиганда с рецептором, но скорее наблюдается в определенных тканях или при определенных условиях (Shah et al., 2019). Этот транспорт происходит в результате эндоцитоза и требует импортина  $\beta 1$ , что указывает на прохождение через ядерную пору (Lo et al., 2006). Процесс нахождения EGFR в ядре является контролируемым, на что указывает и наличие у EGFR функционального сигнала ядерного экспорта (Lo et al., 2006). EGFR транспортируется в ядро в комплексе с ЭФР (De Angelis Campos et al., 2011) и обнаруживается как в нуклеоплазме, так и во внутренней ядерной мембране (Lo, 2010). Лиганды EGFR по-разному влияют на возможность этого транспорта: так, добавление ЭФР, TGF $\alpha$ , гепарин-связывающего ЭФР и бетацеллюлина приводило к дозозависимому накоплению EGFR в ядрах клеток аденокарциномы печени человека, тогда как амфирегулин и эпирегулин не оказывали такого действия (Faria et al., 2016). Механизмы, приводящие к ядерному накоплению рецептора, остаются не до конца ясными до настоящего момента, возможно, что EGFR может оказываться в ядре несколькими путями (Han and Lo, 2012; Lo, 2010; Shah et al., 2019; Wang et al., 2010). Из эндосом рецепторы могут попадать в ЭР и выходить в цитозоль при помощи ретроградного транспорта через транслокон Sec61, который обеспечивает, как транспорт вновь синтезируемых белков в ЭР, так и перемещение неправильно свернутых белков обратно в цитозоль. Несколько исследований показали, что EGFR взаимодействует с Sec61 $\beta$ , одной из трех субъединиц транслокона (Liao and Carpenter, 2007; Wang et al., 2010). Однако, где происходит перемещение EGFR через этот транслокон, почему этому не мешает гликозилированность рецептора и каким образом в ядре он оказывается в комплексе с лигандом, неизвестно.



Непонятно также, что обеспечивает растворимость EGFR в нуклеоплазме. Среди предлагаемых путей транспорта EGFR в ядро отмечают выход его в цитозоль из ЭР с последующим транспортом через ядерную пору, транспорт в виде интегрального белка до наружной оболочки ядра и далее через периферические каналы ядерной поры. Возможен также прямой транспорт некоторой фракции эндосом к ядру с последующим слиянием с ядерной оболочкой и, затем, транспортом через ядерную пору на внутреннюю мембрану ядра (Chaumet et al., 2015). Поскольку Sec61 был обнаружен во внутренней мембране ядерной оболочки, возможно, что EGFR проникает в ядро непосредственно из нее (Wang et al., 2010).

Внутри ядра EGFR может взаимодействовать с транскрипционными факторами STAT3, STAT5, E2F1, фосфорилировать ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) обеспечивая ускорение пролиферации и репарационных процессов, увеличивать радиорезистентность клеток. Благодаря этому ядерный EGFR участвует в пролиферации, опухолегенезе, метастазировании, репарации ДНК, а также обеспечивает устойчивость к повреждающему ДНК излучению и алкилирующим противоопухолевым агентам (Lo, 2010).

### **2.5.5. Экспрессия EGFR при онкологических заболеваниях**

Активация EGFR при малигнизации может быть вызвана повышенным содержанием рецепторов, увеличенной аутокринной или паракринной продукцией активирующего фактора роста и изменением собственной тирозинкиназной активности в результате мутаций. Часто причиной активации EGFR является сочетание сразу нескольких факторов, что усложняет поиск лечения.

Одной из наиболее частых причин активации путей, управляемых EGFR, является увеличение его экспрессии. Причиной этого может быть не только амплификация гена, но усиление его транскрипции, трансляции, уменьшение деградации рецептора и изменение в экспрессии некодирующих РНК (Chia et al., 2019; Franovic et al., 2007; Liu et al., 2017). Приводимые в разных работах оценки экспрессии EGFR для разных онкологических заболеваний сильно варьируют, что зависит от стадии заболевания, использованной ранее терапии, популяции, метода исследования (определение мРНК, иммуногистохимия), оцениваемого параметра, используемых антител, времени хранения препаратов. В некоторых случаях было обнаружено достаточно большое увеличение экспрессии EGFR. Так, среднее увеличение содержания мРНК EGFR при раке головы и шеи составляло 69 раз по сравнению с нормальной тканью (Grandis and Tweardy, 1993). Прямого однозначного соответствия между мРНК и экспрессией белка исследования не выявляют, а иммуногистохимическое выявление экспрессии не является строго количественным, и,

кроме, того подвержено влиянию многих не всегда учитываемых факторов (Atkins et al., 2004). В тех случаях, когда в исследованиях использовали несколько методов, иммуногистохимическое окрашивание показывает меньшую частоту встречаемости сверхэкспрессии EGFR по сравнению с увеличением уровня мРНК. Так, например, выявляемая сверхэкспрессия по данным иммуногистохимических исследований при колоректальном раке составляла 61%, по анализу мРНК – 79% EGFR и при выявлении одним из двух способов – 82% (Yen et al., 2010). В одном и том же исследовании образцов немелкоклеточного рака легкого сверхэкспрессия EGFR в зависимости от выбранных коммерческих антител варьировала в диапазоне от 5% до 56% (Lee et al., 2010). Тем не менее, именно этот вариант оценки экспрессии EGFR позволяет получить данные по содержанию рецептора, суммирующие изменения транскрипции, трансляции и деградации белка. Анализ большого числа проведенных исследований позволяет выявить те онкологические заболевания, при которых увеличение экспрессии EGFR является существенным (таблица 2.4). Все экспериментальные работы, цитированные в таблице, были проведены с использованием иммуногистохимии, для полноты картины приведены данные из предыдущих обзоров, в части которых цитированы работы как проведенные с использованием иммуногистохимии, так и с использованием других методов. Необходимо также отметить, что эти данные трудно соотносимы с получаемыми на культурах клеток величинами количества рецепторов на клетках и соответствуют изменениям относительно содержания рецептора в той же нормальной ткани. В ряде случаев: рак мочевого пузыря, глиомы, рак головы и шеи, рак легкого, это дает основания для разработки местных таргетных методов терапии с использованием радионуклидов, ФС, наночастиц, реагирующих на различные типы излучения.

В целом, повышенная экспрессия EGFR является одним из наиболее частых событий, регистрируемых при онкологических заболеваниях. Так, при анализе опухолей с неизвестным первичным происхождением экспрессия EGFR была обнаружена в 55% случаев, причем амплификация его гена (17%) оказалась наиболее частым событием среди всех проанализированных маркеров (Gatalica et al., 2014).

**Таблица 2.4. Частота встречаемости увеличенной экспрессии EGFR при онкологических заболеваниях**

Заболевание	Процент опухолей со сверхэкспрессией EGFR	Источник
Рак головы и шеи	80 – 100 38 – 92 46, 68, 56-85, 49, 68	Обзор (Herbst and Shin, 2002) Обзор (Kalyankrishna and Grandis, 2006) (Chua et al., 2004), (Wei et al., 2007b), (Grobe et al., 2014), (Wang et al., 2016b), (Politi et al., 2019)
Рак шейки матки	70 – 90 30 – 98 18 – 87 76 – 79	Обзор (Schrevel et al., 2011) Обзор (Gui and Shen, 2012) Обзор (Tian et al., 2016) <sup>a</sup> (Li et al., 2014)
Мезотелиома	44 – 97 64	Обзор (Chia et al., 2019) (Chia et al., 2021)
Рак толстой кишки	25 – 77 61, 53, 39, 62	Обзор (Herbst and Shin, 2002), (Rokita et al., 2013), (Yun et al., 2018), (Huang et al., 2017)
Рак поджелудочной железы	30 – 89 30 – 95 40 – 70 42 – 64	Обзор (Grapa et al., 2019) Обзор (Cook et al., 2014) Обзор (Karandish and Mallik, 2016) (Park et al., 2015)
Немелкоклеточный рак легкого	40 – 80 32 – 100 56	Обзор (Herbst and Shin, 2002) Обзор (Lee et al., 2010) <sup>b</sup> (Lee et al., 2010) <sup>b</sup>
Рак молочной железы	14 – 91 2 – 60	Обзор (Herbst and Shin, 2002) Обзор (Gonzalez-Conchas et al., 2018) <sup>f</sup>
Рак яичников	35 – 70 9 – 62 46 – 64, 57	Обзор (Herbst and Shin, 2002) Обзор (Sheng and Liu, 2011) (Wang et al., 2016a), (Perren, 2016)
Глиома	40 – 63 68, 65	Обзор (Herbst and Shin, 2002) (Shinojima et al., 2003), (Zhao et al., 2012)
Рак мочевого пузыря	31 – 48 27, 74, 71	Обзор (Herbst and Shin, 2002) (Wang et al., 2007), (Chaux et al., 2012), (Carlsson et al., 2015)
Нейроэндокринные опухоли	42 – 100 28 – 57, 87	Обзор (Girard, 2010) <sup>d</sup> (Rusch et al., 1996; Srirajaskanthan et al., 2010)

<sup>a</sup> – средневзвешенное – 48,5% по 20 работам с использованием иммуногистохимии и 1823 пациентам; <sup>b</sup> – средневзвешенное – 49,8% по 15 исследованиям и 2399 пациентам с одинаковыми mAb; <sup>b</sup> – 71% - плоскоклеточный рак, 48% - аденокарцинома; <sup>f</sup> – средневзвешенное 21,4% по 36 иммуногистохимическим исследованиям и 12066 пациентам; <sup>d</sup> – тимома, средневзвешенное 70,5%, по 8 иммуногистохимическим исследованиям и 227 пациентам.

Гетерогенность тех изменений, которые приводят к онкологическим заболеваниям, приводит к тому, что при одной и той же локализации опухоли возникают принципиально разные варианты заболеваний. При подробной генетической характеристике выявляются подтипы онкологических заболеваний в рамках одной локализации, в которых с очень высокой вероятностью наблюдаются одни и те же изменения в ключевых регуляторных белках, к которым относится и EGFR. Так, например, сверхэкспрессия EGFR выявляется в 97% случаев «классической» формы мультиформной глиобластомы (Verhaak et al., 2010).

#### **2.5.6. Успехи и ограничения направленной блокировки сигнального пути EGFR**

Контролируя один из наиболее часто работающих «входов» сигнальной сети, опосредующей регуляцию деления клеток, EGFR является значимым маркером малигнизации. Более важно, что во многих случаях состояние или экспрессия этого рецептора является одним из необходимых звеньев злокачественного перерождения клеток. Нарушение активации EGFR часто дает постоянный пролиферативный сигнал, без прерывания которого деление клеток становится постоянным. Нужно отметить, что повышенная экспрессия EGFR в солидных опухолях часто ассоциируется с увеличенной продукцией соответствующих лигандов, что приводит к хронической активации рецептора. Естественным решением этой проблемы является прерывание активации EGFR, что может быть достигнуто как блокированием связывания активирующего лиганда, так и ингибированием тирозинкиназной активности. Первый вариант эффективен при повышенной экспрессии EGFR, второй – при перманентной активации рецептора за счет мутаций, в особенности, при подборе специфичного при данной мутации ингибитора.

На востребованность прерывания взаимодействия между лигандами и EGFR указывает большое количество разнообразных искусственных полипептидов, способных к связыванию с внеклеточными доменами EGFR: к настоящему времени их насчитывается около 40 (London and Gallo, 2020). Они включают в себя химерные антитела, фрагменты антител, однодоменные антитела антителомиметики, сконструированные на основе различных каркасных белков: DARPIn на основе анкириновых повторов, аффибоди на основе Z-домена белка А, аднектинов на основе 10-го домена фибронектина III типа. Вариантами, успешно дошедшими до широкого терапевтического применения, являются такие моноклональные антитела как цетуксимаб (Эрбитукс), панитумумаб (Вектибикс), нимотузумаб (Тералок), нецитумумаб (Портразза) (таблица 2.5). Эти антитела связываются с доменом III внеклеточной части EGFR, не позволяя природным лигандам – факторам роста – активировать рецептор. Цетуксимаб является производным высокоаффинного моноклонального мышинового антитела С225, слитого с константной

частью IgG1 человека (Cunningham et al., 2004). Изотип IgG1 обуславливает также способность цетуксимаба вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность, в отличие от панитумумаба привлекая NK-клетки для уничтожения раковых клеток (Trivedi et al., 2016). К преимуществам панитумумаба относится то, что он, полностью основан на IgG человека и, поэтому, его применение менее подвержено появлению аллергических реакций и анафилаксии (Cohenuram and Saif, 2007). Эти два первых терапевтических моноклональных антитела начали широко применяться в клинической практике, начиная с середины 2000-х. В 2015 г. к ним добавилось еще одно моноклональное человеческое антитело – нецитумумаб (Thatcher et al., 2015), которое применяют для лечения плоскоклеточной немелкоклеточной карциномы легких. Его отличает существенно большее, чем у цетуксимаба и панитумумаба, время полувыведения, около двух недель. Еще одно терапевтическое моноклональное антитело – нимотузумаб, представляющее собой гуманизированное мышье антитело отличаются менее выраженными, чем при применении остальных терапевтических антител, побочными эффектами (Li and Yan, 2018). Это объясняют оптимальным для лечения средством к EGFR, что позволяет оказывать эффект в основном на клетки со средней и большой экспрессией рецептора и мало затрагивает клетки с небольшим количеством EGFR (Boland and Bebb, 2009; Garrido et al., 2011). Еще ряд моноклональных антител, ингибирующих EGFR, прошел несколько стадий клинических испытаний, но не получил разрешения для широкого клинического применения в силу отсутствия выраженного улучшения лечения по сравнению с уже применяемыми вариантами терапии. К ним относятся гуманизированные IgG1 матузумаб и имгатузумаб, человеческие залутумумаб и долиготузумаб, который взаимодействует и с EGFR, и с ErbB3 (London and Gallo, 2020).

**Таблица 2.5. Антитела к EGFR, применяемые в клинической практике.**

Название	$K_d$	Тип	Тип рака
Цетуксимаб	0,1 нМ	Химерное, C225 мышь и IgG1 человека	Колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого
Панитумумаб	0,05 нМ	IgG2 человека	Колоректальная рак, рак молочной железы
Нимотузумаб	1 нМ	IgG1, гуманизированное	Плоскоклеточный рак головы и шеи, назофарингеальная карцинома, глиома, рак поджелудочной железы
Нецитумумаб	0,3 нМ	IgG1 человека	Немелкоклеточный рак легкого

Подавляющая часть уже применяемых для терапии антител, препятствующих связыванию эндогенных лигандов, также как и находящихся в разработке вариантов, обладает двумя механизмами действия: ингибированием пролиферативного сигнального пути и антителозависимой цитотоксичностью. Цитотоксический компонент действия этих антител неспособен, однако, обеспечить достаточный противоопухолевый эффект. Появление же активирующих мутаций в расположенных ниже по сигнальной цепи звеньях, как правило, сводит на нет блокирование сигнала, поступающего от рецептора. Наиболее известным примером таких мутаций являются активирующие мутации *KRAS*. Опухоли, в которых детектируется дикий тип *KRAS*, чувствительны к блокированию антителами, тогда как, например, мутации в кодонах 12 и 13 экзона 2 гена *K-RAS* приводят к стабилизации функционально активного комплекса *RAS-GTP* и непрерывной передаче сигнала по *MAPK*-пути, и действие антител на опухоли с таким измененным *K-RAS* не проявляется. Такие мутации встречаются, в частности, в 40-45% случаях колоректального рака и в 15-30% случаев немелкоклеточного рака легких (Ciardiello and Tortora, 2008). Активирующие мутации не ограничиваются *K-RAS*, причиной устойчивости опухолей к блокирующей *EGFR* терапии могут быть также изменения в генах *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN* и других (Therkildsen et al., 2014), а также экспрессия некодирующих РНК (Lu et al., 2017). Кроме того, после первоначального ответа на лечение антителами к *EGFR* неизменно возникает вторичная резистентность, причиной которой могут быть как мутации *KRAS* (Misale et al., 2012), так и других генов (Siravegna et al., 2015).

После раскрытия деталей активации *EGFR* в результате связывания факторов роста огромные усилия были приложены для разработки и испытания ингибиторов фосфорилирования *EGFR*. В практику лечения ряда онкологических заболеваний (таблица 2.6) вошли такие ингибиторы как гефитиниб (Иресса), эрлотиниб (Тарцева), лапатиниб (Тайверб), афатиниб (Товок), осимертиниб (Тагриссо), бригатиниб (Алунбриг) и дакомитиниб (Визимпро) (Roskoski, Jr., 2020) икотиниб (Конмана) (Yang et al., 2017). Применение пероральных ингибиторов первого поколения (гефитиниб и эрлотиниб) при немелкоклеточном раке легкого (плоскоклеточный рак и аденокарцинома) показало значительное улучшение лечения по сравнению с традиционной химиотерапией (Mok et al., 2009). Наиболее распространенными мутациями *EGFR* являются делеции 746-750 в экзоне 19 или точечная мутация с заменой лейцина на аргинин L858R (Sequist et al., 2011). Пациенты с активирующими мутациями *EGFR* оказались достаточно чувствительны к обратимым ингибиторам первого поколения, которые имеют многократно большее сродство к этим мутантным формам рецептора по сравнению с нормальным *EGFR*. Несмотря на то, что эти ингибиторы оказались эффективными в качестве начальной

терапии, они не действуют на сочетание вышеупомянутых мутаций, в также ряд других, прежде всего, T790M (Pao et al., 2005). Это побудило продвижение в практику необратимых ингибиторов второго поколения, таких как афатиниб и дакомитиниб, призванных преодолеть нечувствительность EGFR с мутацией T790M к эрлотинибу и gefитинбу, с более широким воздействием на другие рецепторы семейства ErbB. Такой вариант оказался не более успешным, чем ингибиторы первого поколения, из-за невозможности достичь достаточной величины терапевтического воздействия по причине токсичности для нормальных тканей (Murtuza et al., 2019). Более успешным в лечении немелкоклеточного рака легкого оказался обладающий большей селективностью осимертиниб (Ramalingam et al., 2020; Soria et al., 2018). Несмотря на заметное увеличение продолжительности периода без прогресса заболевания постепенное развитие резистентности к лечению требует как применения сочетания разных ингибиторов, так и поиска дальнейших более эффективных средств воздействия. Возникающие мутации в локусе C797, по которому осимертиниб присоединяется к EGFR, приводят к появлению устойчивых вариантов опухолей (Nagano et al., 2018).

**Таблица 2.6. Ингибиторы тирозинкиназы EGFR, применяемые в медицинской практике.**

Название	Мишень	Тип	Заболевание
Гефитиниб	EGFR, del 746-750, L858R	Обратимый	Немелкоклеточный рак легких
Эрлотиниб	EGFR, del 746-750, L858R	Обратимый	Немелкоклеточный рак легких, рак поджелудочной железы
Икотиниб	EGFR, del 746-750, L858R	Обратимый	Немелкоклеточный рак легких
Бригатииниб	EGFR, C797S, ALK*	Обратимый	Немелкоклеточный рак легких
Лапатиниб	EGFR, ErbB2	Необратимый	Рак молочной железы
Афатиниб	EGFR, ErbB2	Необратимый	Немелкоклеточный рак легких
Осимертиниб	EGFR, del 746-750, L858R, T970M, ins 20	Необратимый	Немелкоклеточный рак легких
Дакомитиниб	EGFR, del 19, L858R, HER2, EGFR, HER4, AKT, ERK	Необратимый	Немелкоклеточный рак легких

\*ALK – киназа анапластической лимфомы.

В основном успехи в применении ингибиторов тирозинкиназной активности EGFR относятся к немелкоклеточному раку легкого. Для данного варианта рака легких характерна как сверхэкспрессия EGFR (примерно в половине случаев), так и мутации,

приводящие к перманентной активации рецептора (Murtuza et al., 2019). Подбор комбинаций ингибиторов тирозинкиназ на основании разной чувствительности мутантных форм EGFR к разным ингибиторам (Li et al., 2020; Vyse and Huang, 2019) с добавлением блокирующих антител могут, по-видимому, улучшать результаты терапии (Murtuza et al., 2019). Разработка панели ингибиторов EGFR стала, таким образом, ярким примером персонализированного подхода к лечению рака, опирающегося на данные о строении и мутациях одного из ключевых звеньев развития злокачественного процесса.

Общими ограничениями направленной на блокирование EGFR терапии являются необходимость перманентного применения терапевтических средств и недостаточная эрадикация раковых клеток. Длительность применения ингибиторов и наличие большого количества опухолевых клеток приводит к обязательному появлению резистентных к терапии вариантов (Wang et al., 2017c) и последующей клональной селекции наиболее устойчивых из них (Murtuza et al., 2019). Снятия ингибирования апоптоза в результате перманентной активации Ras/Raf/MEK/ERK через EGFR (Sordella et al., 2004) оказывается недостаточно для радикального уничтожения опухолей. Возникающая резистентность опухолей обусловлена помимо мутаций в гене EGFR также другими нарушениями в сигнальной сети, регулирующей пролиферацию. Такие нарушения включают в себя активирующие мутации KRAS, BRAF, каталитической субъединице фосфатидилинозитол-4-5-бисфосфат киназы (PIK3CA), слияние генов, затрагивающее активацию RET, FGFR3 и BRAF, амплификацию MET, FGFR, ErbB2 и другие (Oxnard et al., 2018; Piotrowska et al., 2018; Schoenfeld et al., 2020; Terai et al., 2013; Wang et al., 2019a; Zhu et al., 2019), а также экспрессию длинных некодирующих РНК, например, UCA1 (urothelial cancer-associated 1) (Cheng et al., 2015). В ряде случаев лечение ингибиторами приводит к изменению типа заболевания, переходу от немелкоклеточного к мелкоклеточному раку легкого (Lee et al., 2017).

Таким образом, направленная, или таргетная терапия, достаточно хорошо развитым примером которой являются подходы, направленные на EGFR, сталкивается с той же проблемой появления устойчивости опухоли, что и традиционная химиотерапия. Как уже было описано выше, одним из решений этой проблемы может служить подбор набора ингибиторов активированного сигнального пути, включающий не только ингибиторы EGFR, но и ингибиторы нижележащих звеньев – KRAS, BRAF и других. Быстро развивающиеся методы жидкостной биопсии (Heitzer et al., 2015) и современных методов секвенирования – NGS (new generation sequencing) (Yohe and Thyagarajan, 2017) делают эту проблему технически решаемой. Тем не менее, высокая гетерогенность, генетическая нестабильность и клональная эволюция опухолей (McGranahan and Swanton,



2017; Negrini et al., 2010) не позволяют рассчитывать на безусловный успех такого подхода. Блокировка пролиферативного сигнала замедляет рост опухоли, но не приводит к ее исчезновению. Добавление к лечению токсических химиотерапевтических средств далеко не во всех случаях способно привести к излечению. Поэтому во многих лабораториях большое внимание уделяется развитию другого решения проблемы устойчивости онкологических заболеваний к терапии – использованию направленного подхода не для ингибирования патологически измененных звеньев нормальных регуляторных процессов, а для селективного уничтожения раковых клеток. Многочисленные варианты различных онкологических заболеваний с повышенной экспрессией EGFR являются перспективными кандидатами на разработку такого подхода.

### **2.5.7. Использование EGFR для доставки**

Традиционно для лечения злокачественных новообразований в основном применяется химиотерапевтические средства, воздействующие на быстро делящиеся клетки, и радиотерапия, которая в первую очередь воздействует на ДНК и, в первую очередь, на делящиеся клетки. И то, и другое воздействие не являются селективным по отношению собственно к опухолевым клеткам, что приводит к появлению тяжелых побочных эффектов, делающих затруднительным излечение. Кроме этих основных методов для противоопухолевой терапии разрабатываются и в некоторых случаях используются также ФДТ и генотерапия. Все эти варианты терапевтических воздействий могут быть соединены с таргетной терапией не только в виде сочетания одновременного или последовательного применения, но и для направленной доставки соответствующего терапевтического начала (токсического химиотерапевтического вещества, источника ионизирующего излучения, ФС или необходимого гена в опухолевые клетки-мишени). EGFR, в силу прямой вовлеченности в активацию деления клеток, эндоцитируемости и частой повышенной экспрессией при многих онкологических заболеваниях, представляется одним из самых привлекательных объектов для создания направленной противоопухолевой терапии.

Связывание активирующих факторов роста с EGFR приводит к увеличению скорости эндоцитоза на порядки. Интернализация рецептора зависит от его димеризации и автофосфорилирования. Антитела к EGFR блокируют этот процесс, однако, по крайней мере, некоторые из них способны относительно эффективно поступать в клетки. Так, mAb 225, переменная часть которого обеспечивает функциональность цетуксимаба, эндоцитируется со скоростью в 6-7 раз меньшей скорости эндоцитоза EGF (Jaramillo et al., 2006), что, тем не менее, существенно превышает поступление EGFR без лиганда в клетку. Как показывают эксперименты, проведенные на клетках аденокарциномы легкого

A549 с умеренной экспрессией EGFR ( $\sim 10^5$  рецепторов на клетку), больше половины поглощенного mAb и EGFR в течение первого часа возвращаются обратно на поверхность, в отличие от рецептора в комплексе с EGF, более 70% которого остается внутри клетки и деградирует в лизосомах. Интересно, что цетуксимаб способен обеспечивать транспорт некоторой части EGFR в ЭР, где он обнаруживается в комплексе с Sec61, и, далее, в ядро клетки (Liao and Carpenter, 2009). Такой транспорт зависит от связывания антител в сайте связывания лигандов и поливалентности связывания антитела, поскольку он не был обнаружен для блокирующего антитела к другому участку рецептора и Fab'-фрагментов цетуксимаба (Liao and Carpenter, 2009). Для эндоцитоза так цетуксимаба, так и наночастиц, покрытых им, требуется кластеризация комплексов лиганд-рецептор на клеточной поверхности в гликофинголипидных доменах, после чего следует кавеолин- и динамин-2- зависимый эндоцитоз (Bhattacharyya et al., 2012). Кластеризация цетуксимаб-рецепторных комплексов в качестве промежуточного шага в процессе инициирования эндоцитоза была также обнаружена при помощи анализа движения единичных частиц на поверхности клетки (Kim et al., 2017). Вышеизложенное объясняет большой интерес к цетуксимабу в качестве лиганда для доставки цитотоксических агентов в раковые клетки-мишени. Перспективным вариантом лигандов считаются искусственные антителоподобные каркасные белки, позволяющие позиционировать в пространстве набор остатков, обеспечивающих взаимодействие с целевой молекулой. К ним относятся аффибоди, создаваемые на основе белка А, которые отличаются небольшим размером (Tolmachev and Orlova, 2020). Несколько аффибоди эффективно взаимодействуют с EGFR, но скорость их эндоцитоза также невелика (Gostring et al., 2010). Существует также используемый для создания различных систем доставки противоопухолевых средств короткий пептид GE11, способный связываться с EGFR, обеспечивающий интернализацию модифицированных им наночастиц (Genta et al., 2017). Среди искусственных лигандов, способных связываться с EGFR, помимо антител и пептидов есть и аптамеры. РНК-аптамер E07 оказался способным связываться с EGFR с наномолярным сродством и около четверти связанного с поверхностью аптамера было способно интернализироваться клетками за 30 минут (Li et al., 2011).

#### **2.5.7.1. Наночастицы для доставки через EGFR**

Наночастицы представляют собой крайне гетерогенный по свойствам класс объектов, размер которых позволяет присоединять к ним (или нагружать в них) большое количество низкомолекулярных противоопухолевых агентов, например, традиционных химиотерапевтических средств. Уже только такое объединение может существенно изменять распределение и фармакокинетику веществ. В отношении онкологических

заболеваний присоединение противоопухолевых агентов к наночастицам производится в расчете на эффект повышенной проницаемости и удержания (enhanced permeability and retention, EPR) (Maeda et al., 2000). На использование этого эффекта, причиной которого является наличие значительного числа больших пор в местах быстрого и хаотичного роста сосудов в опухоли, возлагали большие надежды в использовании наночастиц для противоопухолевой терапии. Клинические исследования показали, однако, что в отличие от экспериментальных опухолей у мышей в опухолях человека EPR менее выражен и может сильно различаться не только между опухолями одного типа у разных пациентов, но и между разными метастазами одного пациента (Danhier, 2016). Среди вариантов преодоления нестабильности эффекта наночастиц рассматривается и придание им функционального адреса, в частности присоединение лиганда к EGFR (Golombek et al., 2018; Park et al., 2019).

Типичным вариантом реализации такого подхода и единственным дошедшим пока до стадии клинической проверки являются иммунолипосомы, нагруженные одним из наиболее распространенных противоопухолевых соединений – доксорубицином. С целью обеспечения устойчивости в крови, такие липосомы несут остатки полиэтиленгликоля (ПЭГ), а для придания специфичности по отношению к раковым клеткам со сверхэкспрессией EGFR Fab'-фрагмента цетуксимаба (Mamot et al., 2012). Такие липосомы, названные авторами anti-EGFR ILs-dox, содержат в среднем по 4000 молекул доксорубицина, лучше переносятся пациентами, чем те же дозы свободного доксорубицина и не показывают побочных эффектов, связанных с блокированием EGFR. В настоящее время этот вариант направленной доставки доксорубицина в клетки с повышенной экспрессией EGFR при лечении трижды негативного рака молочной железы находится на второй стадии клинических испытаний. В экспериментах на животных введение такого рода липосом с Fab'-фрагментами цетуксимаба способно в 6 раз увеличивать накопление лекарства в ксенографтах рака молочной железы MDA-MB-468 (Mamot et al., 2005).

Целый ряд похожих систем доставки, использующих химиотерапевтические средства, упакованные в липосомы, которые модифицируют лигандами к EGFR, находится на стадии доклинических исследований. К ним относятся иммунолипосомы с доксорубицином и цетуксимабом, присоединенным через фолат-связывающий белок (Pan and Lee, 2007), бор-содержащим анионом для нейтрон-захватной терапии и холестерин-цетуксимабом (Pan et al., 2007), цисплатином и нимотузумабом (Vazquez-Becerra et al., 2017), 5-фторурацилом и цетуксимабом (Petrilli et al., 2018), липосомы с ФС фталоцианином цинка и однодоменными антителами к EGFR EGal (Broekgaarden et al.,

2016), липосомы с оксалиплатином и EGF (Zalba et al., 2016), цисплатином и mAb к EGFR (Jung et al., 2015), липосомы с гемцитабином с присоединенными ПЭГ и mAb к EGFR (Aggarwal et al., 2013). Необходимо отметить, что такие подходы с направленной доставкой противоопухолевых средств показали возможность преодоления множественной лекарственной устойчивости, что часто является проблемой при противоопухолевой терапии (Mamot et al., 2005).

Все перечисленные варианты могут оказаться полезными для клиники, однако поиск оптимального лекарства, лиганда, способа присоединения продолжают интенсивно разрабатываться. Так, для получения однородного присоединения к липосомам использовали сортазу, соединяющую пептидные цепи по специфической последовательности LPETG на C-конце с пентаглицином на N-конце (Woll et al., 2018). Другим направлением совершенствования противоопухолевых средств является применение нескольких цитотоксических агентов загруженных в иммунолипосомы. Для реализации этого подхода были исследованы иммунолипосомы с доксорубицином и винорелбином с новыми однодоменными scFv EGFR-s10 (Wang et al., 2020). Еще одним вариантом использования сочетанного воздействия являются иммунолипосомы с цетуксимабом несущие доксорубицин и  $\beta$ -излучатель  $^{188}\text{Re}$ , в качестве потенциального тераностического средства (Hsu et al., 2015). Общим направлением поиска лучших противоопухолевых средств является разработка многофункциональных систем доставки лекарственных средств. В применении липосомных вариантов доставки это реализуется, в частности, в виде так называемых функционализированных липосом. Одним из вариантов подхода являются термочувствительные липосомы с доксорубицином и пептидом GE11 (Haeri et al., 2016). Эти липосомы, стабильные при температуре тела, при повышении температуры становятся неустойчивыми и высвобождают лекарство при 40°C, что при необходимости может обеспечить дополнительную селективность воздействия за счет локального нагрева. Чувствительность к pH окружения является другим вариантом реализации дополнительных функций: иммунолипосомы с mAb к EGFR начинают высвобождать гемцитабин при понижении pH (Kim et al., 2009), что может быть реализовано как в эндосомах, так и в закисленной части внеклеточного пространства ряда опухолей.

Другим вариантом наночастиц для направленной доставки противоопухолевых лекарств в клетки с использованием EGFR являются мицеллы. Мицеллы на основе сополимеров гидроксипропилметакриламида и лактата с ПЭГ с доксорубицином присоединенным через pH-чувствительный линкер были модифицированы наноантителом EGa1 для взаимодействия с EGFR. Полученные мицеллы обладали как способностью

тормозить рост ксенографтов клеток рака головы и шеи за счет блокирования EGFR, так и токсичностью за счет доставки доксорубина в клетки (Talelli et al., 2013). Подобная мицеллярная конструкция, несущая паклитаксел, была создана на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) и ПЭГ с присоединенным цетуксимабом (Gener et al., 2015). Другой вариант наночастиц с паклитакселом и квантовыми точками для тераностики содержит фосфолипид с присоединенным ПЭГ и лиганд к EGFR в виде цетуксимаба или аптамера. Мицеллы с лигандами к EGFR достоверно сильнее тормозили рост ксенотрансплантата рака поджелудочной железы, чем исходные варианты наночастиц (Kang et al., 2018). Создаются также мицеллярные конструкции, доставляющие в клетки несколько терапевтических агентов. Примером такой конструкции могут служить катионные мицеллы с цетуксимабом, доставляющие цитотоксический гемцитабин и микроРНК miR-205, сниженный уровень которой ассоциирован с опухолевыми стволовыми клетками. Такой подход, предназначенный для лечения прогрессирующего рака поджелудочной железы, привел к повышению эффективности терапии ксенографтов по сравнению с каждым из агентов, доставляемых мицеллами по отдельности (Mondal et al., 2017). Еще один вариант мицелл – токоферил-ПЭГ с присоединенным цетуксимабом был успешно использован для терапии ксенографтов трижды негативного рака молочной железы для доставки паклитаксела (Kutty et al., 2015).

Ряд работ по направленной доставке цитотоксических средств используют лиганды к нескольким рецепторам опухолевых клеток. Особенно интересными представляются подходы с одновременной нацеленностью на EGFR, как рецептор, вызывающий эпителиально-мезенхимальный переход (Lamouille et al., 2014), и маркеры стволовых раковых клеток. Перспективным вариантом являются наночастицы из сополимеров молочной и гликолевой кислоты (PLGA) с двойной специфичностью, обусловленной аптамерами к EGFR и CD133 нагруженные салиномицином, антибиотиком, наиболее активно действующим на стволовые клетки опухолей (Jiang et al., 2015). Подобной направленностью обладают наночастицы на основе гиалуроновой кислоты с двойной специфичностью – EGFR (пептид GE11) и CD44 за счет связывания с ней гиалуроновой кислоты. В качестве цитотоксического агента эти частицы несли сериновую протеазу гранзим Б (Chen et al., 2017).

К настоящему времени создано и проверено на модельных опухолях лабораторных животных большое количество сочетаний взаимодействующих с EGFR наночастиц, и загружаемых в них терапевтических агентов. Так, гибридные липид-PLGA наночастицы с присоединенным ПЭГ и Fab'-фрагментами антител к EGFR, загруженные

адрианомицином, тормозили рост ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы (Gao et al., 2014). Несущие паклитаксел самособирающиеся липидные наночастицы, стабилизированные плуроником и ПЭГ, с присоединенными mAb к EGFR также показали увеличенную эффективность по отношению к клеткам рака яичника *in vitro* и *in vivo* (Zhai et al., 2018). Вариант с пролекарством паклитаксел-ацетатом, загруженным в наночастицы PLGA с присоединенным цетуксимабом, был исследован при терапии ксенографтов рака легкого A549, и не показал улучшения накопления в опухоли. Тем не менее иммунонаночастицы с цетуксимабом показали лучший терапевтический эффект по сравнению с исходными наночастицами (Karra et al., 2013). Доставку паклитаксела в клетки рака желудка *in vitro* и *in vivo* обеспечивали наночастицы на основе полиглутамата и хитозана с присоединенным цетуксимабом (Sreeranganathan et al., 2017) Наночастицы PLGA с использованием цетуксимаба и паклитаксела показали также увеличение эффективности терапии ксенографтов рака легкого (Patel et al., 2018). Наночастицы из двуокиси кремния с доксорубицином, модифицированные цетуксимабом, улучшали терапию ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы (Wang et al., 2017b).

Многие перспективные варианты лекарственных средств используют вещества, о применении которых в медицинской практике нет достаточной информации. В таких случаях путь от результатов, полученных на культурах клеток и на животных, до клинического применения требует значительного времени и больших затрат. Примером попытки создания варианта с максимальным количеством уже разрешенных для лечения компонентов служат модифицированные ПЭГ липидные наночастицы на основе лецитина с присоединенным EGF, несущие гемцитабин (Sandoval et al., 2012).

Собственные свойства материала наночастиц также могут быть использованы при направленной доставке с помощью EGFR. Так наночастицы оксида железа с присоединенным цетуксимабом, могут быть использованы не только для магнитно-резонансной диагностики, но и для усиления эффекта радиотерапии. Попадая в клетки такие частицы вызывают при облучении увеличение продукции АФК, что увеличивает эффект радиотерапии ксенографтов глиомы (Bouras et al., 2015).

Дополнительное покрытие гемцитабином золотых наночастиц с присоединенным цетуксимабом оказывало терапевтический эффект при лечении ксенографтов аденокарциномы поджелудочной железы (Chen et al., 2016). Нельзя не упомянуть и о возможности использования золотых наночастиц, покрытых антителами к EGFR для фототермического уничтожения клеток опухоли (El-Sayed et al., 2006). В этом случае специфическое поглощение наночастиц является причиной долговременного удерживания наночастиц в опухоли.

Приведенные примеры показывают широкое поле деятельности для совершенствования традиционных химиотерапевтических средств лечения онкологических заболеваний с помощью их направленной доставки и добавления фармакокинетических, собственных транспортных и цитотоксических свойств. Общим для этих подходов является необходимость включения в состав конструкций элементов, предотвращающих поглощение частиц мононуклеарно-макрофагальной системой, в качестве которых чаще всего используют ПЭГ.

#### **2.5.7.2. Радионуклидная терапия, направленная на EGFR**

В качестве цитотоксического начала в направленной радионуклидной терапии используются изотопы, испускающие  $\alpha$ -,  $\beta$ -частицы,  $\gamma$ -излучение и ЭО. Для  $\beta$ -частиц нахождение внутри клетки не имеет значения с точки зрения повреждения раковой клетки, эндоцитоз может только улучшить удержание в опухоли присоединенного к лекарственному средству  $\beta$ -излучателя. Действие  $\alpha$ -частиц существенно более выражено при излучении внутри ядра, для проявления эффекта ЭО, как правило, необходима ядерная локализация. Часто радионуклиды, используемые для терапии и диагностики, испускают несколько видов излучения. С точки зрения доставки в клетки-мишени наибольший интерес представляют ЭО, испускаемые в результате электронного захвата или внутренней конверсии. Они характеризуются очень малым пробегом в тканях (типично – в нанометровом диапазоне) и высокой линейной передачей энергии (9-26 кэВ/мкм). При распаде в непосредственной близости от ядерной ДНК эмиттеры ЭО являются перспективными агентами для избирательного уничтожения целевых клеток с минимальным повреждением окружающих. Учитывая характерную для многих типов рака сверхэкспрессию EGFR на поверхности опухолевых клеток, а также способность EGFR импортироваться в ядро, были разработаны и разрабатываются различные варианты систем EGFR-направленной доставки эмиттеров ЭО разной степени сложности. Внутривенное введение меченных  $^{125}\text{I}$  мышиных mAb 425 приводило к существенному увеличению (с 7 до 16 месяцев) продолжительности жизни пациентов с тяжелыми формами глиобластомы при монотерапии (Li et al., 2010). Эти антитела являются отчасти интернализуемыми, как показали эксперименты с глиомными клеточными линиями от 20 до 40% антител, связанных с поверхностью клеток могут интернализироваться (Emrich et al., 1996). Среди наиболее простых и хорошо изученных вариантов таких систем доставки находится ЭФР с присоединенным к нему хелатирующим агентом ДТРА для связывания одного из перспективных для клинического применения эмиттеров ЭО –  $^{111}\text{In}$ . Первые исследования эффективности  $^{111}\text{In}$ -ДТРА-EGF были опубликованы 20 лет назад. В них было показано, что  $^{111}\text{In}$ -ДТРА-EGF проникал в экспрессирующие EGFR клетки рака

молочной железы, при этом 15% интернализированной радиоактивности достигало клеточного ядра. При этом инкубация с  $^{111}\text{In}$ -DTPA-EGF значительно замедляла рост клеток-мишеней. В последующих работах была показана эффективность и безопасность подобного подхода *in vivo* на мышинной модели рака молочной железы (Reilly et al., 2006), а также оценена потенциальная возможность замены EGF на связывающийся с EGFR, но не активирующий его урезанный вариант EGF (Panosa et al., 2015). Первая фаза клинических исследований показала отсутствие высокой токсичности и иммуногенности  $^{111}\text{In}$ -DTPA-EGF после однократного введения (Vallis et al., 2014). Эффективность подобного подхода может быть улучшена путем введения в состав узнающих EGFR конструкций дополнительного сигнала ядерной локализации, позволяющего увеличить импорт в ядро. Так, добавление сигнала ядерной локализации в состав доставляющей  $^{111}\text{In}$  конструкции на основе нимотузумаба, антитела к EGFR, значительно увеличило накопление радиоактивности в ядрах клеток рака молочной железы со сверхэкспрессией EGFR, тем самым придав ей большую цитотоксичность по сравнению с контрольной конструкцией без сигнала ядерной локализации. Сигнал ядерной локализации был успешно задействован и в более сложной системе двойной адресной доставки  $^{111}\text{In}$ , где входящий в конструкцию EGF отвечал за узнавание клеток-мишеней, а антитело к  $\gamma$ -H2AX – позволяло осуществить доставку радионуклида к маркеру ранней репарации ДНК гистону  $\gamma$ -H2AX (Cornelissen et al., 2013). Взаимодействие с опосредующими импорт в ядро факторами происходит в цитозоле, при этом после связывания с EGFR нацеленная на него конструкция претерпевает интернализацию и оказывается в замкнутых внутриклеточных везикулах. Собственный транспорт поверхностных рецепторов, в том числе для EGFR, в ядро невелик и направлен в основном в лизосомы и на поверхность клетки. В то же время клетки обладают развитой системой транспорта между органеллами, которую можно использовать для изменения транспорта создаваемых лекарственных средств. Вариантом использования радионуклидной терапии, основанной на использовании повышенной экспрессии EGFR, являются липосомы с присоединенным  $^{186}\text{Re}$  (излучающий  $\beta$ -частицы и ЭО) или  $^{188}\text{Re}$  (только  $\beta$ -частицы), которые вводили постоперационно в резекционную полость крыс с ортотопическими опухолями рака молочной железы человека. Такой подход призван улучшить существующие химиотерапевтические и радиотерапевтические варианты терапии, используемые в клинике (Li et al., 2012).

Высокая линейная передача энергии (50-230 кэВ/мкм) и относительно небольшой пробег (50-100 мкм)  $\alpha$ -частиц делают испускающие их радионуклиды более цитотоксичными в случае их распада внутри клетки (Sobolev et al., 2016). Адресная



доставка эмиттеров альфа-частиц внутрь раковых клеток, экспрессирующих EGFR, была успешно осуществлена в ряде исследований. В основном, в качестве нацеливающей на EGFR молекулы используют давно применяемое в клинике моноклональное антитело к EGFR цетуксимаб. Так,  $\alpha$ -эмиттер  $^{213}\text{Bi}$ , присоединенный к цетуксимабу, показал высокую цитотоксичность *in vitro* на клетках трижды негативного рака молочной железы, экспрессирующих EGFR (Song et al., 2013). *In vivo*  $^{213}\text{Bi}$ , доставляемый анти-EGFR антителом матузумабом, показал высокую эффективность на ортотопической мышинной модели рака мочевого человека, значительно увеличив продолжительность жизни животных по сравнению с контрольными группами (Fazel et al., 2015; Pfost et al., 2009). Пилотное исследование эффективности местного применения  $^{213}\text{Bi}$ , доставляемого цетуксимабом, для лечения рака мочевого пузыря на стадии *in situ* продемонстрировало потенциальную перспективность такого подхода: у 3 из 12 пациентов наблюдалась полная ремиссия после одно- или двукратной инстиляции данного радиофармпрепарата (Autenrieth et al., 2018).

На мышинной модели диссеминированных внутрибрюшинных опухолей LS-174T (рак кишечника человека) была показана эффективность противоопухолевого действия другого  $\alpha$ -эмиттера  $^{212}\text{Pb}$ , доставляемого цетуксимабом: медианная продолжительность жизни животных увеличилась до 84 дней по сравнению с 34 днями в группе животных, которым вводили  $^{212}\text{Pb}$ , доставляемый неспецифическим антителом (Milenic et al., 2015). Эффективность терапии  $^{212}\text{Pb}$ –цетуксимабом можно было еще увеличить как предварительным введением гемцитабина, так и комбинацией с  $^{212}\text{Pb}$ –трастузумабом, антителом к HER-2.

### **2.5.7.3. Иммунотоксины, направленные на EGFR**

Использование в качестве токсического начала каталитических субъединиц бактериальных токсинов представляет собой еще один из возможных вариантов противоопухолевых средств. Такие вещества включают в себя токсин, в котором лигандная часть, обеспечивающая связывание с клетками, заменена на антитело, его фрагмент или другой лиганд к выбранному интернализуемому рецептору. Общепринятое название – иммунотоксины – не совсем удачно, поскольку к этому типу противоопухолевых агентов относят и фрагменты токсинов, химически соединенные или генноинженерно слитые с природными лигандами. К настоящему времени было создано и исследовано более полутора десятков конструкций с лигандами к EGFR и частями различных токсинов, главным образом псевдомонадного экзотоксина, дифтерийного токсина и сапорина (обзор (Simon and FitzGerald, 2016) и (Deng et al., 2017; Yang et al., 2018)). Природные токсины помимо собственно токсической активности обладают также

собственным механизмом проникновения в цитозоль клетки. Например, дифтерийный токсин за счет транслокационного домена в слабокислой среде способен к встраиванию в мембрану эндосомы и переносу каталитической субъединицы в цитозоль, псевдомонадный экзотоксин по системе везикулярного транспорта через аппарат Гольджи попадает в ЭР и оттуда путем ретроградного транспорта в цитозоль. АДФ-рибозилирующие субъединицы этих токсинов обладают крайне высокой цитотоксичностью, что часто ставит вопрос о достаточности для терапевтического применения ширины терапевтического диапазона иммунотоксинов (Kim et al., 2020). Тем не менее, три иммунотоксина уже получили одобрение для клинического применения для лечения нескольких гематологических онкологий: на основе интерлейкина 2 и части дифтерийного токсина (Онтак) для лечения Т-клеточной лимфомы; анти-CD22 с частью псевдомонадного экзотоксина (Лумоксити) для лечения волосатоклеточного лейкоза и на основе интерлейкина 3 с частью дифтерийного токсина (Элзонрис) для лечения злокачественных бластных плазмцитоподобных дендритных клеток (Kim et al., 2020).

Создание лекарственного средства, использующего такой принцип для лечения солидных опухолей, представляет собой более сложную задачу. Тем не менее, одно из таких соединений, ТП-38, представляющее собой лиганд к EGFR, TGF $\alpha$ , слитый с частью псевдомонадного экзотоксина с делецией, оставляющей токсическую АДФ-рибозилирующую активность, но неспособной связываться с клетками, показало обещающие результаты в доклинических исследованиях. Этот иммунотоксин был применен для проверки возможности лечения глиобластомы при местном введении в головной мозг при помощи конвекционно-усиленной доставки. Исследования показали, что такой метод интрапаренхимальной доставки лекарственных средств привел к полному ответу на лечение у нескольких пациентов (Sampson et al., 2008). Аналогичный иммунотоксин (D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL) (Chandramohan et al., 2017) был создан с использованием варибельного фрагмента антитела, способного связываться как с диким типом EGFR, так и с EGFRvIII (Zalutsky et al., 2012), постоянно активированным мутантом, делеционным по части внеклеточного домена рецептора, который особенно часто встречается при глиобластомах. Данная конструкция показала значительное увеличение продолжительности жизни животных при терапии ортотопических опухолей глиом человека у иммунодефицитных мышей (Chandramohan et al., 2013). Сочетание терапии D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL ортотопических опухолей головного мозга у мышей с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа  $\alpha$ CTLA-4/ $\alpha$ PD-1/ $\alpha$ PD-L1 позволило элиминировать экспериментальные глиомы у части животных (Chandramohan et al., 2019).

#### **2.5.7.4. Доставка фотосенсибилизаторов с использованием EGFR**

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой достаточно интересный и перспективный подход к лечению ряда заболеваний, в первую очередь, онкологических (Agostinis et al., 2011). Данный вид терапии основан на избирательном накоплении в опухоли ФС и последующем ее облучении светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения ФС. При этом происходит запуск фотодинамических реакций, приводящих к образованию АФК, обладающих сильным повреждающим действием. Пробег наиболее реакционноспособных АФК (синглетный кислород, гидроксильный радикал) ограничен несколькими десятками нанометров, что делает их наиболее эффективными в случае попадания в ядро целевой клетки (Liang et al., 1998).

Среди наиболее продвинутых к использованию средств необходимо отметить RM-1929, представляющее собой иммуноконъюгат ФС dyeIRDye700DX с цетуксимабом, антителом к EGFR, проходящий в настоящее время клинические испытания для лечения рецидивирующего рака головы и шеи методом ФДТ (Gillenwater et al., 2020). Целый ряд иммуноконъюгатов ФС mAb или их фрагментами находится на стадии доклинических исследований (Fernandes et al., 2019).

#### **2.5.7.5. Генотерапевтические подходы с использованием EGFR**

Несколько комбинированных подходов было предложено для транспорта через EGFR генетического материала, генов и миРНК. Для этого использовали, например, перенацеливание аденовирусной трансфекции на клетки, сверхэкспрессирующие EGFR с помощью химерного белка, состоящего из EGFR и внеклеточного домена рецептора аденовируса hCAR (human coxsackie B and adenovirus receptor) (Harvey et al., 2010). Модифицированный аденовирус, доставляющий ген тимидинкиназы вируса простого герпеса человека, обеспечивал уничтожение клеток опухоли яичников, что замедляло рост ксенографтов (Harvey et al., 2010). Другим вариантом комбинированного подхода является доставка гена натрий-йодидного транспортера, который способен накачивать в клетки йодид. Наночастицы на основе полиэтиленimina и GE11 доставляли этот ген в ксенографты рака толстой кишки, что обеспечивало как визуализацию опухолей, так и торможение их роста (Urnauer et al., 2017). Липосомы с миРНК для инактивации сурвивина с двумя лигандами – пептид GE11 к EGFR и гиалуроновая кислота к CD44, тормозили рост ксенографтов гепатоцеллюлярной карциномы (Liang et al., 2019). Нельзя не отметить, что EGFR, в особенности его мутантный вариант EGFRvIII, образующий уникальный эпитоп, интенсивно исследуются, в том числе, в нескольких клинических испытаниях, на возможность использования в CAR-T терапии (Bagley and O'Rourke, 2020).

Анализ тенденций по разработке методов использования EGFR для лечения показывает, что, как и прежде, большое внимание уделяется способам блокирования EGFR-опосредованной сигнализации. Однако все больший интерес вызывают подходы, интегрирующие использование сверхэкспрессии и изменения в EGFR с дополнительными воздействием, прежде всего поражающим, на раковые клетки (Grapa et al., 2019; Westphal et al., 2017; Xu et al., 2017). Помимо традиционных широко применяемых комбинаторных подходов с одновременным использованием нескольких лекарств, создаются многофункциональные системы, сочетающие доставку с несколькими одновременно или последовательно применяемыми адресами с уничтожающим измененную клетку воздействием. EGFR, как один из наиболее изученных входов в сигнальную систему, регулирующую извне пролиферацию клетки, является часто используемым вариантом для обкатки новых систем доставки в клетку-мишень.

## **2.6. Рецептор фолата<sup>10</sup>**

Одним из поверхностных клеточных рецепторов, доступных из кровяного русла в основном у аномальных клеток является фолатный рецептор (ФР), который часто сверхэкспрессируется на многих раковых клетках. Хотя этот рецептор в некоторой степени экспрессируется на нормальных клетках эпителиального происхождения, он в основном становится доступным для циркулирующих в крови агентов после злокачественной трансформации (Lu and Low, 2012).

### **2.6.1. Типы фолатных рецепторов**

Рецепторы фолата представляют собой гликопротеины, ответственные за связывание фолата с высоким сродством и последующий транспорт в клетки через эндоцитоз. Семейство этих рецепторов человека включает в себя три хорошо охарактеризованных типа рецепторов ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma/\gamma'$ ) с гомологией около 70 – 80 % (Salazar and Ratnam, 2007).  $\alpha$ - и  $\beta$ - варианты присоединены к плазматической мембране гликозилфосфоинозитидного «якоря»  $\gamma$ - и  $\gamma'$  (укороченная форма  $\gamma$ -варианта рецептора) лишены последовательности для прикрепления этого «якоря» и являются секретируемой изоформой рецептора (Shen et al., 1994; Shen et al., 1995). К настоящему времени получены кристаллографические модели  $\alpha$ - и  $\beta$ - вариантов рецептора, соответствующие их различным состояниям связывания, а также кристаллическая структура ФР- $\alpha$  в комплексе с фолатом (Chen et al., 2013; Wibowo et al., 2013).

---

<sup>10</sup> Материалы раздела 2.6 изложены в работе автора и его соавторов: Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. (2015) Modular Nanotransporters for Targeted Intracellular Delivery of Drugs: Folate Receptors as Potential Targets. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 9, 1227-1238

Профиль экспрессии каждого подтипа ФР зависит от стадии дифференцировки и типа ткани (Lu and Low, 2012). Экспрессия ФР- $\gamma/\gamma'$  очень низка и ограничивается лимфоидными клетками (костный мозг, селезенка, тимус) (Shen et al., 1994). ФР- $\beta$  экспрессируется на ряде гемопоэтических клеток и дифференцированных клетках миеломоноцитарной линии; однако он находится в функционально неактивной форме, неспособной связывать фолат или его производные (Reddy et al., 1999). Функциональный ФР- $\beta$  выявляется на плаценте (Elnakat and Ratnam, 2004), активированных макрофагах и различных местах поражения при псориазе, ревматоидном артрите, атеросклерозе и других заболеваниях и ряде лейкозов (Ross et al., 1999).

Существует ряд нормальных тканей и типов клеток (проксимальные каналцы в почках, сосудистое сплетение, матка, маточная труба, придаток яичка, ацинарные клетки молочной железы, подчелюстные слюнные и бронхиальные железы, пневмоциты I и II типов в легких, трофобласты в плаценте) со значительным уровнем экспрессии ФР- $\alpha$  (Parker et al., 2005; Weitman et al., 1992), однако его локализация, как правило, ограничена апикальной мембраной поляризованных нормальных клеток эпителиального происхождения (за исключением клетки пигментного эпителия сетчатки (Chancy et al., 2000; Weitman et al., 1992)), что делает рецептор недоступным для циркулирующих в крови агентов. Поэтому, после внутривенного введения накопление низкомолекулярных фоллиево-радионуклидных конъюгатов в нормальных тканях ограничивается почками (за счет клубочковой фильтрации) и макрофагами периферической крови (включая активированные Купферовские клетки (Lu and Low, 2012). Достаточно большие макромолекулы, созданные для взаимодействия с ФР- $\alpha$  (антитела, белки, наночастицы и т. д.) не подвергаются клубочковой фильтрации и мало накапливаются в почках. Было продемонстрировано, что модификация фолатного радиоконъюгата альбумин-связывающей частью снижает его накопление в почках с  $\sim 70\%$  ID/g до менее  $30\%$  ID/g (Muller et al., 2013).

### **2.6.2. Экспрессия фолатных рецепторов при онкологических заболеваниях**

В отличие от его незначительного экспонирования в кровяное русло в нормальных тканях, ФР- $\alpha$  легко доступен для переносимых кровью агентов после злокачественной трансформации. Уровень его экспрессии сильно повышен при многих злокачественных новообразованиях, включая рак матки, шейки матки и яичников (O'Shannessy et al., 2013; Wu et al., 1999), молочной железы (Hartmann et al., 2007), головного мозга brain (Weitman et al., 1992), легких (Cagle et al., 2013), головы и шеи (Xie et al., 2013), мезотелиому (Bueno et al., 2001), рак толстой кишки (Shia et al., 2008), меланому (Sanchez-del-Campo et al.,

2009), рак поджелудочной железы, почки (Anthony A.C., 1996). Кроме того, была продемонстрирована положительная корреляция между уровнем экспрессии ФР- $\alpha$  и стадией (Toffoli et al., 1997; Xie et al., 2013), метастатическим потенциалом (D'Angelica et al., 2011), гистологической выраженностью (Toffoli et al., 1997), устойчивостью к химиотерапии (Sanchez-del-Campo et al., 2009) и неблагоприятным исходом заболевания (Hartmann et al., 2007). Это показывает, что высокий уровень экспрессии ФР- $\alpha$  связан с наиболее агрессивными и трудноизлечимыми видами онкологических заболеваний, из-за чего этот рецептор может рассматриваться в качестве ценной мишени для направленных терапевтических подходов.

Увеличение экспрессии FR- $\alpha$  может быть результатом путем лечения агонистом глюкокортикоидных рецепторов дексаметазоном или антагонистом эстрогена тамоксифеном при злокачественных новообразованиях, положительных по широко выраженному рецептору глюкокортикоидов или рецептору эстрогена- $\alpha$ , соответственно (Kelley et al., 2003; Tran et al., 2005). Было продемонстрировано, введение дексаметазона мышам с ксенотрансплантатами HeLa у мышей вызывает увеличение экспрессии ФР- $\alpha$  в опухоли при отсутствии экспрессии в других тканях мыши (Tran et al., 2005). Эти результаты обеспечивают потенциальную возможность повышения эффективности терапии направленной на лечение злокачественных новообразований, обладающих небольшой или неоднородной экспрессией ФР- $\alpha$  в опухолях. Кроме того, другой родственный рецептор – ФР- $\beta$  – активируется при таких онкологических заболеваниях, как острый и хронический миелогенный лейкозы (Sadasivan et al., 1987; Sadasivan et al., 1986), а также саркомы (Lu and Low, 2012). Всё это делает использование ФР очень привлекательным вариантом разработки методов противоопухолевой терапии.

Взаимодействие с фолатным рецептором может быть обеспечено с помощью использования его естественного лиганда - фолиевой кислоты, которая обладает рядом привлекательных характеристик, включая высокое сродство связывания ( $K_d \sim 0,01-3$  нМ в зависимости от подтипа рецептора) (Wibowo et al., 2013), простоту химической модификации в различных органических или водных растворителях, длительный срок хранения, низкой токсичностью и иммуногенностью (Lu and Low, 2012). Такие свойства рецептора послужили основанием для разработки большого количества подходов с использованием фолата для доставки лекарств и диагностики. Для большинства из них было продемонстрировано значительно увеличенное накопление в клетках-мишенях *in vitro*, а некоторые показали многообещающие результаты *in vivo* (Lu and Low, 2012; Muller et al., 2013). К недостаткам, существенным для терапевтического применения,

относится низкая скорость интернализации (до  $1-2 \times 10^5$  молекул на клетку в час) (Paulos et al., 2004). Только от 15 до 25% конъюгатов, связывающихся с рецептором, оказывается внутри клетки (Lu and Low, 2012). Такие свойства сужают диапазон использования данного рецептора до использования интеллектуальной доставки высокоцитотоксичных агентов точно в наиболее уязвимый клеточный компартмент, либо систем доставки с чрезвычайно высокой емкостью для действующего начала.

## **2.7. Использование эндоцитоза и выход из эндосом<sup>11</sup>**

В результате использования эндоцитоза или фагоцитоза для транспорта биологически активных средств в клетку они оказываются в замкнутых мембранных образованиях эндосомах или родственных им компартментах. Согласно одному из основных путей транспорта молекул, содержимое ранних эндосом за счет работы мембранных АТФазных протонных помп закисляется (с рН 6-6,5 до рН 5,0), они превращаются в поздние эндосомы и, в конечном счете, сливаются с лизосомами (рН < 5). Существует целый ряд лекарств, которые необходимо доставить именно в лизосомы (Biswas and Torchilin, 2014). Это могут быть, например, лизосомные ферменты, которые нужно доставить в лизосомы в случае нехватки этих ферментов при целом ряде заболеваний (Torchilin, 2006). Для их доставки используются, например, липосомы, содержащие на поверхности лизосомотропный октадецил-родамин В (Koshkaryev et al., 2011).

Кроме того, известно, что высвобождение лизосомных ферментов приводит клетку к апоптозу (Biswas and Torchilin, 2014). Поэтому при разработке методов лечения различных онкологических заболеваний нередко используют адресную доставку в лизосомы опухолевых клеток различных веществ, нарушающих целостность мембран лизосом (Kurz et al., 2008). Такими веществами могут быть детергенты, например, сфингозин, лизосомотропные токсины, ФС, а также вещества, способные накапливаться в лизосомах и при концентрации выше критической нарушать их целостность (Biswas and Torchilin, 2014). Для этих целей также можно использовать различные химиотерапевтические средства, например, церамид, доставка которого в лизосомы с помощью модифицированных трансферрином липосом приводила к заметному увеличению апоптоза злокачественных клеток как *in vitro*, так и *in vivo* (Koshkaryev et al., 2012). Кроме того, для удержания радиоизотопов в опухолевых клетках их часто доставляют в эндосомы/лизосомы, где они могут задерживаться за счет присоединения к

---

<sup>11</sup> Раздел является частью работы автора и его соавторов: Раздел написан по статье автора и его соавторов: Розенкранц А.А., Уласов А.В., Сланикова Т.А., Храмов Ю.В., Соболев А.С. (2014) Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки. *Биохимия*, **79**, 9, 1148-1168.

заряженной группе (Vaidyanathan et al., 2001).

Однако, в случае необходимости адресной доставки лекарств в цитозоль, ядро или митохондрии, транспортер для доставки терапевтического средства должен обладать способностью покинуть эндосомы до попадания в лизосомы с целью не допустить деградации переносимого им соединения лизосомными гидролазами (протеазами, липазами, фосфатазами, гликозидазами и сульфатазами). Из системы взаимосвязанных при помощи везикулярного транспорта компартментов (эндосомы, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи), в которую после эндоцитоза попадает транспортер, существует естественный ретроградный путь транспорта в цитозоль, который в норме используется для утилизации белков с неправильной структурой ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) (Olzmann et al., 2013). Известно, что некоторые токсины, такие как коклюшный, холерный и шига-токсины (Mukhopadhyay and Linstedt, 2013), а также рицин (Wesche et al., 1999) после попадания в эндосомы могут, по крайней мере отчасти, транспортироваться по ретроградному пути через сортировочные эндосомы в аппарат Гольджи и далее в эндоплазматический ретикулум, из которого для молекул, идущих по ретроградному пути, возможен выход в цитозоль. Считается, что для движения по ретроградному пути молекулам необходимо связаться с определенными белками-рецепторами на поверхности клеток (Mukhopadhyay and Linstedt, 2013). Так, например, для шига-токсина таким рецептором является GPP130 или Gb3 (Mukhopadhyay and Linstedt, 2012; Mukhopadhyay and Linstedt, 2013). Токсины, такие как шига-токсин, состоят из одной А-субъединицы и пяти В-субъединиц (Mukhopadhyay and Linstedt, 2013). За движение по ретроградному пути отвечает В-субъединица, которая в случае шига-токсина связывается с рецептором Gb3 (Johannes and Romer, 2010; Mukhopadhyay and Linstedt, 2013). Следует отметить, что рецепторы Gb3 сверхэкспрессированы на ряде типов опухолевых клеток, а также на дендритных клетках, поэтому транспортеры лекарств, содержащие В-субъединицу токсина, пытаются применять при лечении онкологических и инфекционных заболеваний (Johannes and Romer, 2010). В частности, к В-субъединице токсина присоединяли такие цитотоксические соединения, как ингибитор топоизомеразы I SN38 для лечения колоректальной карциномы (El et al., 2007), проапоптотический лиганд периферического бензодиазепинового рецептора RO5-4864 (El et al., 2008), и такие ФС, как производное порфирина TPP(p-O-β-GluOH)<sub>3</sub> (Amessou et al., 2008) и хлорин *e*<sub>6</sub> (Tarrago-Trani et al., 2006). Так как рецепторы Gb3 сверхэкспрессированы на антиген-представляющих дендритных клетках, то в состав вакцин к различным злокачественным и инфекционным заболеваниям можно включать



конъюгаты опухолевых и вирусных антигенов с В субъединицей шига-токсина (Adotevi et al., 2007; Vingert et al., 2006). Однако, на настоящий момент при разработке средств адресной доставки лекарств ретроградный путь используется не часто, скорее всего, потому, что его функционирование тесно сопряжено с разворачиванием белков с последующей утилизацией протеасомами, что заметно сужает круг транспортеров и доставляемых веществ.

Неудивительно, что чаще для доставки эндоцитированных веществ в цитозоль пытаются использовать закисление среды, происходящее по мере продвижения по эндоцитозному пути. В случае вирусной доставки генов используются собственные транспортные механизмы вирусов, позволяющие им переносить свое содержимое в цитозоль (Beatty and Curiel, 2012). Для наиболее эффективно доставляющих генетический материал в клетки аденовирусов выход из эндосом осуществляется за счет изменения конформации компонентов капсида при закислении среды эндосомы (Meier and Greber, 2004). Эту способность аденовирусов вызывать рН-зависимое разрушение липидного бислоя неоднократно успешно тестировали с целью доставки в необходимый компартмент клетки токсинов (FitzGerald et al., 1983) или же плазмид, переносимых в клетки при помощи рецептор-опосредованного эндоцитоза (Michael and Curiel, 1994).

Искусственные системы доставки в цитозоль, ядро или митохондрии также должны содержать компоненты, обеспечивающие перенос лекарственного средства через мембрану, например, средства, нарушающие целостность мембран. Для транспортеров, идущих по лизосомному пути, механизм такого использует за счет своего транслокационного домена дифтерийный токсин (Ladokhin, 2013). В его основе лежит рН-чувствительное изменение конформации белка, в результате которого он приобретает сродство к мембранам, встраивается в них и нарушает их целостность.

Для доставки различных транспортеров в цитозоль клетки широкое распространение нашло также включение в состав их состав CPP (Erazo-Oliveras et al., 2012). Активное изучение таких пептидов началось после обнаружения способности фрагментов трансаактиватора транскрипции (ТАТ) вируса иммунодефицита человека первого типа проникать в клетки (Green and Loewenstein, 1988). Обычно к CPP относят короткие (10-30 аминокислот) пептидные молекулы, заряженные положительно в нейтральной среде (Madani et al., 2013). К подобным CPP относятся также транспортан, пенетратин и олигоаргинины. Довольно часто эти пептиды имеют амфифильные свойства. CPP широко используют для доставки в клетки нуклеиновых кислот, белков, флуорофоров и различных лекарств (Erazo-Oliveras et al., 2012). При высоких концентрациях данные пептиды, по-видимому, способны проникать напрямую через

плазматические мембраны клеток, как индивидуально, так и в составе небольших транспортеров, однако основным путем их проникновения в клетку является эндоцитоз и эффективность выхода транспортеров, содержащих СРР, из эндосом в цитозоль невысока (Erazo-Oliveras et al., 2012). Механизм, при помощи которого СРР выходят из эндосом, до конца не ясен. Предполагают, что он связан с неравномерным распределением отрицательно заряженных липидов внутри и вовне эндосом, предположительно с большим содержанием во внешнем монослое (Cahill, 2009). Электростатические взаимодействия между положительно заряженными СРР и этими липидами могут привести к дестабилизации бислоя и образованию в нем дефектов. На стадии поздних эндосом поверхностный отрицательный заряд внешнего липидного монослоя эндосом существенно возрастает. Поэтому не удивительно, что многие СРР, в том числе ТАТ-пептид, выходят в цитозоль на стадии поздних эндосом (Erazo-Oliveras et al., 2012). Если транспортером переносятся белки, то это может привести к их частичной деградации и потере функциональной активности за счет действия гидролаз. Для повышения эффективности выхода из эндосом транспортеров, содержащих СРР, создают системы доставки с использованием нескольких копий СРР. Мультивалентность позволяет существенно повысить локальную концентрацию СРР, что, благодаря лучшему взаимодействию с отрицательно заряженными липидами, эффективнее дестабилизирует бислой. Было показано, что мультивалентные СРР значительно лучше выходят из эндосом, чем обычные СРР (Angeles-Boza et al., 2010; Erazo-Oliveras et al., 2012). Так, например, тример флуоресцентно-меченного ТАТ-пептида выходит из эндосом при концентрациях в 5–10 раз меньших, чем мономер или димер ТАТ-пептида (Angeles-Boza et al., 2010; Erazo-Oliveras et al., 2012). Слишком большое количество копий СРР может, однако, привести к обратному эффекту, благодаря сильному суммарному взаимодействию этих пептидов с эндосомами (Erazo-Oliveras et al., 2012). К недостаткам этого подхода можно также отнести повышенную иммуногенность мультивалентных СРР *in vivo*.

Для того чтобы обеспечить рН-зависимый выход из эндосом используют также амфифильные отрицательно заряженные пептиды (Li et al., 2004; Yessine and Leroux, 2004). Подобно описанному выше Т-домену дифтерийного токсина, эти пептиды при уменьшении рН переходят в мембраноактивное состояние. Эти пептиды содержат как гидрофобные аминокислотные остатки, так и остатки глутаминовой и аспарагиновой кислоты, которые при низких рН протонируются, что приводит к увеличению гидрофобности молекулы, приобретению ею упорядоченной, чаще всего  $\alpha$ -спиральной конформации и взаимодействию молекулы с липидным бислоем (Erazo-Oliveras et al., 2012). Примерами таких пептидов могут быть НА2-пептид (пептид слияния из вирусного

гемагглютини́на вируса гриппа) (Wharton et al., 1988) и GALA-пептид (Li et al., 2004). Совместное использование таких пептидов и CPP в составе одного транспортера может существенно увеличить эффективность попадания транспортера в цитозоль клеток (Erazo-Oliveras et al., 2012). Так, например, HA2-пептид, соединенный с опухолевым супрессорным белком p53, содержащим полиаргининовую последовательность R11 (HA2-p53-R11) более эффективно подавляет рост опухолевых клеток, чем конъюгат p53-R11 сам по себе (Michiue et al., 2005). Однако, эти анионные пептиды могут закориваться в мембране эндосом, поэтому для эффективного выхода транспортера из эндосом анионный пептид следует, по-видимому, присоединять к транспортеру с помощью гидролизуемой в цитозоле связи, например, дисульфидной (Erazo-Oliveras et al., 2012).

Выхода транспортеров, в том числе, содержащих CPP, из эндосом можно достичь путём включения в их состав ФС и облучением светом соответствующей длины волны (Berg et al., 1999; Berg et al., 2010). При облучении ФС образуют АФК, которые могут окислять липиды, что может вызвать образование дефектов в липидных мембранах. Из-за малых длин пробега АФК, ФС должны находиться в непосредственной близости от мембраны эндосом, что достигается благодаря взаимодействию CPP с липидным бислоем. Разрушение эндосом при помощи АФК часто приводит к гибели клетки. Кроме того, применение данного подхода *in vivo* принципиально ограничено глубиной проникновения света в ткань организма (Erazo-Oliveras et al., 2012).

Для выхода некоторых транспортеров из эндосом не обязательно, чтобы они содержал отдельный мембраноактивный модуль. Для ряда невирусных систем доставки ДНК было предположено, что протонируемые полимеры (Boussif et al., 1995), обычно используемые в качестве модуля-носителя и компактизатора ДНК, согласно предложенной авторами гипотезе “протонной губки”, вызывают набухание и осмотический лизис эндосом. Этот механизм был предложен для объяснения выхода из эндосом полимеров, таких как полиэтиленимин (ПЭИ) и полиамидамин (ПАМАМ). Их отличительной особенностью является наличие в их составе большого числа вторичных и третичных аминогрупп со значением  $pK_a$  5-7. При попадании в эндосомы эти полимеры способны создавать буферный эффект, что приводит к большей активности  $H^+$ -АТФазы, а, следовательно, большему накоплению протонов в эндосомах. Это, в свою очередь, за счет работы  $H^+/Cl^-$ -обменников приводит к аккумуляции в эндосомах ионов хлора (от 40 до 115 мМ) (Sonawane et al., 2003). Вследствие резкого возрастания осмотического давления происходит увеличение объема (на 140 %) и лизис эндосом, что, по мнению авторов гипотезы, позволяет транспортерам, содержащим ПЭИ или ПАМАМ, выйти в цитозоль. В то же время, имеется целый ряд данных, которые противоречат гипотезе «протонной

губки» или же не могут быть ею объяснены (Benjaminsen et al., 2013; Forrest et al., 2004; Funhoff et al., 2004; Gabrielson and Pack, 2006; Richardson et al., 2010). Следует добавить, что ПЭИ и ПАМАМ и другие подобные катионные полимеры способны непосредственно дестабилизировать мембрану эндосом (Klemm et al., 1998; Zhang and Smith, 2000). Трудно оценить насколько велик вклад предлагаемого механизма в транспорте из эндосом, поскольку такие внутриклеточные мембранные компартменты, как эндосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, представляют собой динамическую систему, в которой постоянно существует входящий и выходящий поток липидов, обеспечиваемый транспортными везикулами. Форма эндосом часто далека от сферичной (Helmuth et al., 2009), что также должно затруднять их осмотический разрыв. Несмотря на то, что ПЭИ и некоторые другие протонируемые поликатионы существенно более эффективны, чем большинство других используемых для этого полимеров, эффективность их выхода из эндосомного пути недостаточна, о чем свидетельствует усиление трансфекции при добавлении в состав полиплексов транслокационного домена дифтерийного токсина, специфически нарушающего структуру мембраны в слабокислой среде (Kakimoto et al., 2009; Kakimoto et al., 2010).

Ряд липидных наночастиц, содержащих катионные липиды, также обладает способностью высвобождать свое содержимое из эндосом в цитозоль. Наличие положительно заряженных фосфолипидов в составе таких частиц, как липоплексы, вызывает электростатическое взаимодействие с отрицательно заряженными фосфолипидами, сопровождающееся флип-флоп переходом во внутренний монослой мембраны эндосомы, что приводит к дестабилизации мембраны и выходу содержимого из эндосом (Xu and Szoka, Jr., 1996). Увеличения выхода доставляемых нуклеиновых кислот из эндосом можно добиться и при включении в состав липоплексов диолеллилфосфатидилэтаноламина (DOPE) за счет pH-зависимого фазового перехода этого липида с образованием гексагональной фазы, что приводит к дестабилизации эндосомной мембраны при взаимодействии с ней липоплексов (Zuhorn et al., 2005).

Таким образом, к настоящему времени разработан целый арсенал средств для, того чтобы обеспечить транспорт лекарств через мембраны в цитозоль в клетки-мишени, которые можно использовать в качестве одного из компонентов многофункциональных транспортных конструкций.

## 2.8. Доставка в ядро<sup>12</sup>

### 2.8.1. Использование ядра в качестве мишени противоопухолевых средств

Ядерная ДНК является обычной молекулярной мишенью для многих вариантов противоопухолевой терапии, включая многие лекарственные препараты и ионизирующее излучение (Hurley, 2002; Roos and Kaina, 2013). Одним из наиболее интенсивно разрабатываемых подходов к повышению эффективности лечения онкологических заболеваний является использование ионизирующего излучения с высокой ЛПЭ и малым пробегом. Такой подход дает возможность усилить воздействие на опухоль при меньшем повреждении здоровых тканей. Это в полной мере относится и к радионуклидной терапии, которая позволяет проводить лечение на уровне отдельных клеток.

Большинство противоопухолевых цитотоксических агентов недостаточно доставить лишь внутрь опухолевых клеток для получения максимального эффекта, поскольку одним из самых чувствительных к их действию компартментов клетки является ядро (Sobolev, 2009). Так, клеточное ядро является наиболее чувствительным компартментом к поражающему эффекту АФК (цитотоксического начала действия ФС (Liang et al., 2000a; Liang et al., 2000b; Ling et al., 2012)), эмиттеров  $\alpha$ -частиц (Vaidyanathan and Zalutsky, 2011), и, особенно, эмиттеров электронов Оже, которые практически неэффективны вне клеточного ядра (Jackson et al., 2013). При этом ни один из перечисленных противоопухолевых агентов не обладает способностью к преимущественному накоплению в ядре клетки. Более того, многие широко используемые в клинике противоопухолевые лекарства так называемой "терапии первой линии", то есть, используемые при соответствующем заболевании в первую очередь, действуют непосредственно на ДНК или ассоциированные с ДНК ферменты (Sui et al., 2011). Таким образом, доставка в ядро цисплатина, камптотецина, доксорубицина, актиномицина D (Jang et al., 2013), особенно в случаях резистентных к их действию, активно выкачивающих такие препараты из цитоплазмы клеток (Sui et al., 2011), необходима для достижения максимальной эффективности их действия. Наконец, используемая при генотерапии ДНК, проявляет свое действие, лишь оказавшись в ядре клетки-мишени. Доставка ДНК в ядро при помощи транспортных систем в этом случае наиболее значима

---

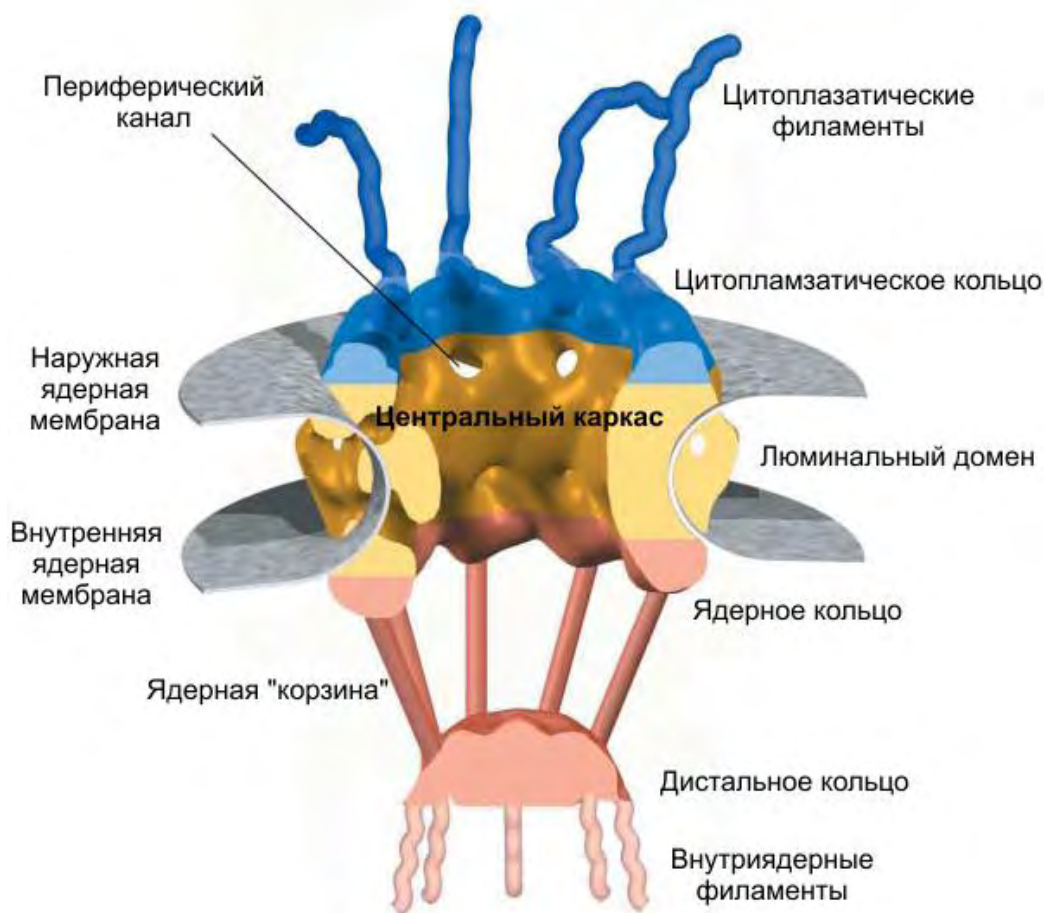
<sup>12</sup> Раздел написан с использованием текста статей автора и его соавторов: Розенкранц А.А., Уласов А.В., Слостникова Т.А., Храмцов Ю.В., Соболев А.С. (2014) Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки. *Биохимия*, **79**(9): 1148-1168; Rosenkranz A. A., Slastnikova T. A., Georgiev G. P., Zalutsky M. R., & Sobolev A. S. (2020). Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters. *Nucl. Med. Biol.*, **80**, 45-56; Rosenkranz A. A., Slastnikova T. A., Durymanov M. O., Georgiev G. P., & Sobolev A. S. (2020). Exploiting active nuclear import for efficient delivery of Auger electron emitters into the cell nucleus. *International Journal of Radiation Biology*, 1-11. DOI: 10.1080/09553002.2020.1815889.

для не делящихся и медленно делящихся клеток, у которых не происходит или редко происходит разборка ядерной мембраны при митозе.

Таким образом, для всех этих разных типов лекарственных средств направленная доставка в ядро является крайне желательной, а зачастую и просто необходимой. Успешный выход из эндосом в цитозоль является необходимым, но недостаточным условием последующего попадания терапевтического агента в ядро клетки. Для понимания и успешного использования механизмов накопления доставляемого препарата в ядре, необходимо учитывать организацию транспорта молекул в цитоплазме (в особенности активный транспорт из цитоплазмы в ядро клетки). Цитоплазма клетки представляет собой организованную, разделенную на отдельные области структуру из цитоскелета и органелл (Luby-Phelps, 2000; Luby-Phelps, 2013), создавая значительные препятствия для свободной диффузии макромолекул (Campbell and Hore, 2003; Glover, 2012). Поэтому направленный транспорт эндогенных белков и органелл в клетке является активным и происходит по своеобразным «рельсам» элементов цитоскелета – микротрубочкам (преимущественно) и актиновым микрофиламентам (Campbell and Hore, 2003; Lakadamyali, 2014; Rogers and Gelfand, 2000). Данные компоненты цитоскелета участвуют как в «заякоривании» импортируемых в ядро белков в цитоплазме (Dong et al., 2000; Luscher and Eisenman, 1992), так и в их активном транспорте к ядру (Giannakakou et al., 2000; Lam et al., 2002; Lopez-Perez and Salazar, 2006; Roth et al., 2007; Roth et al., 2011). Направленный внутриклеточный транспорт вдоль системы микротрубочек осуществляется при помощи специальных моторных белков, которые транспортируют макромолекулы в направлении к ядру (динеин) или от ядра (кинезин) (Lakadamyali, 2014). Таким образом, следующим шагом доставляемого терапевтического агента на пути к ядру после его успешного выхода из эндосом может быть взаимодействие с системой ретроградного транспорта по микротрубочкам (динеин/микротрубочки) для его доставки в непосредственную близость к комплексу ядерной поры (Favaro et al., 2014; Glover, 2012). Основываясь на этом, ряд авторов использует последовательности для взаимодействия с легкой цепью динеина (Moseley et al., 2010) или даже саму легкую цепь динеина (Favaro et al., 2014) для обеспечения более эффективной доставки действующего агента (например, ДНК) в ядро. Так, использование модульной конструкции, состоящей из легкой цепи динеина Rp3, N-концевого ДНК-связывающего домена и C-концевого мембраноактивного ТАТ-пептида для доставки ДНК позволило получить достаточно эффективный и малотоксичный невирусный вектор для трансфекции (Favaro et al., 2014).

### 2.8.2. Комплекс ядерной поры

Главным барьером на пути транспорта макромолекул из цитозоля в клеточное ядро служит ядерная оболочка, содержащая поры (рис. 2.6). Она состоит из двух фосфолипидных мембран, расположенных на расстоянии 30 нм друг от друга each other (Cautain et al., 2015). Учитывая, что толщина бислоев составляет около 5 нм каждый, а ядерной ламини – 14 нм (Turgay et al., 2017), нуклеоплазма отделена от цитозоля расстоянием более 50 нм. Поэтому большая часть АФК, испускаемых ФС, а также ЭО, испускаемых радионуклидами, помещенными на внешнюю ядерную мембрану, не может достичь ДНК. Очевидно, что их эффективность значительно увеличится при доставке внутрь клеточного ядра. Движение гидрофильных молекул из цитозоля в ядро контролируется комплексом ядерных пор (nuclear pore complex, NPC), который пересекает обе ядерные мембраны. NPC представляет собой селективно проницаемый барьер, облегчающий транспорт между ядром и цитозолем по водным каналам, обеспечивающий как пассивную диффузию ионов и мелких белков, так и активный транспорт макромолекул и частиц размером до 39 нм (Pante and Kann, 2002). Помимо основного центрального канала, NPC также имеет восемь меньших периферийных каналов диаметром от 5 до 10 нм (Grossman et al., 2012).



**Рисунок 2.6. Структура ядерной поры** по (Fahrenkrog and Aebi, 2003).

Типичное ядро клетки позвоночных имеет от 10 до 20 NPC на квадратный микрометр поверхности (около 2000 до 5000 NPC на ядро) (Grossman et al., 2012). NPC действует как эффективный барьер для более мелких молекул с пассивной диффузией через NPC, падающий экспоненциально с увеличением размера молекулы (Timney et al., 2016). Белки размером более 40 кД могут эффективно транспортироваться через NPC только энергозависимым образом (Turgay et al., 2017). Транспорт в ядро и из него макромолекул осуществляется с участием специальных транспортных белков – транспортин (импортинов и экспортинов) (Chook and Suel, 2011), которые «узнают» специфические сигналы в составе транспортируемых макромолекул — сигналы ядерной локализации (СЯЛ) и ядерного экспорта (СЯЭ) (Chook and Suel, 2011; Lin and Hu, 2013; Marfori et al., 2011; Poon et al., 2005; Xu et al., 2010). К настоящему времени охарактеризовано большое количество различных СЯЛ. Белки, содержащие наиболее хорошо изученные «классические» СЯЛ (большой Т-антиген вируса SV-40, нуклеоплазмин), транспортируются в ядро в составе комплекса с гетеродимером, образованным импортинами  $\alpha$  и  $\beta$  (Lott and Cingolani, 2011). Наряду с «классическими»



последовательностями ядерного импорта, существует множество «неканонических» СЯЛ, в узнавании которых принимает участие только импортин-β и его гомологи (Marfori et al., 2011), димеры импортин-β с его гомологами (Flores and Seger, 2013), либо димер импортин-β с ещё одним адаптерным транспортин-ом – снурпортином-1 (Marfori et al., 2011).

Показано, что в злокачественных клетках часто происходят изменения в цитоплазмально-ядерном транспорте. Из белков с различным поведением в злокачественных и нормальных клетках особый интерес вызывают белки, накапливающиеся преимущественно в ядрах опухолевых клеток. Такими свойствами обладают производное человеческого α-лактальбумина HAMLET (Fast et al., 2005; Gustafsson et al., 2005; Hallgren et al., 2008) и белок вируса анемии цыплят апоптин (Kuusisto et al., 2008; Los et al., 2009; Maddika et al., 2006; Poon et al., 2005). HAMLET – это комплекс α-лактальбумина и олеиновой кислоты (Fast et al., 2005). Показано, что HAMLET способен накапливаться в цитоплазме и быстро транслоцироваться в ядра опухолевых клеток (75% в течение 1 часа) (Ho et al., 2012) в то время как у нормальных клеток он обнаруживается только в цитоплазме, при этом в гораздо меньшем количестве (Gustafsson et al., 2005). Апоптин – это небольшой белок (121 а.к.) вируса анемии цыплят, обладающий способностью селективно накапливаться в ядрах опухолевых и измененных клеток, не накапливаясь в нормальных (Backendorf et al., 2008; Maddika et al., 2006). Несмотря на значительное количество работ, посвященных, в том числе, и исследованию механизма селективного накопления апоптина в ядрах опухолевых клеток (Heilman et al., 2006; Kucharski et al., 2011; Lee et al., 2007), однозначного понимания этого механизма пока нет. Предложено несколько гипотез, в основном, основывающихся на опухолевоспецифичном ингибировании СЯЭ в составе молекулы апоптина, при сохранении функциональности содержащихся в последовательности этого белка СЯЛ (Kuusisto et al., 2008).

### **2.8.3. Использование сигнала ядерной локализации для доставки в ядро**

Привлекательной возможностью для доставки в ядро опухолевой клетки является использование тех конкретных рецепторов злокачественных клеток (например, рецепторов семейства ErbB, нуклеолина и IGF-1), которые подвержены внутренним естественным транспортным путям от плазматической мембраны в ядро (Lo et al., 2006; Shi et al., 2007; Wang and Hung, 2012). В большинстве случаев механизмы этих эндогенных транспортных путей не ясны и могут быть реализованы через транслокционный комплекс Sec61 (Chaumet et al., 2015; Lo et al., 2006). Альтернативным вариантом может быть транспорт

интегральных мембранных рецепторов через эндоплазматический ретикулум к внешней ядерной мембране, а затем в ядро через периферические каналы NPC (Chaumet et al., 2015; Zuleger et al., 2012). Следует отметить, что эффективность транспорта этого рецептора невысока, так как добавление NLS в конструкцию, меченную излучателем АЭ, значительно повышает их цитотоксичность (Costantini et al., 2008; Costantini et al., 2010; Fasih et al., 2012). Кроме того, эти транспортные пути находятся под контролем сигнальных сетей, которые могут влиять на внутриклеточное распределение рецепторов и затруднять получение необходимого результата (Han and Lo, 2012).

Для осуществления адресной доставки действующего агента в ядро клетки-мишени часто в состав конструкций (наночастицы, полимеры, мицеллы, белки, пептиды, антитела), переносящих само лекарство, включают различные СЯЛ (Chan et al., 2010; Subramanian et al., 1999; Yu et al., 2012). При этом, преимущественно используют наиболее хорошо изученные «классические» СЯЛ. Так, введение последовательности большого Т-антигена вируса SV40 в состав конструкций для доставки терапевтических агентов (ДНК, ФС, радионуклиды, доксорубин) позволило добиться значительного накопления в ядрах мишеных клеток и увеличения эффективности их действия (Bisland et al., 1999; Chan et al., 2010; Chan et al., 1998; Kim et al., 2012; Yu et al., 2012).

Учитывая, что такие агенты как эмиттеры электронов Оже, практически неэффективны вне клеточного ядра, ряд групп исследователей, используют конъюгированные с СЯЛ интернализуемые антитела или пептиды для адресной доставки эмиттеров ЭО (например,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ) в ядра опухолевых клеток (Chan et al., 2010; Chen et al., 2006; Cornelissen and Vallis, 2010). Присоединение к доставляющей конструкции нескольких СЯЛ обеспечивает доставку в ядра 25-30% интернализованной радиоактивности (Chan et al., 2010; Chen et al., 2006). Присоединение еще большего количества СЯЛ способно увеличить транспорт в ядро до 2/3 от интернализованной радиоактивности (Chen et al., 2006). Неясно, что обеспечивает увеличение накопления в ядре: возможно присоединение такого количества положительно заряженных последовательностей начинает влиять на проникновение доставляющей конструкции через мембраны эндосом.

Проведенный анализ литературы, относящейся к созданию лекарств направленного действия на опухолевые клетки, показывает актуальность этой проблемы. Решением ее занимается многие лаборатории по всему миру. Одним из возможных путей решения проблемы является доставка средств мощного локального воздействия в наиболее чувствительные к ним компартменты клеток. К таким воздействиям относятся

повреждающие органические соединения частицы с высокой ЛПЭ и малым пробегом, активные формы кислорода и радикалы, которые возникают при распаде ряда радионуклидов и облучении ФС. Полученные в результате молекулярно-биологических исследований сведения о различии нормальных и злокачественных клеток могут быть использованы для создания транспортных конструкций, переносящих агентов, вызывающих локальные повреждения наиболее значимых биологических структур. Возможным вариантом использования особенностей узнавания и транспорта опухолевых клеток является создание конструкций для доставки генов, способных массово производить в этих злокачественных клетках-мишенях токсические продукты.

### 3. Материалы и методы исследования

#### 3.1. Культуры клеток

На разных этапах работы использовали следующие клеточные культуры: гепатомы человека линии PLC/PRF/5, фибробласты человека, меланомы мыши линий В16-F1 и Клаудмана S91 (клон М3), линии нормальных эмбриональных фибробластов мыши СЗН/10Т1/2 и НИН/3Т3, эпидермоидную карцинома человека линии А431, карциномы легкого человека А549, Calu-1, бронхоальвеолярную карциному NCI-H358, мукоэпидермоидные карциному легкого человека NCI-H292 и NCI-H358, рак протоков молочной железы человека ВТ-474, человеческие эмбриональные клетки почек НЕК293, эпителиоидную карциному шейки матки HeLa, мышиную карциному легких Льюиса (LLC-1), глиомы человека D247 MG, U87 MG, U87 MG wttEGFR, глиомы крысы С6, аденокарциномы яичников человека SK-OV-3, рака мочевого пузыря человека линий HT-1376, RTv4, ScaBER, EJ, T24, 5637 были получены из коллекций клеточных культур: American Type Culture Collection (ATCC), США, Российской коллекции клеточных культур, коллекции клеточных культур Duke University, США. Клетки эпителия молочной железы мыши HC-11 были получены от Helinski (de Wet et al., 1987). Все клеточные линии вели согласно рекомендациям источников.

#### 3.2. Синтез конъюгата (БСА)-(хлорин $e_6$ )-инсулин

Бычий сывороточный альбумин (БСА; «Serva», Германия) конъюгировали с хлорином  $e_6$  с помощью циклогексил-3(2-морфолиноэтил)карбодиимид мето-4-толуенсульфоната (ЦМКД; «Serva») в 2 mM Na-фосфатном буфере, pH 7,5 при соотношении БСА:(хлорин  $e_6$ ):(ЦМКД) равном 1:30:90. Реакционную смесь оставляли на ночь в холодильнике при 4°C, после чего полученный конъюгат БСА-(хлорин  $e_6$ ) диализовали против раствора, содержащего 50 mM NaCl и 0,3 mM ЭДТА, pH 7,0. Инсулин конъюгировали с диализованным конъюгатом БСА-(хлорин  $e_6$ ) с помощью глутарового альдегида («Merck», Германия). Для этого инсулин растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО, «Sigma», США) и добавляли в качестве свидетеля [ $^{125}$ I]-инсулин. К этому раствору инсулина добавляли раствор конъюгата БСА-(хлорин  $e_6$ ) в буфере, содержащем 50 mM NaCl и 0,3 mM ЭДТА, pH 7,0, и разводили в 2 раза 50 mM ацетатным буфером pH 3,6. Реакционную смесь переносили в лед и добавляли 25% глутаровый альдегид из расчета 45 мкл на 2,1 мг инсулина, затем оставляли на ночь в холодильнике. Полученный конъюгат диализовали против 10 mM ацетатного буфера pH 4,0 с 5% ДМСО. Конъюгат БСА-(хлорин  $e_6$ )-инсулин (1:13:16) анализировали при помощи ТСХ на пластинах с силикагелем G («Serva») в смеси этанол:уксусная кислота 95:5 (Mew et al., 1983). Более

95% хлорина  $e_6$  было ковалентно связано с БСА. ЭФ в 10% ПААГ не выявил в конъюгате свободного инсулина. Синтез конъюгата осуществлялся в Т.В. Ахлыниной в сотрудничестве с автором.

### 3.3. Синтез конъюгата БСА-(хлорин $e_6$ )-(СЯЛ Р11К)-инсулин

Конъюгацию БСА с хлорином  $e_6$  проводили в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5 при 4<sup>0</sup> С в течение 18 часов при помощи ЦМКД и соотношении БСА:(хлорин  $e_6$ ):ЦМКД равном 1:30:300, после чего полученный конъюгат диализовали против того же буфера. Для получения конъюгата, содержащего СЯЛ, использовали пептид PKKKRKVEDPYC (P11K, синтезирован в ИБХ им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова), в состав которого входит последовательность СЯЛ большого Т-антигена вируса SV-40 (подчеркнута). Для ковалентного присоединения С-концевой сульфгидрильной группы пептида к аминокетильным группам конъюгата БСА-(хлорин  $e_6$ ) последний обрабатывали 3-малеимидобензоилгидроксисукцинимидным эфиром (МБС; «Sigma»), с целью замены α-аминогрупп на малеимидные группы. Реакцию проводили в том же Na-фосфатном буфере при соотношении БСА:МБС равном 1:100. МБС разводили в диметилформамиде и добавляли к конъюгату БСА-(хлорин  $e_6$ ), после чего смесь оставляли на 1 час при комнатной температуре и диализовали против 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,5, с 0,5 мМ ЭДТА, добавляли пептид P11K в 30-кратном избытке по отношению к малеимидному производному конъюгата БСА-(хлорин  $e_6$ ). Реакцию проводили 3 часа в атмосфере инертного газа при комнатной температуре, после чего избыток пептида удаляли диализом против Na-фосфатного буфера с ЭДТА. С целью последующего присоединения инсулина отдельно получали конъюгат БСА-инсулин с помощью глутарового альдегида, аналогично описанному выше получению конъюгата БСА-(хлорин  $e_6$ )-инсулин. Затем конъюгаты БСА-инсулин и БСА-(хлорин  $e_6$ )-(пептид P11K) раздельно инкубировали с N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионатом (SPDP; «Sigma») в 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,5, после чего пиридилдитиопропионатное (ПДП) производное конъюгата БСА-(хлорин  $e_6$ )-пептид инкубировали с 50 мМ дитиотреитолом (ДТТ; «Sigma») в течение 30 минут при 37<sup>0</sup>С, диализовали и полученный таким образом HS-БСА-(хлорин  $e_6$ )-P11K инкубировали с конъюгатом ПДП-(БСА)-инсулин, в результате образовался конъюгат [БСА-(хлорин  $e_6$ )-P11K]-(БСА-инсулин). Синтез конъюгатов был проведен в сотрудничестве с Д.А. Янсом и Т.В. Ахлыниной.

### **3.4. Синтез конъюгатов БСА-(СЯЛ Р101К)-(хлорин $e_6$ )-инсулин и БСА-(СЯЛ Р101Т)-(хлорин $e_6$ )-инсулин.**

Пептиды Р101К (CGPGSDDEAAADAQHAAPPKKRKVGY) и Р101Т (CGPGSDDEAAADAQHAAPPKTKRKYGY) были любезно предоставлены Г. Тотом и И. Паво (Institute for Medical Chemistry, Szeged Medical University, Венгрия, подчеркнута последовательность СЯЛ, жирным выделена аминокислота, замена которой приводит к полной потере свойств СЯЛ). Данные пептиды содержат на N-конце цистеин, через SH-группу которого можно проводить ковалентное присоединение пептида к модифицированным при помощи МБС аминок группам БСА. Реакцию между МБС и конъюгатом БСА-(хлорин  $e_6$ ) проводили как описано выше. Ковалентное присоединение пептидов к конъюгату БСА-(хлорин  $e_6$ ) с активными малеимидными группами проводили при 30-кратном избытке пептидов по отношению к конъюгату в течение 3 часов при комнатной температуре, после чего полученный конъюгат диализовали против 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,5 с 0,5 мМ ЭДТА, после чего проводили восстановление собственных сульфгидрильных групп БСА при помощи ДТТ для чего к конъюгату БСА-(хлорин  $e_6$ )-пептид добавляли ДТТ до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали при 37° С 30 мин и диализовали восстановленный конъюгат против 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,5 с 0,5 мМ ЭДТА.

Для ковалентного присоединения инсулина к полученному конъюгату инсулин модифицировали сульфосукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилатом («Pierce», США). Для этого инсулин и карбодиимид разводили в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5 и смешивали в соотношении 1:1,5. Реакция проходила при 37°С в течение 30 мин. Затем проводили диализ против 10 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7,5 с 0,5 мМ ЭДТА. Полученные модифицированный инсулин и восстановленный конъюгат БСА-пептид-(хлорин  $e_6$ ) смешивали в атмосфере инертного газа в соотношении 15:1 и реакцию присоединения проводили в течение 18 часов при 4°С, после чего полученный конечный конъюгат очищали при помощи гель-фильтрации на Сефакриле S-300 в 25 мМ HEPES, pH 7,5, 50 мМ NaCl. Синтез конъюгатов был проведен в сотрудничестве с Д.А. Янсом и Т.В. Ахлыниной.

### **3.5. Синтез конъюгатов ( $\beta$ -галактозидаза-СЯЛ)-инсулин-(хлорин $e_6$ ) и ( $\beta$ -галактозидаза)-инсулин-(хлорин $e_6$ )**

В качестве компонента-носителя в данных конъюгатах были использованы рекомбинантный белок, представляющий собой продукт химерного гена, в котором были слиты последовательности СЯЛ большого Т-антигена вируса SV40 (111-135, с

модификациями) и  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* (9-1023), а также исходная, немодифицированная галактозидаза. Для получения химерного белка P10 и  $\beta$ -галактозидазы использовали соответственно плазмиды pDJ87 и pDJ148, любезно предоставленные проф. Д.А. Янсом (Австралия).

Для каждого белка соответствующую культуру *E. coli* наращивали в среде LB («Sigma») с ампициллином и изопропил- $\beta$ -тиогалактозидом («СибЭнзим») в качестве индуктора экспрессии белка. После центрифугирования бактериальной массы и лизиса ультразвуком суспензию вновь центрифугировали и супернатант наносили на аффинную колонку, где в качестве сорбента использовался *p*-аминобензил-1-тио- $\beta$ -D-галактопиранозид («Sigma»). После промывки колонки буфером с 20 мМ трис-HCl, pH 7,4, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,6 М NaCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола (для удаления примесей других белков), выделяемый белок элюировали боратным буфером (0,1 М, pH 10,05; 10 мМ 2-меркаптоэтанол). Присутствие белка во фракциях определяли по цветной реакции с *o*-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозидом («Sigma»). После диализа в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,0 с 10 мМ 2-меркаптоэтанолом белок концентрировали при помощи ультрафильтрации.

С целью последующего присоединения к белку получали аминоксиды хлорина *e*<sub>6</sub>, для этого к хлорину *e*<sub>6</sub> добавляли ЦМКД и диаминогексан («Sigma») в 5 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5. Соотношение концентраций (хлорин *e*<sub>6</sub>):(ЦМКД):диаминогексан в реакционной смеси составляло 1:100:100. Реакция проходила при 4<sup>0</sup>С в течение ночи. Затем избыток ЦМКД и диаминогексана удаляли диализом в Na-фосфатном буфере (10 мМ, pH 7,0), через диализную мембрану с размером пор 1000 Д.

Для получения конъюгатов с лигандом, имеющим специфические интернализуемые рецепторы, использовали инсулин, модифицированный цитракониевым ангидридом. Взаимодействие инсулина с цитракониевым ангидридом приводит к защите концевых аминокислот инсулина, которые участвуют во взаимодействии с рецепторами, поэтому при дальнейшей модификации инсулина после цитраконирования участвуют аминокислоты лизинов, находящиеся в середине полипептидной цепи. Модификацию инсулина цитракониевым ангидридом проводили по методу Шектера (Shechter et al., 1978).

Для конъюгации белков с аминоксидом хлорина *e*<sub>6</sub> использовали ЦМКД. Реакцию проводили в 10 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,0 при концентрационном соотношении белок:(аминоксид хлорина *e*<sub>6</sub>):ЦМКД равном 1:30:300. Конъюгаты

очищали от несвязавшегося моногексиламид хлорина  $e_6$  и избытка ЦМКД диализом. После чего модифицированный цитраконильными группами инсулин был ковалентно присоединен к конъюгатам ( $\beta$ -галактозидаза-СЯЛ)-(хлорин  $e_6$ ) и ( $\beta$ -галактозидаза)-(хлорин  $e_6$ ) с помощью SPDP (Jung et al., 1981). Инсулин использовали в концентрации, в 15 раз превышающей концентрацию конъюгата. После инкубации и диализа в Na-фосфатном буфере (10 мМ, рН 7,0) цитраконильные группы снимали при помощи закисления и последующего защелачивания (Shechter et al., 1978) и полученный конъюгат диализовали против 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,0. Соотношение белок:(хлорин  $e_6$ ):инсулин в этих конъюгатах было равно 1:5:8. ). Синтез конъюгатов был проведен в сотрудничестве с Д.А. Янсом и Т.В. Ахлыниной.

### 3.6. Присоединение $^{211}\text{At}$ к полипептидным конъюгатам

$^{211}\text{At}$  присоединяли МНТ в виде N-сукцинимидного эфира *p*-астатбензойной кислоты по модифицированной нами методике Харрисона и Ройла (Harrison and Royle, 1984). Нитрит натрия (1 мг) и *p*-аминобензойную кислоту (ПАБК) (0,5 мг) растворяли в 100 мкл 1 М HCl на ледяной бане. Реакцию образования diazosоединения проводили в течение 10 минут при 0°C, затем добавляли 1,5 мг мочевины. К 150 мкл 67 нМ diaзотированной ПАБК в 1 М HCl добавляли 5 мкл концентрированной HCl и 350 мкл  $^{211}\text{At}$  в 50 мМ растворе NaOH, после чего инкубировали при 55°C в течение 5 минут, затем охлаждали на льду в течение 3 минут, добавляли 10 мкл концентрированной HCl, экстрагировали полученную *p*-астатбензойную кислоту (ПАтБК) диметилловым эфиром и упаривали, после чего ПАтБК растворяли в 25 мкл тетрагидрофурана («Sigma»). Полученный раствор добавляли к раствору дициклогексилкарбодиимида (688 нМ) и N-гидроксисукцинимид (557 нМ) (оба - «Sigma»). Реакцию активации карбоксильной группы проводили при 55°C в течение 1 часа и упаривали раствор до объема 10 мкл. Для ковалентного присоединения  $^{211}\text{At}$  к модульному носителю P10-инсулин (89 мкг, 450 мкл в боратном буфере рН 9,2 и 150мМ NaCl) раствор модульного носителя переносили в пробирку с N-сукцинимидным эфиром ПАтБК и инкубировали на льду 20 минут. Отделение астатинированного модульного носителя P10-инсулин от не присоединённого N-сукцинимидного эфира ПАтБК проводили при помощи гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-50. Для проверки цитотоксического действия астатинированного модульного носителя использовали препараты с исходной удельной радиоактивностью порядка 9 МБк/мг. Препараты с удельной радиоактивностью менее 5 МБк/мг не использовали в силу отсутствия у них выраженного цитотоксического действия.



Присоединение астата было проведено в лаборатории М. Залуцкого (M.R. Zalutsky) сотрудниками лаборатории О. Поцци (O. Pozzi) и М. Хенсом (M. Hens).

### **3.7. Исследование цитотоксического действия астатинового конъюгата Р10-инсулин**

Клетки гепатомы человека PLC/PRF/5 рассеивали в 24 луночный планшет за два дня до эксперимента по 10 тыс. клеток в лунку. Перед добавлением астатиновой композиции клетки трижды отмывали раствором Хенкса, а затем помещали в среду ДМЕМ с 25 mM HEPES pH 7,3, 50 мкг/мл гентамицином, 0,2 % БСА, после чего к клеткам добавляли конструкцию Р10-инсулин с присоединенным  $^{211}\text{At}$  в концентрациях от 1 до 32,6 нМ и радиоактивностью в диапазоне от 1 до 33 кБк/мл. После добавления препарата, содержащего  $^{211}\text{At}$ , клетки инкубировали в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа, затем трижды отмывали от среды с радионуклидом раствором Хенкса, после чего культивировали в течение 3-4 дней в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Выживаемость клеток определяли при помощи окрашивания метиленовым синим выживших прикрепленных клеток (Finlay et al., 1984).

### **3.8. Исследование влияния аденовирусов на целостность бислоевых мембран**

Утиный аденовирус EDS-76 из аллантаоиса, очищенный в градиенте CsCl, был предоставлен Б.С. Народицким и его коллегами. Липосомы, нагруженные кальцеином («Serva»), получали из фосфатидилхолина яичного желтка (PC, «Sigma») обращенно-фазовым испарением (Szoka, Jr. and Papahadjopoulos, 1978), интенсивно диализовали против 25 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl и затем хранили в атмосфере азота при  $4^{\circ}\text{C}$ . Липосомы очищали гель-фильтрацией на Sephadex G-25 в 25 mM цитратном буфере с 150 mM NaCl, pH 5,0. Аденовирусы (аликвоты по 10-20 мкл раствора CsCl) инкубировали с липосомами (20 мкл) в 200 мл того же буфера, доведенного до необходимого pH. Флуоресценцию (возбуждение при 493 нм, испускание при 518 нм) измеряли в 1 мл 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl с использованием флуоресцентного спектрофотометра Shimadzu 510 (Япония). Кинетику выхода красителя измеряли в 1 мл раствора цитрат-NaCl при указанном pH. Фоновую утечку (0%) измеряли после добавления того же объема раствора CsCl липосом без аденовируса и инкубации. Максимальный выход красителя (100%) определяли добавлением 10 мкл 10% раствора Тритона X-100, и результаты нормализовали согласно этой шкале.

### **3.9. Определение выживаемости клеток**

Выживаемость клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 определяли по тесту колониеобразования: клетки после облучения помещали в среду с сывороткой и культивировали 10 дней до образования колоний, число которых затем подсчитывали; а

также при помощи окрашивания 0,1% трипановым синим через 1 час после облучения (Cook and Mitchell, 1989).

Выживаемость клеток глиомы крысы линии С6 (Finlay et al., 1984) определяли при помощи окрашивания метиленовым синим. Через день после посева в 35 мм чашки Петри, клетки инкубировали 18 часов с различными концентрациями конъюгатов или хлорина  $e_6$ , затем промывали и облучали. Через 10 дней колонии фиксировали, окрашивали 0,5 % раствором метиленового синего в 50 % этаноле в течение 30 минут и промывали 7 раз дистиллированной водой, после чего метиленовый синий экстрагировали 1% раствором N-лауроилсаркозина («Sigma») и определяли поглощение при 630 нм (Finlay et al., 1984).

Для определения выживаемости клеток меланомы мыши В16-F1 их рассеивали в 96- или 48-луночные плашки, через 24 часа добавляли фотосенсибилизирующие агенты и инкубировали 18 часов, после чего клетки промывали 3 раза раствором Хенкса, добавляли среду DMEM без индикатора с БСА 2 мг/мл и облучали на графопроекторе 9200 (3М, США) модель 9200, затем выращивали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение недели. После этого клетки вновь промывали и фиксировали и окрашивали при комнатной температуре в течение 30 минут 0,5% раствором метиленового синего в 50% этаноле (Finlay et al., 1984), отмывали, экстрагировали раствором, содержащим 50 % этанола и 50 % 1 мМ HCl (Pansky et al., 1997) и измеряли оптическую плотность при помощи многоканального фотометра для плашек Multiscan («Labsystem», Швеция) при 650 нм.

Клетки эпидермоидной карциномы человека А431 для определения выживаемости рассеивали в 48-луночные плашки через 24 часа к клеткам добавляли различные концентрации свободного ФС или конъюгатов генно-инженерных белков с ФС и инкубировали 20 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего отмывали от свободного ФС и конъюгатов раствором Хенкса, добавляли среду, инкубировали в течение 2 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После инкубации клетки трижды отмывали раствором Хенкса, добавляли среду DMEM для воздуха и облучали с помощью графопроектора Пеленг-2400 (Россия), после чего клетки выращивали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение двух суток, фиксировали, окрашивали и измеряли оптическую плотность как это указано в предыдущем абзаце для клеток В16-F1.

### **3.10. Конструирование модульных плазмид, кодирующих МНТ**

Все молекулярно-биологические процедуры, включая выделение ДНК, рестрикцию, фосфорилирование олигонуклеотидов, лигирование ДНК, трансформацию ДНК в клетки *E. coli*, проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполнены по стандартным методикам или протоколам к соответствующим препаратам. Для

клонирования модуля СЯЛ в pGEM4Z использовали штамм *E. coli* DH5α [REP4], в остальных случаях - штамм M15[REP4].

Для получения модуля СЯЛ использовали праймеры:

5'-GTGAGATCTGGGTTCTTCTACSTTTCTCTTC-3'

5'-GTGAGATCTGCGCGTAATGAGCTCCTTGCAAAC-3'

ПЦР проводили Deep Vent полимеразой («Promega», США) с плазмиды p10 (Jans et al., 1991) (здесь и далее сайты рестриктаз подчеркнуты, расшифровка сайтов на рисунке 3.1), стоп-кодона или комплементарные им участки выделены жирным шрифтом).

Модуль МСГ получен химико-ферментативным способом из олигонуклеотидов:

M1, 5'-GATCCTACTCCATGGAACAСТТ-3'

M2, 5'-CCGTTGGGGCAAGCCGGTATA-3'

M3, 5'-AGCTTATACCGGCTTGCCC-3'

M4, 5'-CAACGGAAGTGTTCCATGGAGTAG-3'

Модуль GALA получен химико-ферментативным способом из олигонуклеотидов:

G1, 5'-CATGGGATCCTGGGAAGCTGCTC-3'

G2, 5'-TGGCTGAAGCACTGGCAGAGGCAGC-3'

G3, 5'-GGCCGCTGCCTCTGCCAGTGCT-3'

G4, 5'-TCAGCCAGAGCAGCTTCCCAGGATCC-3'

G5, 5'-GGCCGAACACCTGGCTGAGGCA-3'

G6, 5'-CTTGCAGAGGCTCTCGAGGCTCT-3'

G7, 5'-GGCTGCAGGTGGGCCCAGATCTA-3'

G8, 5'-AGCTTAGATCTGGGCCCACCT-3'

G9, 5'-GCAGCCAGAGCCTCGAGAGCCTC-3'

G10, 5'-TGCAAGTGCCTCAGCCAGGTGTTC-3'

Для получения модуля *HMP* использовали праймеры:

5'- GCAAAAAAAGGGATCCCATATGCTTGACGCTC -3'

5'- CCGGCAACTCTAGATCTCAGCACСТТАТGCG -3'

ПЦР проводили Таq-полимеразой («СибЭнзим», Россия) с хромосомной ДНК *E. coli*.

Для получения модуля ДТокс использовали праймеры:

5'-GTAGGTGGATCCGGGTCATCCATAAATCTTGATTGG-3'

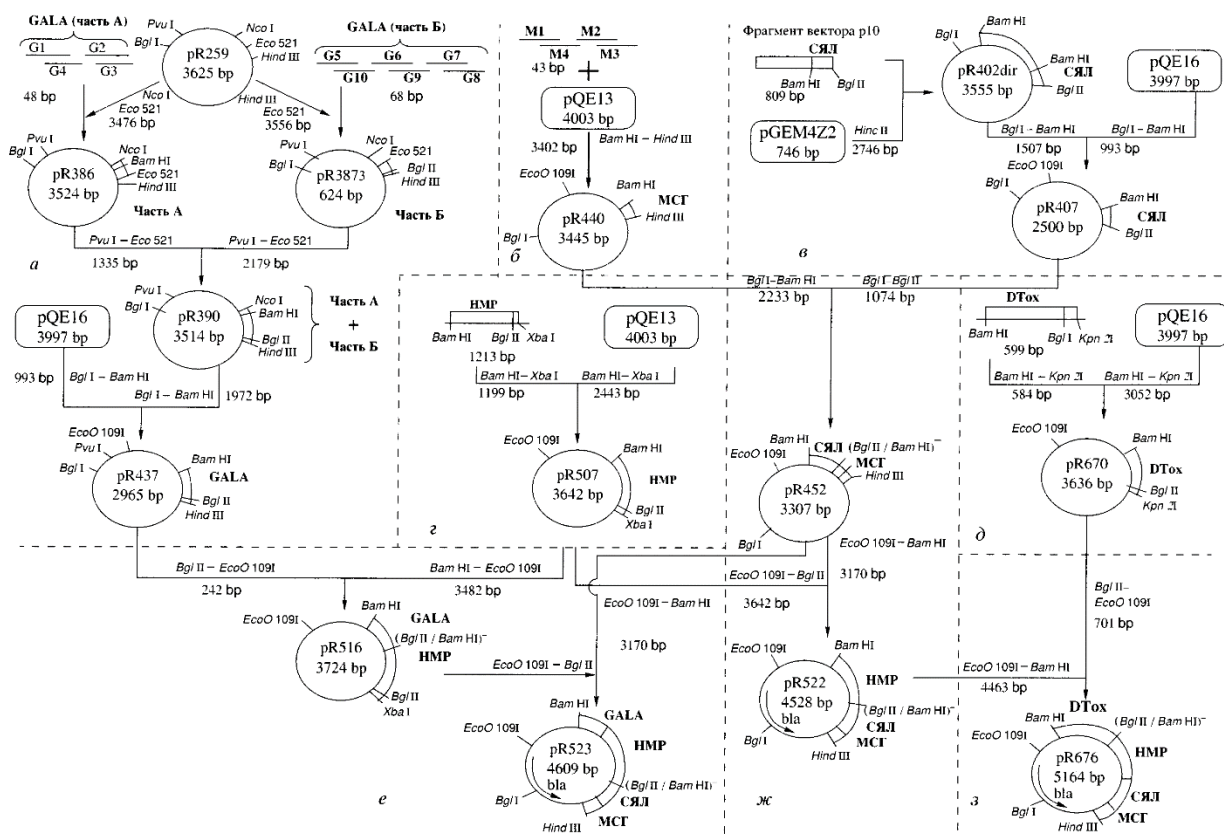
5'-CCCGTCATCCGGAAATGGTTAAGATCTATGCCCCGG-3'

ПЦР проводили Taq-полимеразой с плазмиды, содержащей клонированный ген дифтерийного токсина, любезно предоставленной Ю.В. Вертиевым (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва).

Генно-инженерные конструкции были получены О.В. Сергиенко и В.Г. Луниным по схеме, представленной на рисунке 3.1.

Экспрессию белков проводили в штамме M15[REP4] *E. coli* согласно методике фирмы QIAGEN, за исключением белка, кодируемого плазмидой pR522, который экспрессировали по аналогичной методике в штамме DH5 $\alpha$ [REP4].

Биомассу лизировали в 10 mM NEPERES буфере, pH 7,5 с 0,1 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 3 mM фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ), 10 мкг/мл лизоцимом (два последних - «Sigma»), обрабатывали ультразвуком (25 кГц), центрифугировали 25 мин при 17000 об/мин (ротор JA-20 «Beckman», США). Супернатант хроматографировали на Blue Sepharose CL-6B («Pharmacia», Швеция), искомые белки элюировали градиентом концентрации 0,7-1,6 M NaCl.



**Рисунок 3.1. Схема конструирования МНТ и их модулей.** а – GALA (эндосомолитический модуль); б –  $\alpha$ МСГ – (лигандный модуль); в – СЯЛ; г – HMP (модуль-носитель); д – ДТокс (эндосомолитический модуль); е – GALA-HMP-СЯЛ- $\alpha$ МСГ; ж – HMP-СЯЛ- $\alpha$ МСГ; з – ДТокс-HMP-СЯЛ- $\alpha$ МСГ.

### **3.11. Определение биологической активности лигандов для меланокортинового рецептора первого типа (MC1R)**

Для определения биологической активности препаратов, содержащих лиганды для MC1R, была использована способность клеток меланомы мыши B16-F1 синтезировать меланин в ответ активацию агонистами (Siegrist and Eberle 1986). Клетки B16-F1 рассеивали в 96-луночные плашки («Costar», США) по 1000 клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM с 1,5 г/л бикарбоната. Через 24 часа среду заменяли на 100 мкл DMEM с 3,7 г/л бикарбоната натрия с различными концентрациями  $\alpha$ МСГ или ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ, по прошествии 48 ч среду заменяли на 125 мкл DMEM с 2,05 г/л бикарбоната натрия; еще через 2 суток добавляли по 75 мкл DMEM с 2,05 г/л бикарбоната натрия. Далее через 18 ч в лунки добавляли по 20 мкл 1 М NaOH и регистрировали поглощение полученных проб при длине волны 405 нм на плашечном фотометре. Эксперименты по определению биологической активности были выполнены в 6 повторах.

### **3.12. Видеоинтенсификационная микроскопия (ВИМ)**

Для визуализации внутриклеточной локализации МРТ (используемых в качестве конъюгатов МРТ-хлорина  $e_6$  или бактериохлорина  $p$ ) 10 мкм 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата («Serva»), индикатора активных форм кислорода (LeBel et al., 1992), добавляли в течение 10 мин к промытым клеткам меланомы мыши М3, инкубированным в течение 18 или 24 ч с конъюгатами МНТ, а затем клетки снова промывали, освещали и исследовали ВИМ. Для этого продукцию 2',7'-дихлорфлуоресцеина немедленно визуализировали с помощью охлажденной ПЗС-камеры (AT200, «Photometrics», США), соединенной с микроскопом Axioplan («Carl Zeiss», Германия). Обработка флуоресцентных изображений (деконволюция, размытие ближайших соседей) проводилась в соответствии с общепринятыми методами (Agard et al., 1989). рН внутриклеточного микроокружения конъюгатов МРТ в местах генерации активных форм кислорода определяли методом видеоинтенсификационной микроскопии с соотношением изображений (Silver, 1998). Для этого получали изображения флуоресценции при возбуждении флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина при 496 и 461 нм. Отношение изображений, отражающее локальный рН, было переведено в обычные цвета с помощью программы PMIS («Photometrics»).

### **3.13. Получение липосом**

Липосомы получали методом обратнoфазного выпаривания (Szoka, Jr. and Praphadjopoulos, 1978). Раствор, содержащий (25 мг или 33 мкмоль) фосфатидилхолина из яичного желтка («Sigma» или Химфармзавод, Харьков), упаривали в круглодонной колбе на роторном испарителе, после чего растворяли в 2,5 мл эфира, добавляли 0,75 мл 100 мМ

(рН 7,3) раствора флуоресцирующего красителя – кальцеина («Fluца», Германия), и озвучивали в озвучивателе Finnsonik W-181-T («Cou Ultrasonic», Финляндия), 90 W, 40 kHz при 0° С до получения прозрачной однофазной системы, не разделяющейся по крайней мере в течение 30 минут. После этого органический растворитель выпаривали на роторном испарителе до получения вязкого геля и последующего образования водной суспензии. К ней добавляли 3 мл буфера 20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат Na, 150 мМ NaCl, рН 7,4, затем фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм (Corning, Нидерланды) для получения однородной по размерам суспензии липосом и хранили в атмосфере инертного газа при температуре 4°С.

Непосредственно перед экспериментом липосомы очищали от свободного кальцеина, находящегося в окружающем растворе, при помощи гель-фильтрации на колонке диаметром 0,6 см и длиной 15 см (Sephadex G-50, «Pharmacia») в буфере 20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат Na, 150 мМ NaCl (буфер для липосом), рН 5,0.

### **3.14. Получение 2',7'-дихлордигидрофлуоресцина и 2',7'-дихлорфлуоресцеина**

2',7'-дихлордигидрофлуоресцин получали гидролизом 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (Keston and Brandt, 1965), для этого 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат растворяли в этиловом спирте до концентрации 10 мМ. К 50 мкл 10 мМ раствора 2',7'-дихлордигидрофлуоресцин диацетата в этиловом спирте добавляли 1,5 мл 15 мМ раствора NaOH и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученный раствор нейтрализовали добавлением 10 мл 25 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,5. Концентрация 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина в полученном растворе составляла 40 мкМ. Раствор 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина хранили в замороженном состоянии при -70°С.

Полученный, как описано выше, 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин титровали перекисью водорода в присутствии пероксидазы до прекращения роста поглощения раствора. Аликвоты полученного 2',7'-дихлорфлуоресцеина замораживали и хранили при температуре – 20° С. Флуоресценцию дихлорфлуоресцеина измеряли при рН от 3 до 7,5 в 50 мМ ацетатно-фосфатном буфере.

### **3.15. Радиолигандный анализ**

#### **3.15.1. Мечение белков <sup>125</sup>I**

Белки и пептиды («Sigma») метили <sup>125</sup>I (Институт им. Хлопина, Россия, или PerkinElmer, США) с использованием Иодогена (1,3,4,6-тетрахлор-3а,6а-дифенилгликолурил, «Sigma»). Для мечения 10 мг белка и 20-40 МБк <sup>125</sup>I в 0,05 м натрий-боратном буфере (рН 8,5) инкубировали в стеклянных флаконах, покрытых 10 мкг

Иодогена, в течение 15 мин при комнатной температуре. Реакцию завершали добавлением тирозина до конечной концентрации 5 мМ. Меченые продукты очищали гель-фильтрацией через колонку PD-10 («GE Healthcare», Великобритания) в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,5. Типичный выход присоединения иода был 70-80%. Для  $^{125}\text{I}$ -ЭФР начальная удельная радиоактивность была в диапазоне от 2,2 до 3,1 ГБК/мг белка.

### **3.15.2. Определение количества рецепторов к ЭФР и МНТ на поверхности клеток и констант сродства радиоактивно меченых ЭФР и МНТ к рецепторам**

Клетки рассеивали в 24- или 48-луночные плашки и выращивали до состояния монослоя.  $^{125}\text{I}$ -ЭФР с исходной удельной радиоактивностью 11 – 33 ГБК/ммоль (300 – 900 Ки/ммоль), был получен при помощи иодирования 10 мкг рекомбинантного ЭФР человека, («Sigma») иодогеном и очищен при помощи гель-фильтрации на колонках PD-10 («GE-HealthCare», США). Через 24 часа к клеткам на холоду добавляли ряд разведений  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в среде DMEM без индикатора, содержащей 250 мг/л  $\text{NaHCO}_3$ , 10 мг/мл БСА, 25 мМ HEPES, pH 7,3, 50 мкг/мл гентамицина (далее DMEM для воздуха). Клетки инкубировали с добавленными лигандами в течение 20 часов при температуре 4°C. После инкубации клетки 4 раза отмывали раствором Хенкса, содержащим 10 мг/мл БСА и 50 мкг/мл гентамицина. Для снятия с поверхности лунок клетки инкубировали 30 минут в 1 М растворе NaOH. Радиоактивность лизата клеток измеряли на сцинтилляционном счетчике RiaGamma 1271 («LKB», Швеция).

Для учета неспецифического связывания ЭФР (сорбция на поверхности лунок, а также связывание с другими компонентами на поверхности клеток) и неспецифического эндоцитоза параллельные пробы инкубировали в присутствии избытка немеченого ЭФР (1°мкМ).

Константу сродства лиганда к рецептору и количество мест связывания определяли посредством нелинейной регрессии в программном пакете GraphPad Prism 5 («GraphPad Software», США), как параметры уравнения, описывающего равновесное обратимое взаимодействие одновалентного лиганда с одновалентным рецептором:

$$Y = B_{\max} \cdot X / (K_d + X),$$

где Y – концентрация связанного лиганда; X – концентрация свободного лиганда;  $B_{\max}$  – концентрация мест связывания;  $K_d$  – константа диссоциации комплекса лиганд-рецептор.

Все эксперименты выполнены с трехкратной повторностью, результаты типичного эксперимента приведены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

### 3.15.3. Исследование конкурентного связывания лигандов с EGFR

Для определения константы сродства МНТ к клеточным рецепторам непрямым методом, клетки А431 рассеивали в 48-луночные плашки по 250 тысяч на лунку в среде DMEM с 10% фетальной сывороткой и 50 мкг/мл гентамицина. Через 24 часа клетки были отмыты 3 раза раствором Хенкса, зафиксированы 0,5 % раствором параформальдегида, приготовленном на растворе Хенкса (200 мкл на лунку), в течение 5 минут на льду и отмыты 5 раз раствором Хенкса, после чего высушены в холодильнике. К клеткам на холоду добавляли среду DMEM для воздуха, содержащую 1-2 нМ  $^{125}\text{I}$ -ЭФР и различные концентрации МНТ. Клетки инкубировали в течение 20 часов при температуре 4 °С, затем 4 раза отмывали раствором Хенкса с 10 мг/мл БСА и 50 мкг/мл гентамицина. С поверхности лунок клетки снимали инкубацией в 1 М растворе NaOH в течение 30 минут и определяли активность лизата клеток, которая характеризовала количество связанного с клетками  $^{125}\text{I}$ -ЭФР. Константы сродства препаратов МНТ определяли при помощи обработки данных с использованием специально разработанной программы анализа конкуренции лигандов за рецептор в присутствии неспецифического связывания, проводящей нелинейное оценивание параметров при помощи минимизации суммы квадратов отклонения экспериментальных данных от теоретической кривой методом деформируемого многогранника [А36].

Теоретические данные рассчитывались по общей формуле:

$$B_1 = \frac{K_1[R]F_1}{1 + K_1F_1 + K_2F_2} + NF_1, \quad (1)$$

где:  $B_1$  – концентрация связанного меченого лиганда,  $K_1$ ,  $K_2$  – константа сродства соответствующего лиганда к рецептору,  $F_1$ ,  $F_2$  – концентрация соответствующего свободного лиганда,  $[R]$  – концентрация свободного рецептора,  $N$  – коэффициент неспецифического связывания;

$K_1$  – константа, полученная из независимых экспериментов по связыванию  $^{125}\text{I}$ -ЭФР с клетками,  $K_2$ ,  $[R]$ ,  $N$  представляют собой оцениваемые при помощи нелинейной регрессии параметры.

Эксперименты выполнены с трехкратной повторностью, результаты типичного эксперимента конкурентного вытеснения приведены в виде среднего значения доли связанного с клетками  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в процентах от максимума  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Метод разработан автором и был использован рядом студентов и аспирантов коллектива. Программа расчета констант взаимодействия конкурирующих лигандов была



написана автором на фортране и перенесена на персональный компьютер под DOS на языке С О.М. Захаровой.

### **3.16. Определение мембранолитического действия рекомбинантных белков на липосомы**

Для исследования эффективности мембранолитического действия полипептидов были приготовлены и очищены липосомы, содержащие флуоресцирующий краситель кальцеин в концентрации, приводящей к практически полному тушению флуоресценции (см. пункт 9 «Материалы и методы»). При выходе красителя из липосом в раствор происходит его разбавление и, следовательно, увеличение интенсивности флуоресценции. Флуоресценцию кальцеина измеряли при помощи спектрофлуориметра Hitachi 650-40 (Япония): длина волны возбуждения  $\lambda=493$  нм, длина волны регистрации  $\lambda=518$  нм, щели 2 и 1,8 нм, соответственно.

Определение рН–зависимости влияния полипептидов на целостность липидного бислоя проводили в диапазоне от 3 до 7,5 единиц рН. Для определения процента выхода кальцеина очищенные липосомы (10 мкл) инкубировали 30 минут с рекомбинантными белками (100 нМ) в буфере для липосом с различными значениями рН, общий объем пробы 200 мкл. Инкубация пептида с липосомами длилась 30 минут при температуре 37°C. Непосредственно перед измерением флуоресценции объем пробы доводили до 1 мл буфером, содержащим 50 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат Na, 150 мМ NaCl, рН 7,5. Полученные значения интенсивности флуоресценции были скорректированы с учетом фонового уровня флуоресценции.

Для определения фонового уровня флуоресценции (собственный уровень утечки кальцеина) были использованы не содержащие полипептидов пробы с теми же значениями рН, что и в случае с рекомбинантными белками. Для определения максимального уровня флуоресценции липосомы разрушали детергентом (10% Triton X-100, «Serva»). За 100% принимали разность максимального и фонового уровней флуоресценции.

Степень выхода красителя из липосом определяли по формуле:

$$A(\%)=(I - I_0)*100/(I_{\max} - I_0),$$

где **I** – интенсивность флуоресценции проб, инкубированных в присутствии рекомбинантных полипептидов; **I<sub>0</sub>** - интенсивность флуоресценции проб, инкубированных в аналогичных условиях без полипептидов (фоновый уровень); **I<sub>max</sub>** – интенсивность флуоресценции при разрушении липосом детергентом.

Определение концентрационной зависимости эффективности мембранолитического действия рекомбинантных белков при фиксированном значении pH (5,5 и 7,5) проводили в диапазоне концентраций белка от 6 нМ до 1 мкМ.

Метод адаптирован для оценки свойств МНТ автором и был использован рядом студентов и аспирантов коллектива. Эксперименты выполнены в трех повторах, результаты на графиках приведены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка.

### **3.17. Выделение импортинов**

Импортин- $\alpha$ , экспрессированный в клетках *E. coli* в составе вектора pQE60 («QIAGEN», Германия), был любезно предоставлен В.Л. Друцей (Институт ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ). Выделение продукта экспрессии вектора, содержащего на C-конце His<sub>6</sub>-последовательность, осуществляли с помощью колоночной аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе («QIAGEN»). Элюцию связанного с колонкой белка вели с помощью раствора 0,4 М имидазола согласно инструкции производителя.

Трансфекция клеток *E. coli* и получение лизата клеток, содержащего химерный белок импортина- $\beta$  с глутатион-S-трансферазой (GST), были проведены В.Л. Друцей. Вектор, содержащий ген химерного белка, был любезно предоставлен профессором Д. Янсом (D. Jans, Австралия). Выделение химерного белка проводили методом аффинной колоночной хроматографии на глутатион-сефарозе («Pharmacia»). На колонку наносили клеточный лизат, 5 раз промывали колонку буфером, содержащем 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6 для элюции белка, неспецифически связанного с колонкой. Элюцию специфически связанного белка проводили раствором 10 мМ глутатиона в 10 мМ Tris-HCl буфере с pH 8,0, содержащем 1 мМ ЭДТА (Pharmacia Biotech).

### **3.18. Исследование сродства МНТ к комплексу импортинов с помощью иммуноферментного анализа**

Для исследования сродства МНТ, содержащих сигнал ядерной локализации, к гетеродимеру импортинов использовали твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA - enzyme linked immuno sorbent assay).

В 96-луночную плашку для иммунологических реакций (Corning, Нидерланды) помещали химерный белок импортин- $\beta$ -GST в количестве 0,5 мкг (3,94 пмоль) белка на лунку в буфере 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,2 и инкубировали в течение 24 часов при температуре 4°C. Затем инкубировали в буфере 110 мМ KCl, 5 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭГТА, 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 20 мМ HEPES, 1 мМ ДТТ, pH 7,4 (далее гибридизационный буфер), содержащем 1% БСА, в течение 1 часа при комнатной температуре. Лунки трижды

промывали гибридационным буфером, добавляли 5-ти кратный молярный избыток импортина- $\alpha$  по отношению к импортину- $\beta$  в гибридационном буфере и инкубировали в течение 24 часов при температуре 4°C. Затем проводили описанные выше процедуры промывок и добавляли ряд разведений исследуемых белков в гибридационном буфере. В качестве контроля использовали белок, не содержащий сигнала ядерной локализации (ДТокс- $\alpha$ МСГ), а также белок *HMP*-(СЯЛ *SV40*)- $\alpha$ МСГ, для которого ранее было показано наличие функционального сигнала ядерной локализации. Инкубацию исследуемых белков с нанесенным на плашки комплексом импортинов- $\alpha/\beta$  проводили в течение 20 часов при 4°C, после чего лунки трижды отмывали гибридационным буфером, содержащим 1% БСА, и добавляли раствор кроличьих антител к рекомбинантному белку *HMP*-(СЯЛ *SV40*)- $\alpha$ МСГ в разведении 1:100 в буфере PBSTA (10 mM Na-фосфат, 150 mM NaCl, 1% БСА, 0,02% Tween 20, pH 7,4). После инкубации в течение 3 часов при комнатной температуре лунки 5 раз промывали буфером PBSTA, добавляли раствор козьих анти-кроличьих антител, связанных с пероксидазой хрена («Sigma»), в буфере PBSTA (1:3000) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Лунки отмывали 7-9 раз буфером PBSTA, добавляли субстрат пероксидазы в 50 mM цитратном буфере, pH 6,5 (0,2 мг/мл *o*-фенилендиамин, 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). После развития окраски реакцию останавливали двойным объемом 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре Multiscan (Labsystem, Швеция) при длине волны 492 нм. Эксперименты выполнены в трех повторах, результаты на графиках представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка.

### **3.19. Исследование сродства МНТ к комплексу импортинов с помощью поверхностного плазмонного резонанса**

Эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу были проведены с помощью Biacore X («Biacore», Швеция). Препарат исследуемого МНТ был иммобилизован на сенсорную ячейку CM5 («Biacore») с помощью набора для присоединения через аминокислотные группы (BR-1000-50, «Biacore»). Связывание гетеродимера импортина с МНТ измеряли путем введения определенной концентрации гетеродимера (в диапазоне от 300 нМ до 1 мкМ) в проточную ячейку, со скоростью потока 10 мкл/мин с последующей стадией десорбции в растворе без гетеродимера.

Чип регенерировали путем введения 30 мкл 10 mM NaOH со скоростью потока 10 мкл/мин, что приводило к удалению нековалентно связанных белков. Процесс регенерации не изменял сродства МНТ к гетеродимеру импортинов. Константы

взаимодействия МНТ с гетеродимером импортинов были определены при помощи программного обеспечения прибора.

### 3.20. Синтез и очистка конъюгатов МНТ с ФС

Для активации карбоксильных групп хлорина  $e_6$  и бактериохлорина  $p$  к раствору ФС в 5 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0, добавляли раствор бифункционального кросс-сшивающего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (30 мг/мл; «Sigma») в воде и раствор N-гидроксицукцинимид (100 мг/мл; «Sigma») в тетрагидрофуране (соотношение порфирин:карбодиимид:N-гидроксицукцинимид 1:30:30) (Pierce). Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. Все операции с ФС проводились в темноте в атмосфере инертного газа. К раствору белка в 0,1 М боратном буфере, pH 9,0 добавляли раствор активированного ФС в соотношении 1:15 и инкубировали на льду в течение 19 часов при постоянном перемешивании.

Для очистки конъюгата от несвязавшегося ФС и сшивающих агентов использовали гель-фильтрацию (Sephadex G-50, «Pharmacia»). 1 мл раствора конъюгата, предварительно преинкубированного в течение 30 минут при температуре 0°C в 3 М гуанидине с добавлением 1 мМ ЭДТА, наносили на колонку диаметром 1 см, длиной 10 см. Очистку проводили в буфере, содержащем 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, 3 М гуанидин-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

Фракции, содержащие белок, были сразу же диализованы против буфера, содержащего 5 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0, последний диализ вели против буфера, не содержащего ЭДТА. Качественную оценку ковалентного присоединения ФС к МНТ и целостность белка оценивали с помощью ЭФ в ПААГ.

### 3.21. Получение препаратов МНТ меченных $^{67}\text{Ga}$

Все используемые для конъюгации и очистки буферы предварительно очищали на ионообменной смоле Chelex-100 (в  $\text{Na}^+$  форме, 200–400 mesh, «BioRad») от ионов металлов для предотвращения образования инертных комплексов с металлами, в том числе  $\text{Ca}^{2+}$ , в следовых количествах имеющимися в воде и реагентах.

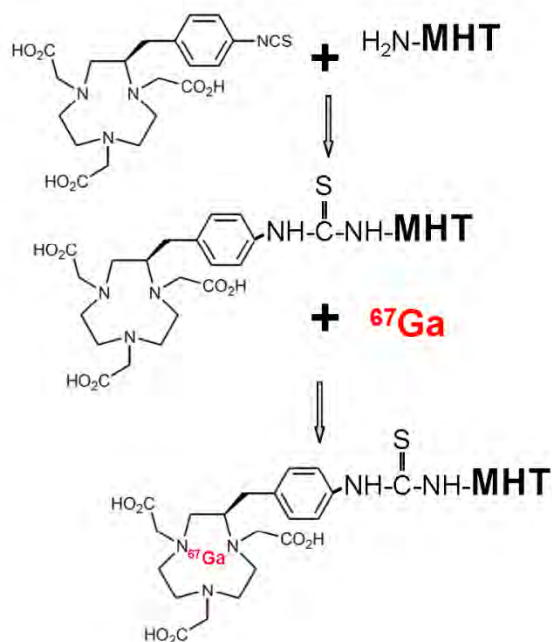
МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в количестве 2,5–4,5 мг инкубировали с 15–20-кратным мольным избытком хелатообразующего агента S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазоциклононан-1,4,7-триацетата (НОТА) («Macrocyclics», США) в 10–12 мл буфера для конъюгации, содержащего 0,5 М  $\text{NaHCO}_3$ , 0,83 М NaCl, pH 8,6 с добавлением 5 мМ ЭДТА 24 часа при комнатной температуре и постоянном перемешивании (Yordanov et al. 2007). Очистка от непрореагировавшего хелатора и смена буфера проводились

трехкратной ультрафильтрацией на концентрирующих ячейках Amicon Ultra - 2ml 30K («Millipore», США) в PBS.

Далее 2-4 мкл  $^{67}\text{Ga}$  в 0,05 М HCl («Nordion», Канада) с активностью 18,5 – 111 МБк были разбавлены буферным раствором 0,5 М ацетата аммония (pH 5,0) до конечного объема 100 мкл. Далее к разведенному изотопу добавляли 100 мкг НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) (или НОТА-ЭФР) в объеме 2-4 мкл и аккуратно перемешивали смесь на вортексе с последующей инкубацией при 37 °С в течение одного часа. После окончания инкубации смесь центрифугировали 2-3 мин на настольной центрифуге (12 500 об./мин). Супернатант отбирали, осадок, содержащий меченый МНТ растворяли в 400 мкл фосфатного буферного раствора с pH 8,0 с добавлением 20 мкл ДМСО. Раствор центрифугировали снова для отделения меченого МНТ, находящегося в супернатанте, от коллоидной формы  $^{67}\text{Ga}$ .

Полученный супернатант наносили на предварительно обработанную двумя миллилитрами 2% сывороточного альбумина и уравновешенную физиологическим буфером гель-фильтрационную колонку PD-10 («GE Healthcare», США). Для максимально полного извлечения реакционной смеси пробирку дважды обмывали 150 мкл физиологического раствора с последующим нанесением на колонку. Реакционной смеси давали войти в носитель колонки и проводили элюцию PBS. Измеряли активность каждой фракции. Фракции, содержащие пик активности, объединяли в одной пробирке с максимальной активностью.

Принципиальная схема мечения МНТ  $^{67}\text{Ga}$  при помощи хелатирующего агента НОТА представлена на рисунке 3.2.



**Рисунок 3.2.** Принципиальная схема мечения МНТ <sup>67</sup>Ga при помощи хелатирующего агента НОТА.

Для оценки степени очистки меченного <sup>67</sup>Ga МНТ от свободной радиоактивной метки использовали стандартный для таких целей метод осаждения в метиловом спирте. Для этого в три центрифужные пробирки на 2 мл отбирали по 5 мкл содержимого пробирки с объединенными целевыми фракциями. В каждую пробирку добавляли по 100 мкл 10% раствора человеческого сывороточного альбумина, а затем по 900 мкл метанола. Содержимое пробирок перемешивали на вортексе и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. По окончании инкубации пробирки центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 минут на 12 000 об/мин, отбирали 250 мкл супернатанта в чистую пробирку объемом 2 мл, и измеряли радиоактивность каждой пробирки на счетчике.

Процент включения метки в МНТ рассчитывали так же, как для [<sup>125</sup>I]-СГМИБ-МНТ (см. выше). Мечение МНТ [<sup>125</sup>I]-СГМИБ и <sup>67</sup>Ga проводилось Е. Кумариану (Е. Koumarianou), М. Пружински (М. Pruszynski) и Д. Аффлек (D. Affleck) в лаборатории М. Залутского (M.R. Zalutsky, Университет Дюка, США).

### 3.22. Исследование кинетики поверхностного связывания, накопления и удержания [<sup>125</sup>I]-СГМИБ-МНТ и [<sup>67</sup>Ga]-НОТА-МНТ в клетках

Клетки A431, D247 MG, рассевали в 24-луночные плашки («Greiner», Германия) по 50 тысяч клеток на лунку в среде «MEM Zink Option» («Gibco/Invitrogen», США) с добавлением 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота. Спустя два дня клетки

отмывали один раз 500 мкл свежей среды, затем наливали по свежую среду и добавляли в лунки один из исследуемых меченых МНТ: [<sup>125</sup>I]-СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) или [<sup>67</sup>Ga]-НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР). Далее клетки инкубировали в течение 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 или 24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации среду, содержащую не связанную с клетками радиоактивность, отбирали, и клетки отмывали трижды на льду ледяным раствором Дульбекко, собирая отмывочную жидкость. Затем клетки обрабатывали раствором трипсина и осаждали центрифугированием, добавив ледяной среды с сывороткой. Далее клеточный осадок отмывали ресуспендированием в ледяной среде и последующим осаждением. Оба супернатанта, содержащих ассоциированную с клеточной поверхностью радиоактивность, объединяли. Радиоактивность собранных фракций, содержащих несвязанную с клетками радиоактивную метку (среда инкубации и отмывочная жидкость), радиоактивную метку, ассоциированную с клеточной поверхностью (супернатанты), внутриклеточную радиоактивную метку (отмытый клеточный осадок) измеряли на автоматическом гамма-счетчике.

Для исследования кинетики удержания радиоактивно меченых МНТ, клетки A431 и D247 MG после 24-часовой инкубации с [<sup>125</sup>I]-СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) или [<sup>67</sup>Ga]-НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР), отмывки, снятия с лунок раствором трипсина и осаждения, проведенных, как описано выше, ресуспендировали в свежей среде с сывороткой и инкубировали в течение 0,5, 2, 4, 8, или 24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации, среду, содержащую вышедшую из клеток радиоактивную метку, отбирали после центрифугирования, отмывки свежей средой и еще одного центрифугирования. Радиоактивность полученных супернатантов и клеточного осадка измеряли на гамма-счетчике.

Полученные кривые связывания, внутриклеточного накопления и удержания радиоактивно меченых МНТ в клетках анализировали при помощи программного пакета GraphPad Prism 5.01 («GraphPad Software», США). Работа была проведена Т.А. Сластниковой и частично Е. Koumariou.

### **3.23. Исследование кинетики транспорта [<sup>125</sup>I]-СГМИБ-МНТ и [<sup>67</sup>Ga]-НОТА-МНТ в ядра клеток эпидермоидной карциномы человека A431**

Для получения чистой ядерной фракции исследуемых клеток мы использовали широко применяемый метод фракционирования клеток (Lo et al. 2006). Вкратце, клетки эпидермоидной карциномы человека A431 рассаживали на 6-луночные плашки в количестве 50 тыс. клеток на лунку. Через 2 суток клетки отмывали, добавляли свежую среду и [<sup>125</sup>I]-СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) до концентрации 30 – 43 нМ или [<sup>67</sup>Ga]-НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) (с удельной радиоактивностью до концентрации 4,3 нМ.

Далее клетки инкубировали в течение 1, 2, 4, 8 или 24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для учета неспецифического накопления радиоактивности в параллельную пробу добавляли 100-кратный избыток по отношению к МНТ свободного ЭФР. По окончании инкубации среду, содержащую не связанную с клетками радиоактивность, отбирали, и клетки отмывали трижды на льду ледяным раствором Дульбекко. Далее клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина и осаждали центрифугированием, добавив ледяной среды с сывороткой. Далее клеточный осадок отмывали ресуспендированием средой на льду и последующим центрифугированием. Оба супернатанта, содержащих ассоциированную с клеточной поверхностью радиоактивность, объединяли. Далее клетки подвергали набуханию в течение 20 мин на льду, ресуспендировали в 0,5 мл ледяного гипотонического буферного раствора, содержащего 25 мМ Трис-НСl рН 7,5, 5 мМ КСl, 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ и 0,15 ед./мл апротинина. 50 мкл суспензии отбиралась для последующего счета радиоактивности. Далее набухшие клетки лизировали в гомогенизаторе Даунса на льду (16 циклов), ядра осаждали центрифугированием (600 g) в течение 10 мин на холоду. Осажденные ядра отмывали от мембранных загрязнений три раза изотоническим буферным раствором, содержащим 0,25 М сахарозу, 6 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,4, 0,5% Тритон X-100, 1 мМ ФМСФ и 0,15 ед./мл апротинин. Чистота и целостность выделенных ядер контролировались в световой микроскоп визуально – на отсутствие загрязнений ядер остатками мембран и недоразрушенных клеток, а также по данным вестерн-блота лизатов ядерной и цитоплазматической фракций на цитоплазматический белок –  $\alpha$ -тубулин и ядерный белок – гистон дезацетилазу-1. Работа была проведена Т.А. Слостниковой и частично Е. Koumagianou.

### **3.24. Синтез МНТ с фолатом в качестве лиганда**

Для синтеза МНТ с присоединенным фолатом использовали усеченный полипептид ДТокс-НМР-СЯЛ, лишенный лигандного модуля, к которому присоединяли малеимидное производное полиэтиленгликоля (ПЭГ, мол. масса 3,4 кД) с фолатом (FA-PEG-Mal, «NanoCs», США). ДТокс-НМР-СЯЛ нарабатывали в *E. coli*, штамм M15, очищали аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе, и обрабатывали 3 мМ трис(2-карбокситил)фосфином добавляя свежеприготовленный 100 мМ раствор для восстановления сульфгидрильных групп в течение 40 минут при 37°C. Смесь диализировали против PBS с 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА; рН 7,3) для снижения концентрации ТСЕР до 8,2 мкМ после чего добавляли FA-PEG-Mal в 50-кратном молярном избытке. После инкубации (4°C, 18 ч) МНТ с присоединенным фолатом (Ф) очищали пятью циклами ультрафильтрации с использованием ячейки Amicon Ultracel-30K. Полученный МНТ<sub>Ф</sub> содержал 1,6 моля ПЭГ-фолата на 1 моль МНТ по



данным ЭФ в ПААГ и спектрофотометрии (рассчитано с использованием коэффициента экстинкции фолата в карбонатном буфере с 5 мм ЭДТА, pH 8,6 ( $\epsilon_{367\text{nm}} = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )). Контрольный МНТ-ПЭГ без лиганда готовили таким же образом с использованием Mal-PEG-NH<sub>2</sub> («Creative PEGWorks», США). Работы были проведены совместно с Т.А. Слестниковой.

### **3.25. Присоединение <sup>111</sup>In к МНТ**

Для присоединения эмиттера ЭО к МНТ<sub>Ф</sub> добавляли 10-кратный молярный избыток бифункционального комплексона S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триацетата (p-SCN-Bn-NOTA, «Macrocyclics», США) в 50 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 150 мМ NaCl и 5 мМ ЭДТА, pH 8,6. После 24 ч инкубации при 20°C полученный конъюгат, обозначенный как НОТА-МНТ<sub>Ф</sub>, очищали ультрафильтрацией в 15 мМ NaCl и 10 мМ NERES, pH 7,5, очищенном ионообменником Chelex-100 («BioRad», США) от ионов, конкурирующих с индием при комплексообразовании. МНТ были успешно конъюгированы с бифункциональными хелаторами p-SCN-Bn-NOTA или p-SCN-Bn-DOТА, получая соотношение хелатор:МНТ 2,5±0,2. Работы были проведены совместно с Т.А. Слестниковой.

### **3.26. Исследование распределения <sup>111</sup>In в организме мышей при помощи однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) совмещенной с компьютерной томографией (КТ)**

Для проведения ОФЭКТ/КТ животных анестезировали 0,8-1,8% изофлурана в воздухе; мыши (n=4; средний объем опухоли 88±19 мм<sup>3</sup>) получали интратуморальные болюсные инъекции 7,3 ± 1,1 МБК <sup>111</sup>In-ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в 45 мкл. Визуализацию всего тела проводили на сканере U-SPECT-II/CT (MILabs, Утрехт, Нидерланды), начиная сразу после инъекции и продолжая в течение 2,5 ч (13 серий по 10 мин чистого времени измерения, всего около 12,5 минут на серию) с использованием коллиматора с диафрагмами диаметром 1,0 мм с последующим немедленным получением КТ всего животного. Дополнительные визуализация ОФЭКТ/КТ проводились до 8 дней (5 серий по 10 мин). Изображения были реконструированы с помощью программного обеспечения U-SPECT-Rec2.34b, полученного от производителя, с последующей совместной регистрацией изображений SPECT на соответствующие КТ-изображения. Количественный анализ изображений после 3D-реконструкции проводился с использованием программного обеспечения PMOD 3.4 (PMOD Technologies Ltd., Швейцария). Работы были проведены совместно с Т.А. Слестниковой при участии сотрудников, аспирантов и студентов коллектива.

### 3.27. Терапия мышинной меланомы при помощи $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ

Эксперименты были проведены на 8-9-недельных самках мышей линии C57Black/6J (Андреевка, Московская область, Россия). Животные содержались в условиях, свободных от патогенов, с доступом к еде и воде *ad libitum*. Экспериментальный протокол был одобрен комиссией МНИОИ им. П.А. Герцена по животным и проводился в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных. Опухоли мышинной меланомы В16-F1 были иницированы путем подкожной инъекции  $10^6$  клеток, суспендированных в 100 мкл среды DMEM, в заднюю боковую область. Для терапевтических исследований мышам, несущим опухоль меланомы мыши В16-F1 (n=5), внутриопухолево вводили 2,6 МБк (1,4 мкг), 5,2 МБк (2,9 мкг) или 10,4 МБк (5,7 мкг) либо  $^{111}\text{In}$ -МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ, либо  $^{111}\text{In}$ -EDTA с той же активностью, либо немеченый ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в том же количестве, либо физиологический раствор в объеме 40 мкл. Эффективность лечения контролировалась с помощью индекса ингибирования роста опухоли, определяемого как:  $[1 - (\text{средний объем обработанных опухолей}) / (\text{средний объем контрольных опухолей})] \times 100\%$ . Работы были проведены совместно с Т.А. Слостниковой при участии сотрудников, аспирантов и студентов коллектива.

### 3.28. Синтез конъюгата инсулин-полилизин

Для оценки эффективности конъюгации инсулин («Sigma») был иодирован  $^{125}\text{I}$  с помощью Йодогена (см. раздел 3.13.1), а поли-L-лизин (pLys) с мол. массой 90 или 120 кД (pLys; «Sigma») метили 1-фтор-2,4-динитро-[U- $^{14}\text{C}$ ]-бензолом или трет-бутоксикарбонил-L-[ $^{35}\text{S}$ ]-метионином («Amersham», Великобритания). Концевые аминокислотные группы инсулина были защищены цитракониевым ангидридом в 25 мМ BES, pH 6,9 (Shechter et al., 1978). Инсулин был ковалентно присоединен к pLys с помощью SPDP («Pharmacia»), для чего инсулин и pLys были мечены SPDP. PDP-pLys был обработан 50 мМ ДТТ для образования свободных SH-групп и очищен диализом. Конъюгацию полученного продукта с PDP-инсулином проводили в течение 18 часов в 50 мМ HEPES, pH 7,4, 0,15 мМ NaCl, 2 М гуанидин, после чего полученный конъюгат инсулин-pLys (Ins-pLys) очищали гель-фильтрацией и удаляли защиту концевых аминокислотных групп инсулина. На конечном этапе конъюгат концентрировали ультрафильтрацией и диализовали против 25 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,25 мМ ЭДТА, pH 7,5. Около 80% инсулина реагировало с pLys, при этом выход после процедуры очистки составил 50%. Полученные конъюгаты содержали инсулин и поли-L-лизин в соотношении от 5:1 до 10:1, что было определено по соотношениям меченых компонентов. Работы были проведены совместно с С.В. Ячменевым.

### **3.29. Формирование комплекса (Ins-pLys)-ДНК и трансфекция клеток**

Для образования комплексов Ins-pLys и плазмиды, несущей ген большого Т-антигена вируса SV-40, Ins-pLys (6 мкМ по полилизину) добавляли к раствору плазмиды pSVRP8, несущей ген большого Т-антигена вируса SV-40 под контролем промотора вируса SV-49 (0,1 мг/мл) в 0,25 мМ ЭДТА, рН 8 и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Оценку образования комплексов (полиплексов) проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (Li et al., 1973), а также аналитического ультрацентрифугирования.

Для трансфекции клетки гепатомы человека PLC/PRF/5, рассаживали на покровные стекла за 2 дня до эксперимента, промывали бессывороточной средой и инкубировали в течение 18 ч с полиплексами (0,1 нМ по плазмидной ДНК). По окончании инкубации клетки промывали и фиксировали ацетоном при -20° С. Экспрессию большого Т-антигена вирSV40 выявляли видеоинтенсификационной микроскопией с помощью непрямой иммуофлуоресценции с использованием хомячьей противоопухолевого сыворотки (Kalderon et al., 1984) и вторичных антител, меченных флуоресцеином. Разные этапы работ были проведены с участием С.В. Ячменевым, О.А. Смирновой и другими аспирантами и студентами коллектива.

### **3.30. Лазерная сканирующая микроскопия флуоресцентно меченых полиплексов на основе Ins-pLys**

Ins-pLys (1,5 мкМ по полилизину в 0,1 М боратном буфере) был мечен флуоресцеинизотиоцианатом (0,1-0,2 мМ) в течение 4 часов при 0°С, после чего очищен диализом против 150 мМ NaCl. Полученный продукт содержал от 10 до 19 остатков флуоресцеина на молекулу полилизина. Для проведения конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), клетки, выращенные на покровных стеклах в течение 2 дней, промывали трижды и инкубировали в течение 3 часов в бессывороточной среде, содержащей 0,2% БСА. Затем добавляли среду RPMI-1640 без бикарбоната и фенолового красного, содержащую 25 мМ HEPES, рН 7,45 и тестируемые компоненты. После инкубации клетки либо непосредственно анализировали с помощью КЛСМ (живые клетки); или дважды промывали PBS, рН 7,3 и фиксировали 15 минут 4% параформальдегидом. Связанную с клетками флуоресценцию визуализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа с объективом 40х. Работа была проведена совместно с Д.Э. Янсом (D.J. Jans).

### **3.31. Синтез конъюгата стрептавидин-полилизин**

Стрептавидин (Molecular Probes) был присоединен к pLys 90 кД с использованием N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионата с использованием той же процедуры,

что и для синтеза конъюгата Ins-pLys, без защиты концевой аминогруппы. Полученный продукт очищали на колонке Sephacryl S-300 («Pharmacia»). Молярное соотношение pLys/стрептавидин составляло от 1 до 2 молекул pLys на молекулу стрептавидина. Работа была проведена совместно с О.А. Смирновой.

### **3.32. Синтез конъюгата стрептавидин-полилизин и формирование полиплексов на основе Ins-pLys и аденовируса**

Аденовирус человека, серотип 5, штамм dl312, дефектный по размножению (Ad5) выращенный в клеточной линии 293 и очищенный в градиенте CsCl был предоставлен Б.Н. Народицким и его сотрудниками.  $5 \cdot 10^{11}$  вирионов/мл в растворе CsCl (1,36 г/мл), содержащем 150 мМ NaCl, 25 мМ HEPES, pH 7,8 биотинилировали при помощи добавления N-гидроксисукцинимидного эфира биотинамидокапроата («Sigma») до концентрации 7 мкМ в течение 3 часов при комнатной температуре и очищали диализом против 25 мМ HEPES, 0,15 М NaCl, pH 7,5. Образование вирусосодержащих комплексов для трансфекции осуществляли при pH 7,5 в 25 мМ буфере HEPES с 150 мМ NaCl и 0,25 мМ EDTA путем последовательного добавления Str-pLys, плазмиды и Ins-pLys к биотинилированным вирусам. Работа была проведена совместно с О.А. Смирновой.

### **3.33. Секреторные формы люциферазы**

Работы по получению секреторируемых форм люциферазы были проведены И.Н. Шацким и И.А. Шиловым. Исходной плазмидой была pRSVL, любезно предоставленная доктором Д. Хелински (de Wet et al., 1987). В этом векторе ген люциферазы находится под контролем длинного концевой повтора (промотора) вируса саркомы Рауса. Для получения плазмиды pRSVspBLG-luc и всех других конструкций использовали сайт-направленный мутагенез (Drutsa et al., 1991). Вкратце, плазмиды расщепляли эндонуклеазой рестрикции, разрезая по уникальному сайту рядом с сайтом, выбранным для мутации, и затем обрабатывали ДНК-полимеразой T4 в отсутствие дНТФ для получения односторонних концевых участков ДНК. Затем мутагенный праймер и два адапторных праймера отжигали с полученными таким образом одноцепочечными хвостами. Для конструирования плазмиды с сигнальным пептидом сайт HindIII pRSVL использовали с адаптерами 5'-GTGTGCACCTCCA-3' и 5'-GTACCGGAATGCTA-3'. Для получения pRSV-spBLG-luc использовали следующий олигонуклеотид: 5'-CATCCTCTAG AGGATAGAAT GGCGCCGGGC CTTTCTTTAT GTTTTTGGCG TCTTCGACGA TGATGGCC-3'. Для конструирования плазмид серии pCMV фрагменты HindIII-SmaI плазмиды pRSVL (включающие полный ген люциферазы вместе с его 5'- и 3'-нетранслируемыми областями) субклонировали в сайты HindIII и EcoRV плазмиды pCRTM3 («Invitrogen»), в результате чего была получена плазида pCMV-luc. Этот вектор

обеспечивает экспрессию белка из сильного промотора цитомегаловируса (CMV). Для создания конструкции, кодирующей слитый с люциферазой  $\alpha$ -лактальбумин человека (LA), сайт рестрикции NheI был введен непосредственно перед геном люциферазы в pCMVluc с использованием праймера 5'-GTTTTTGGCGT CTTCCGCTAG CATGGTTTAC CAACA-3' тем же направленным мутагенезом. Параллельно с этим был синтезирован ген LA человека с помощью полимеразной цепной реакции с использованием геномной ДНК человека в качестве матрицы. Праймеры для полимеразной цепной реакции содержали сайты рестрикции BglII и NheI для последующего субклонирования продукта полимеразной цепной реакции. Полученный таким образом ген LA человека затем клонировали в вектор pGEM7Zf («Promega»). Ген LA вырезали с использованием сайтов рестрикции HindIII и NheI и вставляли в модифицированный сайт NheI, содержащий вектор pCMV-luc, для создания плазмиды pCMV-LA-luc.

### **3.34. Трансфекция клеток эпителия молочной железы HC-11 полиплексами**

Клетки HC-11 рассеивали в чашки в планшеты за 2 дня до эксперимента. После промывания свежей средой RPMI-1640 к клеткам добавляли полиплексы (1–12,5 нМ ДНК) в среде RPMI 1640 с 2 мг/мл БСА, 25 мМ HEPES, pH 7,5, и инкубировали в течение 3 или 18 ч при 37° С. По окончании инкубации к клеткам добавляли 5-кратный избыток среды RPMI-1640 с 5% фетальной телячьей сыворотки и бикарбоната, и клетки помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор с на 2 дня, после чего измеряли активность люциферазы. Работы были проведены совместно О.А. Смирновой.

### **3.35. Трансфекция молочных желез**

Работа производилась на самках мышей BALB/c весом 18-20 г и трехлетних овцах романовской породы. Для трансфекции молочных желез В.А. Никитиным было сконструировано специальное устройство для введения материала в молочный проток железы. Вкратце, устройство состояло из корпуса с выемкой в форме соски, канала для подачи отрицательного давления, специального расширителя сфинктера в осевом канале в дне полости. В составе устройства была также специальная канюля с полостью для измерения объемов, проходящих через осевой канал. В молочные протоки мышей вводили 25–75 мкл, а в молочную железу овцы вводили 75 мл раствора Хенкса с трансфицирующими полиплексами, содержащем 50 мкг/мл гентамицина. Лактацию овец индуцировали в соответствии с двухнедельным режимом гормональной индукции (Fowler et al., 1991). Работы были проведены совместно с В.А. Никитиным и О.А. Смирновой, а также сотрудниками Всероссийского НИИ животноводства И.Н. Шайдуллиным и И.Ю. Шиховым в части работ, проведенных с овцами.

### 3.36. Вестерн-блот

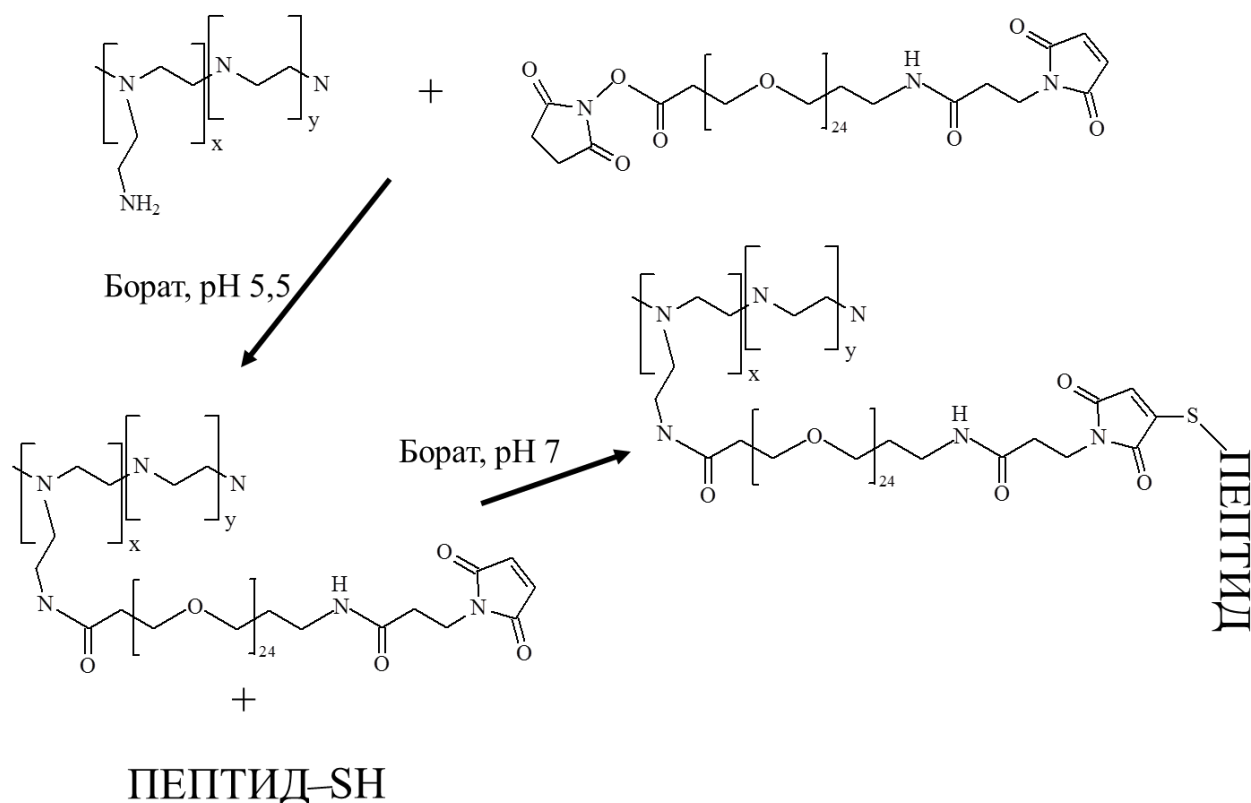
Белки молока (10 мкл молока на дорожку) разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле (12,5%) с SDS и переносили на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны инкубировали при 25° С в течение 60 минут в трис-буферном физиологическом растворе, содержащем 0,05% Tween 20 и 3% бычьего сывороточного альбумина, а затем в течение 60 минут с первичным антителом. Для иммуноблота использовали аффинно очищенные кроличьи анти-люциферазные антитела (Promega), в разведении 1:5000. После промывания солевым раствором Tween с трис-буфером мембраны инкубировали в течение 60 мин с конъюгатом щелочной фосфатазы против кроличьего IgG («Sigma»), и иммуноблоты, проявляли с использованием 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфата / пара-нитросинего тетразолия («Sigma») в качестве субстрата. Работа была проведена совместно с О.А. Смирновой.

### 3.37. Синтез блок-сополимеров на основе полиэтиленimina и полиэтиленгликоля

Общая схема синтеза, впервые использованная Климан с соавторами (Kleemann et al., 2005), представлена на рисунке 3.3. Для синтеза использовали полиэтиленимин (ПЭИ) с молекулярной массой 25 кД («Polysciences», США) и бифункциональный полиэтиленгликоль (ПЭГ), содержащий малеимидную и N-гидроксисукцинимидную эфирную группы (N-гидроксисукцинимидил-75-N-(3-мале-имидопропионил)-амидо-4,7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73-тетраоксапента-гептаконтаноат, «Quanta BioDesign», США). К навескам бифункционального ПЭГ добавляли раствор ПЭИ (2,83 мг/мл) в 0,1 М боратного буфера при pH 5,5 для получения растворов с молярными соотношениями ПЭГ:ПЭИ от 4,5 до 30. Реакцию проводили в течение 4 часов при комнатной температуре с последующим доведением pH до 7 с помощью 10 М NaOH.

Для конъюгации водный раствор 12 мг/мл ТАТ-пептида (GRKKKRRQRC, синтезирован «Русбиолинк», Россия) добавляли к ПЭГ-ПЭИ для реакции сульфгидрильных групп ТАТ-пептида с малеимидными группами ПЭГ-ПЭИ. Смесь перемешивали 2 часа при комнатной температуре и оставляли в холодильнике на ночь при 4° С при постоянном перемешивании. Удаление непрореагировавшего ПЭГ и низкомолекулярных остатков выполняли с помощью ультрафильтрации через ячейки Amicon Ultracel-10k («Millipore», США), снабженной мембраной, отсекающей молекулы с молекулярной массы более 10 кД.

Аналогичным образом осуществлялся синтез блок-сополимера с пептидом МК1с, специфичным для меланокортиновых рецепторов первого типа: МК1с: CGYGPKKKRKVSGSGSSIISHFRWGKPV.



**Рисунок 3.3. Общая схема получения блок-сополимера ПЕПТИД-ПЭГ-ПЭИ.**

Концентрацию ПЭИ определяли в конъюгате с помощью спектрофотометрии медных комплексов иминогрупп (Kunath et al., 2002). Концентрацию ПЭГ в блок-сополимерах оценивали по поглощению комплекса иодида бария с полиэтиленгликолем (Gong et al., 2007). Для определения содержания пептида в блок-сополимерах при синтезе в раствор добавляли аликвоты очищенного гель-фильтрацией пептида с радиоактивной ( $^{125}\text{I}$ ) или флуоресцентной ( $\text{Cy3}$  или  $\text{Cy5}$ ) меткой. Соотношения ТАТ:ПЭИ в блок-сополимерах составляло от 0,40 до 0,95. Работы были проведены совместно с Ю.В. Храпцовым, А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым и М.О. Дурымановым.

### 3.38. Измерение активности люциферазы

Трансфицированные конструкциями на основе полилизина клетки промывали 100 мМ калий-фосфатным буфером, pH 7,8, содержащим 1 мМ дитиотреитол и 2 мМ EDTA, затем разрушали с использованием 1% Triton X-100 («Serva») в том же буфере и центрифугировали. 50 мкл полученного супернатанта смешивали с 350 мкл 25 мМ глицилглицинового буфера, pH 7,8, содержащего 15 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 2 мМ АТФ, 10 мМ ДТТ, затем добавляли 20 мкл 1 мМ CoA и 100 мкл 1 мМ люциферина. Люминесценцию измеряли с помощью люцинометра LKB 1250 (Швеция). Стандарт 1 нг люциферазы («Sigma») соответствует 1250 единиц. Биопсийный материал, полученный от животных, замораживали и хранили в жидком азоте до использования. Образцы тканей молочных

желез промывали раствором Хенкса, гомогенизировали в 100 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,8, с 1 мМ EGTA, 3 мМ Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, с 0,1% бычьим сывороточным альбумином, 1 мМ дитиотреитолом, 1% Triton X-100, 20 мкг/мл апротинина («Sigma») и центрифугировали. Активность люциферазы измеряли в полученном супернатанте, как указано выше.

Эффективность доставки генов в клетки с помощью полиплексов на основе ПЭИ были выполнены в 24-луночных культуральных планшетах в соответствующей среде. Клетки в количестве 25 000 клеток на лунку рассеивали за 24 часа до проведения трансфекции, после чего заменяли среду в лунке на 0,5 мл свежей среды и добавляли 12,5 мкл раствора полиплексов до конечной концентрации 0,5 мкг/мл по ДНК. Для приготовления проб спустя 48 часов после добавления полиплексов использовали набор Luciferase Assay System («Promega», США) согласно протоколу производителя. Измерения люминисценции проводили на люминометре Glomax («Promega», США). Нормировку осуществляли на концентрацию белка, измеренную методом Брэдфорда. Работы были проведены совместно с М.О. Дурымановым.

### **3.39. Формирование полиплексов.**

Для формирования полиплексов использовали предварительно приготовленные стерильные растворы блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ и исследуемой плазмиды, которые хранились при температуре -40°C и 20% стерильный раствор глюкозы (DNAse, RNAse, Protease Free Grade) с 10 мМ HEPES pH 7,4. Полиплексы, состоящие из плазмидной ДНК и ТАТ-ПЭГ-ПЭИ, получали в стерильном изотоническом растворе глюкозы при pH 7,4. Раствор полимера быстро добавляли к ДНК и перемешивали на вортексе с последующей 20-минутной инкубацией при комнатной температуре перед использованием. При исследовании влияния соотношения азота ПЭИ к фосфату ДНК (N/P) на эффективность трансфекции концентрацию раствора ПЭИ-ПЭГ-ТАТ сохраняли концентрацию ДНК 20 мкг/мл, чтобы получить отношения N:P от 10 до 40. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым, М.О. Дурымановым, Ю.В. Храмцовым.

### **3.40. Исследование полиплексов с помощью динамического светорассеяния**

Размеры частиц полиплексов измеряли с использованием ZetaPALS («Brookhaven Instruments», США) в 2,5% глюкозе, 10 мМ HEPES, pH 7,0. Прибор был калиброван в соответствии со стандартами размеров наносфер (полистирольные микросферы в воде, 92 ± 3,7 нм) от «Duke Scientific» (США). Рассеянный свет регистрировали под углом 90 °. Измерения были проведены в кварцевой кювете объемом 40 мкл при 25° С при скорости счета от 10 до 370 кГц в семи циклах продолжительностью 240 секунд каждый и проанализированы с помощью прилагаемой к прибору программы, исходя из



сферического приближения размеров частиц для анализа мультимодального распределения по размерам (MSD). Гидродинамический диаметр полиплексов измеряли на приборе ZetaPALS. Для измерений использовали программу BIC Particle Sizing Software, рассчитывающую средний гидродинамический диаметр частиц и распределение частиц по размерам, исходя из предположения, что частицы имеют сферическую форму.

$\zeta$ -потенциалы полиплексов были измерены в 4 мл кювете с помощью стандартной электрофоретической ячейки прибора ZetaPALS при 25° С в течение 1 часа. Для расчета величины  $\zeta$ -потенциала были использованы следующие параметры: вязкость – 1,078 сП, индекс преломления среды – 1,338, диэлектрическая постоянная – 78,54. Измерения были проведены совместно с А.В. Уласовым, М.О. Дурымановым, Ю.В. Храмцовым.

### **3.41. Измерение размеров полиплексов с помощью атомно-силовой микроскопии**

Изображения полиплексов ПЭИ-ДНК и ПЭИ-ПЭГ-ТАТ-ДНК получали с использованием многомодового атомно-силового микроскопа Nanoscope IIIa («Veeco Instruments», США), работавшего в режиме прерывистого контакта в жидкой среде. 100 мкл образца полиплексов (1,8–7,2 мкг/мл по ДНК) наносили на свежерасщепленную слюду, инкубировали при комнатной температуре 15 минут, затем ячейку герметично закрывали и промывали свежим буфером (2,5% глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7,0), чтобы удалить излишки образца. Для АСМ использовали кантилеверы N/P-S (Digital Instruments, США) с номинальной константой жесткости 0,06 Н/м и радиусом кривизны зонда 10 нм, работающие на резонансных частотах ~ 9 кГц. Все изображения получали со скоростью сканирования ~ 3 Гц с разрешением 512 × 512 пикселей. Шумные линии сканирования были удалены со всех АСМ изображений, после чего изображения были сглажены. Для анализа использовали изображения размером 10 × 10 мкм, полученные в семи разных местах образца. Высоту полиплексных наночастиц и площади их поперечных сечений каждого типа исследованных полиплексов анализировали с использованием процедур анализа частиц программного обеспечения прибора. Для анализа учитывали только частицы высотой более 7 нм, что позволило исключить большую часть загрязнений. Для анализа распределения размеров полиплексных наночастиц были построены частотные гистограммы количества частиц на 1 мкм<sup>2</sup> с шагом 2000 нм<sup>2</sup> поверхности слюды с учетом только наночастиц площадью более 1000 нм<sup>2</sup>. Вклад свободных частиц блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ был учтен путем построения аналогичной гистограммы для этих блок-сополимеров при той же концентрации (380 нМ). В случае полиплексов ПЭИ-ДНК поперечные срезы делались на высоте 3 нм, поскольку почти все частицы имели высоту меньше 7 нм. Учитывали только частицы площадью более 600 нм<sup>2</sup>, поскольку площадь

частиц ПЭИ была меньше  $600 \text{ нм}^2$ . Частотные гистограммы площади наночастиц ПЭИ-ДНК с шагом  $170 \text{ нм}^2$  оказались унимодальными. Для каждого типа анализируемых полиплексов рассчитывалась доля частиц с площадью поперечного сечения в определенном диапазоне. Для оценки размеров частиц учитывали поправки на расширение экспериментально оцененных диаметров частиц, вызванное конечными размерами острия кантилевера и деформацию наночастиц полиплекса при получении изображений. Расчеты размеров полиплексных наночастиц в растворе проводили в приближении сферической формы, определяя их диаметр как  $D_p = 2(3D^2r/8)^{1/3}$ , где  $D$ , представляет собой диаметр полиплекса на слюде, а  $2r$  – средняя высота полиплекса на слюде. Измерения были проведены Ю.В. Храмцовым.

### **3.42. Трансфекция *in vitro***

Эффективность трансфекции клеток с помощью плазмиды, кодирующей EGFP, проверяли на одиннадцати клеточных линиях следующим образом: клетки высевали с плотностью 10 000 клеток на лунку на 48-луночные планшеты для культивирования клеток за 24 часа до экспериментов по трансфекции. Полиплексы получали, как описано выше. Для измерения 12,5 мкл образца полиплексов добавляли в каждую лунку, содержащую 500 мкл свежей среды. Среду не заменяли, и клетки инкубировали с полиплексами еще 48–72 часа. Флуоресценцию GFP, экспрессированного в трансфицированных клетках, наблюдали с помощью КЛСМ с использованием системы LSM-510 META NLO, Carl Zeiss, Германия. Эксперименты проводили в трех повторах, данные выражали в виде процента трансфекции в клетках, трансфицированных GFP. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, М.О. Дурымановым, Ю.В. Храмцовым, Г.А. Трусковым.

### **3.43. Получение флуоресцентно меченых полиплексов**

Плазмидную ДНК (pHTERT-ТК, 4,7 т.п.н., кодирующую тимидинкиназу Herpes simplex под промотором теломеразы человека) биотинилировали с использованием биотин-11-dUTP и набора Биотин-Рэндомпрайм («Силекс», Россия). Биотинилированную ДНК метили квантовыми точками Qdot605, конъюгированными со стрептавидином («Invitrogen», США). Электрофорез в 0,6% агарозе показал наличие комплексов ДНК-квантовые точки и отсутствие свободных квантовых точек при молярном соотношении плазмидная ДНК : квантовая точка = 2 : 1. что позволило всем квантовым точкам образовывать комплекс с плазмидной ДНК. Для получения меченой ДНК 2,16 мкл 40 нМ Qd605, конъюгированных со стрептавидином, добавляли к 9 мкл биотинилированной ДНК pHTert-HSVtk (40 мкг/мл) перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре (Ho et al., 2006).

Флуоресцентное мечение блок-сополимера на основе ПЭИ (отношение ПЭГ:ПЭИ = 1,74, отношение ТАТ / ПЭИ = 0,53) проводили N-сукцинимидильным эфиром Alexa Fluor647 (Invitrogen, США). Раствор красителя в диметилсульфоксиде добавляли к раствору блок-сополимера в десятикратном молярном соотношении 10 по отношению к ПЭИ при pH 7. Смесь инкубировали в течение 12 часов в темноте и при интенсивном перемешивании, а затем еще 2 часа при pH 8,1. Флуоресцентно меченый блок-сополимер отделяют от свободного непрореагировавшего красителя путем повторного диализа против 25 ммоль / л боратного буфера, pH 7,5. Степень мечения определяли на спектрофотометре, измеряя поглощение AlexaFluor647 при 647 нм. Степень мечения ПЭИ-ПЭГ-ТАТ красителем AlexaFluor647 составила 5 молекул красителя на молекулу блок-сополимера.

Для приготовления меченых полиплексов (N/P = 40) 2,27 мкл меченного AlexaFluor647 блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ с концентрацией 8,38 мкМ и 2,83 мкл немеченого блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ (20,1 мкМ) добавляли к 4,5 мкл 10 мМ HEPES буфера, pH 7,0, содержащего 10% глюкозу. 11,16 мкл плазмидной ДНК (40 мкг/мл), меченной квантовыми точками Qd605 добавляли к смеси меченого и немеченого блок-сополимера, перемешивали и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Проведенное с помощью АСМ сравнение частотных распределений площадей сечений меченых и немеченых полиплексов показало их сходство со статистически значимым коэффициентом корреляции  $r = 0,96$ .

#### **3.44. Исследование внутриклеточная локализация полиплексов**

Клетки карциномы легких человека A549 и Calu-1 и клетки мышинной меланомы Клаудмана S91 (клон M3) рассевали по 20000-50000 в 1 мл среды DMEM/F12 с 10% сывороткой в камеры POCmini («Cell Cultivation System», Германия) и культивировали при 37° С и 5% CO<sub>2</sub>. Через сутки клетки отмывали и добавляли 700 мкл среды IMEM (Improved MEM Zinc Option) без индикатора с 10% сывороткой, 8 мМ HEPES, 0,15% NaHCO<sub>3</sub>. К клеткам добавляли меченный полиплекс с N/P = 40, 0,36 мкг по ДНК. За час до съемки добавляли 5 мкг/мл красителя Xёхст 33258 и 50–75 нМ LysoTracker Green DND-26 для визуализации клеточных ядер и лизосом/эндосом соответственно. Перед съемкой эндоцитоз в клетках блокировали, охлаждая камеры до температуры 11-12° С. Среду с полиплексами отбирали в отдельную пробирку, после чего добавляли на 10 минут лектин из проростков пшеницы (WGA) конъюгированного с Cy3 для визуализации плазматической мембраны клетки в концентрации 5 мкг/мл, дважды отмывали клетки средой IMEM и добавляли к ним исходную культуральную среду, содержащую полиплексы.

Через 0,5, 1, 2,5, 4, 8 и 16 часов после трансфекции клетки исследовали с помощью мультифотонного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM-510 Meta NLO (Carl Zeiss, Германия) с объективом  $\times 63$ , NA – 1,4 и охлаждаемой приставкой при 10–12° С. Для регистрации сигнала красителя Хёхст 33258 использовали двухфотонное возбуждение фемтосекундного лазера (MaiTai Broadband, «Spectra-Physics», США) при 760 нм (435-485 нм фильтр для флуоресценции), для возбуждения красителя LysoTracker использовали линию 488 нм аргонового лазера (фильтр с пропусканием 500-530 для регистрации флуоресценции), для квантовых точек – линию 458 нм (регистрация в полосе 590-612 нм метасистемы конфокального микроскопа для собственной флуоресценции и 650-710 нм для резонансного переноса энергии, FRET на краситель Alexa 647). Изображения клеток получали, используя режим оптических срезов Z-stack (не менее 20 оптических срезов на исследуемое поле).

Для оценки распаковки полиплексов в клетках был использован известный алгоритм пиксельного анализа изображения (Chen et al., 2008). Для каждой временной точки случайным образом было выбрано не менее 30 клеток, что позволяет получить статистически значимый результат (Akita et al., 2004). Границы каждой клетки определяли по изображениям, полученным в канале Cy3-WGA. Объемы всех интернализированных частиц были определены путем суммирования вокселей с помощью плагина ObjectCounter3D («Institut Curie», Франция) для ImageJ (v1.43i; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Тип каждой частицы – упакованная в наночастице полиплекса или свободная ДНК был определяли в цифровом виде с помощью FRET. Частицы, которые давали FRET-обусловленный сигнал в канале AlexaFluor647 учитывали в качестве нераспакованных полиплексов. При отсутствии FRET-обусловленного сигнала AlexaFluor647 доставленная полиплексами ДНК считали распакованной. Внутриклеточная локализация каждой частицы полиплексов определяли по ко-локализации со специфическими красителями плазматической мембраной, ядра и лизосом/эндосом. Ко-локализация определяли с помощью плагина Colocalization («Institut Jacques Monod», Service Imagerie, Франция) для программы ImageJ. Воксельные объемы полиплексов в цитозоле вычисляли по разнице между полным воксельным объемом полиплексов в клетке и суммой воксельных объемов в ядре, лизосомах/эндосомах и на плазматической мембране. Обработка изображений и подсчет воксельных объемов проводилось в программе ImageJ. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, М.О. Дурымановым, Ю.В. Храпцовым, Г.А. Трусовым.

### 3.45. Исследование противоопухолевой эффективности генно-терапевтических продуктов, доставляемых полиплексами на основе ПЭИ-ПЭГ-ТАТ

Для работы использовали мышей линии C57black/6J (Филиал «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАН), средний вес на начало эксперимента –  $19,8 \pm 0,2$  (среднее  $\pm$  стандартная ошибка). Животные содержались на стандартном гранулированном сухом корме.

Клетки линии карциномы легкого мыши линии LLC1 – карциномы Льюиса – (получены от Е.П. Копанцева, ИБХ РАН) культивировали на среде DMEM/F12 («Gibco») с 10% эмбриональной коровьей сыворотки в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в газовой смеси, состоящей из воздуха с 5% CO<sub>2</sub>. Для получения экспериментальных опухолей клетки LLC1 инокулировали подкожно в заднюю правую часть спины в количестве  $1 \cdot 10^6$  клеток на животное в объеме 20 мкл, в среде DMEM/F12. Предварительно (за 1-2 дня до начала эксперимента) с участка, в который вводили клетки (1,5 – 2 см<sup>2</sup>), волосы были удалены под авертиновым наркозом. Начиная с 13 дня с момента инокуляции, после появления у животных пальпируемых опухолей, производили измерение размеров опухолей (длина, ширина, высота) при помощи электронного штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали по формуле эллипсоида (Tomayko and Reynolds, 1989). Критерием эвтаназии служило достижение опухоли 10% от массы животного.

Для приготовления полиплексов использовали следующие плазмиды: в качестве контроля – pGL3 basic vector, («Promega», содержит ген люциферазы *Photinus pyralis*, не содержит промотора); pSurv4\_TK\_pGL3 (получена от Т.В. Виноградовой, ИБХ РАН, содержит ген *HSVtk*, под контролем промоторной области гена сурвивина человека); pHTERT\_TK (получена от И.В. Коробко, ИБГ РАН, содержит ген *HSVtk* под контролем промотора теломеразы человека); pCMV\_TK\_pGL3 (получена от Т.В. Виноградовой, содержит ген *HSVtk* под контролем цитомегаловирусного промотора). Все плазмиды были выделены при помощи набора EndoFree Plasmid Maxi Kit («Qiagen»). Все полиплексы были приготовлены также конъюгат блок-сополимера полиэтиленмин-полиэтиленгликоль с ТАТ-пептидом (ПЭИ-ПЭГ-ТАТ). Полиплексы готовили при помощи быстрого смешивания раствора ПЭИ-ПЭГ-ТАТ с раствором ДНК в изотоническом растворе глюкозы с 10 мМ HEPES, pH 7, в конечной концентрации полиплекса 80 мкг ДНК в миллилитре. Препараты полиплекса готовили в день эксперимента в стерильных условиях. Перед введением животным в препараты добавляли гентамицин до конечной концентрации 50 мкг/мл. Введение полиплекса проводили при помощи внутриопухолевой инъекции в объеме 50 мкл на животное при помощи инсулинового шприца (BD Micro-Fine Plus 0,5 мл, 12,7 мм x 0,33 мм) на 17 и 21 день после инокуляции клеток животным. Каждая опытная группа животных, получавших полиплекс с геном *HSVtk* под контролем

различных промоторов, и ганцикловир («Hoffmann-La Roche», Швейцария) в дозе 75 мг/кг состояла из 8 животных, в качестве контрольной группы (8 животных) использовали группу, получавшую полиплекс с геном люциферазы pGL3 basic vector. Животные были равномерно распределены по группам, согласно измеренным размерам опухолей. Средний размер опухолей на момент начала лечения был 38 мм<sup>3</sup>, средние размеры опухолей групп статистически не различались. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, Т.А. Слестниковой, М.О. Дурьмановым, Ю.В. Храпцовым, Г.А. Трусовым.

### **3.46. Исследование противоопухолевой эффективности генотерапии с помощью полиплексов на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с**

Опухоли мышинной меланомы Клаудмана S91 (M3) были индуцированы путем подкожной инъекции в область голени  $2 \cdot 10^6$  клеток в среде DMEM/F12 в объеме 20 мкл, самкам мышей DBA/2J. Полиплексы были введены в опухоли по достижению среднего объема опухоли 250 мм<sup>3</sup>. Животных эвтаназировали по достижению объема опухоли 1500 мм<sup>3</sup>. Для терапии были приготовлены полиплексы с ПЭИ-ПЭГ-МК1с или ПЭИ-ПЭГ и плазмидой pCMV-HSVtk с концентрацией 80 мкг/мл и N/P, равным 30. Мышам с экспериментальными подкожными опухолями внутриопухолево вводили 125 мкл полиплексов (10 мкг ДНК / опухоль) на 18-й день после инокуляции клеток животным. Начиная со следующего дня после введения полиплексов мыши получали внутрибрюшинные инъекции ганцикловира. Дважды в день делали семь внутрибрюшинных инъекций ганцикловира. Через день после последней инъекции ганцикловира полиплексы были введены второй раз с последующими семью введениями ганцикловира. Контрольной группе вводили только внутрибрюшинно ганцикловир. Работы были проведены с А.В. Уласовым, Т.А. Слестниковой, М.О. Дурьмановым, Ю.В. Храпцовым, Г.А. Трусовым.

## **4. Результаты**

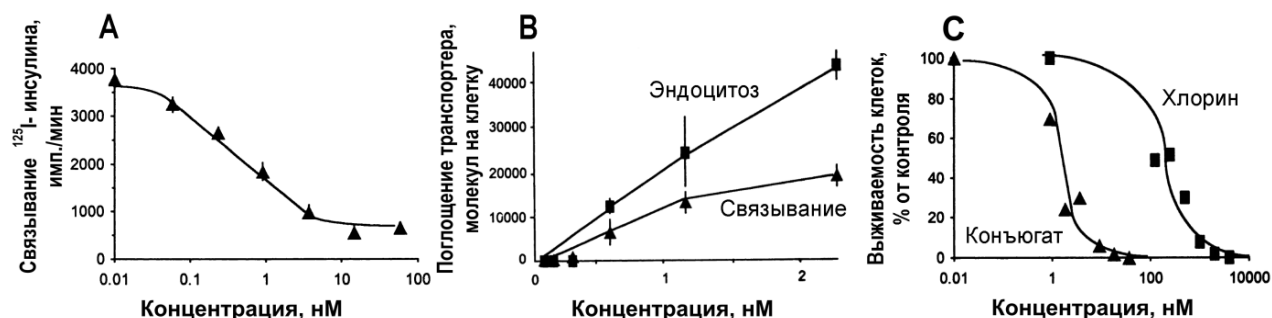
### **4.1. Изменение эффективности фотосенсибилизаторов в результате присоединения к носителям, доставляющим их внутрь клетки**

#### **4.1.1. Интернализуемые конструкции**

Как показали проведенные эксперименты присоединение ФС к интернализуемому лиганду для поверхностных рецепторов способно усилить его действие, поскольку наиболее чувствительные мишени для воздействия АФК находятся внутри клетки. Так ковалентное присоединение хлорина  $e_6$  к конканавалину А существенно усиливает его действие на фибробласты человека. Так, отсутствие прикрепленных живых клеток после облучения наблюдалось при 15,7 мкМ хлорина  $e_6$ , в то время как для присоединенного к конканавалину ФС эта концентрация была в пять раз ниже. В то же время присоединение ФС к макромолекулам, способным по-разному связываться с клетками в зависимости от их типа, способно изменить специфичность его действия. Для создания специфических средств доставки для выбранного типа клеток наиболее распространенным вариантом является использование антител. В общем случае антитела могут обеспечить хорошую селективность воздействия, однако, для максимальной эффективности таких действующих веществ как ФС, необходима этих веществ доставка в более чувствительные к их действию внутриклеточные компартменты. В случае терапии злокачественных новообразований наиболее удобным средством доставки могут быть вещества, являющиеся лигандами к тем поверхностным интернализуемым рецепторам, экспрессия которых повышена по сравнению с окружающими нормальными клетками.

В качестве модельной системы для создания такого рода системы доставки ФС мы использовали хорошо изученный инсулин, который может взаимодействовать с собственным интернализуемым рецептором, а также с рецепторами для инсулиноподобных факторов роста (ИФР) I и II. Инсулиновый рецептор сверх-экспрессирован при ряде гепатом, раке молочной железы, ИФР I при различных карциномах и остеосаркомах, новообразованиях щитовидной железы, а ИФР II при солитарных фиброзных опухолях легких. Прямое присоединение доставляемого вещества к инсулину часто приводит к инактивации молекулы, поэтому для создания работоспособной транспортной системы мы использовали предварительное присоединение ФС к промежуточному компоненту – белку носителю, в качестве которого использовали БСА, после чего к полученному конъюгату БСА-хлорин  $e_6$  ковалентно присоединяли инсулин. Этот конъюгат эффективно конкурировал с инсулином за специфические места связывания на поверхности клеток гепатомы человека, поглощался

клетками и вызывал увеличение эффективности хлорина  $e_6$  (рис. 4.1). Проведенные исследования показали перспективность использования конструкций, доставляющих ФС внутрь клетки-мишени для усиления фотодинамического действия.



**Рисунок 4.1. Взаимодействие конструкции инсулин-БСА-хлорин с клетками гепатомы человека PLC/PRF/5 и ее цитотоксическое действие.** А – конкурентное вытеснение  $^{125}$ I-инсулина конъюгатом инсулин-БСА-(хлорин  $e_6$ ), В – связывание и эндоцитоз конъюгата  $^{125}$ I-инсулин-БСА-(хлорин  $e_6$ ), С – цитотоксическое действие свободного хлорина  $e_6$  и конъюгата с инсулин-БСА-(хлорин  $e_6$ ) по тесту колониеобразования. Результаты получены совместно с Т.В. Ахлыниной.

Результаты раздела опубликованы в статьях: Akhlynyna T.V., Gulak P.V., Serebryakova N.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. (1990) Photodynamic action of concanavalin A - chlorin  $e_6$  conjugate on human fibroblasts. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **109**, 183-184 (вклад автора состоит в выполнении части экспериментов, участии в анализе результатов и участии в написании); Sobolev A.S., Akhlynyna T.V., Yachmenev S.V., Rosenkranz A.A., Severin E.S. (1992) Internalizable insulin-BSA-chlorin  $e_6$  conjugate is a more effective photosensitizer than chlorin  $e_6$  alone. *Biochemistry International*, **26**, 445-50 (вклад автора состоит в выполнении части экспериментов и участии в анализе результатов и участии в написании); Akhlynyna T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Gulak P.V., Serebryakova N.V., Sobolev A.S. (1993) The use of internalizable derivatives of chlorin  $e_6$  for increasing its photosensitizing activity. *Photochem. Photobiol.*, **58**, 45-48; Akhlynyna, T.V., Rosenkranz, A.A., Jans, D.A., & Sobolev, A.S. 1995. Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic activity of chlorin  $e_6$ . *Cancer Res.* **55**, 1014-9 (вклад автора состоит в выполнении части экспериментов, в частности, экспериментов по изучению взаимодействия конструкций с клетками при помощи радиолигандного метода и ВИМ, и также участии в анализе результатов и участии в написании). Автор признателен всем коллегам, без идей и работы которых эти результаты не могли быть получены.

#### 4.1.2. Интернализуемые конструкции с сигналом ядерной локализации

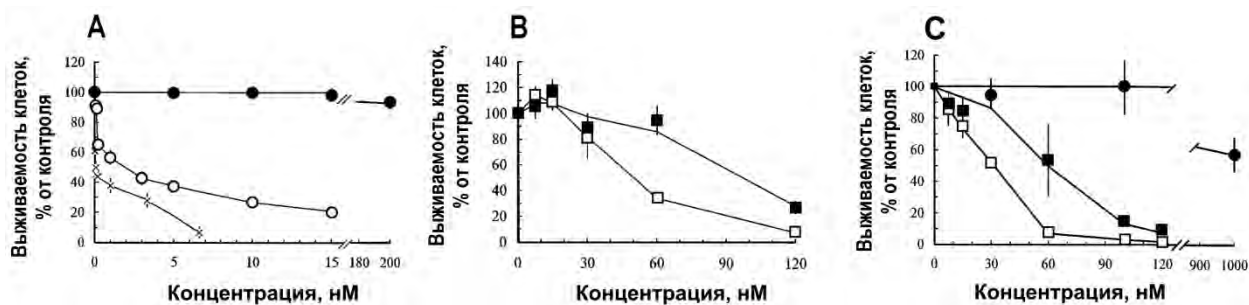
##### 4.1.2.1. Конструкции для доставки фотосенсибилизаторов

Более выраженное действие ФС может быть получено в результате включения в транспортную конструкцию компонента для транспорта в ядро. В качестве такого



компонента в совместных работах с лабораторией Д. Янса (D.A. Jans, Австралия) были использованы аминокислотные последовательности с сигналом ядерной локализации (СЯЛ) большого Т-антигена обезьяньего вакуолизирующего вируса SV-40, с прилегающими регуляторными участками.

Среди использованных последовательностей были: *PKKKRKVEDPYC* в пептиде P11Lys с минимальным СЯЛ (выделен курсивом), *CGPGSDDEAAADAQHAAPPK<sup>u</sup>KKRK-VGY* в пептиде P101Lys с сигналом ядерной локализации и прилегающей регуляторной N-концевой последовательностью, а также *SSDDEATADAQHAAPPK<sup>u</sup>KKRKVEDP* в составе генно-инженерного белка P10 на основе бактериальной β-галактозидазы. Для проверки значимости цитоплазмально-ядерного транспорта в контрольных конструкциях необходимый для транспорта в ядро остаток лизина в 128 положении (выделен подчеркиванием) был заменен на треонин. Как показала работа, выполненная на клетках гепатомы человека PLC/PRF/5 и глиомы крысы С6, наличие функционального СЯЛ существенно увеличивает эффективность ФС, присоединенного к конструкциям, содержащим интернализуемый лиганд инсулин, компонент, содержащий СЯЛ и носитель для присоединения ФС, в качестве которого использовали БСА или β-галактозидазу (рис. 4.2). Замена лизина на треонин в сигнале ядерной локализации P101 приводила к уменьшению фотодинамического действия конструкций как на клетках глиомы крысы (концентрация полумаксимального эффекта,  $EC_{50}$  увеличивалась с  $28 \pm 3$  нМ до  $78 \pm 29$  нМ) так и на клетках гепатомы человека ( $EC_{50}$  увеличивалась с  $50 \pm 8$  нМ до  $104 \pm 21$  нМ). Наибольший эффект по усилению фотодинамического действия ФС среди 10 синтезированных вариантов был обнаружен у конструкции P10-(хлорин  $e_6$ )-инсулин (рис. 4.2a):  $EC_{50}$  выживаемости клеток PLC/PRF/5 уменьшилось с 320 нМ у свободного хлорина до 0,13 нМ у конструкции. В пересчете на одну молекулу ФС эффективность его фотоцитотоксического действия увеличилась более чем в 800 раз. Проведенные исследования показали перспективность использования конструкций, доставляющих ФС внутрь клетки-мишени и, внутри этих клеток, в ядро для усиления фотоцитотоксического действия.



**Рисунок 4.2. Фотодинамическая активность специфически интернализуемых конструкций, содержащих СЯЛ.** А и В – выживаемость клеток гепатомы PLC/PRF/5, С – клеток глиомы крысы Сб. х – (хлорин  $e_6$ )–P10-инсулин (соотношение компонентов 1:3:8); ○ – (хлорин  $e_6$ )– $\beta$ -галактозидаза-инсулин (соотношение компонентов 1:2:8); ● – свободный хлорин  $e_6$ ; □ – (хлорин  $e_6$ )–BCA-P101Lys-инсулин (соотношение компонентов 1:1:11:2); ■ – BCA-P101Thr-(хлорин  $e_6$ )-инсулин (соотношение компонентов 1:1:8:2). Результаты получены совместно с Т.В. Ахлыниной.

Основные результаты данного раздела опубликованы в статье: Akhlynina T.V., Jans D.A., Rosenkranz A.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., Sobolev A.S. (1997) Nuclear targeting of chlorin  $e_6$  enhances its photosensitizing activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 20328-31 (вклад автора состоит в дизайне синтеза конструкций, участии в синтезе конструкций, участии в планировании работ и анализе результатов, а также в участии в написании). Автор глубоко признателен всем коллегам, с которыми была выполнена работа.

#### 4.1.2.2. Конструкции для доставки излучателей $\alpha$ -частиц

ФС могут обеспечить локализованное воздействие за счет местного облучения светом соответствующей длины волны, однако их применение в случае диссеминированных новообразований малоперспективно. Кроме того, эффективность ФС принципиально зависит от толщины слоя ткани, через которую ведется облучение. Вариантом доставляемого в ядра клеток цитотоксического начала могут быть радионуклиды, испускающие частицы с коротким пробегом и обладающие мощным локальным поражающим эффектом. К таким радионуклидам с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) относятся  $\alpha$ -эмиттеры, в частности,  $^{211}\text{At}$ , который испускает одну  $\alpha$ -частицу с пробегом в ткани 70-80 мкм на распад и имеет удобный для медицинского применения период полураспада 7,2 ч. Для проверки возможности увеличения цитотоксичности к конструкции P10-инсулин при помощи карбодиимида присоединяли [ $^{211}\text{At}$ ]-*p*-астатбензойную кислоту, полученную в НИИЯФ МГУ, и очищали полученный препарат гель-фильтрацией. Присоединение  $^{211}\text{At}$  к конструкции P10-инсулин привело к значительному усилению его цитотоксического действия на клетках гепатомы: при использовании присоединенный к интернализуемой конструкции с СЯЛ 37 %

выживаемость ( $A_{37}$ ) достигалась при активности 240 кБк/мл, тогда как для свободного  $^{211}\text{At D}_0$  лишь при активности 2000 кБк/мл.

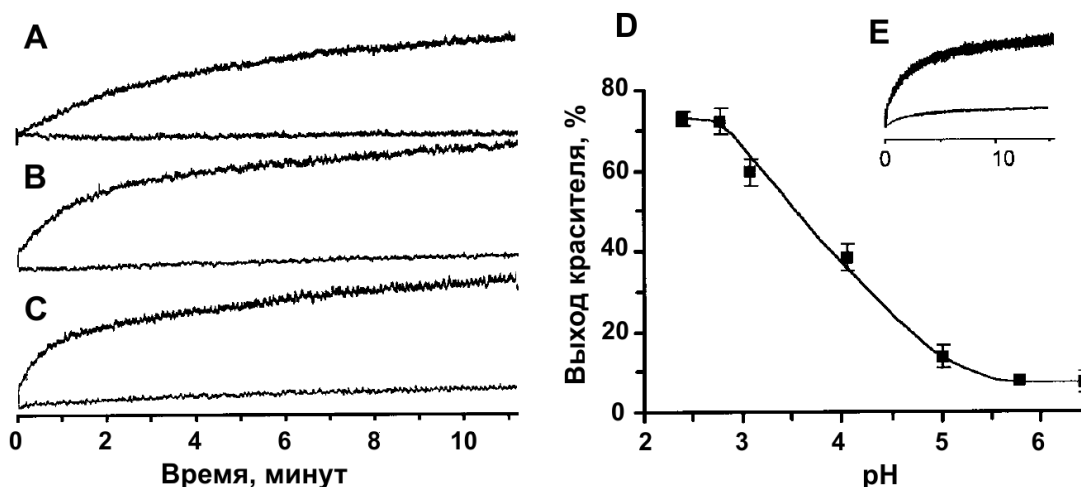
Проведенные эксперименты по астатинированию и очистке МПТ для направленной доставки в ядра клеток-мишеней показали, что возможно получение препаратов с удельной радиоактивностью около 9 МБк/мг, и эти препараты способны почти на порядок увеличить цитотоксическое воздействие  $^{211}\text{At}$ . Увеличение удельной активности препаратов способно, по-видимому, увеличить и цитотоксическое действие астата, присоединенного интернализуемой конструкции. Еще одним резервом, позволяющим надеяться на значительное увеличение цитотоксичности по отношению к клеткам мишеням, является включение дополнительного модуля, обеспечивающего эффективный выход интернализуемых конструкций из замкнутых мембранных образований эндоцитозного пути, куда попадают макромолекулы в процессе рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Описанные работы были проведены П.А. Набатниковым и Р.А. Алиевым.

Основные результаты данного раздела опубликованы в статье: Розенкранц А.А., Набатников П.А., Алиев Р.А., Янс Д.А., Соболев А.С. (2004) Направленная доставка  $\alpha$ -эмиттера астата-211 в ядра клеток гепатомы человека значительно усиливает его цитотоксическое действие. *Молекулярная медицина*, № 2, 47-55 (вклад автора состоит в участии организации работ, планировании экспериментов, синтезе конъюгатов и в написании статьи). Автор признателен всем коллегам, которые принимали участие в данной работе.

#### **4.1.3. Влияние эндосомолитических средств на эффективность действия интернализуемых конструкций с сигналом ядерной локализации**

Проведенные эксперименты показали перспективность использования конструкций, поступающих в клетки-мишени при помощи рецептор-опосредуемого эндоцитоза и доставляющих ФС в ядро клетки с использованием СЯЛ. Однако при поступлении таких конструкций в клетки они оказываются внутри ограниченной мембраной эндосом, что делает их слабо доступными для механизма, обеспечивающего транспорт в ядро, компоненты которого находятся в цитозоле. В этом случае использование средств, обеспечивающих специфическое проникновение конструкций через мембрану эндосомы способно увеличить эффективность доставки действующего начала. Такими свойствами обладают, в частности аденовирусы, которые могут способствовать выходу в цитозоль различных макромолекул, находящихся в тех же эндосомах (FitzGerald et al., 1983). Проведенные эксперименты показали, что многие аденовирусы, например, утиный аденовирус EDS-76 обладает рН-зависимой

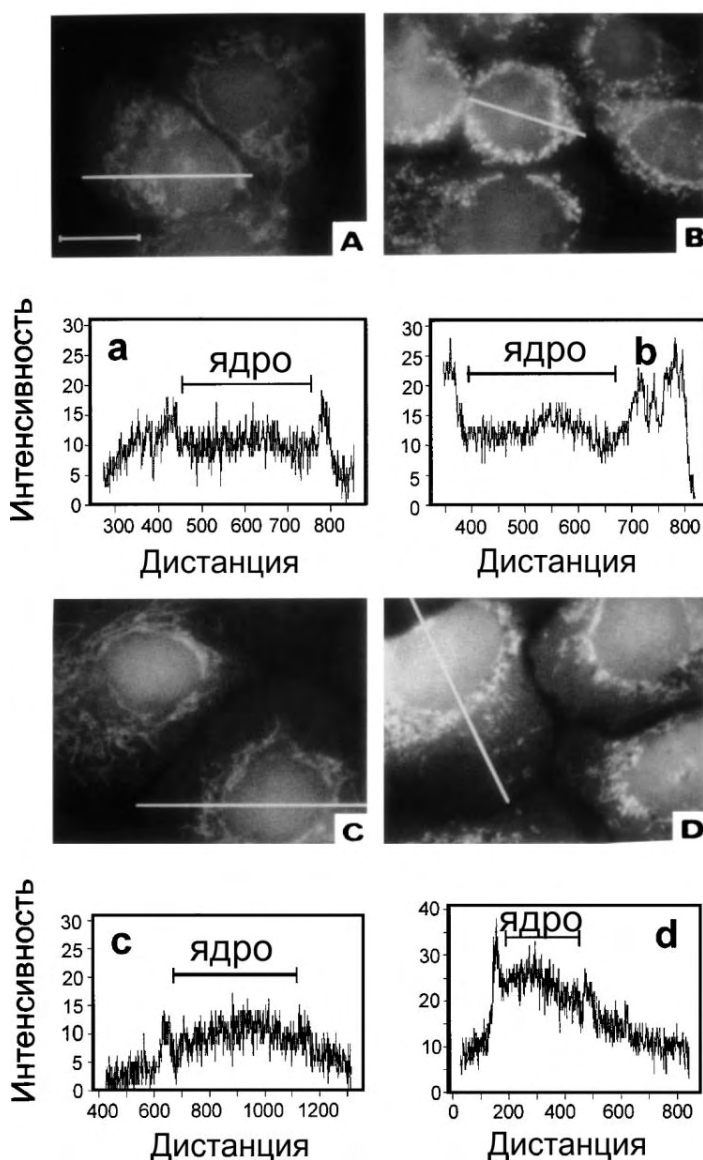
способностью нарушать целостность бислойных фосфолипидных мембран (рис. 4.3). Аналогичными свойством обладали и другие исследованные нами аденовирусы: аденовирус человека Ad5 dl312 и аденовирус цыпленка CELO.



**Рисунок 4.3. Выход флуоресцентного красителя из липосом, опосредованная аденовирусом EDS-76.** А, В, С, Е – кинетика выхода опосредованного аденовирусом высвобождения кальцеина из липосом при рН 3. Аденовирус EDS-76, предоставленный Б.С. Народицким, ( $2,8 \cdot 10^{10}$  вирионов) в 50 мкл раствора CsCl добавляли в кювету с липосомами (3 нмоль липосом в 1 мл) верхние кривые при 2°C (А), 20°C (В) и 37°C (С). Нижние кривые в А - С демонстрируют сигнал после добавления 50 мкл CsCl без аденовируса. D – рН-зависимость выхода красителя из липосом, индуцированных с аденовирусом в течение 30 мин при 37° С в 200 мл раствора лимонной кислоты NaCl с  $5,6 \cdot 10^9$  вирионов EDS-76; перед началом измерения добавляли 800 мкл раствора HEPES-NaCl, рН 7,5. (е) EDS-76-зависимая утечка липосом при рН 3 (верхняя кривая) и 5 (нижняя кривая); данные были скорректированы до эквивалентных количеств флуоресценции (флуоресценция кальцеина была в 4,8 раза выше при рН 5, чем при рН 3). Результаты получены совместно с О.А. Смирновой.

Для проверки предположения о возможном усилении фотодинамического эффекта при помощи компонента, способствующего разрушению эндосом, мы провели инкубацию клеток гепатомы одновременно с конструкцией (хлорин  $e_6$ )–P10-инсулин или (хлорин  $e_6$ )– $\beta$ -галактозидаза-инсулин и дефектным по размножению штаммом аденовируса человека Ad5 dl312, обладающим способностью к разрушению эндосом, в которые он попал. Продукция активных форм кислорода, детектируемая по образованию флуоресцирующего 2',7'-дихлорфлуоресцеина из нефлуоресцирующего предшественника была заметно увеличена в ядрах клеток по сравнению с цитоплазмой только в том случае, когда в хлорин  $e_6$  был доставлен в клетки одновременно с обладающим эндосомолитическим действием вирусом (рис. 4.4). Полученные результаты свидетельствуют, что для эффективной доставки действующего начала при помощи рецептор-опосредуемого эндоцитоза в ядра клеток-мишеней необходимы не только

лиганд к эндоцитируемому поверхностному рецептору и СЯЛ, но и компонент, способствующий эффективному выходу доставляемого вещества из эндосом.



**Рисунок 4.4.** Влияние добавления аденовирусов на распределение продукции активных форм кислорода в живых клетках гепатомы человека PLC/PRF/5 после доставки ФС конструкциями, поглощаемыми рецептор-опосредуемым эндоцитозом и последующего облучения. Клетки инкубировали с 20 нМ (хлорин  $e_6$ )- $\beta$ -галактозидаза-инсулина (А, В) или (хлорин  $e_6$ )-Р10-инсулином (С, D) и Ad5 dl312 ( $3,7 \times 10^{10}$  частиц/мл) в течение 18 часов при  $37^\circ\text{C}$  после чего отмывали, инкубировали с 5 минут с 2',7'- дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом и облучали на слайд-проекторе ( $96 \text{ кДж/м}^2$ ). Изображения были получены при помощи видео-интенсификационной микроскопии. Панели а, b, с, d представляют собой профили распределения уровней градаций серого (интенсивность) вдоль линий, пересекающих клетки на панелях А, В, С, D, соответственно. Масштабная планка на панели А – 10 мкм. Результаты получены совместно с Т.В. Ахлыниной.

Проведенные исследования показали перспективность использования конструкций, доставляющих ФС внутрь клетки-мишени путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза, и осуществляющих последующий выход из эндосом, а также транспорт в ядро для усиления фотодинамического действия ФС.

Приведенные в разделе 4.1.3 результаты опубликованы в статьях: Rosenkranz A.A., Antonenko Y.N., Smirnova O.A., Yurov G.K., Naroditsky B.S., Sobolev A.S. (1997) Avian Adenovirus Induces Ion Channels in Model Bilayer Lipid Membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 750-3 (вклад автора состоит в идее работы, участии в планировании экспериментов и анализе результатов, выполнении части экспериментов, в написании статьи); Akhlynina T.V., Jans D.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I.,

Rosenkranz A.A., Naroditsky B.S., Sobolev A.S. (1999) Adenovirus synergise with nuclear localisation signals to enhance the nuclear delivery and photodynamic action of internalizable conjugates containing chlorin  $e_6$ . *Int. J. Cancer.*, **81**, 734-40 (вклад автора состоит в выполнении части экспериментов, в частности в синтезе конъюгатов и ВИМ, участии в анализе результатов и участии в написании статьи). Автор выражает искреннюю признательность всем коллегам, участвовавшим в работе.

#### **4.2. Создание модульных рекомбинантных транспортеров для доставки лекарственных веществ в ядра опухолевых клеток-мишеней**

Опираясь на полученные результаты, А.С. Соболев предложил схему создания модульных нанотранспортеров (МНТ) представляющих собой рекомбинантные полипептидные конструкции, состоящие из нескольких модулей с различными функциями:

- лигандного модуля с лигандом к сверхэкспрессированным на поверхности опухолевых клеток интернализуемым рецепторам;
- модуля, обеспечивающего выход конструкции из эндосом;
- модуля, обеспечивающего транспорт в ядро;
- модуля-носителя для присоединения действующего начала и объединения всех остальных модулей в единое целое.

Для реализации такой схемы необходимо выбрать подходящие варианты модулей, способ их объединения в единое целое и порядок расположения.

В настоящее время известен целый ряд интернализуемых поверхностных рецепторов, экспрессия которых увеличена на различных типах опухолевых клеток. К ним относятся в первую очередь рецепторы различных ростовых факторов, регулирующих деление клеток различных типов: рецепторы семейства эпидермального фактора роста (erbB), рецепторы факторов роста фибробластов, рецепторы фактора роста нервов, различных интерлейкинов, c-Kit и многие другие. Для первой серии модульных нанотранспортеров была выбрана в качестве лигандного модуля последовательность  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона ( $\alpha$ -МСГ), экспрессия рецептора к которому увеличена в подавляющем числе меланом человека. Эта короткая последовательность (13 а.к.) одинакова у человека, мыши и ряда других млекопитающих, что позволяет использовать один и тот же модуль как в экспериментах с экспериментальными опухолями лабораторных животных, так и делает возможным применение тех же конструкций для лечения онкологических заболеваний человека в случае проведения успешных экспериментов на животных.

В качестве эндосомолитического модуля после анализа литературных данных и проведения ряда предварительных экспериментов был выбран транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс), который способен к нарушению целостности липидного бислоя в слабокислой среде. При поступлении внутрь клетки-мишени путем рецептор-опосредованного эндоцитоза МНТ оказываются в эндосомах, клеточном компартменте, внутреннее содержимое которого закисляется за счет работы протонной помпы, поэтому способность ДТокс разрушать липидный бислой в слабокислой среде должна способствовать выходу МНТ из эндосом в цитозоль до того как содержимое эндосом поступит в лизосомы, где подвергнется воздействию различных литических ферментов. В качестве альтернативного эндосомолитического модуля в предварительных экспериментах была использована также амфипатическая последовательность GALA.

В качестве модуля, обеспечивающего транспорт в ядро, был использован оптимизированный сигнал ядерной локализации (СЯЛ) большого Т-антигена вируса SV40 с фланкирующим с N-конца регуляторным участком:

SS<sup>112</sup>DDEATADAQHA<sup>124</sup>PPKKKRKVEDP

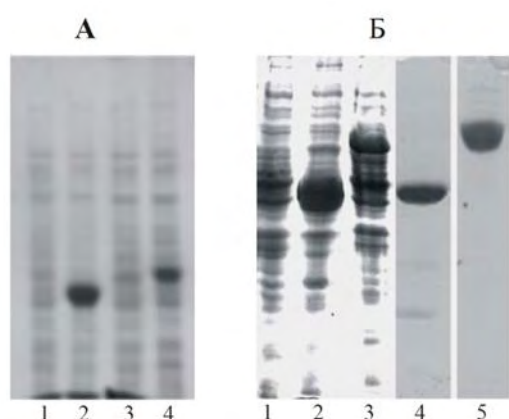
где числа относятся к аминокислотной последовательности Т-антигена, его минимальный СЯЛ подчеркнут (а.к. с 126 по 132), серин-112 – сайт фосфорилирования протеинкиназой СК2, ускоряющей ядерный импорт; аланин-124 (замещающий природный треонин – сайт фосфорилирования протеинкиназой Cdc2, ингибирующей ядерный импорт).

В качестве модуля носителя был использован гемоглобиноподобный белок *E. coli*, HMP, который служит для объединения модулей в единое целое и их пространственного разнесения, а также обеспечивает достаточный выход вариантов МНТ в растворимой фракции.

Схема генно-инженерной сборки различных МНТ была разработана В.Г. Луниным. Каждый генный модуль, кодирующий соответствующий полипептидный модуль, был сконструирован согласно следующей общей схеме: сайт *Vam*HI – модуль – сайт *Bgl*III – стоп-кодон – сайт *Hind*III. Эта схема позволяет помещать каждый генный модуль в любое место химерного гена, т.к. он фланкирован рестриктными сайтами *Vam*HI и *Bgl*III, имеющими одинаковые липкие концы. Все конструкции были собраны последовательным клонированием, и полученные плазмиды были поставлены под контроль сильного промотора бактериофага T5.

Особенностью  $\alpha$ -МСГ, требующей помещения его на С-конце МРТ, является то, что лишь модификация N-конца  $\alpha$ -МСГ не приводит к существенной потере как способности связываться с рецептором, так и его биологической активности в целом

(Sahm et al., 1994; Wen et al., 1991b). Последовательность транслокационного домена ДТокс была взята с прилегающим к нему природным спейсером, разделяющим домены природного дифтерийного токсина. Для проверки функционирования был получен ряд конструкций как со всеми четырьмя модулями: ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ, *GALA-HMP*-СЯЛ-МСГ, так и неполные: *HMP*-СЯЛ-МСГ, ДТокс-*HMP*, *HMP*. Уровень экспрессии МРТ в *E. coli* варьировал от 5-8% для *GALA-HMP*-СЯЛ-МСГ до 20-30% для *HMP*-СЯЛ-МСГ и ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ, полученные конструкции были очищены хроматографически (рис. 4.5).



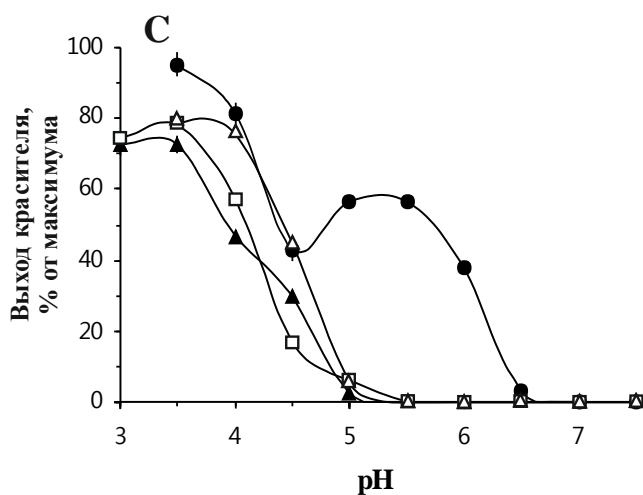
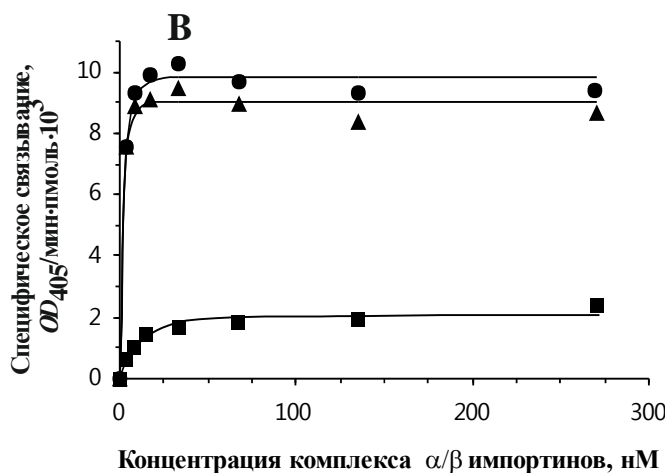
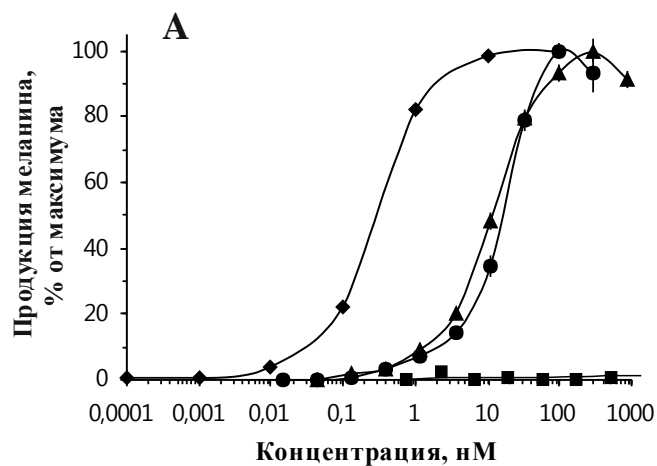
**Рисунок 4.5. Экспрессия МНТ и их очистка.** А - лизат штаммов *E. coli*, трансфицированных плазмидами, несущими ген *HMP-СЯЛ-МСГ* (1,2) или ДТокс-*HMP-СЯЛ-МСГ* (3,4) до индукции синтеза МНТ (1,3) и после индукции (2,4). Б - очистка МНТ: лизат исходного штамма *E. coli* (1), неочищенные (2,3) и очищенные (4,5) МНТ: *HMP-СЯЛ-МСГ* (2,4) и ДТокс-*HMP-СЯЛ-МСГ* (3,5). Электрофорез по Лэммли в 7% (А) и 10% (Б) полиакриламидном геле. Результаты получены совместно с В.Г. Луниным, О.В. Сергиенко, О.Л. Ворониной.

Для определения возможности функционирования каждого модуля в составе МНТ были проведены эксперименты на модельных системах.

МСГ и его аналоги способны вызывать индукцию синтеза меланина в клетках меланоцитарного ряда (Siegrist and Eberle, 1986). Индукция меланогенеза в клетках мышинной меланомы В16-F1 показала, что МНТ способны взаимодействовать с меланокортиновыми рецепторами этих клеток и вызывать в них биологический ответ (рис. 4.6А). Концентрации полумаксимального эффекта ( $EC_{50}$ ) для обоих МНТ были близки:  $13,5 \pm 0,5$  нМ для *HMP-СЯЛ-МСГ* и  $17 \pm 2$  нМ для ДТокс-*HMP-СЯЛ-МСГ*;  $EC_{50}$  для немодифицированного МСГ была  $0,36 \pm 0,05$  нМ. Рекомбинантные полипептиды, аналогичные по дизайну вышеупомянутым, но не содержащие в своем составе последовательности МСГ, не вызывали индукции меланогенеза в клетках В16-F1.

Как показало исследование взаимодействия МРТ с комплексом  $\alpha/\beta$ -импортинов, опосредующих цитоплазмально-ядерный транспорт, СЯЛ в их составе сохранил способность связываться с импортинами (рис. 4.6В): константа диссоциации ( $K_d$ ) для комплекса  $\alpha/\beta$ -импортинов с *HMP-СЯЛ-МСГ* была  $1,9 \pm 0,4$  нМ, а с ДТокс-*HMP-СЯЛ-МСГ* –  $2,5 \pm 0,7$  нМ, что характерно для белков, содержащих СЯЛ большого Т-антигена вируса SV-40:  $K_d$  около 2 нМ (Hubner et al., 1997).





**Рисунок 4.6. Проверка функционирования модулей МНТ.** А – концентрационная зависимость индукции меланогенеза в клетках В16-F1 при добавлении МНТ, В – связывание МНТ с  $\alpha/\beta$ -импортин-GST гетеродимером, С – выход кальцеина из липосом, индуцированный МНТ. ◆ – свободный МСГ, ▲ – HMP-СЯЛ-МСГ, ● – ДТокс-HMP-СЯЛ-МСГ, ■ – ДТокс-HMP, △ – GALA-HMP-СЯЛ-МСГ, □ – HMP. Данные, представленные на панели В, получены в результате совместных работ с Дэвидом Янсом (D.A. Jans) Анной Джон (A.P. John); результаты, представленные на панели С, с А.А. Кофнер.

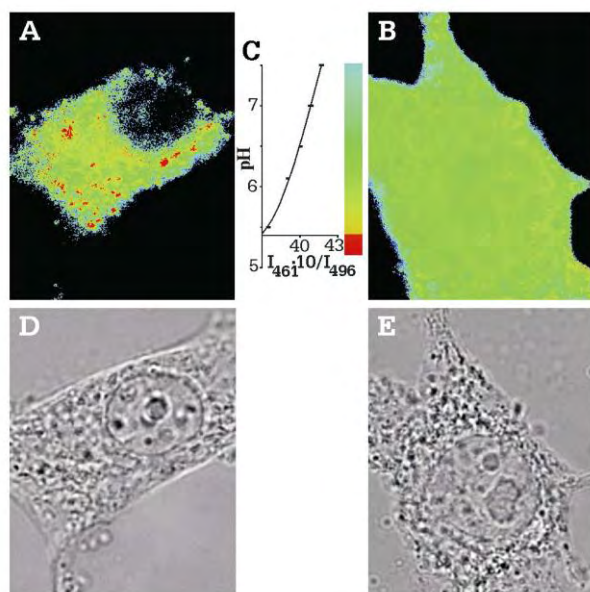
МНТ, попадающие в клетки-мишени путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза, оказываются в эндосомах – замкнутых мембранных структурах со слабокислым рН, – из которых им нужно выйти в цитозоль для эффективного взаимодействия с импортинами. Для оценки способности полипептида в кислой среде образовывать поры в мембранах обычно исследуют выход флуоресцентного красителя из нагруженных им липосом при различных рН (Nir and Nieva, 2000). Опыты на нагруженных кальцеином липосомах показали, что полумаксимальный эффект GALA-НМР-СЯЛ-МСГ наблюдается около рН 4,5 (рис. 4.6С), более кислом, чем в эндосомах (Wang et al., 2017a). Выход кальцеина под влиянием ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ (рис. 4.6С) был обнаружен в 2-х диапазонах рН: от 3,5 до 4,5, что, по-видимому, обусловлено наличием НМР в составе полипептида (рис. 4.6В), и от 4,5 до 6,5. Последний максимум, предположительно связанный с наличием модуля ДТокс, вызывает образование пор при рН, близких к эндосомным (Wang et al., 2017a).

Исследование проводимости бислоевых фосфатидилхолиновых мембран, проведенное Ю.Н. Антоненко и Т.И. Рокицкой, выявило, что при добавлении МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ при рН 5,5, но не 7,5, происходит образование крупных нерегулярных пор с проводимостью 2-5 нСм. Такой уровень проводимости соответствует порам диаметром в несколько нанометров (Cruickshank et al., 1997), что может обеспечить как проникновение кальцеина, так и более крупных молекул.

Для проверки возможности использования полученных МНТ для доставки действующего начала в ядра опухолевых клеток-мишеней к МНТ были ковалентно присоединены ФС хлорин  $e_6$  или же бактериохлорин  $p$  (БХ  $p$ ). Ковалентное присоединение ФС не влияло на функциональную активность модулей МРТ.

Исследование локализации и мест внутриклеточного фотодинамического действия ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ-ФС и НМР-СЯЛ-МСГ-ФС в клетках меланомы показало, что МНТ накапливаются в клетках и характер этого накопления зависит от наличия функционального эндосомолитического модуля в составе МНТ. Наличие ДТокс обуславливает диффузный характер флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина, возникающей в результате генерации активных форм кислорода в клетках, тогда как без такого компонента в составе МНТ флуоресценция сосредоточена в отдельных участках цитоплазмы, отражая, по-видимому, накопление МНТ в эндоцитозных компартментах. Видеоинтенсификационная микроскопия отношения изображений показала, что рН этих участков ниже 5,4, что свидетельствует о нахождении ФС, доставленного в клетку МНТ НМР-СЯЛ-МСГ находится в основном в замкнутых клеточных компартментах с кислой средой (рис. 4.7). Присутствие эндосомолитического модуля ДТокс перемещает места генерации активных форм кислорода, генерация активных форм кислорода происходит не

только по всей цитоплазме клеток, но и в ядре. После добавления *HMP*-СЯЛ-МСГ-(БХ) флуоресценция 2',7'-дихлорфлуоресцеина выявлялся в ядрах лишь 12,2% клеток, тогда как после добавления ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ-(БХ) – в ядрах 87,5% клеток ( $p < 0,05$ ).

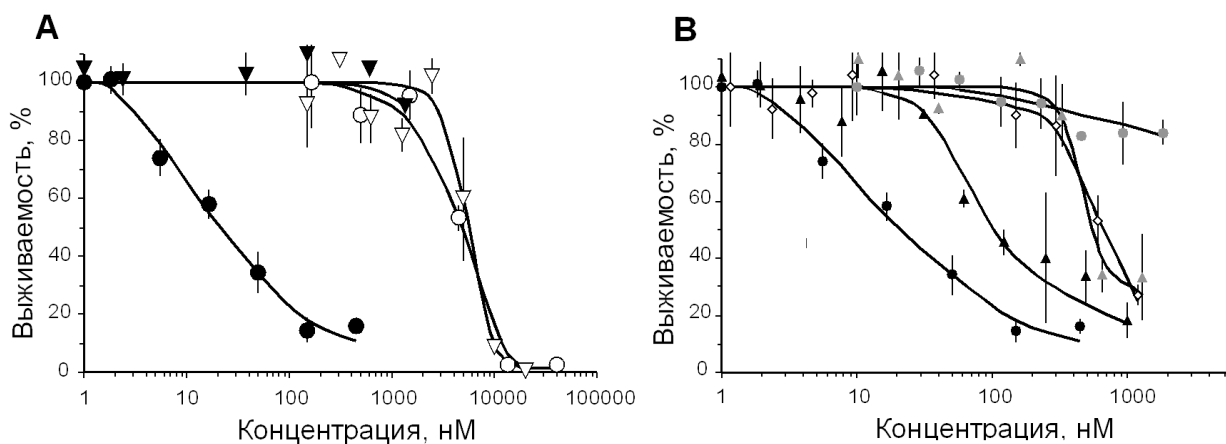


**Рисунок 4.7. pH-зависимость микроокружения МНТ в клетках меланомы. А и D – *HMP*-СЯЛ-МСГ, В и Е – ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ, С – зависимость отношения интенсивности флуоресценции ( $I$ ) при двух длинах волн – 461 нм и 496 нм от pH и соответствующая шкала условных цветов для панелей А и В. D и Е изображение в проходящем свете тех же клеток, что на панелях А и В, соответственно. Клетки меланомы Клаудмана S91, клон М3, были проинкубированы с МНТ и места генерации активных форм кислорода и pH микроокружения были выявлены по флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Результаты получены совместно с М.А.**

Шумянцевой.

#### 4.2.1. Исследование фотоцитотоксичности фотосенсибилизаторов, присоединенных к модульным нанотранспортерам

Исследование фотоцитотоксического действия на клетках мышиной меланомы В16-F1 показало, что включение ФС в состав МНТ многократно увеличивает их эффективность (рис. 4.8). Концентрация полумаксимального действия ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ-(бактериохлорин  $p$ ) на этих клетках была более чем на 2 порядка ниже, чем для свободного бактериохлорина  $p$ . В то же время нормальные фибробласты мыши линий СЗН/10Т1/2 (рис. 4.8) не повреждались конъюгатом ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ-(бактериохлорин  $p$ ) в тех концентрациях, в каких он был эффективным на клетках меланомы, что доказывает клеточную специфичность использованного МНТ. Свободный бактериохлорин  $p$  оказывал фотоцитотоксическое действие примерно в том же диапазоне концентраций, что и на клетках меланомы В16-F1 (рис. 4.8). Проведенные исследования показали возможность создания модульных полипептидных конструкций для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней, которые можно получать при помощи экспрессии кодирующей конструкции гена и перспективность ее для доставки ФС и уничтожения клеток с повышенной экспрессией МС1R. Открытым, однако, оставался вопрос о возможности использования такого типа конструкций для рецепторов другого типа.



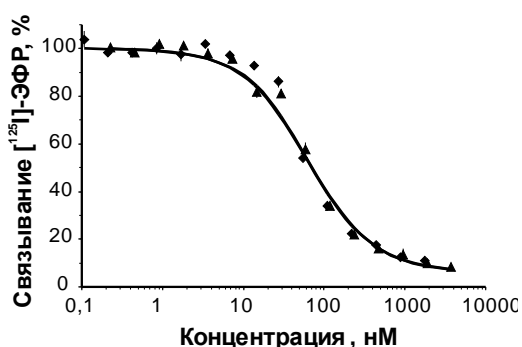
**Рисунок 4.8. Усиление фотоцитотоксической активности в результате доставки ФС бактериохлорина *p* в опухолевые клетки-мишени. А** – клеточная специфичность цитотоксического действия МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ с присоединенным ФС бактериохлорином *p*. **В** – сравнение действия разных по набору модулей МНТ с присоединенным ФС бактериохлорином *p* на клетки меланомы мыши В16-F1. (●) – действие МНТ-ФС на клетки меланомы мыши В16-F1 и на нормальные фибробласты мыши СЗН/10Т1/2 (▼), а также свободного бактериохлорина *p* на клетки меланомы (○) и фибробласты (▽), (▲) – НМР-СЯЛ-МСГ, (◇) – НМР-МСГ, (▲) – ДТокс-МСГ, (●) – ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ без присоединенного ФС. Часть результатов получена совместно с А.А. Кофнер.

Результаты раздела 4.2.1 опубликованы в статьях: Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., Jans D.A., Sobolev A.S. (2003) Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity. *FASEB J.* 17, 1121-3, полная версия: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.02-0888fje> (вклад автора состоит разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, методов определения активности лигандного и эндосомолитического модуля, руководстве частью работ, выполнении части работ, включая определение цитотоксичности, ВИМ, измерение активности модулей, анализе результатов, участии в написании статьи); Розенкранц А.А., Лунин В.Г., Сергиенко О.В., Гилязова Д.Г., Шумянцева М.А., Воронина О.Л., Янс Д.Э., Кофнер А.А., Миронов А.Ф., Соболев А.С. (2003) Направленная внутриклеточная доставка локально действующих лекарств: Специфическая доставка фотосенсибилизаторов в ядра клеток меланомы. *Генетика*, 39, 259-68 (вклад автора состоит разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, разработке методов определения активности лигандного и эндосомолитического модуля, руководстве частью работ, выполнении части работ, анализе результатов, участии в написании статьи); Khramtsov Y.V., Rokitskaya T.I., Rosenkranz A.A., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Antonenko Y.N., Sobolev A.S. (2008) Modular

drug transporters with diphtheria toxin translocation domain form edged holes in lipid membranes. *J. Control. Release* **128**, 241-7 (вклад автора состоит в получении МНТ для исследования, проведении экспериментов с липосомами, анализе получаемых результатов, участии в написании статьи). Автор признателен всем коллегам, без идей и работы которых эти результаты не могли быть получены.

#### 4.2.2. Модульные нанотранспортеры с эпидермальным фактором роста в качестве лигандного модуля

Другим вариантом МНТ, сделанным по такому же принципу, были конструкции, предназначенные для доставки лекарственных средств в клетки различных карцином с повышенной экспрессией рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), принадлежащему к семейству *erbB*-рецепторов. Этот рецептор часто сверхэкспрессирован на клетках различных новообразований человека (рак легких, рак молочной железы, глиома, опухоли головы и шеи, мочевого пузыря, и др.). Используя уже опробованную схему создания МНТ, был получен ряд конструкций, в том числе ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, НМР-СЯЛ-ДТокс-ЭФР, а также ряд неполных по составу модулей конструкций. Проверка функциональности модулей показала, что все они сохраняют свою активность. Лигандный модуль сохранял способность к специфическому связыванию с рецепторами ЭФР на поверхности клеток А431 с константой диссоциации около 20 нМ (рис. 4.9). МНТ не менял своего сродства в результате лиофилизации (рис. 4.9), и был способен к хранению в течение не менее 1,5 лет в холодильнике.

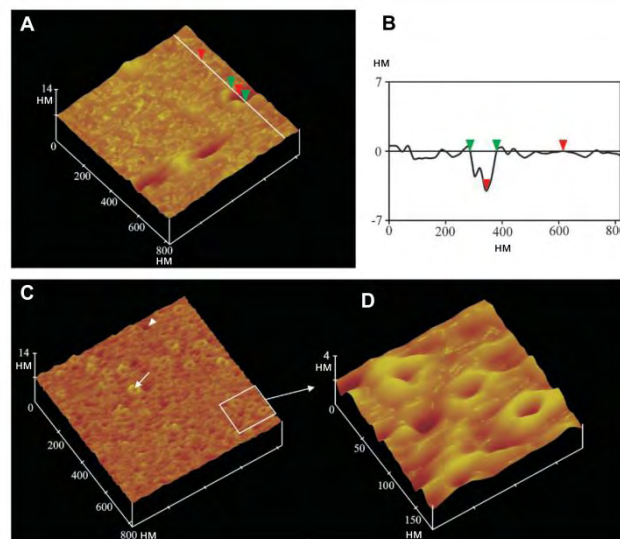


**Рисунок 4.9.** Конкурентное связывание [<sup>125</sup>I]-ЭФР и МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с клетками эпидермоидной карциномы человека А431. (▲) – МНТ после выделения (◆) – МНТ после лиофилизации и растворения. Константа сродства, рассчитанная при помощи нелинейного оценивания параметров для свежеочищенного МНТ –  $K_a = (0,054 \pm 0,050) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , для лиофилизованного  $(0,046 \pm 0,050) \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

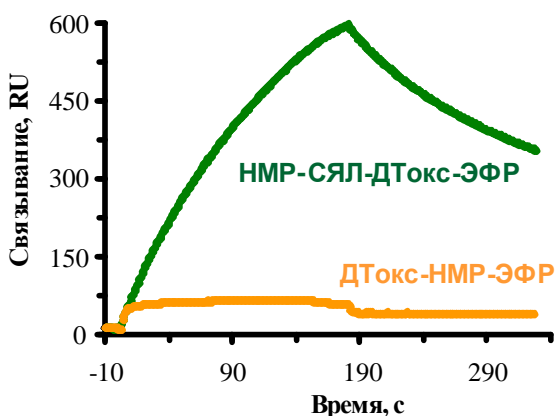
Оба варианта полноразмерного МНТ с ЭФР в качестве лигандного модуля обладали способностью к нарушению целостности липидного бислоя в слабокислой среде (рН 5-6). Кроме этого, как показали исследования, выполненные с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) на бислоях из фосфатидилхолина с целью прояснения механизма нарушения целостности бислоя, полноразмерный МНТ в слабокислой среде был способен встраиваться в бислои и образовывать в нем кольцевые структуры и поры большего размера, пронизывающие бислои насквозь (рис. 4.10). Как свидетельствуют результаты исследования взаимодействия анти-МНТ, присоединенных к кантилеверу

атомно-силового микроскопа с этими кольцевыми структурами, выступающими над поверхностью бислоя, эти структуры состоят из молекул МНТ. Исходя из гидродинамического размера МНТ ( $10,6 \pm 0,5$  нм) было оценено, что эта кольцевая пора, образующаяся в слабодиссоциированной среде, состоит из  $11 \pm 2$  молекул МНТ.

**Рисунок 4.10. Образование пор в липидном бислое, вызванное добавлением МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР при pH 5,5.** **А** – 3D-реконструкция поверхности бислоя из яичного фосфатидилхолина, полученная при помощи АСМ в контактном режиме; **В** – сечение изображения, представленного на панели А. Вертикальные и горизонтальные размеры поры отмечены красными и зелеными метками; **С** – 3D-реконструкция поверхности бислоя, полученная по результатам АСМ в полуконтактном режиме, белые метки указывают на характерные кольцевые структуры. **Д** – увеличенная часть изображения, выделенная на панели С. Представленные результаты получены совместно с Ю.В. Храмцовым.



Для проверки работоспособности модуля, обеспечивающего транспорт в ядро у созданной серии конструкций, были проведены эксперименты по исследованию взаимодействия МНТ и комплекса  $\alpha/\beta$ -импортинов, методом поверхностного плазмонного резонанса. Различные МНТ были ковалентно присоединены к чипу CM-5, после чего было изучено связывание комплекса импортинов с модифицированным чипом при разных



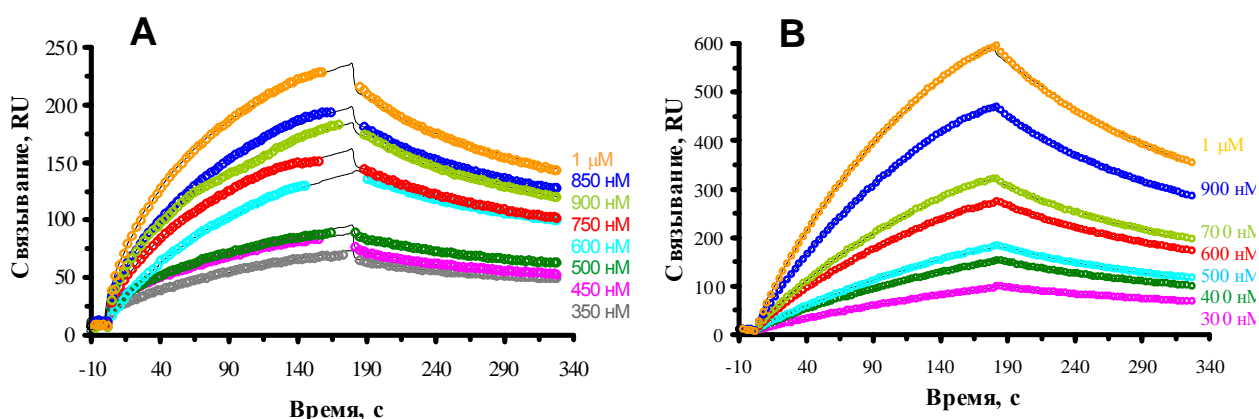
концентрациях. Только те МНТ, в состав которых входил СЯЛ, взаимодействовали с комплексом импортинов (рис. 4.11).

**Рисунок 4.11. Взаимодействие комплекса импортинов с полным МНТ НМР-СЯЛ-ДТокс-ЭФР и с МНТ ДТокс-НМР-ЭФР, дефицитным по сигналу ядерной локализации.** Концентрация комплекса импортинов 1 мкМ. Результаты получены совместно с Д.Г. Гилязовой.

Проведенные расчеты показали, что полученные данные плохо соответствуют модели простого ленгмюровского связывания, но могут быть описаны моделью с промежуточным состоянием (рис. 4.12). Константа сродства  $K_a$ , рассчитанная по этой

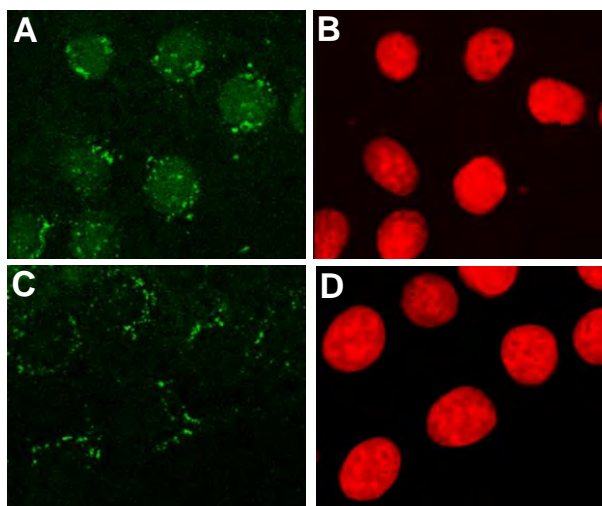


модели, была  $3,06 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  для ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР и  $1,57 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  для НМР-СЯЛ-ДТокс-ЭФР.



**Рисунок 4.12. Взаимодействие МНТ с возрастающими концентрациями гетеродимера импортинов.** А – ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, В – НМР-СЯЛ-ДТокс-ЭФР. Экспериментальные данные, использованные в расчетах, обозначены цветными символами, результат аппроксимации – сплошной линией. Результаты получены совместно с Д.Г. Гилязовой.

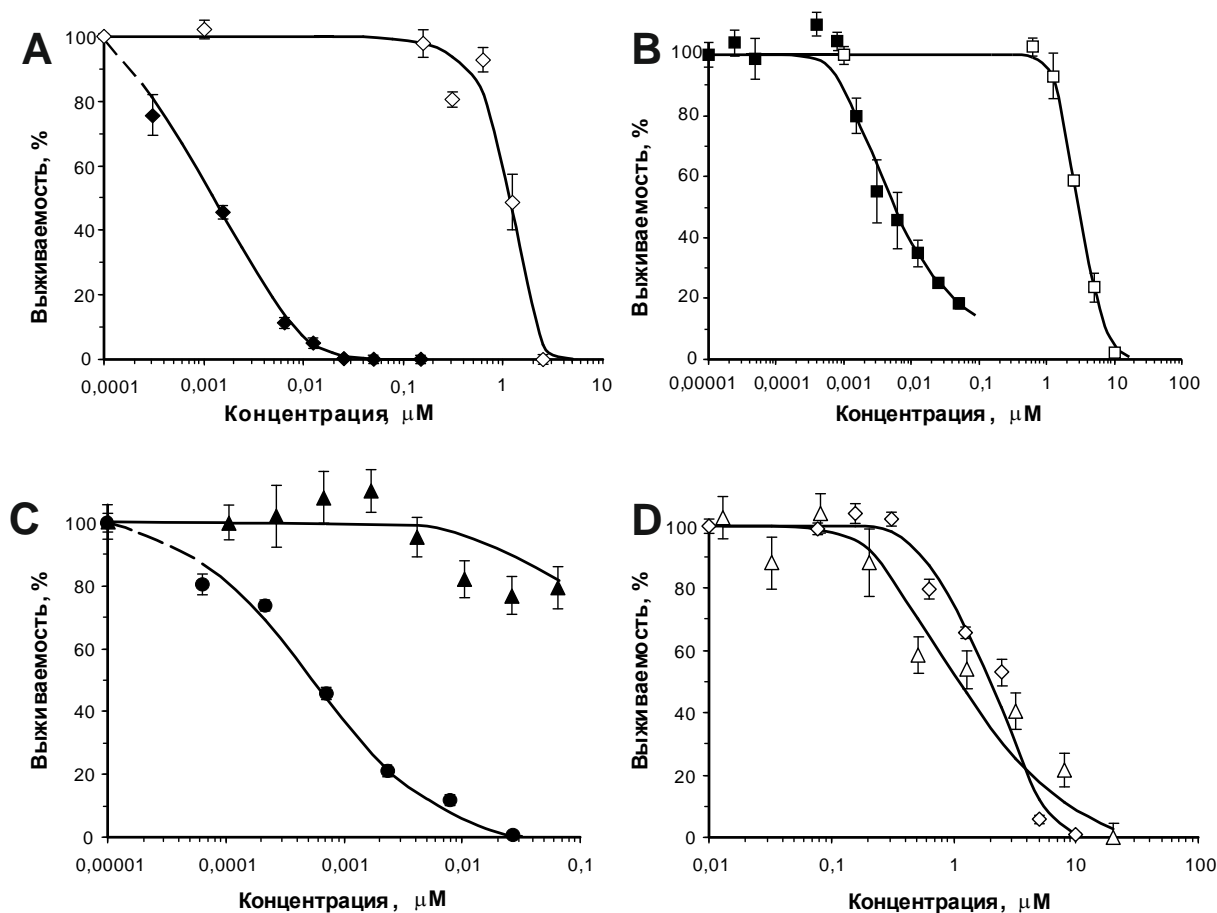
Работоспособность модулей в клетке подтверждают данные, о распределении МНТ, полученные иммунофлуоресцентным методом при помощи КЛСМ (рис. 4.13).



**Рисунок 4.13. Внутриклеточное распределение МНТ в клетках А431, определенное при помощи непрямой иммунофлуоресценции КЛСМ.** А, В – ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР; С, D – ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР; А, С – иммунофлуоресцентные изображения, полученные с помощью микроскопа TSC SP2; В, D – изображения тех же клеток, прокрашенных красителем ToPro 3, специфичным для клеточных ядер. 200 нМ МНТ, были проинкубированы с клетками в течение 4 часов, отмыты, проинкубированы в течение 3 часов, зафиксированы и прокрашены антителами на МНТ и ToPro 3. Результаты получены совместно с Д.Г. Гилязовой.

Исследование генерации АФК после облучения ФС (бактериохлорина  $p$  и хлорина  $e_6$ ) с помощью спиновых ловушек показало, что ковалентное присоединение ФС к МНТ не вызывает уменьшение продукции  $^1\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  и  $\cdot\text{O}_2^-$  (получено совместно с К.Н. Тимофеевым и Е.О. Артеменко).

Проведенные серии экспериментов показали, что все модули МНТ с ЭФР в качестве лигандного модуля сохраняют необходимые функциональные свойства, в том числе в клетках-мишенях в культуре. ФС, присоединенные к таким полноразмерным МНТ, многократно (до 3000 раз) раз усиливают свое цитотоксическое действие (рис. 4.14).



**Рисунок 4.14. Фотоцитотоксичность и клеточная специфичность ФС, транспортируемых МНТ, по сравнению со свободными ФС.** А – фотоцитотоксичность ДТокс-СЯЛ-НМР-ЭФР-(хлорин  $e_6$ ) (◆) и свободного хлорина  $e_6$  (◇) на клетках А431; В – фотоцитотоксичность НМР-СЯЛ-ДТокс-ЭФР-(бактериохлорин  $p$ ) (■) и свободного бактериохлорина  $p$  (□) на клетках А431; С – фотоцитотоксичность ДТокс-СЯЛ-НМР-ЭФР-(хлорин  $e_6$ ) на раковых клетках А431 (●) и фибробластах НИН 3Т3 (▲) (2); D – свободный хлорин  $e_6$  на раковых клетках А431 (◇) и фибробластах НИН 3Т3 (Δ). Результаты получены совместно с Д.Г. Гилязовой.

Результаты раздела 4.2.1 опубликованы в статьях: Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G, Sergienko O.V., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., Sobolev A.S. (2005) Recombinant modular transporters on the basis of epidermal growth factor for targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Proc. SPIE*, **5973**, 101-10 (вклад автора состоит в руководстве частью работ, разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, выполнении части работ, включая радиолигандный анализ, исследования на липосомах, ВИМ, анализе результатов, участии в написании статьи); Артеменко Е.О., Гилязова Д.Г., Розенкранц А.А., Лунин В.Г., Сергиенко О.В., Тимофеев



К.Н., Грин М.А., Миронов А.Ф., Рубин А.Б., Соболев А.С. (2005) Влияние присоединения бактериохлорина р к модульным рекомбинантным транспортерам для направленной внутриклеточной доставки на эффективность его фотодинамического действия. *Молекулярная медицина*, № 4, 43-7 (вклад автора состоит в руководстве частью работ, разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, выполнении части работ, включая радиолигандный анализ, исследования на липосомах, КЛСМ, анализе результатов, участии в написании статьи); Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., Sergienko O.V., Khramtsov Y.V., Timofeyev K.N., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., Georgiev G.P., Sobolev A.S. (2006) Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters. *Cancer Res.*, **66**, 10534-40 (вклад автора состоит в руководстве частью работ, разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, выполнении части работ, анализе результатов, участии в написании статьи); Khramtsov Y.V., Rokitskaya T.I., Rosenkranz A.A., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Antonenko Y.N., Sobolev A.S. (2008) Modular drug transporters with diphtheria toxin translocation domain form edged holes in lipid membranes. *J. Control. Release* **128**, 241-7 (вклад автора состоит в получении препаратов МНТ, включая исследования на липосомах, анализе результатов, участии в написании статьи). Автор признателен всем коллегам-соавторам, без которых эти результаты не могли быть получены.

#### **4.3. Фотодинамическая терапия экспериментальных опухолей с помощью фотосенсибилизаторов, присоединенных к модульным нанотранспортерам**

Увеличения специфической фотоцитотоксичности по отношению к опухолевым клеткам-мишеням в культуре недостаточно для утверждения о возможности получения эффективного лекарственного средства. Необходимым этапом проводимых работ является проверка возможности эффективной терапии экспериментальных опухолей лабораторных животных.

Одним из важных свойств транспортеров для доставки лекарств является их собственная токсичность. Проведенные эксперименты не выявили заметной токсичности МНТ при введении мышам. Внутривенное введение максимально достижимой по объему и растворимости дозы ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ (7,5 мг на животное) не вызывало ни гибели животных, ни заметных изменений в поведении животных. Не приводило к нежелательным последствиям и многократное, до 5-6 раз введение МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ и ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в дозах 1-3 мг на животное. Введение 4 мг ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР не выявило макроскопических патологических изменений в органах животных по сравнению с введением физиологического раствора.

Для проведения успешной противоопухолевой ФДТ наибольшее значение имеет соотношение содержания препарата в опухоли и окружающих тканях. Для меланомы это в первую очередь кожа и мышцы. Для подбора оптимальных условий проведения терапии экспериментальных меланом радиоактивно меченный  $^{125}\text{I}$  МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ был внутривенно введен мышам C57Black/6J с подкожной меланомой B16-F1. Специфичность накопления МНТ в опухоли увеличивалась с увеличением вводимой дозы и времени, прошедшего после инъекции (табл. 4.1, 4.2).

**Таблица 4.1.** Отношение активности  $^{125}\text{I}$  в опухоли B16-F1 к окружающим тканям в зависимости от времени, прошедшего после внутривенного введения мышам меченого  $^{125}\text{I}$  МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в дозе 0,5 мг/кг; среднее  $\pm$  стандартная ошибка (n=3).

Время после введения меченого МНТ	Отношение активности	
	Опухоль/мышца	Опухоль/кожа
1 ч 10 мин	2,2 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,8
3 ч	4,7 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4
15 ч	6,9 $\pm$ 1,7	3,3 $\pm$ 0,5

Представленные эксперименты проведены совместно с П.В. Гулаком и Т.А. Слостниковой.

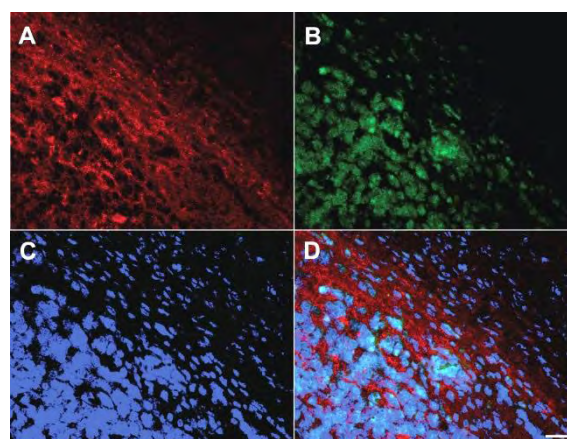
**Таблица 4.2.** Отношение накопленной активности  $^{125}\text{I}$  в опухоли B16-F1 к окружающим тканям через 3 часа после внутривенного введения меченого МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ; среднее  $\pm$  стандартная ошибка (n=3).

Количество введенного меченого МНТ, мг/кг	Отношение радиоактивности:	
	Опухоль/мышца	Опухоль/кожа
0,5	4,7 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4
9,7	8,2 $\pm$ 2,0	9,8 $\pm$ 1,8
38,6	13,4 $\pm$ 1,7	4,9 $\pm$ 2,3

Представленные эксперименты проведены совместно с П.В. Гулаком и Т.А. Слостниковой.

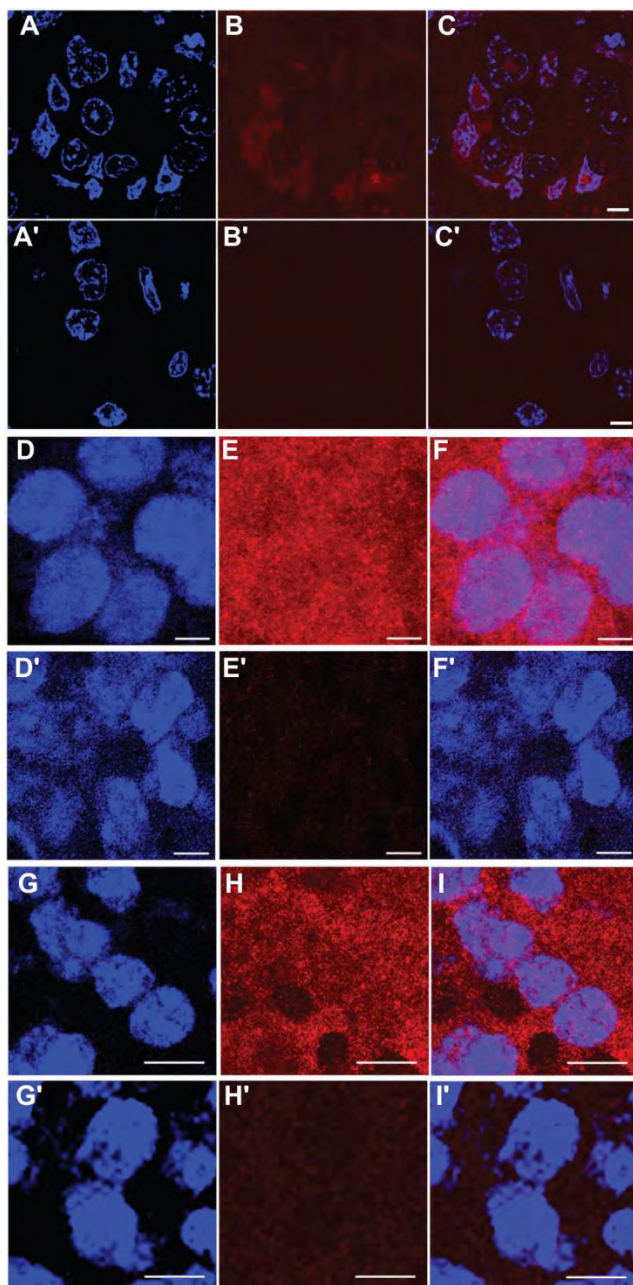
Общее количество накопленного препарата уменьшалось со временем, поэтому для дальнейшей работы чаще всего использовали 3 часа после введения МНТ. Изучение локализации МНТ в опухоли B16-F1 через 3 часа после введения методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью КЛСМ показало его интенсивное накопление в опухоли, в том числе совпадающее с локализацией ядер опухолевых клеток (рис. 4.15).

**Рисунок 4.15.** Распределение МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в сингенной меланоме мыши и прилегающей ткани через 3 часа после последнего внутривенного введения: **А** – результат регистрации непрямой иммунофлуоресценции клеток, окрашенных антителами к МНТ; **В** – результат регистрации флуоресценции зеленого флуоресцентного белка, экспрессирующегося в клетках



меланомы; **С** – выявление ядер с помощью ДНК-специфичного флуоресцентного красителя DAPI; **Д** – результат наложения трех каналов флуоресценции. Объектив 40х, NA=1,3, масштабная планка 20 мкм. Представленные данные получены совместно с Т.А. Слостниковой.

Для более достоверного определения внутриклеточного распределения МНТ *in vivo* изображения срезов тканей были сняты при помощи объектива 63х. Изображения срезов тканей трех видов опухолей с повышенной экспрессией рецепторов ЭФР (эпидермоидная карцинома человека А431) и меланокортиновых рецепторов первого типа (мышинные меланомы В16-F1 и Клаудмана S91, клон М3), полученных из опухолевой ткани спустя 3 часа после внутривенного введения МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР (эпидермоидная карцинома) и ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ (меланомы) свидетельствуют о том, что *in vivo* МНТ достигают ядер злокачественных клеток-мишеней (рис. 4.16).

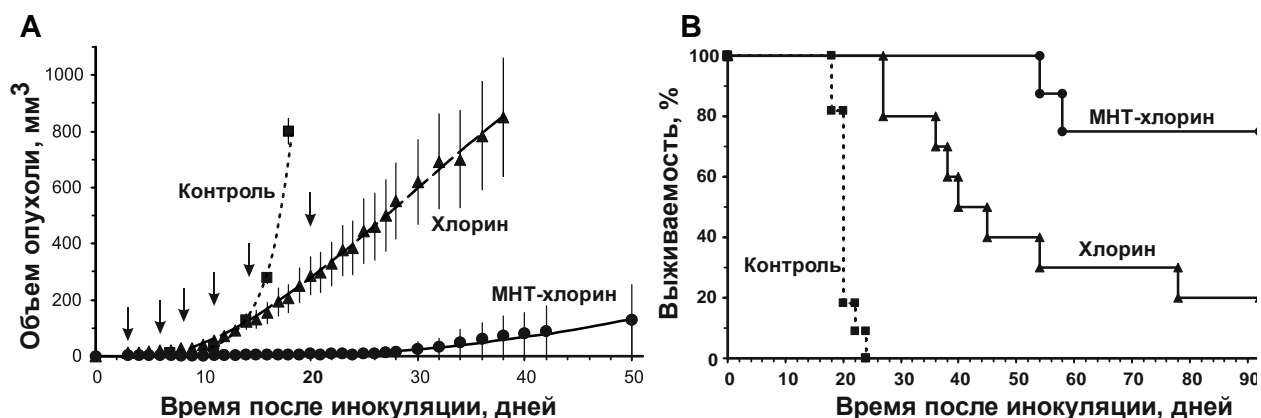


**Рисунок 4.16. Внутриклеточное распределение МНТ в срезах опухолей.** **А – С** –распределение ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР–(хлорин  $e_6$ ) спустя 3 часа после внутривенного введения в клетках опухоли карциномы А431, 2-3 мкм срезы опухолей, полученные от мышей линии Balb/c *ByJCo-nu/nu* с привитой эпидермоидной карциномой человека А431 через 3 часа после внутривенного введения; **А' – С'** – то же, что и **А – С**, только после введения животным PBS без МНТ; **Д – Е** – 10 мкм срезы опухолей, полученные от мышей линии C57Black/6J с привитой сингенной меланомой В16-F1 после внутривенного введения ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ; **Д' – Е'** – то же, что и **Д – Е** после введения животным PBS без МНТ; **Г – I** – 10 мкм срезы опухолей, полученные от мышей линии DBA/2 с привитой сингенной меланомой Клаудмана S91 после внутривенного введения ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ, **Г' – I'** – то же, что и **Г – I**, только после введения животным PBS без МНТ. **А, А', Д, Д', Г, Г'** - выявление ядер с помощью ДНК-специфичного флуоресцентного красителя DAPI (синий); **В, В', Е, Е', Н, Н'** – результат регистрации непрямо́й иммунофлуоресценции (вторичные антитела, меченные Alexa555) срезов, окрашенных антителами к МНТ (красный); **С, С', F, F', I, I'** – наложение каналов флуоресцентных изображений ядер (синий) и непрямо́й

иммунофлуоресценции МНТ (красный). Масштабная планка – 10 мкМ. Представленные данные получены совместно с Т.А. Сладниковой.

Количественная оценка изображений клеток и ядер меланомы Клаудмана показывает, что в  $97,8 \pm 0,2\%$  участков цитоплазмы клеток меланомы и в  $84,3 \pm 0,1\%$  ядер регистрируется сигнал от антител к МНТ. В прилегающих к опухоли нормальных тканях сигнал от МНТ был зарегистрирован в  $35,6 \pm 0,3\%$  участков цитоплазмы и  $35,6 \pm 0,3\%$  – ядер.

ФДТ экспериментальных опухолей, полученных подкожной инокуляцией клеток эпидермоидной карциномы человека А431 мышам Balb/c ВуJlco-nu/nu показала, что лечение с помощью МНТ-ФС ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР-(хлорин  $e_6$ ) приводит к 98% ингибированию роста опухоли относительно контроля, ФДТ у которого не проводили. Ингибирование роста опухоли в группе мышей, получавших ФДТ с использованием свободного хлорина  $e_6$ , относительно контроля, составило 94% (рис. 4.17). Все животные контрольной группы умерли к 22 дню с момента инокуляции клеток. К концу трехмесячного (92 дня) периода наблюдения выживаемость животных, получавших ФДТ с использованием МНТ-ФС, составила 75%, в 3,5 раза больше, чем у животных, получавших ФДТ с использованием свободного ФС – 20% (рис. 4.17В).



**Рисунок 4.17. Эффективность ФДТ мышей** линии Balb/c ВуJlco-nu/nu с привитой эпидермоидной карциномой человека А431 с использованием ФС хлорина  $e_6$ , присоединенного к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, и свободного ФС. **А** – рост опухолей, среднее  $\pm$  стандартная ошибка; **В** – выживаемость тех же групп мышей, что и на панели А. Стрелками обозначены дни проведения сеансов ФДТ. Представлены данные работ, проведенных совместно с Т.А. Сладниковой, П.В. Гулаком и Р. Схиффелерсом (Schiffelers R.M.).

К достоверному торможению роста опухолей и достоверному увеличению средней продолжительности жизни животных привела и ФДТ мышей с экспериментальными меланомами с использованием бактериохлорина  $r$ , присоединенного к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ (табл. 4.3). Эффект данного МНТ оказался менее выраженным, чем при использовании ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, что, по-видимому можно

объяснить существенно меньшим количеством рецепторов на клетках меланом по сравнению с клетками A431.

**Таблица 4.3.** Эффективность ФДТ с использованием бактериохлорина *p*, присоединенного к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ.

Опухоль	Число сеансов ФДТ (число облучений на один сеанс)	Ингибирование роста опухоли, % относительно:		Продолжительность жизни по сравнению с контролем, %	
		контроля	БХ	МНТ-БХ	БХ
Меланома В16-F1	4 (3)	80	85	160*	100
	5 (1)	82	89	170*	90
Меланома Клаудмана S91 (клон М3)	5 (1)	98	93	250**	170

БХ – бактериохлорин *p*; достоверность отличия от соответствующей группы, получавшей БХ, по критерию Мантеля-Ханзеля: \* –  $p < 0,002$ ; \*\* –  $p < 0,05$ .  
Результаты получены совместно с Т.А. Слостниковой и П.В. Гулаком.

Результаты раздела 4.3 опубликованы в статье: Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Schiffelers R.M., Lupanova T.N., Khrantsov Y.V., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. (2012) Modular nanotransporters: a multipurpose in vivo working platform for targeted drug delivery. *Int. J. Nanomed.* **7**, 467-82 (вклад автора состоит в разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, проведении экспериментов, включая частично радиолигандный анализ, КЛСМ и работу на животных, анализе результатов, участии в написании статьи); Слостникова Т.А., Розенкранц А.А., Лупанова Т.Н., Гнучев Н.В., Соболев А.С. (2012) Исследование эффективности модульного нанотранспортера для адресной доставки фотосенсибилизаторов в ядра клеток меланомы *in vivo*. *Докл. АН РФ*, **446**, 342-4 (вклад автора состоит в разработке методов присоединения ФС и очистки получаемых конъюгатов, выполнении работ, включая частично КЛСМ и работу на животных, анализе результатов, участии в написании статьи). Автор признателен всем коллегам-соавторам, без вклада которых эти результаты не могли быть получены.

Проведенный цикл исследований позволяет сделать вывод, что разработанные МНТ являются перспективным средством доставки ФС в ядра опухолевых клеток-мишеней, многократно усиливающим терапевтическую эффективность ФС при лечении экспериментальных опухолей. Значительный интерес представляет исследование возможности применения МНТ для доставки других вариантов действующего начала. В качестве такого варианта был выбран  $\alpha$ -эмиттер астат-211, который при распаде дает  $\alpha$ -частицы с длиной пробега, соответствующей нескольким клеточным диаметрам.

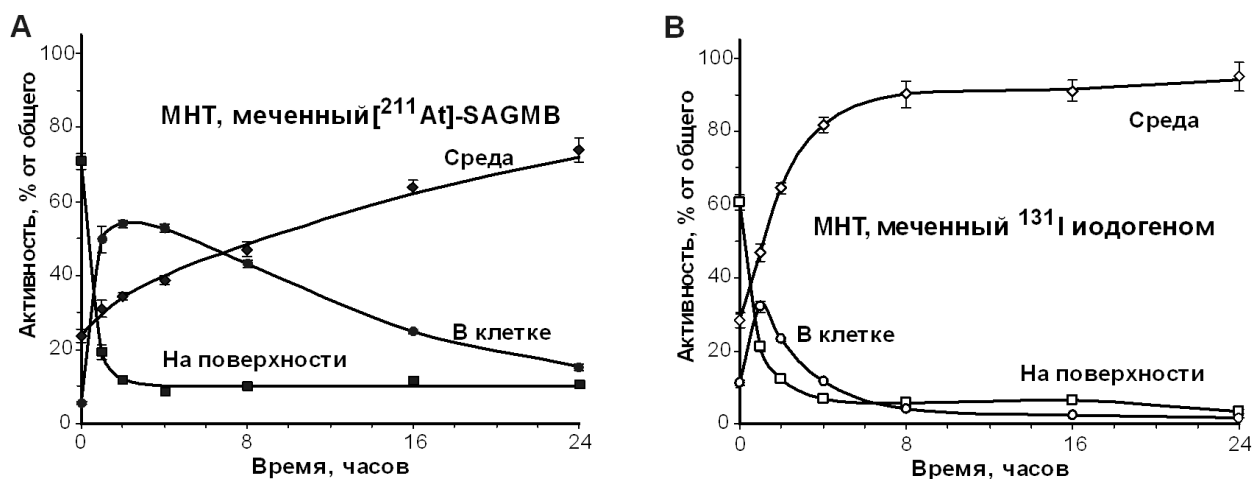
#### 4.4. Использование модульных нанотранспортеров для доставки $\alpha$ -эмиттеров

$^{211}\text{At}$  представляет собой  $\alpha$ -эмиттер с привлекательными для терапии злокачественных новообразований свойствами: период его полураспада составляет 7,2 часа, что позволяет избежать излишней лучевой нагрузки от продуктов деградации лекарственного средства. Средняя энергия испускаемых при распаде  $^{211}\text{At}$   $\alpha$ -частиц составляет 6,79 МэВ, что соответствует пробегу 55-70 мкм в водной среде и средней величине ЛПЭ – 99 кэВ на 1 мкм. Прохождение трэка таких частиц через ядро приводит к образованию плохо репарируемых двунитевых разрывов ДНК. Для уничтожения клетки достаточно нескольких  $\alpha$ -частиц, прошедших через ее ядро. Иод и астат легко присоединяются к белкам под воздействием таких окислителей как хлорамин Т и иодоген. К сожалению, получающийся в результате иодированный тирозин неустойчив *in vivo* из-за работы внутриклеточных деиодиназ. Для преодоления данной проблемы в сотрудничестве с лабораторией М. Залуцкого (M.R. Zalutsky) был использован разработанный в этой лаборатории метод непрямого астатинирования. Для этого был использован N-сукцинимидил 3- $^{211}\text{At}$ астато-5-гуанидинометилбензоат (SAGMB), который устойчив *in vivo*. Как показали проведенные эксперименты, меченный астатом SAGMB МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР лучше поступает в клетки и дольше в них удерживается, чем добавленный одновременно с ним такой же МНТ, меченный  $^{125}\text{I}$  при помощи Иодогена (рис. 4.18).

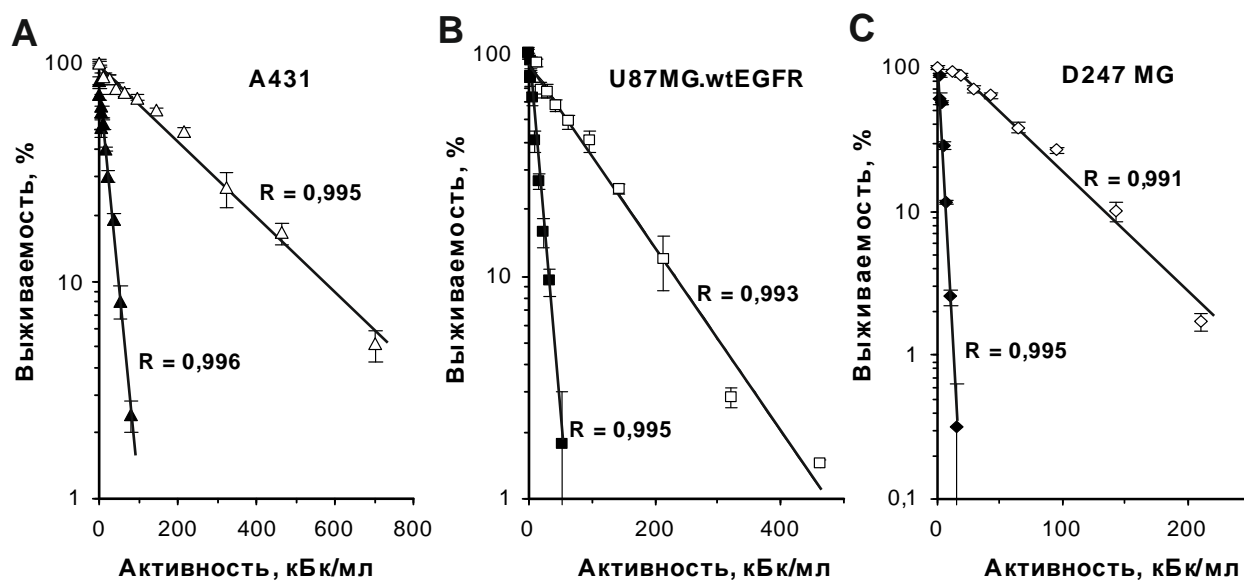
Присоединение  $\alpha$ -эмиттера астата-211 к МНТ приводило к значительному (в 10 – 20 раз) усилению его цитотоксичности у раковых клеток с повышенной экспрессией рецептора ЭФР (рис. 4.19). Для клеток A431 увеличение цитотоксичности, вызванное присоединением At к МНТ, выраженное в виде соотношения, активностей, при которых количество выживших клеток уменьшается в  $e$  раз, составило 14,5 раза, для глиомы U87 MG.wtEGFR – 8,25 раза, для глиомы D247 MG – 18,3 раза.

Полученные данные свидетельствуют о том, МНТ могут быть полезны при доставке в ядра опухолевых клеток-мишеней не только ФС, но и изотопов, испускающих  $\alpha$ -частицы с пробегом 50 – 100 мкм.





**Рисунок 4.18. Параллельное измерение связывания, интернализации и выхода МНТ из клеток.** А – МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, меченный  $[^{211}\text{At}]\text{-SAGMB}$ ; В – МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, меченный иодогеном. По 40 нМ  $[^{211}\text{At}]\text{-SAGMB-МНТ}$  и  $[^{131}\text{I}]\text{-МНТ}$  было одновременно добавлено к  $5 \times 10^5$  клеток А431 при 4°C. После инкубации в течение 1 часа клетки были отмыты и перенесены на 37°C. Через заданные промежутки времени клетки были отмыты и радиоактивность в среде, на поверхности клеток и внутри клеток была определена для обоих изотопов при помощи  $\gamma$ -счетчика. Результаты получены в Университете Дюка (США) в лаборатории М. Залутского (М.Р. Zalutsky) совместно с сотрудниками лаборатории.



**Рисунок 4.19. Зависимость выживаемости опухолевых клеток в культуре от концентрации добавленного  $^{211}\text{At}$ .** Выживаемость, определенная по тесту образования колоний клеток эпидермоидной карциномы человека А431 (А); глиобластомы человека U87 MG.wtEGFR (В); глиобластомы человека D247 MG (С). Черные символы –  $[^{211}\text{At}]\text{-SAGMB-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР}$ , белые символы – свободный  $[^{211}\text{At}]\text{-астатид}$ . Результаты получены в Университете Дюка (США) в лаборатории М. Залутского (М.Р. Zalutsky) совместно с сотрудниками лаборатории.

Результаты раздела 4.4 опубликованы в статье: Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Pozzi O.R., Lunin V.G., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. (2008) Engineered Modular Recombinant Transporters: Application of New Platform for Targeted Radiotherapeutic Agents to alpha-

Particle Emitting  $^{211}\text{At}$ . *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **72**, 193-200 (вклад автора состоит в получении препаратов МНТ для работы, иодировании МНТ, проведении всех экспериментов на клетках, анализе результатов, участии в написании статьи). Автор признателен своим соавторам, без вклада которых эта работа не могла быть осуществлена.

#### 4.5. Использование модульных нанотранспортеров для доставки эмиттеров электронов Оже

В последнее время все больший интерес в качестве терапевтического средства вызывают эмиттеры электронов Оже, изотопы, у которых при распаде происходит электронный захват, что, в свою очередь, приводит к испусканию спектра низкоэнергетических электронов, обладающих малой длиной пробега и достаточно большой ЛПЭ. Из-за короткого пробега ЭО их цитотоксичность максимальна в ядре клетки, поэтому присоединение таких радионуклидов к МНТ может дать значительный терапевтический эффект. В настоящее время доступными для работы является несколько разрешенных к медицинскому применению изотопов, являющихся достаточно эффективными эмиттерами ЭО. Среди них  $^{125}\text{I}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ .

##### 4.5.1. Использование модульных нанотранспортеров для доставки $^{125}\text{I}$

В качестве модельного эмиттера ЭО был использован  $^{125}\text{I}$ , период полураспада которого 60 дней, и, поэтому, данный изотоп удобен для постановки лабораторных экспериментов. Кроме того, для устойчивого, неразлагаемого *in vivo*, присоединения иода к МНТ можно использовать тот же способ, который уже был успешно применен для присоединения астата через N-сукцинимидил 3-[ $^{211}\text{At}$ ]астато-5-гуанидинометилбензоат (SGMIB).  $^{125}\text{I}$  присоединенный таким способом эффективно взаимодействовал с опухолевыми клетками, обладающими повышенной экспрессией рецептора ЭФР и поступал в них (рис. 4.20).

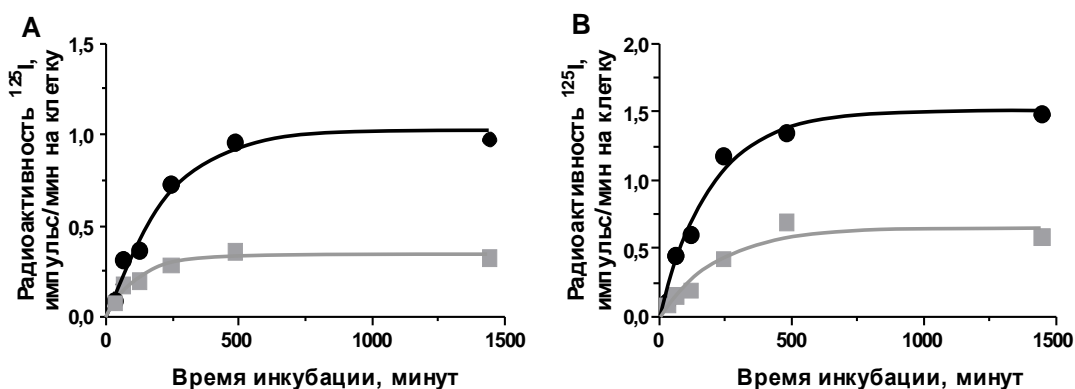
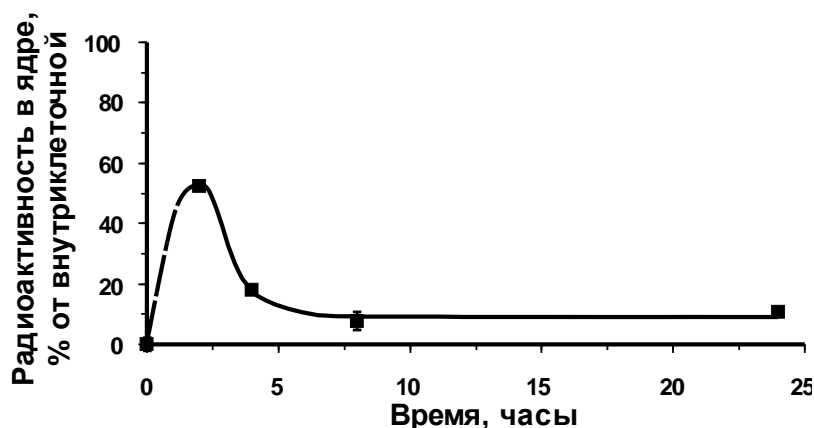


Рисунок 4.20. Кинетика связывания с поверхностью и поступления в клетку  $^{125}\text{I}$ , присоединенного к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с помощью SGMIB. А – клетки эпидермоидной карциномы А431; В – глиомы D247 МГ. ■ – связывание с поверхностью,



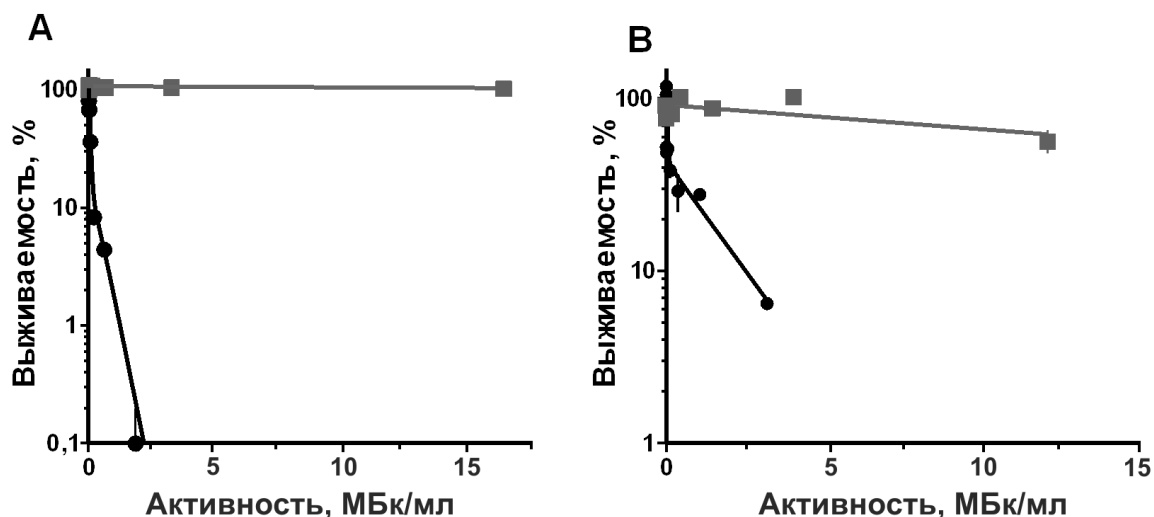
● – поступление внутрь клетки. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

Большая часть (более 50%) поглощенного путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза МНТ быстро достигала ядер, после чего в результате процессов биодegradации доля МНТ в ядре снижалась (рис. 4.21). В качестве контроля использовали  $^{125}\text{I}$ , присоединенный к альбумину.



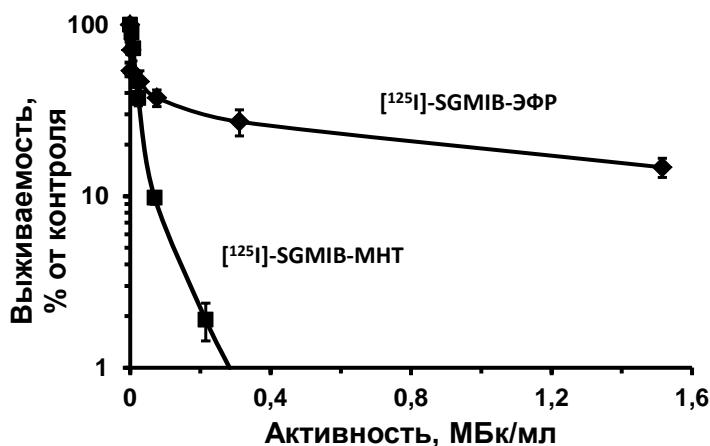
**Рисунок 4.21.** Кинетика ядерного накопления [ $^{125}\text{I}$ ]-SGM1B-ДТокс-NMP-СЯЛ-ЭФР в клетках эпидермоидной карциномы человека A431. Результат типичного эксперимента выполненного в трех повторах. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

В результате доставки эмиттера ЭО  $^{125}\text{I}$  в ядра опухолевых клеток-мишеней его цитотоксичность многократно увеличивалась: рассчитанная величина  $A_{37}$  (падение выживаемости в  $e$  раз относительно начального уровня) была 74 кБк/мл для [ $^{125}\text{I}$ ]-SGM1B-ДТокс-NMP-СЯЛ-ЭФР и 290 МБк/мл для  $^{125}\text{I}$ -БСА (экстраполяционная оценка), т.е. эффективность цитотоксического действия на эти клетки за счет присоединения к МНТ увеличивалась в 4 000 раз (рис. 4.22) Для клеток глиобластомы D247 MG, обладающих на порядок меньшим количеством рецепторов ЭФР,  $A_{37}$  составила 0,33 МБк/мл для [ $^{125}\text{I}$ ]-SGM1B-МНТ и 21 МБк/мл для  $^{125}\text{I}$ -БСА, цитотоксичность  $^{125}\text{I}$  в результате присоединения увеличилась более, чем в 60 раз.



**Рисунок 4.22.** Цитотоксическое действие эмиттера ЭО  $^{125}\text{I}$  по тесту образования колоний. ● –  $^{125}\text{I}$ , присоединенный к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, ■ –  $^{125}\text{I}$ , присоединенный к БСА. **А** – клетки эпидермоидной карциномы А431 **В**, **В** – клетки глиобластомы человека D247 MG. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

Эффективность цитотоксического действия [ $^{125}\text{I}$ ]-SGMIB-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) значительно усиливалась по сравнению с [ $^{125}\text{I}$ ]-SGMIB-ЭФР, что свидетельствует о зависимости цитотоксического эффекта от функционирования модулей, обеспечивающих внутриклеточной доставки (рис. 4.23). Усиление цитотоксичности меченного МНТ по сравнению с ЭФР возрастало с увеличением концентрации добавленных препаратов.



**Рисунок 4.23.** Сравнение цитотоксического действия эмиттера ЭО  $^{125}\text{I}$ , присоединенного к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР или ЭФР. Инкубация клеток А431 была проведена в течение 24 часов с указанными концентрациями препаратов, после чего выживаемость была оценена по тесту колониеобразования. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

Проведенные на основании данных о кинетике поглощения  $^{125}\text{I}$  клетками A431, и кинетики его ядерного накопления расчеты позволили рассчитать количество распадов в ядре клеток-мишеней уменьшающих их выживаемость в  $e$  раз. Эта величина (317 распадов на ядро) оказалась всего в три раза меньшей, чем для случая, когда весь излучающий ЭО  $^{125}\text{I}$  ковалентно присоединен к ДНК.

Результаты данного раздела опубликованы в статье: Slastnikova T.A., Koumariou E., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Lupanova T.N., Sobolev A.S., Zalutsky M.R (2012). Modular nanotransporters: a versatile approach for enhancing nuclear delivery and cytotoxicity of Auger electron-emitting  $^{125}\text{I}$ . *EJNMMI Res.*, **2**, № 59. DOI:10.1186/2191-219X-2-59 (вклад автора состоит в участии в подготовке препаратов МНТ для работы, в планировании экспериментов, в анализе результатов и в написании статьи). Автор признателен своим соавторам, без которых эта работа не могла быть осуществлена.

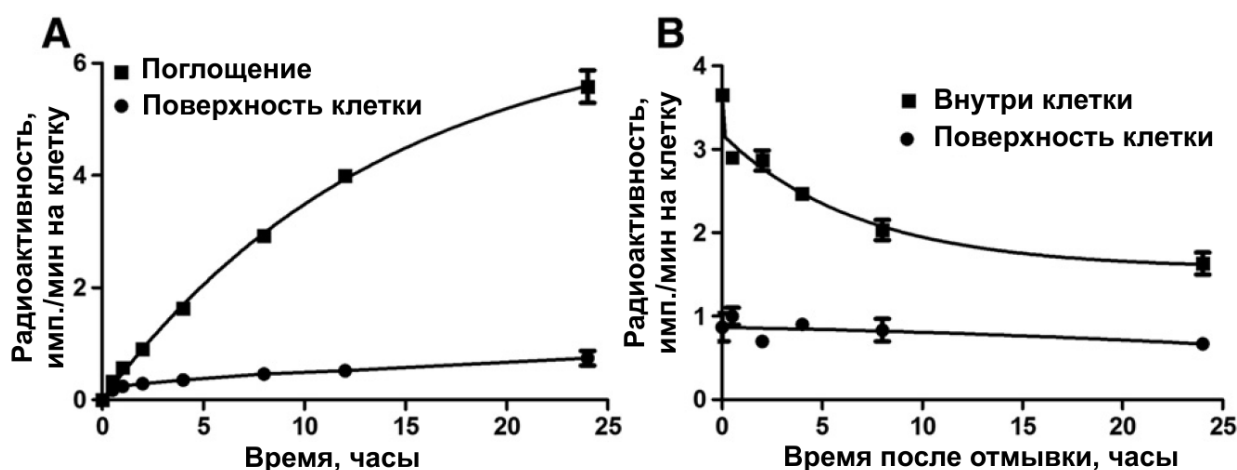
#### **4.5.2. Использование МНТ для доставки $^{67}\text{Ga}$**

##### **4.5.2.1. Мечение препаратов МНТ $^{67}\text{Ga}$**

Препараты, содержащие  $^{67}\text{Ga}$ , давно применяются для медицинской диагностики (Chitambar, 2010) и рассматриваются в качестве перспективного варианта для терапии за счет испускания ЭО (Othman et al., 2017). Для присоединения  $^{67}\text{Ga}$  к ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР был использован хелатор НОТА, ковалентно присоединенный к МНТ при помощи бифункционального производного этого хелатора (соотношение МНТ:НОТА после мечения находилось в диапазоне 1 – 2,5). При проведении мечения при оптимальных условиях для встраивания Ga в НОТА (pH 4,5–5,0) успешно проходил процесс мечения НОТА-БМА, однако НОТА-МНТ агрегировал и выпадал в осадок. Увеличение или снижение pH реакции приводило к резкому снижению мечения. Солюбилизация НОТА-МНТ может быть достигнута добавлением при помощи добавления ДМСО 5% (объем/объем) или SDS. При использовании ДМСО в выход мечения составил около 63%; однако большую часть активности не удавалось снять со стенок пробирки. Использование SDS в качестве солюбилизирующего агента также не привело к успеху. При мечении НОТА-МНТ в гетерогенной системе при pH 5 с последующим растворением в фосфатном буфере с pH 8 и очисткой гель-фильтрацией были получены препараты с удельной активностью  $0,96 \pm 0,10$  ГБк/мг (73 Ки/мкмоль). Анализ  $^{67}\text{Ga}$ -НОТА-МНТ с помощью денатурирующего ЭФ конъюгата показал, что 80% и 10–20%  $^{67}\text{Ga}$  присутствовали в полосах с молекулярной массой  $\sim 75$  и 150 кД, что отражает наличие мономерных и димерных МНТ.

#### 4.5.2.2. Кинетика эндоцитоза и выхода из клеток $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР

Кинетика эндоцитоза и выхода  $^{67}\text{Ga}$  из клеток была оценена с помощью инкубации  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с клетками А431, экспрессирующими EGFR. Внутриклеточная активность увеличивалась с течением времени и начала выходить на плато через 24 часа (рис. 4.24 А). Активность  $^{67}\text{Ga}$ , связанная с поверхностью клеток была значительно ниже и оставалась относительно стабильной с течением времени. Поглощение  $^{67}\text{Ga}$  клетками через 24 часа составило  $30,1 \pm 4,6\%$  от добавленной активности. Учитывая период полужизни  $^{67}\text{Ga}$  и кинетику поглощения, 24-часовой инкубационный период был подходящим для исследований кинетики выхода  $^{67}\text{Ga}$  из клеток и определения цитотоксичности. Выход  $^{67}\text{Ga}$  из клеток А431 был медленным (рис. 4.24 В). Полученные данные поглощения и выхода из клеток соответствовали экспоненциальным зависимостям. Кинетика поглощения хорошо аппроксимировалась функцией  $A(t) = A_{\max} \cdot (1 - e^{-kt})$ , где  $A$  – активность  $^{67}\text{Ga}$  в клетках, а  $t$  – время инкубации ( $r^2 = 0,99$ ). Кинетика выхода лучше соответствовала сумме двух экспонент  $A(t) = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t}$ , где  $t$  – время инкубации ( $r^2 = 0,92$ ).

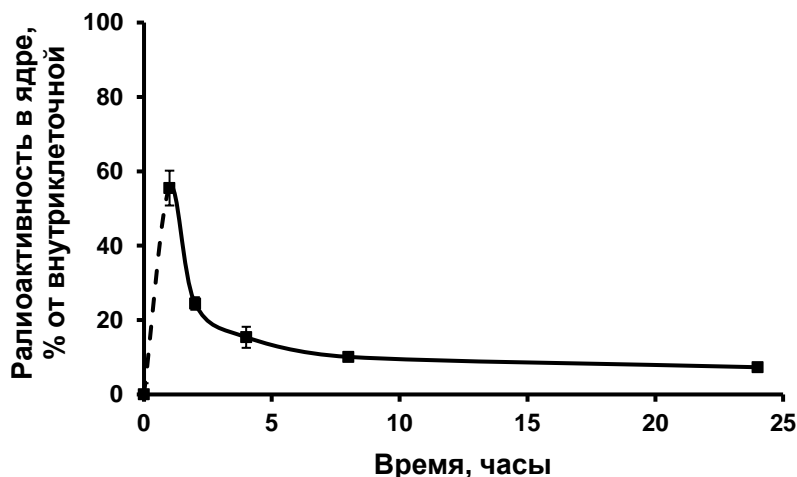


**Рисунок 4.24. Кинетика поглощения и выхода меченого  $^{67}\text{Ga}$  МНТ клетками А431.** А – поглощение и поверхностное связывание  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, В – выход из клеток  $^{67}\text{Ga}$  после смены среды и отмывки клеток после 24-часовой инкубации с  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Линии регрессии проведены согласно уравнениям, приведенным в тексте, с использованием Prism 5. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

#### 4.5.2.3. Транспорт $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в ядра клеток А431

Кинетику транспорта  $^{67}\text{Ga}$  в ядра клеток определяли после инкубации клеток А431 с  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР. Через 1 час в ядрах присутствовало  $55,5 \pm 3,0\%$  от общей внутриклеточной активности, что указывает на быструю транслокацию  $^{67}\text{Ga}$ -

ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в ядро (рис. 4.25). Через 1 час после начала инкубации в ядрах обнаруживалось  $0,295 \pm 0,017$  имп./мин на клеточное ядро. Достигнутый уровень активности  $^{67}\text{Ga}$  мало изменялся в течение следующих 4 часов, оставаясь постоянным в течение 4 часов, после чего незначительно снижалась до уровня около 0,15 имп./мин на клеточное ядро.

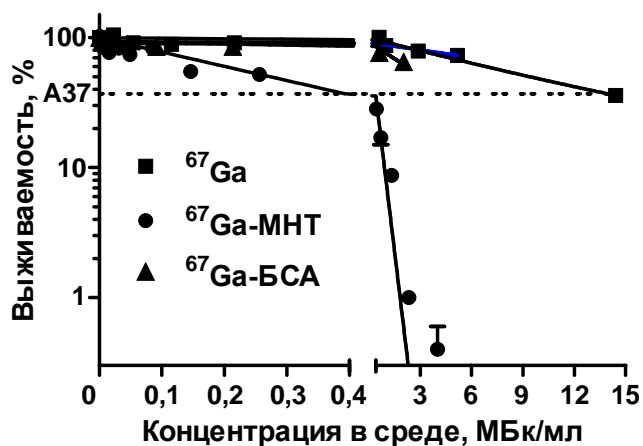


**Рисунок 4.25.** Кинетика ядерного накопления  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в клетках эпидермоидной карциномы человека А431. Результат типичного эксперимента, выполненного в трех повторах. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

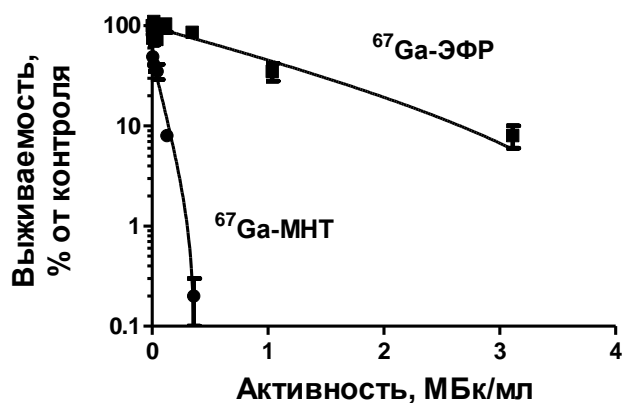
#### 4.5.2.4. Исследование цитотоксичности $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР

Клоногенная выживаемость клеток А431 после инкубации в течение 24 часов с  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР приведена на рисунке 4.26. В качестве контролей были использованы исходный  $^{67}\text{Ga}$ , а также  $^{67}\text{Ga}$ , присоединенный к БСА с помощью того же самого хелатора НОТА. Выживаемость клеток экспоненциально уменьшалась в зависимости от добавленной активности. Активности, необходимые для снижения выживаемости до 37% ( $A_{37}$ ) и до 10% ( $A_{10}$ ), были определены с помощью регрессионного анализа (таблица 4.4). Значение  $A_{37}$  для  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР составляло  $5,4 \cdot 10^6$  распадов в минуту на лунку, в то время как соответствующая выживаемость при использовании клеток  $^{67}\text{Ga}$ -БСА и  $^{67}\text{Ga}$  требовала в 17 и 385 раз большей активности. Сравнение цитотоксичности  $^{67}\text{Ga}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР и  $^{67}\text{Ga}$ -ЭФР показало, что, несмотря на то, что ЭФР поступает внутрь клетки путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза (Sorkin and Goh, 2008) и часть его может транспортироваться в ядро (Lo, 2010), этот процесс недостаточно эффективен (рис. 4.27). Так, активность, необходимая для снижения образования колоний клеток U87 MG wtEGFR в  $e$  раз ( $A_{37}$ ) и в 10 раз ( $A_{10}$ ) были в 72 и 18 раз выше для  $^{67}\text{Ga}$ -ЭФР по сравнению с  $^{67}\text{Ga}$ -МНТ. Аналогичным образом,

для клеток A431 потребуется в 13 и 18 раз больше активности, чтобы снизить выживаемость до 37% и 10% уровней с  $^{67}\text{Ga}$ -ЭФР по сравнению с  $^{67}\text{Ga}$ -МНТ (Таблица 4.4). Эти результаты демонстрируют, что модули внутриклеточной локализации МНТ вносят значительный вклад в цитотоксическую эффективность доставляемого МНТ эмиттера ЭО в дополнение к эффектам от связывания, эндоцитоза и внутриклеточного транспорта лиганда с EGFR на клетке-мишени.



**Рисунок 4.26.** Усиление цитотоксического действия эмиттера ЭО  $^{67}\text{Ga}$ , в результате присоединения к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР. Инкубация клеток A431 была проведена в течение 24 часов с указанными концентрациями препаратов, после чего выживаемость была оценена по тесту колониеобразования. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слестниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).



**Рисунок 4.27.** Сравнение цитотоксического действия эмиттера ЭО  $^{67}\text{Ga}$ , присоединенного к МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР или ЭФР. Инкубация клеток глиомы U87 MG wtEGFR была проведена в течение 24 часов с указанными концентрациями препаратов, после чего выживаемость была оценена по тесту колониеобразования. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слестниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

**Таблица 4.4. Сравнение цитотоксичности  $^{67}\text{Ga}$  и препаратов, меченных  $^{67}\text{Ga}$ .**

Линия клеток	Препарат $^{67}\text{Ga}$	$A_{37}$ , МБк/мл (Увеличение $A_{37}$ по отношению к $A_{37}$ для МНТ)	$A_{37}$ МБк/мл (Увеличение $A_{10}$ по сравнению с $A_{10}$ для МНТ)
A431	ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР	0,15	0,34
	ЭФР	1,94(13)	6,1 (18)
	БСА	2,49 (17)	5,8 (17)
	Исходный $^{67}\text{Ga}$	57,8 (385)	134 (388)
U87 MG wttEGFR	ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР	0,025	0,14
	ЭФР	1,80 (72)	2,6 (18)

Представленные результаты получены в результате совместных работ с Т.А. Слостниковой и сотрудниками отдела радиологии Медицинского центра Университета Дюка (США) (руководитель отдела М. Залуцкий (M.R. Zalutsky)).

Результаты раздела 4.5.2 опубликованы в статье: Koumariyanou E., Slastnikova T.A., Pruszyński M., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. (2014) Radiolabeling and in vitro evaluation of  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-modular nanotransporter--a potential Auger electron emitting EGFR-targeted radiotherapeutic. *Nucl. Med. Biol.* **41**, 441-9 (вклад автора состоит в участии в подготовке препаратов МНТ для работы, в планировании экспериментов, в анализе результатов и в написании статьи). Автор признателен своим соавторам, без которых эта работа не могла быть осуществлена.

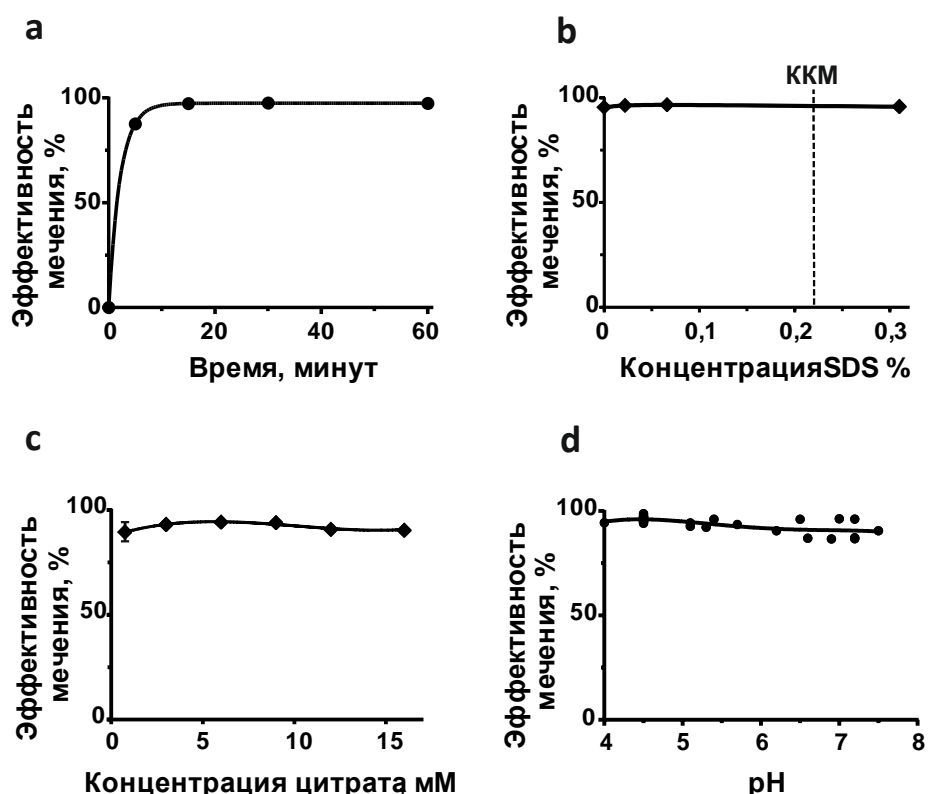
#### **4.5.3. Разработка пригодного для терапии метода присоединения $^{111}\text{In}$ к МНТ и проверка возможности его использования для терапии**

##### **4.5.3.1. Метод присоединения $^{111}\text{In}$ к макромолекулам**

Изотоп  $^{111}\text{In}$  является одним из стандартных диагностических изотопов, применяемых в медицинской практике (Price and Orvig, 2014; Wadas et al., 2010) и испускает помимо  $\gamma$ -излучения значительное количество ЭО (Lee et al., 2015). Для его присоединения к биологически активным молекулам необходим ковалентно связанный с этим веществом хелатор. Для этого МНТ были конъюгированы с бифункциональными хелаторами p-SCN-Bn-NOTA или p-SCN-Bn-ДОТА, до соотношения хелатор: МНТ  $2,5 \pm 0,2$  по данным денатурирующего ЭФ в ПААГ.

Присоединение  $^{111}\text{In}$  к белкам с помощью различных хелаторов обычно проводят в ацетате в слабокислых условиях (Wadas et al., 2010). Из-за быстрого гидролиза  $^{111}\text{In}$  при

нейтральном pH, а также из-за плохой растворимости МНТ в слабокислых растворах, попытки мечения конъюгатов НОТА-МНТ или ДОТА-МНТ  $^{111}\text{In}$  в ацетатном буфере не привели к успеху. Использование протокола, который был разработан ранее для мечения  $^{67}\text{Ga}$  НОТА-МНТ, также не привело к удовлетворительному результату. Основываясь на возможности использования промежуточных нестабильных комплексов для улучшения присоединения индия в реакционную смесь был добавлен HEPES и цитрат (Brom et al., 2012; Morfin and Toth, 2011). Для улучшения растворимости МНТ в реакционной смеси использовали также SDS (в 10 раз ниже критической концентрации мицеллообразования) с целью экранировать гидрофобные участки, которые, экспонируются на молекуле МНТ при закислении. При использовании стандартизованного набора условий мечения, описанных в разделе «Материалы и методы», кинетика образования  $^{111}\text{In}$ -НОТА-МНТ при  $37^\circ\text{C}$  была достаточно быстрой (рис. 4.28а). Выходы мечения конъюгатов НОТА-МНТ индием были достаточно постоянными в широком диапазоне концентраций SDS (рис. 4.28b), концентрации цитрата (рис. 4.28c) и pH (рис. 4.28d).

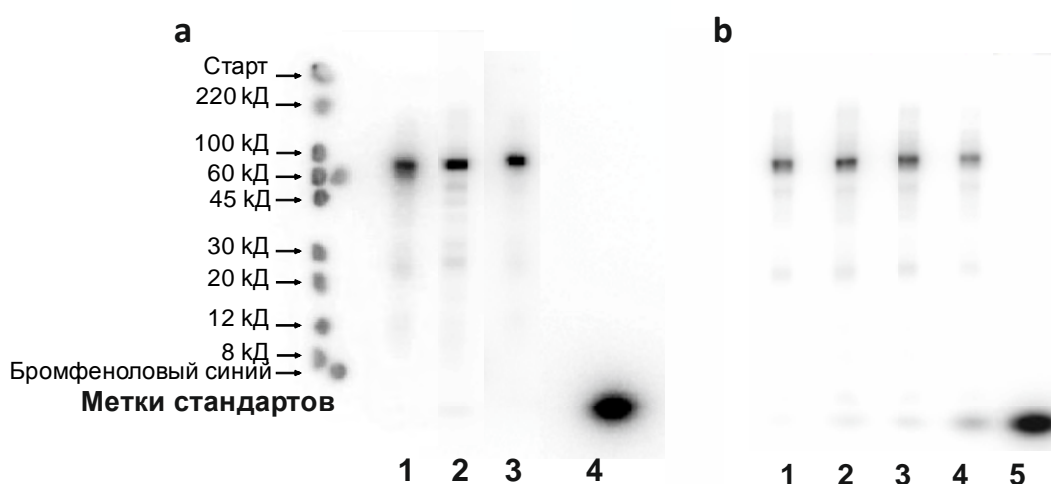


**Рисунок 4.28. Определение оптимальных параметров мечения МНТ.** Выход  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в зависимости от: **a** – времени реакции; **b** – концентрации SDS в реакционной смеси; **c** – концентрации цитрата; и **d** – pH реакционной смеси. ККМ – критическая концентрация мицеллообразования. Представленные результаты получены совместно с Т.А. Слостниковой.

Автордиография результатов мечения денатурирующего ЭФ в ПААГ трех различных конъюгатов НОТА-МНТ представлены на рисунке 4.29а. Стандартный



диагностический препарат  $^{111}\text{In}$  не позволял получить удельную активность  $^{111}\text{In}$ -НОТА-МНТ больше 0,2 ГБк/мг. Удельную активность  $^{111}\text{In}$ -НОТА-МНТ удалось повысить до 2,7 ГБк/мг, используя изготовленные по заказу партии  $^{111}\text{In}$  (рис. 4.29b). Поскольку выходы при мечении постоянно были практически количественными ( $96,5 \pm 0,1\%$ ,  $n = 19$ ), полученные препараты  $^{111}\text{In}$ -НОТА-МНТ не очищали перед использованием. Тот же самый процесс мечения, выполняемый с традиционно используемым для присоединения индия ДОТА, продемонстрировал довольно медленную кинетику реакции при  $37^\circ\text{C}$ , достигая плато примерно через 3,5 часа, что ограничивает его дальнейшую потенциальную клиническую трансляцию; поэтому все дальнейшие работы проводились с использованием конъюгатов НОТА-МНТ.

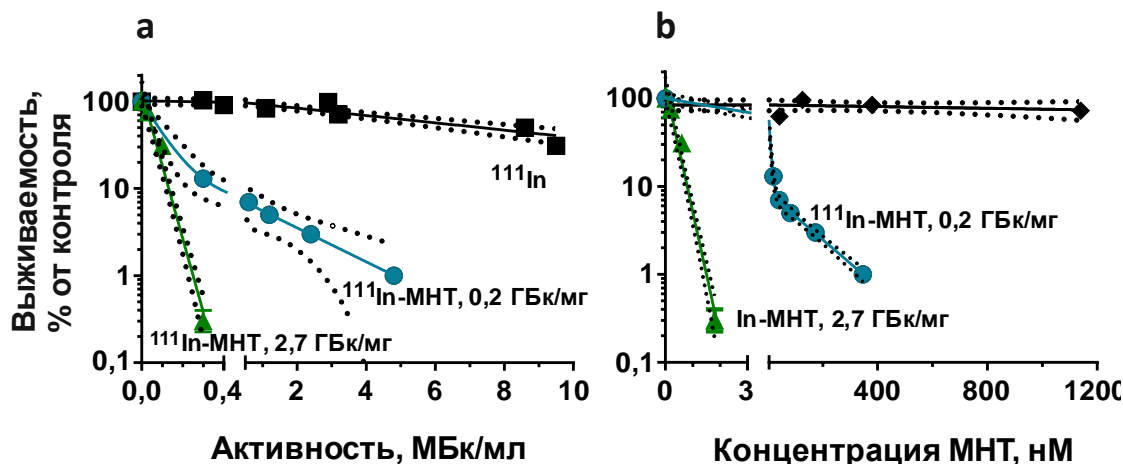


**Рисунок 4.29. Авторадиограммы гелей денатурирующего ЭФ в ПААГ после мечения МНТ  $^{111}\text{In}$ .** **а** –  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ (1),  $^{111}\text{In}$ -(ДТокс-НМР-СЯЛ)-ФК (2),  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР (3) и контрольного  $^{111}\text{In}$  (4). Метки стандартов обозначают положение полос от цветных маркеров ЭФ ColorBurst. Основная полоса соответствует ожидаемой молекулярной массе МНТ (70-76 КДА), минорные полосы, непосредственно перед бромфеноловым синим (по сравнению с основной дорожкой 4), соответствуют свободному  $^{111}\text{In}$  (3-5%). Слабые полосы (1-10%), соответствующие мол. массам 20-50 КДА, являются продуктами деградации МНТ. **б** – авторадиограмма геля  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ при различных соотношениях  $^{111}\text{In}$ /МНТ в реакционной смеси: 0,2 ГБК/мг (1), 1,1 ГБК/мг (2), 2,0 ГБК/мг (3), 4,4 ГБК/мг (4), 7,3 ГБК/мг (5). Представленные результаты получены совместно с Т.А. Слостниковой.

#### 4.5.3.2. Проверка цитотоксичности препаратов МНТ, меченных $^{111}\text{In}$

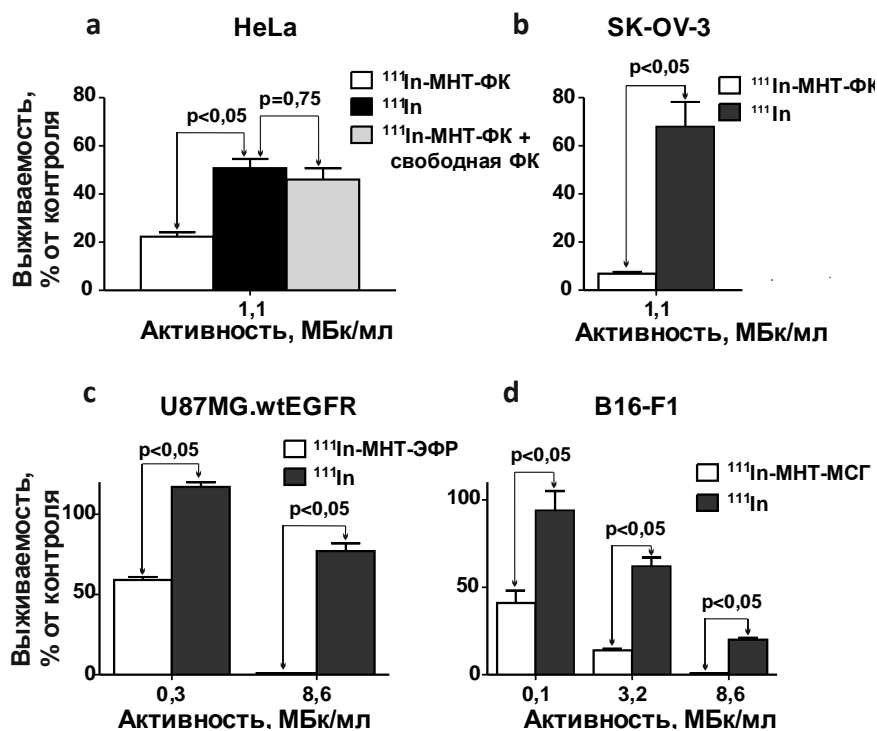
Цитотоксичность препаратов  $^{111}\text{In}$ -МНТ была значительно выше для клеток соответствующих клеточных линий по сравнению с контрольным  $^{111}\text{InCl}_3$ . Как и следовало ожидать для насыщаемых рецептор-опосредованных процессов, цитотоксическая активность препаратов  $^{111}\text{In}$ -МНТ зависела от их удельной радиоактивности. В частности,  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР значительно сильнее подавлял выживаемость клеток А431, определяемую по тесту колониеобразования, при удельной

радиоактивности 2,7 ГБк/мг по сравнению 0,2 ГБк / мг.  $A_{10}$ , активность, обеспечивающая 10% выживаемость клеток, составляла для МНТ с высокой удельной радиоактивностью 0,13 МБк/мл по сравнению с 0,38 МБк/мл для МНТ с низкой (рисунок 4.30).



**Рисунок 4.30.** Цитотоксичность  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с высокой (2,7 ГБК/мг) или низкой удельной активностью (0,2 ГБК/мг) для клеток А431. а – зависимость выживаемости клеток по тесту колониеобразования от добавленной активности, б – зависимость выживаемости от концентрации добавленного МНТ. Сплошные линии представляют собой линии регрессии, полученные по одноэкспоненциальной модели ( $^{111}\text{In}$ , ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР,  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с высокой удельной радиоактивностью) или двухэкспоненциальной модели ( $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с низкой удельной радиоактивностью). Пунктирные линии обозначают 95% доверительные интервалы. Представленные результаты получены совместно с Т.А. Слостниковой.

МНТ с присоединенной фолиевой кислотой также показали увеличение цитотоксичности  $^{111}\text{In}$  по сравнению со свободным радионуклидом. Колониеобразующая способность клеток, экспрессирующих фолатный рецептор (HeLa, SK-OV-3), оказалась значительно ниже по сравнению с той же активностью  $^{111}\text{InCl}_3$  (рис. 4.31а и 4.31b). Более того, этот эффект был блокирован избытком свободным фолатом, что подтверждает специфичность цитотоксичности  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ФК в отношении клеток-мишеней, экспрессирующих ФР (рис. 4.31а). Усиление цитотоксичности наблюдались для  $^{111}\text{In}$ , доставленного с помощью ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ (рис. 4.31с) и ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР (рис. 4.31d) в клетки опухолевых линий, сверхэкспрессирующих МС1R (B16-F1) или EGFR (U87 MG.wtEGFR), соответственно.

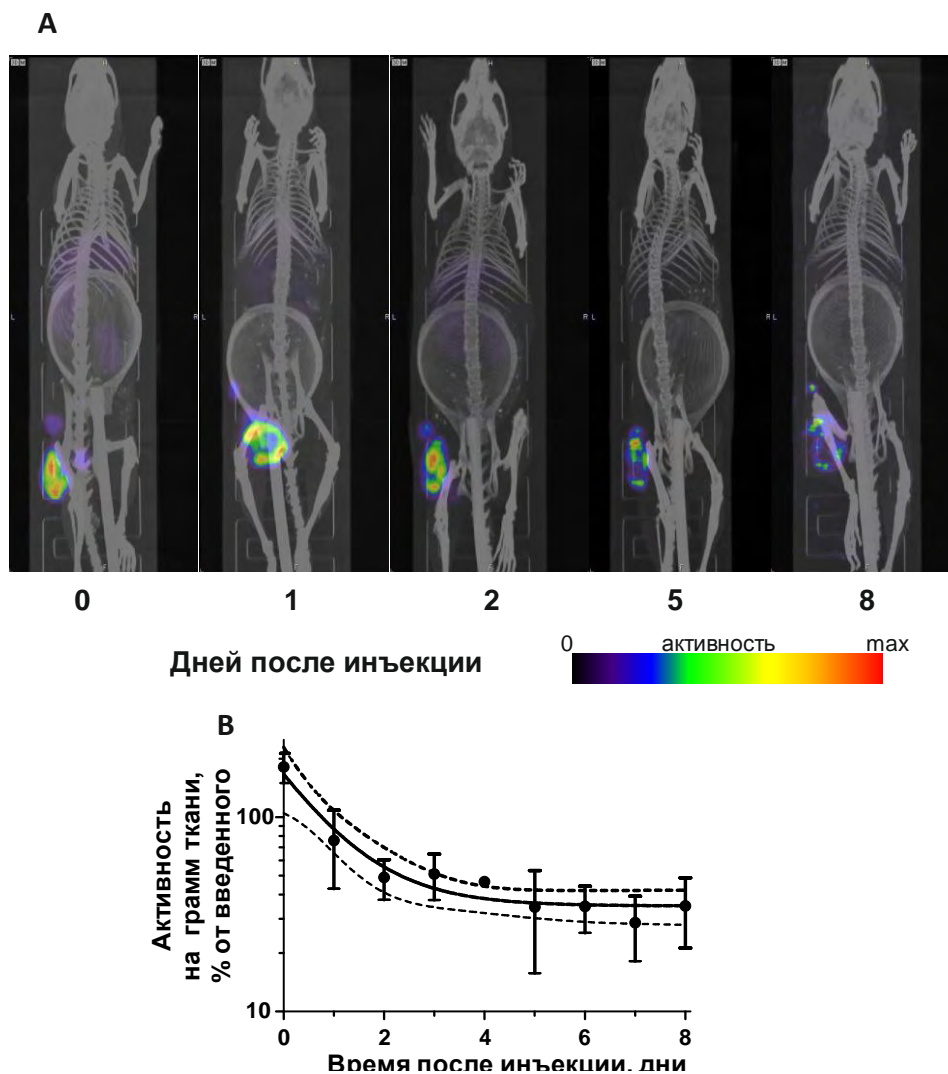


**Рисунок 4.31. Усиление цитотоксического действия  $^{111}\text{In}$  в результате присоединения к различным МНТ. а,б** – цитотоксическое действие  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-*HMP*-СЯЛ-ФК на клетки линий с повышенной экспрессией ФР, **с** –  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-*HMP*-СЯЛ-ЭФР на клетки со сверхэкспрессией EGFR U87MG.wtEGFR; и **д** –  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ на клетках со сверхэкспрессией MC1R меланомы B16-F1. Значимость различия рассчитана по критерию Краскала-Уоллиса. Представленные результаты получены совместно с Т.А. Слостниковой.

Эксперименты разделов 4.5.3 и 4.5.4 опубликованы в статье: Slastnikova, T.A., Rosenkranz, A.A., Morozova, N.B., Vorontsova, M.S., Petriev, V.M., Lupanova, T.N., Ulasov A.V., Zalutsky M.R., Yakubovskaya R.I., Sobolev, A. S. (2017). Preparation, cytotoxicity, and in vivo antitumor efficacy of  $^{111}\text{In}$ -labeled modular nanotransporters. *Int. J. Nanomed.*, 12, 395, соавторам которой, принимавшим участие в подготовке и проведении экспериментов, обсуждении результатов и написании, автор выражает искреннюю признательность.

#### 4.5.3.3. Томографическое исследование распределения $^{111}\text{In}$ -ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ в организме мышей

Распределение  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ внутриопухолевой инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-*HMP*-СЯЛ-МСГ было исследовано при помощи ОФЭКТ совмещенной с КТ. Проведенные эксперименты продемонстрировали хорошее сохранение интратуморальной активности  $^{111}\text{In}$  (рис. 4.32) и незначительное перераспределение в другие органы.



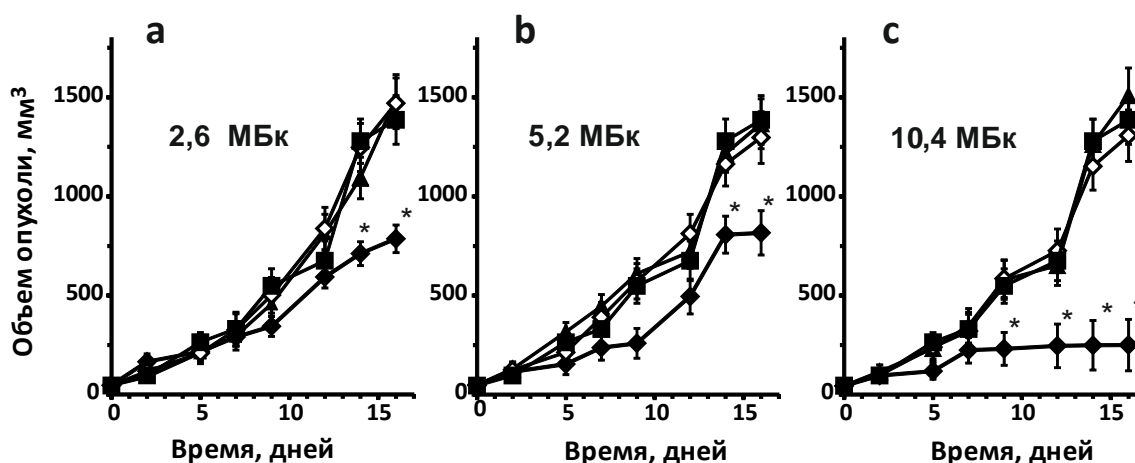
**Рисунок 4.32. Визуализация распределения активности  $^{111}\text{In}$  после введения  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в подкожные опухоли меланомы В16-F1 у мышей C57Black/6J по результатам компьютерной томографии. А – совмещенные изображения ОФЭКТ (градации цвета согласно шкале под рисунком) и КТ репрезентативного животного в указанное время после инъекции в градациях серого. Б – скорректированный на распад выход  $^{111}\text{In}$  из опухоли. Пунктирные линии указывают на 95% доверительный интервал. Кольцо в области живота, представленное на томограммах, является датчиком дыхания. Представленные результаты получены совместно с Т.А. Слатниковой, Ю.В. Храпцовым и другими сотрудниками лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта.**

Аппроксимация кинетики изменения активности в опухоли при помощи одноэкспоненциального уравнения с поправкой на распад показало, что время двукратного уменьшения активности ( $t_{1/2}$ ) составляет 3,7 дня (95% доверительный интервал: 2,8–5,3 дней), однако полученные данные лучше соответствовали анализу по уравнению суммы двух экспонент ( $P=0,0003$ , F-тест) с  $t_{1/2}$  около 0,5 и 11 дней. Активность  $^{111}\text{In}$  в нормальных тканях после интратуморального введения  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ было довольно низкой, на грани чувствительности метода и ограничивалась слабым

сигналом, наблюдаемым только в почках и печени (рис. 4.32А). Полученные данные показали обоснованность исследований терапии экспериментальной мышинной меланомы путем введения  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ.

#### 4.5.3.4. Радионуклидная терапия мышинной меланомы

Проверка возможности использования  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ для противоопухолевой терапии была осуществлена на модели подкожной меланомы мышши линии В16-F1, у мышей С57-Black/6J. Проведенные эксперименты показали статистически значимую дозозависимую задержку роста опухолей при трех разных вводимых активностях МНТ с присоединенным  $^{111}\text{In}$ : 2,6, 5,2 и 10,4 МБк (рис. 4.33).



**Рисунок 4.33. Терапия подкожных опухолей мышинной меланомы В16-F1 у мышей С57black/6J.** Мышам вводили в опухоль:  $\blacklozenge$  –  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в дозе А – 2,6 МБк (1,4 мкг), В – 5,2 МБк (2,9 мкг) или С – 10,4 МБк (5,7 мкг),  $\blacksquare$  – физиологический раствор,  $\blacktriangle$  –  $^{111}\text{In}$  в тех же дозах или  $\diamond$  – немеченый ДТокс-НМР-СЯЛ-МСГ в тех же концентрациях. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольными группами согласно дисперсионному анализу (ANOVA). Представленные результаты получены в результате совместной работы с Т.А. Слостниковой и сотрудниками МНИОИ имени П.А. Герцена.

Наибольшая вводимая доза приводила к самому выраженному эффекту, торможению роста опухоли на 82% по сравнению с контрольными животными, получавшими физиологический раствор. Те же самые дозы либо контрольного  $^{111}\text{In}$ , не присоединенного к МНТ, либо немеченого МНТ не приводили к какому-либо ингибированию роста опухоли.

Проведенные исследования выявили перспективность использования модульных нанотранспортеров для лечения меланом, в том числе, для местного применения, например, для увеальных меланом для терапии которых используют брахитерапию с использованием  $^{125}\text{I}$ ,  $^{106}\text{Ru}$  и  $^{103}\text{Pd}$  (Krantz et al., 2017). Результаты данного раздела изложены в статье: Slastnikova, T.A., Rosenkranz, A.A., Morozova, N.B., Vorontsova, M.S., Petriev, V.M., Lupanova, T.N., Ulasov A.V., Zalutsky M.R., Yakubovskaya R.I., Sobolev, A. S.

(2017). Preparation, cytotoxicity, and in vivo antitumor efficacy of  $^{111}\text{In}$ -labeled modular nanotransporters. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 395. DOI:10.2147/IJN.S125359 (вклад автора состоит в организации и планировании работ, разработке совместно с Т.А. Слестниковой метода присоединения  $^{111}\text{In}$  к белкам, проведении части экспериментов, анализе результатов, написании статьи). Эксперименты с животными по терапии экспериментальной меланомы проводились сотрудниками МНИОИ им. П.А. Герцена, которым автор искренне признателен. Автор также благодарен коллегам по лаборатории и, прежде всего, Т.А. Слестниковой за их вклад в работу.

#### **4.6. Создание и исследование свойств МНТ с присоединенным фолатом**

Одним из вариантов сверхэкспрессированных рецепторов на поверхности клеточной мишени являются рецепторы, специфически связывающие низкомолекулярные вещества, например фолат. Примером является рецептор фолата, повышенная экспрессия которого часто наблюдается при карциномах почек, эндометрия, легких, молочной железы, мочевого пузыря и поджелудочной железы, мезотелиомах и в подавляющем большинстве случаев карцином яичника (Parker et al., 2005; Scaranti et al., 2020). Значительный интерес поэтому представляет исследование возможности использования таких веществ в качестве лигандов (лигандных модулей) МНТ. Напрашивающимся вариантом специфического присоединения таких лигандов к МНТ является использование двух сульфгидрильных групп модуля-носителя. Эти группы, судя по структуре модуля *HMP*, плохо доступны для модификации, поэтому для синтеза МНТ, несущего фолат, был использован вариант безлигандного МНТ с дополнительным цистеином на С-конце молекулы.

##### **4.6.1. Синтез МНТ с присоединенным фолатом**

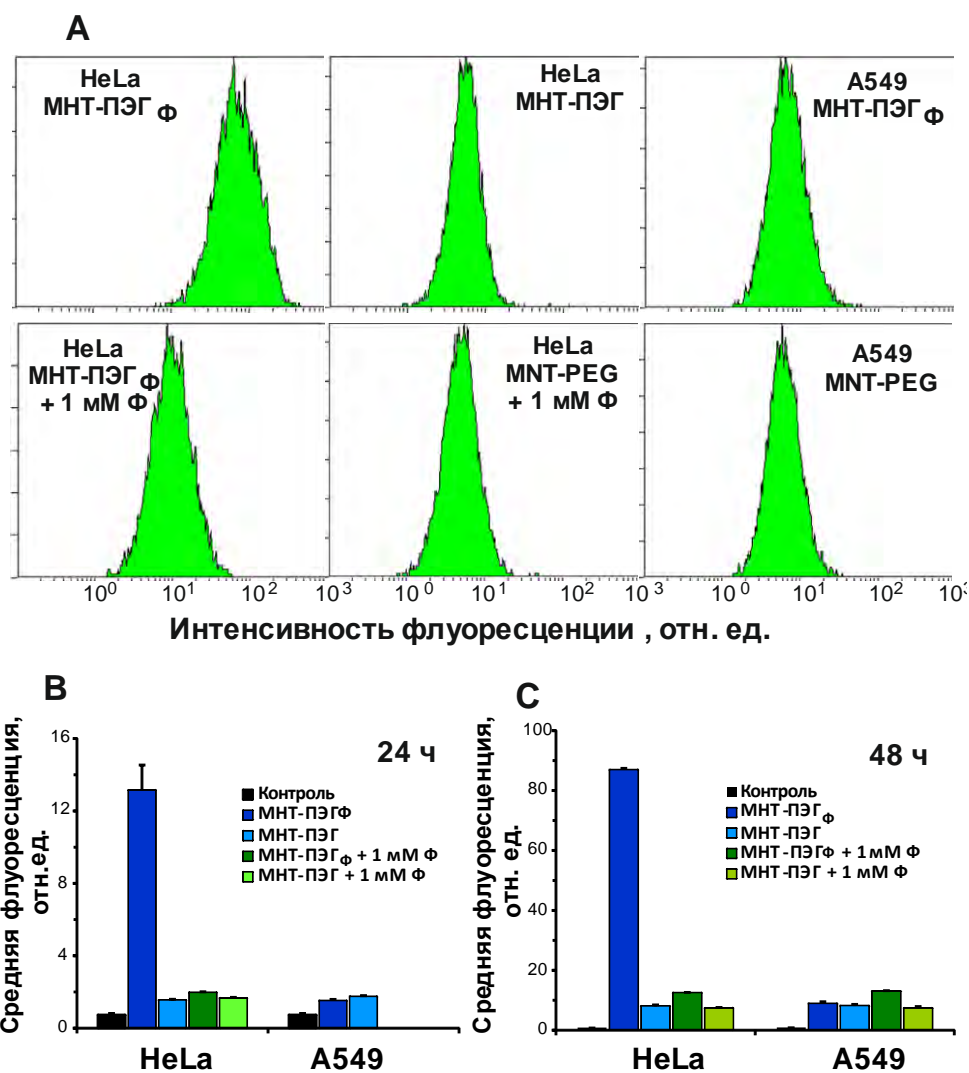
Безлигандный МНТ был успешно экспрессирован и очищен чистоты более 90%. Конъюгация малеимидного производного фолатированого полиэтиленгликоля (Mal-PEG-FA) с МНТ потребовала поиска оптимальных условий, дающих высокий выход реакции. Использование дитиотреитола с последующей очисткой от него не привело к ожидаемому результату, по-видимому, из-за недостаточно долгого сохранения восстановленного состояния сульфгидрильных групп. В таких случаях удобно воспользоваться восстанавливающим реагентом трис(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР), который не требует очистки перед реакцией присоединения. Было обнаружено, что, в отличие от заявлений производителя, 5 мМ ТСЕР мешает реакции малеимида с SH-группами. Добавление довольно короткой стадии диализа после 40-минутного восстановления SH и снижение конечной концентрации ТСЕР до ~8 мкМ в реакционной смеси привело к значительному увеличению выхода реакции (87%). Как и ожидалось, выход реакции

увеличивался с увеличением молярного отношения FA-PEG-Mal:МНТ, при реакции начиная с 19% (2 : 1) до 82% (50 : 1). Дальнейшее увеличение молярного отношения FA-PEG-Mal:МНТ, приводило к образованию высокомолекулярных продуктов, проявляющихся в виде полос в верхней части электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Эти высокомолекулярные полосы, скорее всего, обусловлены конъюгатами нескольких молекул МНТ, предположительно обусловленные следовыми примесями FA-PEG-Mal. Основываясь на зависимости выхода реакции (исключая высокомолекулярные продукты) молярного отношения FA-PEG-Mal: МНТ, был выбран 50-кратный молярный избыток FA-PEG-Mal по отношению к МНТ.

#### **4.6.2. Исследование интернализации МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф)**

Интернализацию ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф), далее обозначенного как МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub>, исследовали с помощью проточной цитометрии. Для этого МНТ были мечены флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647. Эксперименты были выполнены при помощи инкубации меченных МНТ с клетками с последующей обработкой трипсином, что удаляло поверхностные белки, в том числе и связанный с рецепторами МНТ, с последующей промывкой. Это позволяло оценивать только ту часть МНТ, которая была поглощена клетками и недоступна для действия трипсина и отмытки. Значительная флуоресценция была обнаружена в клетках, экспрессирующих фолатный рецептор (HeLa) после инкубации с флуоресцентно меченым МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> (рис. 4.34). Средняя интенсивность флуоресценции росла с увеличением времени инкубации с 24 до 48 часов (рис. 4.34). Добавление 1 мМ фолата приводило к значительному снижению среднего значения внутриклеточной флуоресценции в сравнении с флуоресцентно меченым МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> – до 9,9% через 24 часа и до 14% через 48 часов (рис. 4.34). Среднее значение внутриклеточной флуоресценции для безлигандного контрольного МНТ-ПЭГ-(Alexa647) в сравнении с флуоресцентно меченым МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> у клеток HeLa составляло 6,6% через 24 часа и 8,4% через 48 часов. Полученные данные свидетельствуют, что присоединение фолата значительно усиливает поглощение МНТ опухолевыми клетками. Добавление избытка свободного фолата к клеткам HeLa, инкубированных с безлигандным контрольным МНТ, не влияло на среднюю флуоресценцию клеток, что свидетельствует об отсутствии специфической интернализации контрольного МНТ-ПЭГ. Более того, в клетки A549, не показывающие заметной экспрессии фолатного рецептора (Yoo and Park, 2004), поступало в десять раз меньше МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub>. Флуоресценция клеток A549, инкубированных с мечеными МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> и МНТ-ПЭГ не отличались между собой.





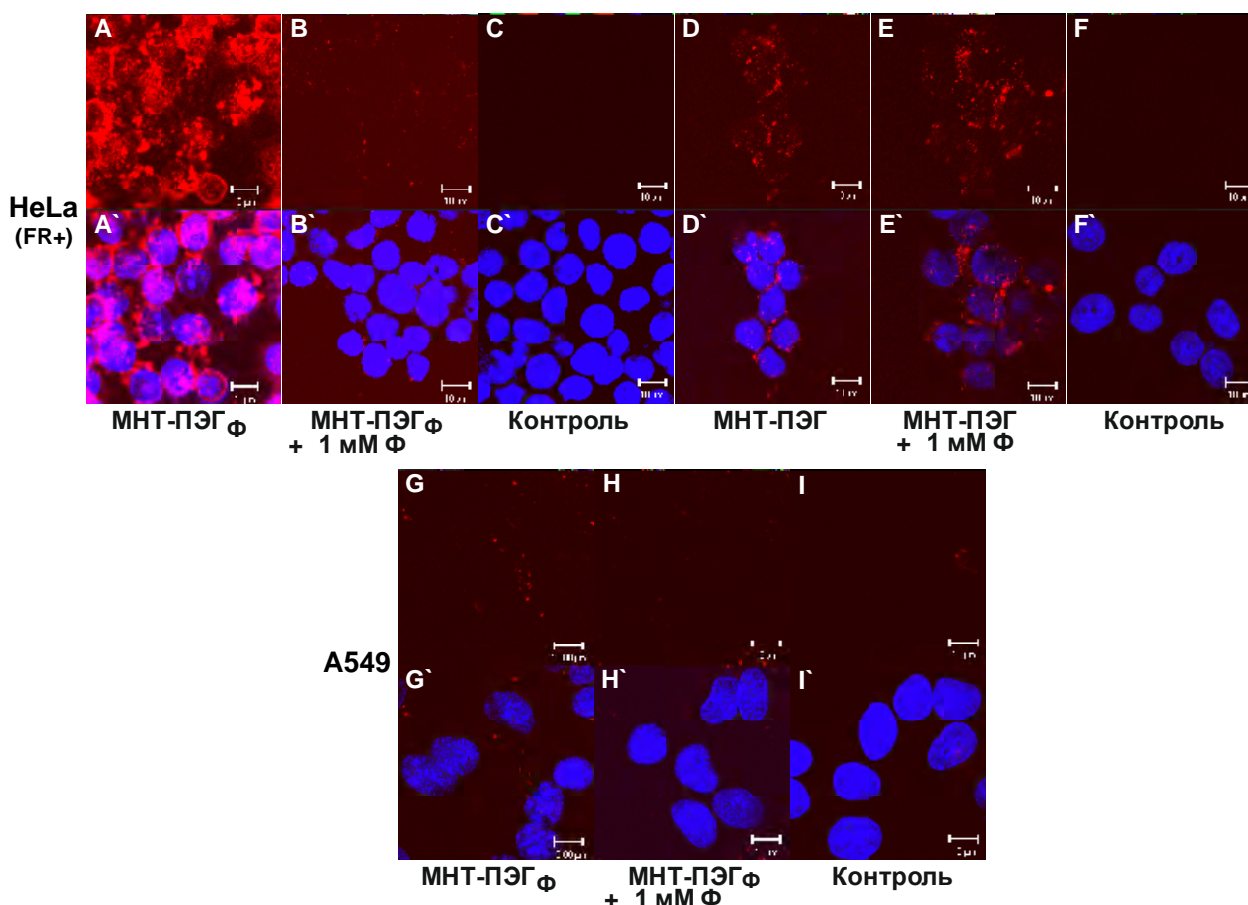
**Рисунок 4.34. Внутриклеточное накопление МНТ-ПЭГ<sub>φ</sub>, меченного Alexa Fluor 647 по данным проточной цитометрии.** А – Типичные гистограммы проточной цитометрии клеток HeLa и A549, инкубированных с 50 нМ МНТ-ПЭГ<sub>φ</sub>-Alexa647, или с МНТ-ПЭГ-Alexa647 с и без 1 мМ фолата, в течение 48 часов при 37°С. В, С – Средняя интенсивность флуоресценции в клетках HeLa или A549, с 50 нМ МНТ-ПЭГ<sub>φ</sub>-Alexa647, или с МНТ-ПЭГ-Alexa647 с и без 1 мМ фолата, в течение 24 часов (В) или 48 часов (С) при 37°С. Клетки, инкубированные без добавок в течение того же времени были использованы в качестве контроля. Планки погрешностей представляют собой стандартные ошибки среднего (n = 3–6). Представленные результаты получены в результате совместной работы с Т.А. Сластниковой и другими сотрудниками лаборатории.

#### 4.6.3. Внутриклеточное распределение МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ<sub>φ</sub>)

Исследование внутриклеточного распределения МНТ-ПЭГ<sub>φ</sub> и его специфичности проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на фиксированных клетках HeLa и A549 (рис. 4.35). Для этого клетки инкубировали с МНТ-ПЭГ<sub>φ</sub> или МНТ-ПЭГ, меченными Alexa Fluor 647, в течение 48 часов. Проведенные эксперименты показали внутриклеточную и внутриядерную флуоресценцию после инкубации с МНТ-ПЭГ<sub>φ</sub>-Alexa647 (рис. 4.35 А и А'). Добавление избытка свободного фолата в среду, а также использование нецелевого контрольного МНТ-ПЭГ-Alexa647



приводили к существенно меньшему сигналу (рис. 4.35 В, В', D и D'). Клетки A549, дефицитные по экспрессии рецептора фолата, демонстрировали едва видимый сигнал, который не зависел от наличия свободного фолата в среде или использования нецелевого контрольного МНТ-ПЭГ (рис. 4.35 G, G', H, H', I и I').

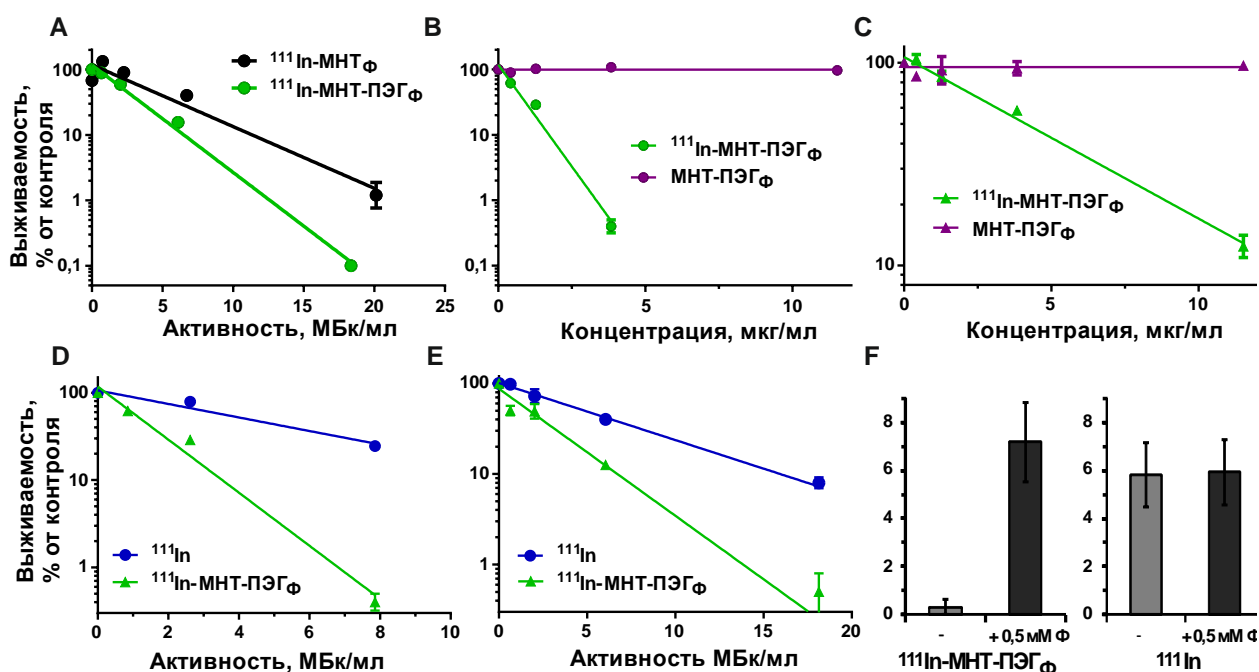


**Рисунок 4.35.** Внутриклеточное распределение МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub>, меченного Alexa Fluor 647, визуализированное конфокальной лазерной сканирующей микроскопией. Изображения с конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (оптические срезы, проходящие через середину ядер) клеток HeLa (экспрессирующие фолатный рецептор-α) или A549 (не экспрессирующие), инкубированных с 50 нМ МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub>-Alexa647 (a, a', g, g'), или с добавлением 1 мМ фолата (b, b', h, h'); с контрольным безлигандным МНТ-ПЭГ-Alexa647, (d, d') или с добавлением 1 мМ фолата (e, e') в течение 48 часов. Необработанные клетки служили контролем автофлуоресценции (c, c', f, f', i, i'). Флуоресценция Alexa Fluor 647, соответствующая распределению МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub>-Alexa647 или МНТ-ПЭГ-Alexa647, представлена красным (a – i), а наложение флуоресценции Alexa Fluor 647 (красный) и красителя ядер DAPI синий представлено на панелях (a' – i'). Масштабная планка = 10 мкм. Объектив Plan-Apochromat 63X, NA=1,4 Oil. Представленные результаты получены в результате совместной работы с Т.А. Сланиковой и другими сотрудниками лаборатории.

#### 4.6.4. Цитотоксичность <sup>111</sup>In-ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф)

Для исследования возможности использования МНТ с присоединенным фолатом для уничтожения клеток с повышенной экспрессией рецептора фолата к МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub> и МНТ-ПЭГ присоединяли <sup>111</sup>In, как описано в разделе «Материалы и методы».

Выживаемость оценивали при помощи колониеобразования. Сравнение клоногенной выживаемости клеток HeLa после 48-часовой инкубации с  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ и  $^{111}\text{In}$ -МНТ $_{\Phi}$  с концентрациями в диапазоне 0–25 МБк приведены на рисунке 4.36А. Проведенные эксперименты демонстрируют преимущество сайт-специфического прикрепления фолата через ПЭГ по сравнению с непосредственным присоединением фолата к МНТ. Немеченый МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$ , в отличие от МНТ с присоединенным  $^{111}\text{In}$  не влиял на выживаемость клеток HeLa и U87 MG, экспрессирующих фолатный рецептор  $\alpha$  (рис. 4.36В и 4.36С). Эти результаты демонстрируют, что в пределах изученного диапазона концентраций немеченый МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$  сам по себе не токсичен. Цитотоксический эффект  $^{111}\text{In}$  на клетки HeLa и U87 MG значительно увеличивался в результате присоединения к МНТ-ПЭГ- $\Phi$  (рис. 4.36D и E). Проведенные эксперименты показали также, что цитотоксическая эффективность  $^{111}\text{In}$ , доставляемого МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$ , значительно уменьшалась в присутствии избытка свободного фолата, в то время как влияние свободного фолата на цитотоксичность  $^{111}\text{In}$  отсутствовало (рис. 4.36F), что свидетельствует о специфичности действия  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$ .



**Рисунок 4.36. Цитотоксичность  $^{111}\text{In}$ , доставляемого МНТ с присоединенным фолатом.** А – Цитотоксичность  $^{111}\text{In}$ -МНТ $_{\Phi}$  на клетки HeLa по сравнению с  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$ . В, С – цитотоксичность  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$  по сравнению с немеченым МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$  на клетках HeLa (В) и U87 MG (С). D, E Цитотоксичность  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$  по сравнению с  $^{111}\text{In}$  на клетках HeLa (D) и U87 MG (E). F – Цитотоксичность  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $_{\Phi}$  и контрольного  $^{111}\text{In}$  в присутствии или в отсутствие 500 мкМ свободного фолата на клетках HeLa. Сплошные линии представляют собой результат аппроксимации данных по одноэкспоненциальной модели. Планки погрешностей представляют собой стандартные ошибки среднего (n = 3–6). Представленные результаты получены в результате совместной работы с Т.А. Слостниковой.

#### 4.6.5. Распределение $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-(ПЭГ-Ф) после внутриопухолевого введения

Как показали результаты ОФЭКТ, совмещенной с рентгеновской КТ, после внутриопухолевой инъекции  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> продемонстрировал хорошее внутриопухолевое удержание активности  $^{111}\text{In}$  (рис. 4.37А-С). Время полувыведения МНТ из ксенотрансплантата HeLa с поправкой на распад, рассчитанное по одноэкспоненциальному уравнению составило около 52 часов (рис. 4.37В). Поступление радиоактивности в нормальные ткани после внутриопухолевого введения  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> было низким (рис. 4.37А и С), и в основном ограничивалось небольшими значениями в печени и почках.

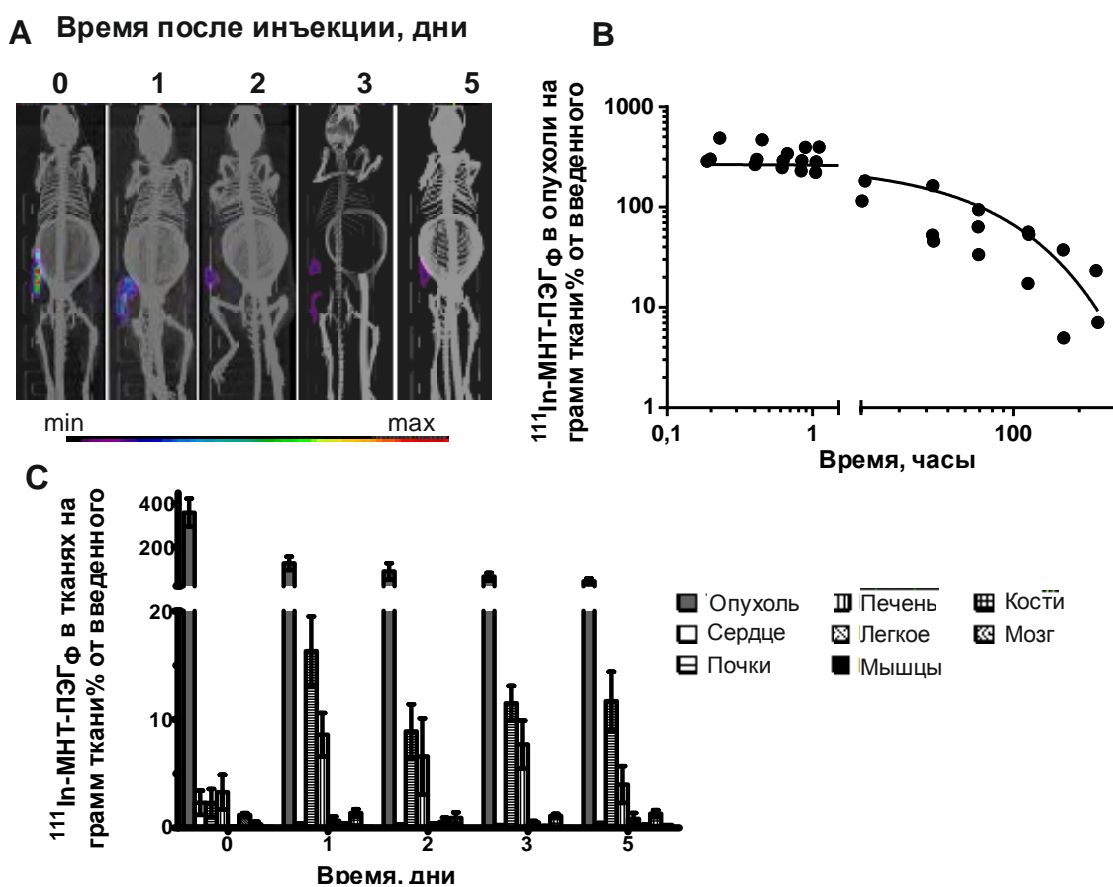
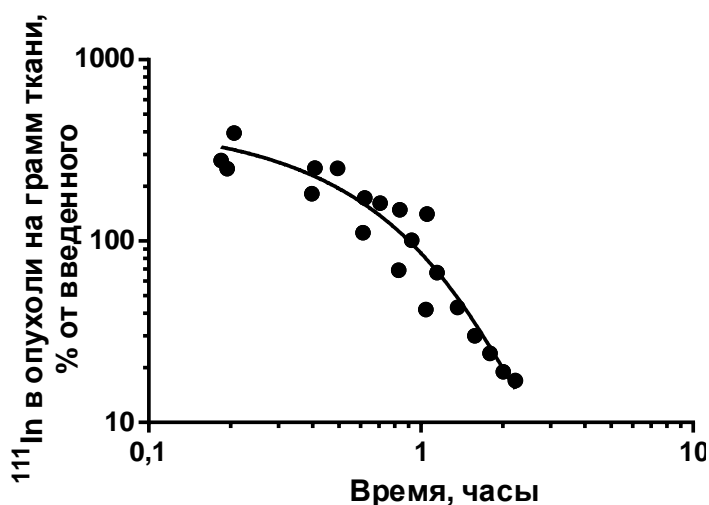


Рисунок 4.37. Распределения активности  $^{111}\text{In}$  после введения  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ПЭГ-Ф ( $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub>) в подкожные опухоли аденокарцинома человека линии HeLa у мышей Balb/c nu/nu по результатам компьютерной томографии. А – совмещенные изображения ОФЭКТ (градации цвета согласно шкале под рисунком) и КТ (градации серого) репрезентативного животного в указанное время после инъекции. Б – скорректированная на распад активность  $^{111}\text{In}$  в опухоли после введения. Сплошная линия показывает результаты аппроксимации данных по одноэкспоненциальной модели. Кольцо в области живота, представленное на томограммах, является датчиком дыхания. С – сравнение распределения активности в органах  $^{111}\text{In}$  после внутриопухолевого введения  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub>. Представленные результаты получены в результате совместной работы с Т.А. Слостниковой и другими сотрудниками лаборатории.

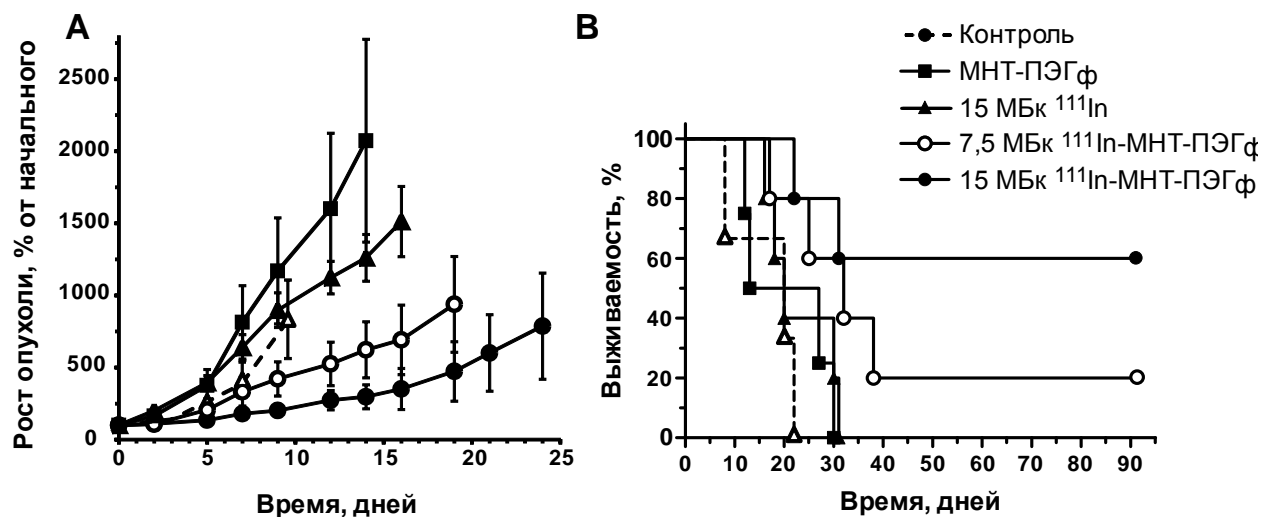
В отличие от  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub>,  $^{111}\text{In}$  быстро элиминировался из опухоли: период полувыведения с поправкой на распад составлял 24 мин (рис. 4.38).



**Рисунок 4.38.** Изменение активности в опухоли мыши после внутриопухолевого введения  $^{111}\text{In}$  в ксенографты аденокарциномы человека HeLa у мышей Balb/c nu/nu. Сплошная линия показывает результаты аппроксимации данных по одноэкспоненциальной модели.

#### 4.6.6. Терапия ксенографтов аденокарциномы человека HeLa

Ксенотрансплантаты аденокарциномы человека HeLa были использованы также для проверки возможности использования МНТ, несущего присоединенный химически фолат, для терапии при помощи доставки в ядра клеток-мишеней эмиттера электронов Оже. МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub> метили  $^{111}\text{In}$  как описано в разделе материалы и методы до начальной удельной активности 2,7 ГБк/мг. Для проверки возможности использования полученного препарата для терапии использовали опухоли, полученные подкожным введением 10 млн клеток HeLa иммунодефицитным мышам BALB/c-nu/nu. Для максимальной доступности рецепторов фолата животных переводили на дефицитный по фолату корм за 10 дней до начала лечения и содержали на нем. Проведенные эксперименты показали дозозависимую задержку роста опухоли после внутриопухолевого введения 7,5 и 15 МБк  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub> на мышь (рис. 4.39А). Измерение размера опухолей показало заметное торможение роста опухолей (ТРО), вплоть до полной их резорбции. Величину ТРО рассчитывали из соотношения объемов (V) опухолей как  $[1 - (V_{\text{эсп}})/(V_{\text{контр}})] \times 100\%$ . Поскольку контрольных групп было две – одна с той же дозой радиоактивности, что и в опытной, но без МНТ, а вторая с той же дозой МНТ, но без радиоактивности, – то для каждой опытной группы получали два значения ТРО соответствующие двум контрольным группам. Для 15 МБк  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ<sub>ф</sub> ТРО составило 76 и 85%, для вдвое меньшей дозы ТРО было меньше – 50 и 70%. Критерием окончания эксперимента служило достижение объема опухоли 2000 мм<sup>3</sup>.



**Рисунок 4.39.** Терапия ксенографтов HeLa с помощью  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $\phi$  на мышинной модели BALB/c (nu/nu). **А** – рост опухолей; **В** – график выживаемости Каплана–Мейера в группах мышей, которым внутрь опухоли вводили 7,5 мкг (15 МБк)  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $\phi$  (●); 3,75 мкг (7,5 МБк)  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $\phi$  (○); 15 МБк  $^{111}\text{In}$  (▲); 7,5 мкг МНТ-ПЭГ $\phi$  (■) или не вводили ничего (Δ). Представленные результаты получены в результате совместной работы с Т.А. Слостниковой и другими сотрудниками лаборатории.

Медиана выживаемости животных контрольных групп 1 и 2 и у животных, не получавших инъекций, не различалась между собой и от контроля (мыши, которым ничего не вводили). В то же время в группе мышей, получавших 7,5 МБк  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $\phi$ , медианная выживаемость увеличивалась в 1,6 раза, а у большинства мышей, получавших 15 МБк  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $\phi$ , опухоли не достигли критического объема к концу эксперимента (3 месяца после или исчезали (рис. 4.39В)). Кривая выживаемости животных, получавших 15 МБк  $^{111}\text{In}$ -МНТ-ПЭГ $\phi$ , достоверно ( $p = 0,0149$  по критерию Кокса–Мантеля, рассчитано с помощью программы GraphPad Prism 6, “GraphPad”, США) отличалась от кривых выживаемости для всех контрольных групп. Более высокая доза была более эффективной с торможением роста опухоли до 80% по сравнению с животными, получавшими соответствующую дозу немеченого МНТ. Соответствующая контрольная инъекция  $^{111}\text{In}$ , не присоединенного к МНТ, не приводила к ингибированию роста опухоли. Существенной потери веса животных не наблюдалось ни в одной группе лечения.

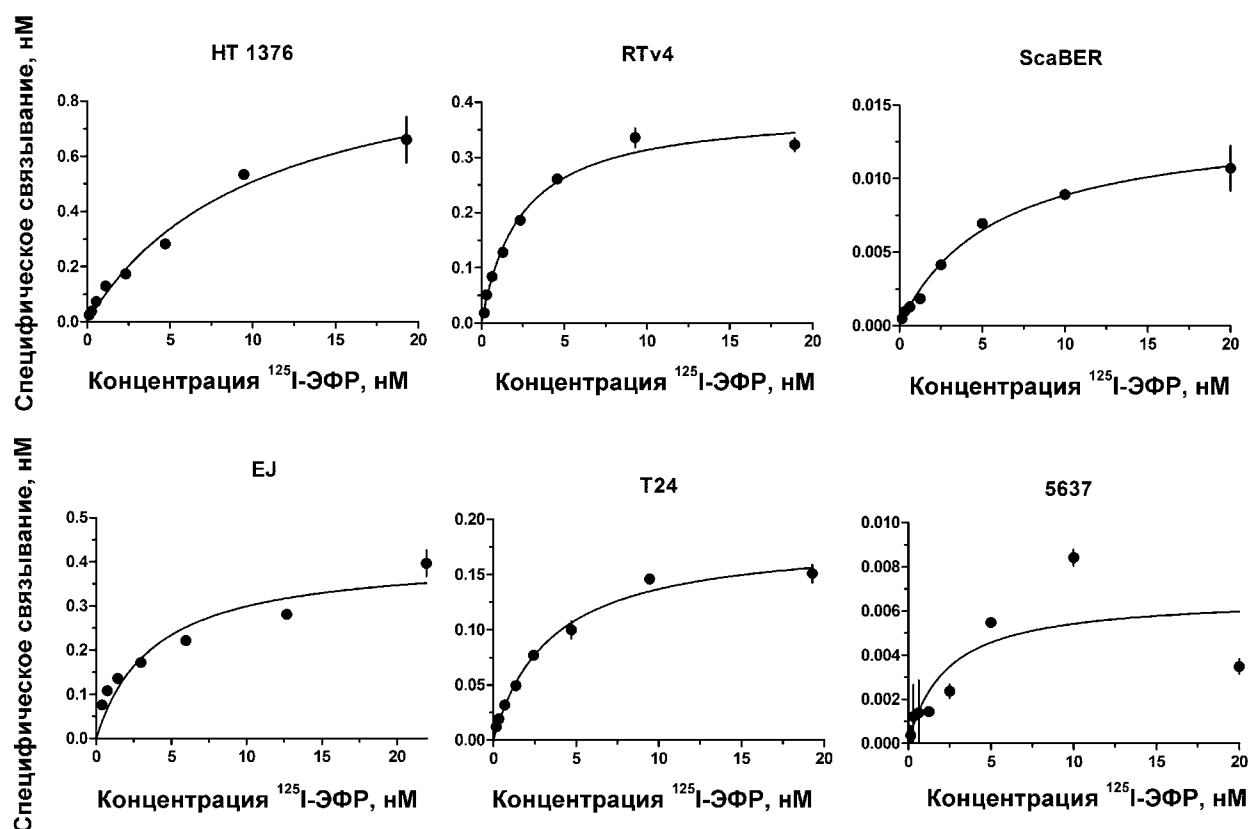
Проведенные исследования продемонстрировали возможность присоединения низкомолекулярного лиганда к блоку модулей МНТ, обеспечивающих внутриклеточный транспорт и присоединение активного начала. Сконструированные таким образом МНТ обладают достоверным терапевтическим потенциалом. Результаты данного раздела изложены в статьях: Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Храмцов Ю.В., Карягина Т.С., Георгиев Г.П., Соболев А.С. (2017). Противоопухолевая эффективность эмиттера ЭО  $^{111}\text{In}$ ,

доставляемого модульным нанотранспортером в ядра клеток с повышенной экспрессией фолатного рецептора. *Доклады Российской академии наук.* **473**, 1, 98-100 (вклад автора состоит в организации работ, участии в планировании экспериментов, выполнении части экспериментальных работ, связанных с проведением экспериментов по мечению препаратов, исследованию их свойств на клетках в культуре и при исследованиях на лабораторных животных, в анализе данных и написании статьи); Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Karyagina T.S., Ovechko S.A., Sobolev A.S. (2017). Development and evaluation of a new modular nanotransporter for drug delivery into nuclei of pathological cells expressing folate receptors. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 1315-34 (вклад автора состоит в организации работ, участии в планировании экспериментов, выполнении части экспериментальных работ, связанных с проведением экспериментов по мечению препаратов, исследованию их свойств на клетках в культуре и при проведении исследований на лабораторных животных, в анализе данных и в написании статьи). Автор искренне признателен своим коллегам, без которых эта работа не могла быть выполнена.

#### **4.7. Применение $^{111}\text{In}$ -МНТ для лечения ксенотрансплантатов мочевого пузыря со сверхэкспрессией EGFR**

##### **4.7.1. Экспрессия EGFR на клеточных линиях рака мочевого пузыря**

Уровень экспрессии EGFR широко варьирует в разных типах опухолевых клеток. Для определения количества EGFR на поверхности клеток был проведен анализ связывания с  $^{125}\text{I}$ -ЭФР с различными линиями клеток мочевого пузыря человека: HT-1376, ScaBER, RTv4, EJ, T24 и 5637. Зависимость связывания клеток от концентрации меченого ЭФР в среде исследовали при 4° С. Число сайтов специфического связывания и константа равновесной диссоциации определяли как параметры уравнения, описывающего равновесное обратимое взаимодействие моновалентного лиганда с рецептором в условиях равновесия. Эксперименты показали, что все эти клеточные линии имеют заметную экспрессию EGFR (рис. 4.40, табл. 4.5), хотя количество рецепторов на клетку у разных линий рака мочевого пузыря может различаться почти на порядок.



**Рисунок 4.40.** Радиолигандный анализ связывания <sup>125</sup>I-ЭФР с клетками рака мочевого пузыря человека линий HT-1376, RTv4, ScaBER, EJ, T24 и 5637. Результаты типичных экспериментов, данные приведены в виде средних значений ± ст. ошибка среднего. Линия регрессии представляет собой результат расчета связывания одного лиганда с рецептором в программе Prism 6. Представлены результаты, полученные в результате совместной работы с Ю.Р. Шараповой.

**Таблица 4.5.** Параметры связывания <sup>125</sup>I-ЭФР с клетками линий рака мочевого пузыря человека.

Линия клеток	$V_{max}$ , мест связывания на клетку ± ст. ошибка	$K_d$ , нМ ± ст. ошибка
HT-1376	211000 ± 22000	10,3 ± 2,4
RTv4	170000 ± 5800	2,4 ± 0,25
ScaBER	169000 ± 8800	5,8 ± 0,8
EJ	162000 ± 9200	3,8 ± 1,0
T24	40000 ± 2200	3,4 ± 0,4
5637	33000 ± 9800	2,4 ± 2,2

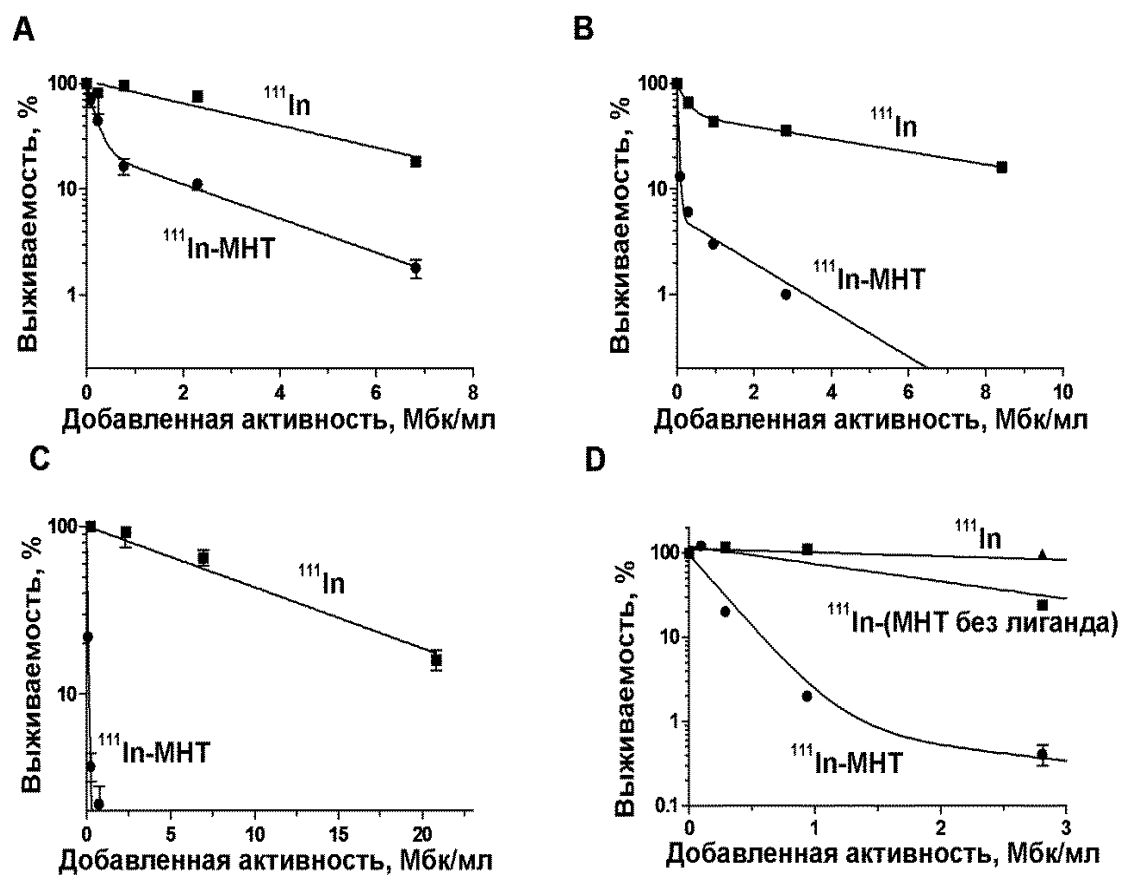
$V_{max}$  – количество мест специфического связывания;  $K_d$  – равновесная константа диссоциации комплекса of <sup>125</sup>I-ЭФР–рецептор.

#### 4.7.2. Исследования цитотоксичности $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР

Для исследования цитотоксичности ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с ковалентно присоединенным хелатором НОТА, был помечен радиоактивным изотопом индия ( $^{111}\text{In}$ ), как описано в разделе «Материалы и методы». Доля изотопа, не присоединенного к МНТ, не превышала 3-5% от общей активности, что было определено при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Зависимости цитотоксического действия свободного  $^{111}\text{In}$  от его концентрации для исследуемых линий клеток рака мочевого пузыря хорошо аппроксимировалась одноэкспоненциальной моделью. Иная картина была выявлена при изучении цитотоксического действия  $^{111}\text{In}$ -НОТА-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР. В большинстве случаев эти зависимости лучше соответствовали двухэкспоненциальной модели. Такой тип зависимости выживаемости клеток от концентрации радиоактивности добавленного вещества может указывать на гетерогенность клеточной популяции по отношению к действию  $^{111}\text{In}$ , доставляемого МНТ. Все исследованные клеточные линии рака мочевого пузыря показали значительное усиление цитотоксичности  $^{111}\text{In}$  после его присоединения к МНТ, нацеленному на EGFR (рис. 4.41, А-С, таблица 4.6). Несмотря на то, что количество EGFR на клетку для клеточных линий рака мочевого пузыря было, по крайней мере, на порядок ниже, чем в клетках линии эпидермоидной карциномы человека А431 ( $\sim 2,5 \cdot 10^6$  рецепторов на клетку), увеличение цитотоксического эффекта было достаточно выраженным (в 20–70 раз по сравнению со свободным  $^{111}\text{In}$ ).

Увеличение цитотоксичности за счет МНТ было строго связано с присутствием в его составе ЭФР:  $^{111}\text{In}$ , присоединенный к усеченному МНТ, не имеющему лигандного модуля, оказывал лишь незначительное влияние на цитотоксический эффект по сравнению со свободным  $^{111}\text{In}$  (рис. 4.41D).





**Рисунок 4.41.** Увеличение цитотоксичности  $^{111}\text{In}$ , в результате доставки с помощью МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в клетки рака мочевого пузыря. А – клетки 5637, В – EJ и С – HT-1376. D – Цитотоксическое действие  $^{111}\text{In}$ , присоединенного к ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, по сравнению с  $^{111}\text{In}$ , присоединенного к МНТ без лиганда (ДТокс-НМР-СЯЛ), на клетки EJ. Линии представляют собой результаты расчета данных по моно- или биэкспоненциальной модели. Планки погрешностей представляют собой стандартные ошибки среднего ( $n = 3-6$ ). Представлены результаты, полученные в результате совместной работы с Т.А. Слостниковой.

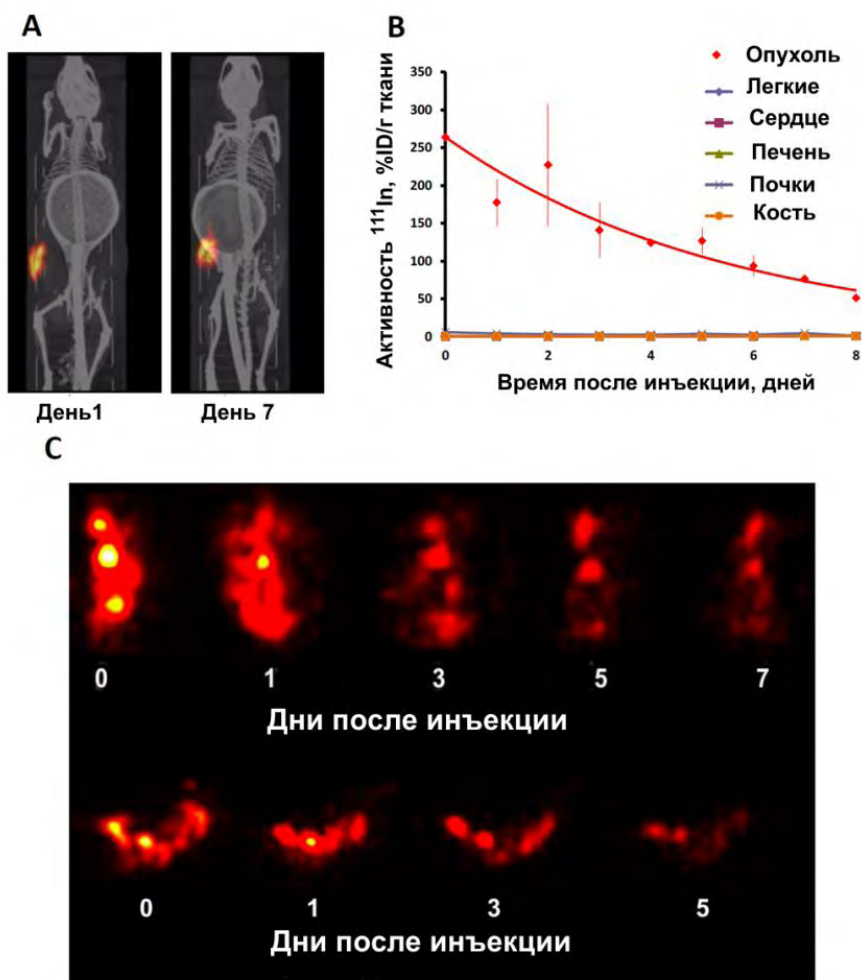
**Таблица 4.6.** Цитотоксическое действие  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР и свободного  $^{111}\text{In}$  на линии раковых клеток.

Линия клеток	$A_{37}$ , МБк/мл		Увеличение цитотоксичности, раз
	$^{111}\text{In}$ -НОТА-МНТ	$^{111}\text{In}$	
А431	0,023	6,3	271
HT-1376	0,19	13,0	70
EJ	0,039	2,22	57
5637	0,41	10,5	19

$A_{37}$  – активность уменьшающая выживаемость клеток в “e” раз.

#### 4.7.3. Исследование распределения $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в организме мышей

$^{111}\text{In}$ , присоединенный к МНТ, нацеленному на EGFR, в отличие от свободного контроля  $^{111}\text{In}$ , оставался в месте инъекции в течение длительного времени. После внутриопухолевой инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР продемонстрировал хорошее внутриопухолевое удерживание активности  $^{111}\text{In}$  (рис. 4.42).

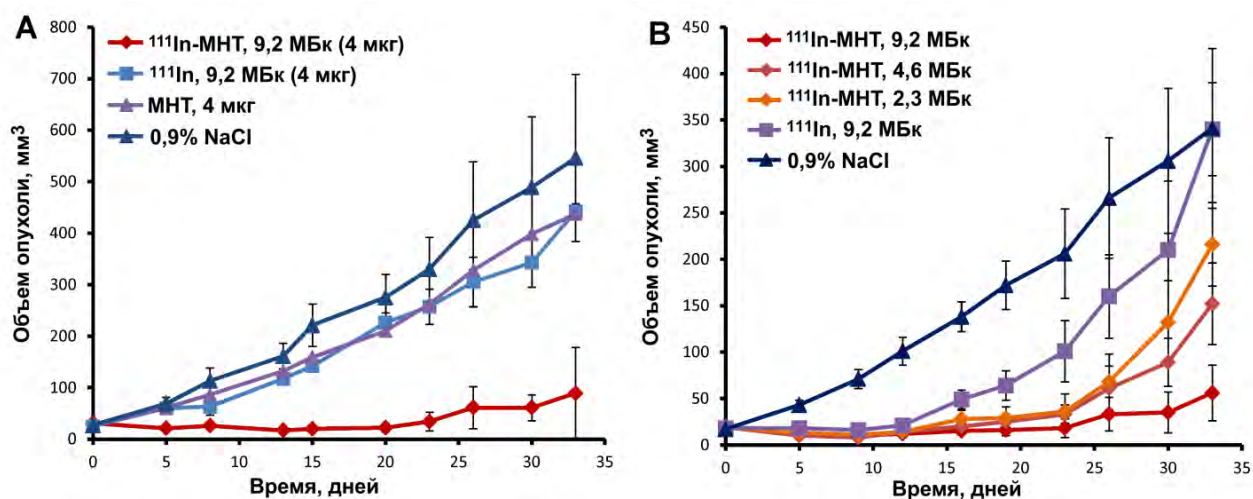


**Рисунок 4.42.** Томографическое исследование иммунодефицитных мышей, несущих подкожные ксенотрансплантаты карциномы мочевого пузыря EJ человека после внутриопухолевой инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР. **А** – Изображения мышей ОФЭКТ/КТ (цветные/серые) животного, полученные в указанные моменты времени после инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с использованием коллиматора с отверстиями диаметром 1 мм. Оба изображения индивидуально масштабированы до максимальной яркости. **В** – Кинетика изменения активности  $^{111}\text{In}$  с коррекцией на распад в ксенотрансплантате EJ и нормальных органах после инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР одноэкспоненциальной модели. **С** – ОФЭКТ опухоли ксенотрансплантата EJ репрезентативного животного с высоким разрешением, полученные в указанные моменты времени после инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с использованием коллиматора с отверстиями диаметром 0,35 мм. Кольцо в брюшной области, представленное на компьютерной томографии мышей, является датчиком дыхания. Представленные результаты получены совместно с Т.А. Сланиковой и А.С. Абросимовым.

Время двукратного уменьшения МНТ в опухоли с поправкой на распад из ксенотрансплантатов EJ составляло  $4,1 \pm 0,5$  дня в соответствии с расчетом модели с одноэкспоненциальным уравнением (рис. 4.42 В). Обнаружение радиоактивности после внутриопухолевого введения  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в нормальных тканях было низким и ограничивалось почти неопределяемым сигналом, наблюдаемым в основном в почках, печени и лимфатических узлах. Последовательная ОФЭКТ/КТ-визуализация с высоким разрешением (диафрагмы коллиматора диаметром 0,35 мм) опухоли показала, что распределение радиоактивности в опухоли оставалось почти неизменным в течение всего периода наблюдения (6 дней) (рис. 4.42 С).

#### 4.7.4. Терапия подкожных ксенотрансплантатов EJ

Для изучения противоопухолевой эффективности  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР на ксенотрансплантатах рака мочевого пузыря человека, 9,2 МБк (4 мкг),  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, 9,2 МБк  $^{111}\text{In}$  без МНТ, 4 мкг ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР без  $^{111}\text{In}$  или физиологический раствор инъецировали в подкожные ксенотрансплантаты EJ на 14-й день после прививки опухоли EJ. Выраженное ингибирование роста ксенотрансплантата наблюдалось после однократной внутриопухолевой инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР по сравнению со всеми контрольными группами (рис. 4.43А). Статистически значимые различия в среднем объеме опухоли наблюдались между группой с инъекцией  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР и всеми контрольными группами с 5-го дня после инъекции. До 26-го дня после однократной внутриопухолевой инъекции  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР у большинства животных этой экспериментальной группы опухоли не увеличивались в размерах. На 26 день после начала лечения средний объем опухоли в группе мышей, получавших инъекцию  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР ( $52 \pm 15 \text{ мм}^3$ ), был в 9 раз меньше среднего объема опухоли у животных контрольной группы, которым вводили физиологический раствор ( $402 \pm 78 \text{ мм}^3$ ). Тенденция к возобновлению роста ксенотрансплантата в группе животных, которым вводили  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, наблюдалась только на 30-й день после обработки. Статистически значимые отличия среднего объема опухоли в группе животных, получавших меченый МНТ, от исходного значения в опухоли до лечения были обнаружены только на 33-й день после инъекции МНТ. Введение одного и того же количества МНТ, нацеленного на EGFR, или только  $^{111}\text{In}$  в той же дозе не привело к заметному изменению скорости роста опухоли (рис. 4.43А).



**Рисунок 4.43.** Противоопухолевое действие  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР на ксенотрансплантаты рака мочевого пузыря человека EJ у иммунодефицитных мышей. **А** – рост опухоли после внутриопухолевой инъекции 9,2 МБк (4 мкг)  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, 9,2 МБк  $^{111}\text{In}$  без МНТ, 4 мкг ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР без  $^{111}\text{In}$  или физиологического раствора в подкожные ксенотрансплантаты EJ. **В** - рост опухоли после внутриопухолевой инъекции 9,2 МБк (4 мкг), или 4,6 МБк (2 мкг), или 2,3 МБк (1 мкг)  $^{111}\text{In}$ -ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в подкожные ксенотрансплантаты EJ. Представленные данные получены в результате совместной работы с сотрудниками МНИОИ имени П.А. Герцена и Т.А. Слостниковой.

Снижение дозы меченого МНТ до 4,6 МБк и 2,3 МБк на мыш (2 мкг и 1 мкг МНТ на мыш, соответственно) привело к дозозависимому снижению противоопухолевого эффекта (рис. 4.43 В). В конце этого эксперимента у 2 из 5 мыш, которым вводили 9,2 МБк  $^{111}\text{In}$ -НОТА-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР на мыш, не было обнаруживаемой опухоли.

Результаты раздела 4.7 изложены в статье: Rosenkranz, A.A., Slastnikova, T.A., Karmakova T.A., Vorontsova M.S. Morozova N.B., Petriev V.M., Abrosimov A.S., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Ulasov A.V., Yakubovskaya, R.I. Georgiev G.P., Sobolev A.S. (2018). Antitumor activity of Auger electron emitter  $^{111}\text{In}$  delivered by modular nanotransporter for treatment of bladder cancer with EGFR overexpression. *Front. Pharmacol.* **9**, 1331. DOI:10.3389/fphar.2018.01331 (вклад автора состоит в организации работ, планировании экспериментов, их проведении, включая получение меченых препаратов, работы на культурах клеток, проведение томографических исследований, анализе результатов и написании). Эксперименты с животными по терапии ксенографтов A431 были проведены сотрудниками МНИОИ им. П.А. Герцена, которым автор искренне признателен. Автор также благодарен коллегам по лаборатории и, прежде всего, Т.А. Слостниковой, за их вклад в работу.

Автор глубоко признателен всем коллегам, благодаря работе которых эти исследования были выполнены.

#### **4.8. Создание многофункциональных конструкций для доставки ДНК на основе полилизина в клетки-мишени**

Перечисленные варианты доставки в заданный компартмент клетки-мишени относятся к доставке цитотоксических средств, применяемых в основном для лечения онкологических заболеваний. Другим классом веществ, направленная внутриклеточная доставка которых представляется перспективным, являются нуклеиновые кислоты, кодирующие необходимые для терапии белки и регуляторные последовательности.

##### **4.8.1. Синтез конъюгата инсулин-полилизин и проверки возможности специфической трансфекции клеток с его помощью**

На первом этапе данной части работы была создана полиплексная система для доставки в клетки плазмидной ДНК на основе поликатиона полилизина (pLys), к которому в качестве эндцитируемого лиганда был присоединен инсулин человека (Ins). Ковалентное присоединение инсулина к полилизину с молекулярной массой 90 кД было осуществлено с помощью сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата. Полученный конъюгат при определенных соотношениях компонентов был способен образовывать наноразмерные комплексы с ДНК за счет зарядовых взаимодействий, образуя комплекс ДНК–(Ins-pLys). Такая относительно простая система была способна обеспечить компактизацию доставляемой плазмидной ДНК и рецептор-опосредуемый транспорт ее внутрь клетки-мишени, в качестве которых служили клетки гепатомы PLC/PRF/5, что было показано с помощью КЛСМ (табл. 4.7).

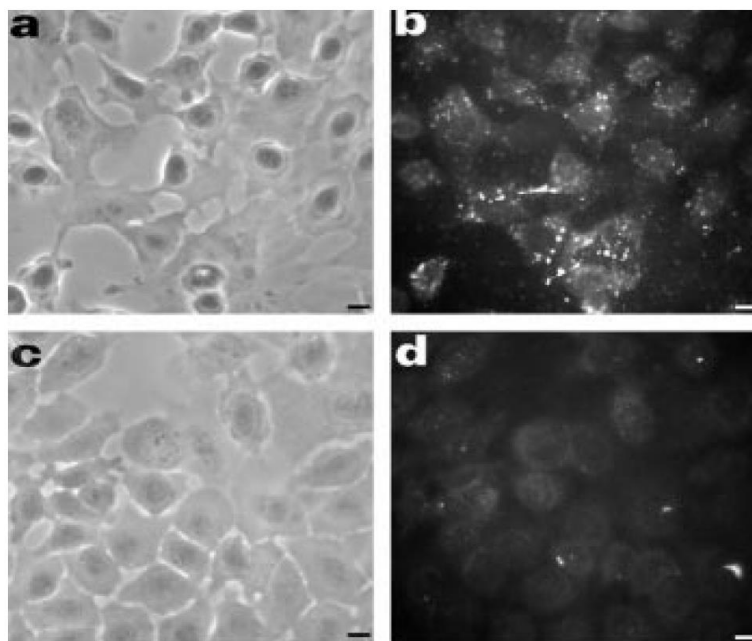
**Таблица 4.7. Флуоресценция интернализованного полиплекса на основе инсулин-pLys, меченного флуоресцеином, в клетках PLC/PRF/5 по данным КЛСМ.**

Добавки	Живые клетки		Фиксированные клетки	
	Цитоплазма у ядра	Ядро	Цитоплазма у ядра	Ядро
Полиплекс*	2469 ± 91	408 ± 11	4119 ± 127	2051 ± 91
Полиплекс + инсулин**	1319 ± 29	316 ± 5	2568 ± 74	1103 ± 29
Нет	843 ± 38	157 ± 4	2260 ± 93	934 ± 33

\* - 3,7 нМ по плазмидной ДНК, \*\* - 10 мкМ. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Во всех случаях различия между интенсивностями флуоресценции после инкубации с конструкцией в отсутствие, и в присутствии 10 мкМ инсулина статистически значимы (p < 0,001).

Аналогичный рецептор-опосредованный эндцитоз полиплексов на основе инсулин-pLys, доставляющих плазмидную ДНК, был обнаружен и в других клетках-

мишенях, в частности, в иммортализованных клетках эпителия молочной железы человека HC-11 (рис. 4.44).



**Рисунок 4.44. Визуализация клеточного поглощения полиплексов на основе Ins-pLys, меченных флуоресцеинизотиоцианатом клетками HC-11 по данным видеоинтенсификационной микроскопии.** Клетки инкубировали с полиплексами (5 нМ по плазмидной ДНК) в течение 3 часов при 37° С в отсутствие (А и В) и в присутствии (С и D) избытка свободного инсулина (10 мкМ). А и С - фазово-контрастные изображения; В и D, флуоресцентные изображения тех же полей, что на А и С, соответственно. Метка – 10 мкм. Изображения получены с фазовоконтрастным объективом 40X (NA = 0,75).

Флуоресценция флуоресцеина существенно уменьшается при закислении среды от нейтрально до слабокислой. Добавление 10 мкМ хлорида аммония, защелачивающего кислые внутриклеточные компартменты клеток, выявило увеличение флуоресценции околядерном пространстве клеток, что свидетельствует о нахождении полиплексов в кислых компартментах, предположительно поздних эндосомах и лизосомах.

Необходимо отметить, что получаемая таким образом эффективность трансфекции клеток гепатомы была невысокой (табл. 4.8).

Невысокой оказалась эффективность трансфекции и при использовании в полиплексах плазмиды, несущей ген люциферазы под контролем RSV-промотора. При трансфекции клеток HC-11, с помощью полиплекса (Ins-pLys)-pRSVL (12,5 нМ) активность люциферазы в клеточных лизатах ( $4,9 \pm 0,7$  отн. ед.  $10^6$  клеток). Избыток свободного инсулина почти полностью ингибировал трансфекцию (менее 0,5 отн. ед.).

**Таблица 4.8. Процент клеток, с экспрессией доставляемого гена в результате трансфекции клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 с использованием полиплекса на основе Ins-pLys.**

Эксперимент	Ins-pLys	Ins-pLys + 40 нМ инсулина	Достоверность различия
1	1,09 ± 0,23	0,19 ± 0,09	p < 0,0005
2	0,61 ± 0,20	0,12 ± 0,09	p < 0,01
3	1,15 ± 0,24	0,40 ± 0,15	p < 0,005

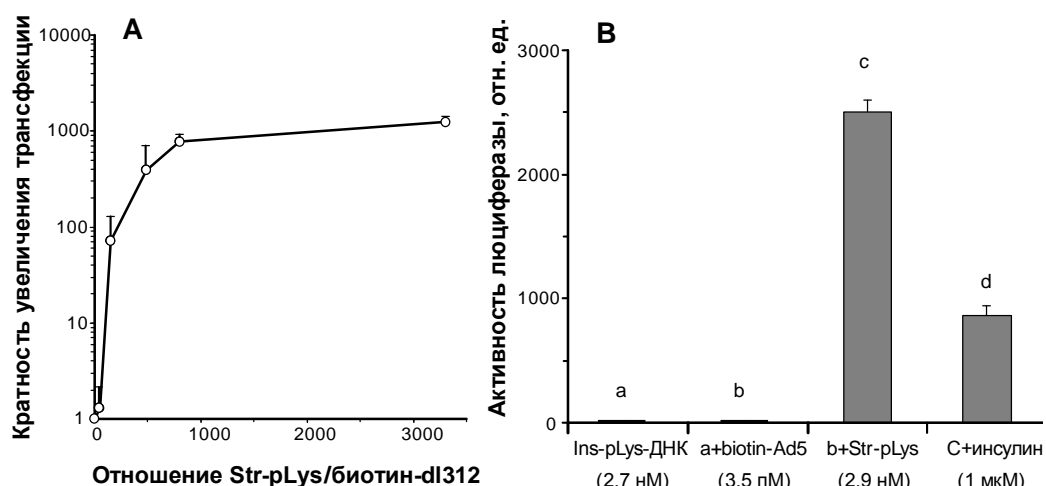
Представленные результаты получены совместно с С.В. Ячменевым.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили сделать заключение, что причиной невысокой трансфекции клеток полиплексами на основе полилизина является, по-видимому, деградация интернализуемых наночастиц в конечном компартменте эндоцитозного пути – лизосомах. Добавление в состав многофункциональной наноконструкции компонента, который способен обеспечить выход конструкции из эндосом до того момента, как она достигнет лизосом способно резко увеличить эффективность трансфекции, сохраняя при этом рецепторную специфичность.

#### **4.8.2. Синтез конъюгата инсулин-полилизин и проверки возможности специфической трансфекции клеток с его помощью**

Аденовирусы способны выходить из эндосом вместе с другими компонентами этих везикул (FitzGerald et al., 1983), и это свойство аденовирусов может успешно использоваться для повышения эффективности трансформации трансфекционных конструкций (Pack et al., 2005). Проведенная проверка показала, что дефектный по репликации аденовирус человека 5 серотипа, штамм dl312 (Ad5), способен увеличивать трансфекцию эпителиальных клеток молочной железы с использованием инсулин-содержащих полиплексов. Значительное (до трех порядков) повышение активности доставляемого гена люциферазы было получено, если вирус был непосредственно связан с pLys через стрептавидин-биотин. Трансфекционная активность зависела от соотношения Str-pLys:вирион в полиплексе (рис. 4.45). Свободный небитинилированный Ad5 был менее эффективным при совместной инкубации с конструкцией (Ins-pLys)-pRSVL; например, добавление  $3,3 \cdot 10^{10}$  вирионов на 6-см чашку Петри в 60 раз увеличивало трансфекцию клеток HC-11 с помощью 5,1 нМ конструкции Ins-pLys. Больше добавление Ad5 приводило к цитотоксичности. Избыток свободного инсулина, добавленный вместе с трансфицирующей конструкцией, значительно снижал экспрессию репортерного гена. Это подтверждает, что трансфекция в этой системе была в основном процессом, опосредованным инсулиновыми рецепторами (рис. 4.45). Аденовирусы птиц (летальный

вирус куриных эмбрионов, CELO или утиный аденовирус EDS-76), лишённые детерминант связывания клеток млекопитающих, также были протестированы. Проведенные эксперименты показали, что эти аденовирусы были способны усиливать трансфекцию клеток HC-11 при только при условии, что они были связаны с трансфицирующими конструкциями. Свободные птичьи аденовирусы, в отличие от человеческого Ad5, не смогли в этом случае усилить трансфекцию (данные не показаны).

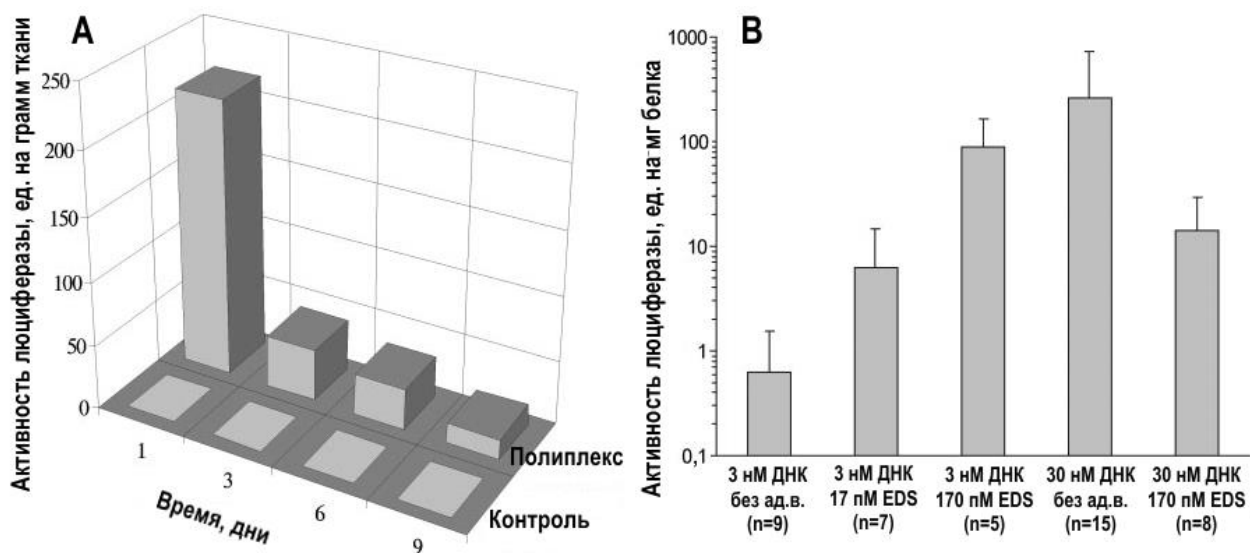


**Рисунок 4.45. Трансфекция клеток HC-11 наночастицами на основе Ins-pLys и плазмиды pRSVL, несущей ген люциферазы.** Клетки эпителия молочной железы мыши HC-11 инкубировали в течение 18 часов с указанными конструкциями, активность люциферазы была измерена через 22-24 часа после окончания инкубации. **А** – влияние включения в наночастицы разного количества эндосомолитического компонента – биотинилированного аденовируса, серотип 5, штамм dl312, дефектного по размножению – на эффективность трансфекции; **В** – сравнение эффективности трансфекции различных вариантов конструкций с и без эндосомолитического компонента на эффективность трансфекции, клетки были инкубированы с (Ins-pLys)-pRSVL (a); (Ins-pLys)-pRSVL и биотинилированным Ad5 dl312 (b); (Ins-pLys)-pRSVL, биотинилированным Ad5 dl312 и стрептавидин-полилизин (c); (Ins-pLys)-pRSVL, биотинилированным Ad5 dl312 и стрептавидин-полилизин и избытком свободного инсулина (d). Отношение аденовирус : стрептавидин-полилизин – 830. Представленные результаты получены совместно с О.А. Смирновой, В.А. Никитиным и другими сотрудниками коллектива.

#### 4.8.3. Трансфекция эпителия молочной железы *in vivo*

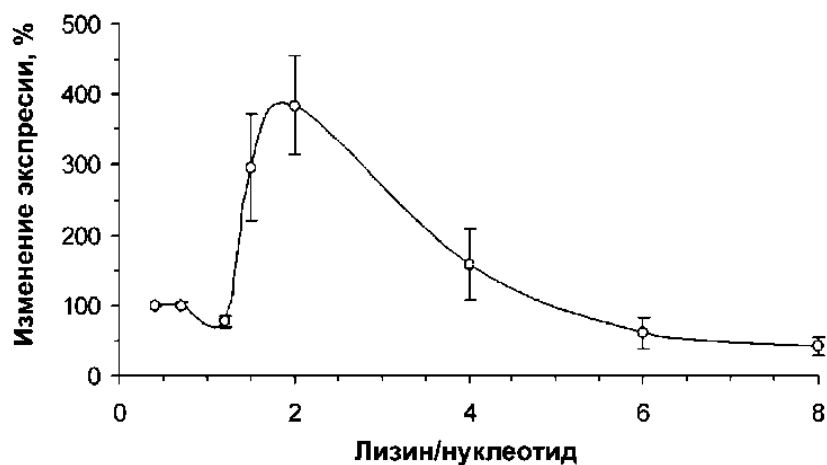
Полученные варианты многофункциональных наночастиц для доставки генов были использованы для трансфекции эпителия молочной железы мышей. Наибольшая активность люциферазы в тканях наблюдалась через сутки после введения полиплексов в молочный проток (рис. 4.46А). Несмотря на то, что на культуре клеток полиплексы с аденовирусными частицами обеспечивали увеличение трансфекции на три порядка, при трансфекции эпителия молочной железы мышей *in vivo* наилучшие результаты обеспечивало увеличение концентрации полиплексов, доставляющих генетический материал без аденовирусов (рис. 4.46В).





**Рисунок 4.46.** Трансфекция клеток молочной железы полиплексными наночастицами на основе Ins-pLys и плазмиды pRSVL, несущей ген люциферазы. **А** – полиплексы (37,5 нМ), вводили в молочный проток мыши в объеме 25 мкл, и активность люциферазы измеряли в гомогенатах ткани молочной железы по истечении указанного времени. В контрольные железы вливали такой же объем раствора Хенкса. Результаты представляют собой среднее от трех до восьми экспериментов; **В** – 40 мкл полиплексов указанного состава вводили в проток молочной железы мышей и измеряли активность люциферазы в гомогенатах ткани железы через 24 часа. Конструкции содержали Ins-pLys, Str-pLys и плазмиду pCMV-luc с соотношением лизин/нуклеотид 0,6. Представленные результаты получены совместно с О.А. Смирновой, В.А. Никитиным и другими сотрудниками коллектива.

Проведенная по результатам экспрессии люциферазы оптимизация состава аденовирус-содержащих полиплексов на основе Ins-pLys показала, что лучший результат получается при соотношении лизин:нуклеотид около 2 (рис. 4.47). Однако попытка трансфекции эпителия молочной железы *in vivo* не привело к появлению измеримой активности в гомогенатах тканей.



**Рисунок 4.47.** Трансфекция клеток HC-11 полиплексами при разном соотношении лизин : нуклеотид. Клетки трансфицировали при помощи полиплекса (аденовирус-биотин)-(Str-pLys)-pRSVL-(Ins-pLys) (0,4 нМ). Все конструкции содержали  $10^{10}$

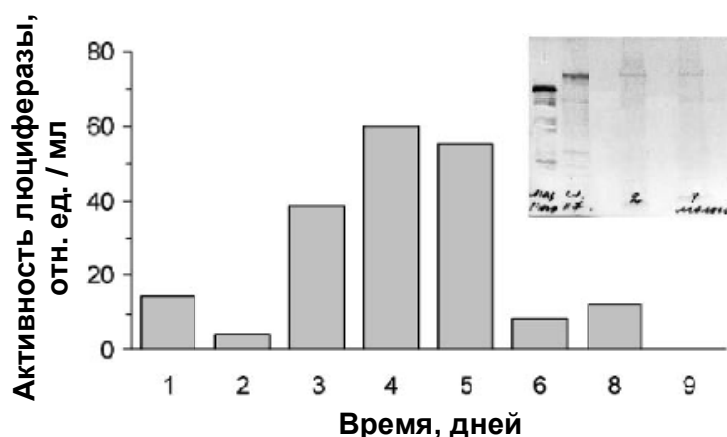
вирусных частиц/мл, Strp-Lys (3,4 пМ), Ins-pLys (2,8 пМ) и pLys (80 кД) до указанных соотношений лизин : нуклеотид. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка (n=3). Представленные результаты получены совместно с О.А. Смирновой.

Хотя люцифераза является очень часто используемым репортерным белком из-за высокой чувствительности и простоты анализа его ферментативной активности, она не является привлекательным вариантом при трансфекции молочной железы для получения продукта в молоке, поскольку не секретрируется из трансфицированных клеток. Для получения секретрируемых форм люциферазы И.А. Шиловым и И.Н. Шацким было создано несколько вариантов генов модифицированного фермента. Сигнальная последовательность из овечьего  $\beta$ -лактоглобулина была добавлена к N-концу (MEDAKN<sup>6</sup>) люциферазы между первой и второй аминокислотами (белок, кодируемый плазмидой pRSV-spBLG-luc). Ген люциферазы также был слит N-концом с геном  $\alpha$ -лактальбумина человека. Для тестирования этих конструкций клетки HC-11 инкубировали с конструкциями (биотинилированный EDS-76)-Str-pLys-(плазмидная ДНК)-(Ins-pLys), содержащими каждый из pRSVL, pRSV-spBLG-luc и pCMV-LA-luc. Люциферазная активность клеток, трансфицированных pRSV-spBLG-luc и pCMV-LA-luc, составляла 22% и 18% от активности клеток, трансфицированных pRSVL. Люциферазная активность, обусловленная трансфекцией плазмидой pCMV-LA-luc, была менее 10% от активности после трансфекции плазмидой pCMV-luc, кодирующей несекретрируемую исходную люциферазу. Иммуноблот клеточных экстрактов с антителами против люциферазы выявил полосу с более высокой молекулярной массой (75 кД, что соответствует слитому белку), чем у немодифицированной люциферазы (60 кД), при этом относительная интенсивность полос указывает на сопоставимые уровни экспрессии обоих белков.

Трансфекция *in vivo* молочных желез мышей (биотинилированный EDS)-(Str-pLys)-(плазида pRSV-spBLG-luc)-(Ins-pLys) (2 нМ) путем введения 3–4 раза в молочные протоки беременных мышей (вторая половина беременности) с интервалами в 1 день приводили к значительной активности люциферазы (в среднем  $118 \pm 13$  ед./мл, n=6), секретрируемой с молоком. В молоке мышей, трансфицированных с помощью той же процедуры плазмидой pRSVL, люциферазной активности не было. Для трансфекции молочной железы овцы использовали полиплекс (Ins-pLys)-(pCMV-LA-luc) (30 нМ). Трем овцам вводили гормоны в течение 14 дней; 75 мл трансфекционной конструкции вводили в одну молочную железу каждой на 10 день и в обе молочные железы каждой на 12 день; т.е., у каждого животного одну железу трансфицировали один раз, а одна – дважды. Две из трех овец начали лактацию, производя более 200 мл на доение, что позволило

количественно определить активность секретируемой люциферазы. Однократно трансфицированные молочные железы производили обнаруживаемую активность люциферазы только на 5-й день от начала лактации, и эта активность была очень низкой, ~2 ед./мл. Активность люциферазы в молоке молочных желез, трансфицированных дважды, была значительно выше, достигая пика на 4 и 5 дни (рис. 4.47). Иммуноблот показал ожидаемые полосы 75 кД в образцах молока объемом 10 мл даже в дни 1 и 2 начала лактации для молока дважды трансфицированных желез (см. вставку на рис. 4.47). Хотя количественно оценить количество LA-luc сложно, по нашим оценкам, продукция слитого белка превышает 0,6 нг белка на мл молока (то есть примерно 120 нг/доение) в дни 4–5.

Трансфекция молочных желез овец при помощи введения в молочный проток конструкции несущей химерный ген лактальбумин-люциферазы обеспечивала появление в молоке целевого белка, что было выявлено как по активности фермента, так и иммунохимически (рис. 4.47).



**Рисунок 4.47. Изменение активности люциферазы в молоке овец после трансфекции на 10 и 12 дни после начала индукции лактации конструкцией (Ins-pLys)-ДНК, с геном лактальбумин-люциферазы.** На вставке иммуноблот коммерческой люциферазы (дорожка 1), экстракта клеток HC-11, после трансфекции геном лактальбумин-люциферазы (2) и образцов молока овцы, полученных на 2 и 4 день после начала лактации (3,4). Представленные результаты работ, были проведенных совместно с В.А. Никитиным и О.А. Смирновой, а также сотрудниками Всероссийского НИИ животноводства И.Н. Шайдуллиным и И.Ю. Шиховым.

Созданные многофункциональные полиплексные конструкции состояли из нескольких компонентов, обеспечивающих упаковку доставляемой ДНК в наночастицы, узнавание клетки-мишени и поглощение в нее при помощи эндоцитируемого лиганда, выход из эндосом. К недостаткам конструкций такого типа можно отнести необходимость включения в нее достаточно большой по размеру (~80 нм) вирусной частицы, что увеличивает размеры получаемых наночастиц и может влиять на эффективность

полиплекса *in vivo*. В этом отношении более подходящими представляются полностью синтетические полиплексные конструкции, обладающие необходимыми функциями: узнавание клетки, транспорт внутрь клетки, выход из эндосом, попадание в ядро. Одним из перспективных вариантов можно считать конструкции на основе полиэтиленимина (ПЭИ), поскольку при попадании в клетку путем эндоцитоза этот поликатион способен вызывать нарушение целостности эндосом, что приводит к выходу их содержимого в цитозоль.

Результаты раздела 4.8 изложены в статьях: Розенкранц А.А., Ячменев С.В., Соболев А.С. (1990) Использование искусственных конструкций для селективного переноса генетического материала в клетки человека путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. *Докл. АН СССР*, **312**, 2, 493-494 (вклад автора состоит в планировании работ, проведении экспериментов, включая синтез конъюгата, получение плазмиды, определение трансфекции, анализе результатов, написании статьи); Rosenkranz A.A., Yachmenev S.V., Jans D.A., Serebryakova N.V., Murav'ev V.I., Peters R., Sobolev A.S. (1992) Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct. *Exp. Cell Res.* **199**, 323-9 (вклад автора состоит в планировании работ, проведении экспериментов, включая синтез конъюгата, получение плазмиды, определение трансфекции, анализе результатов, написании статьи); Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K. (1998) Receptor mediated transfection of murine and ovine mammary glands *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 7928-33 (вклад автора состоит в планировании работ, проведении экспериментов, включая синтез конъюгатов, получение плазмиды, определение трансфекции, анализе результатов, участие в написании статьи). Разработанный метод трансфекции был использован также для доказательства возможности переноса генетического материала в ранние эмбрионы млекопитающих: Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. (1999) Receptor-mediated transport of foreign DNA into preimplantation mammalian embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 112-20. Автор признателен всем коллегам-соавторам, благодаря вкладу которых эти работы были осуществлены.

#### **4.9. Полиплексные конструкции для доставки генетического материала в клетки на основе полиэтиленимина и пептида для проникновения в клетку**

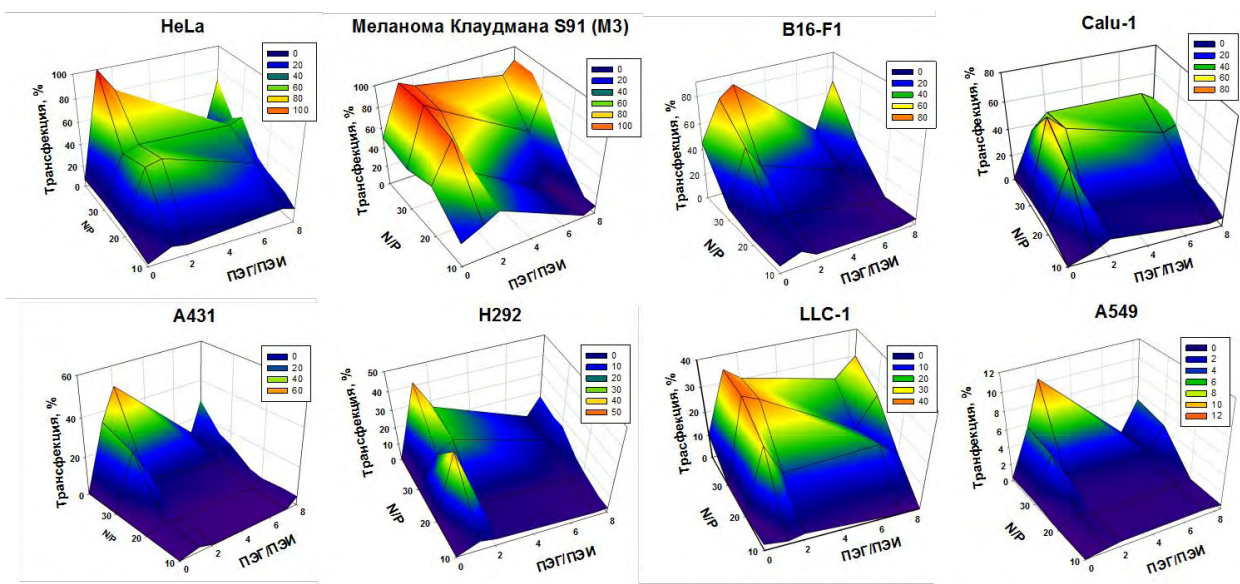
Основными недостатками системы для доставки ДНК в клетки на основе рLys являются ее низкая эффективность и необходимость использования действенного эндосомолитического компонента, наиболее эффективным вариантом которого оказались аденовирусы. Достаточно эффективным альтернативный подходом оказалось

использование для компактизации ДНК другого поликатиона – полиэтиленimina (ПЭИ) (Boussif et al., 1995).

#### **4.9.1. Оптимизация полиплексов на основе полиэтиленimina для доставки ДНК в клетки**

Эффективность полиплексов в значительной мере зависит от состава их компонентов и стабильности его воспроизведения. Для достижения этого результата были использованы методы количественного определения состава блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ-ТАТ, перспективность которых была продемонстрирована ранее Климан с соавторами (Kleemann et al., 2005). Для получения более стабильного результата вместо ПЭГ с известной средней молекулярной массой был использован бифункциональный ПЭГ строго определенного состава, состоящий из 24 звеньев. Использование нескольких вариантов соотношений компонентов при синтезе блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ-ТАТ позволило получить палитру различных полиплексов с различными соотношениями ПЭГ/ПЭИ и азота поликатиона к фосфату ДНК N/P. Для всех этих комбинаций была оценена эффективность трансфекции на 8 клеточных линиях. Формы зависимостей процента трансфицированных клеток от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P образовывали характерные похожие у разных клеточных линий «поверхности трансфекции» (рис. 4.48). Для всех протестированных линий клеток имеется два пика на этой «поверхности трансфекции» при ПЭГ/ПЭИ – 1,2 и N/P – 30-40, а также при ПЭГ/ПЭИ – 8,4 и N/P – 30-40. Коэффициенты межповерхностной линейной корреляции находились в диапазоне от 0,64 до 0,96 и были статистически значимыми: для всех линий клеток (табл. 4.9). Этот результат предполагает возможность использования известных оптимальных соотношений компонентов полиплекса для трансфекции других линий клеток.

Для анализа связи между отношениями компонентов в блок-сополимере и эффективностью трансфекции, были вычислены частные коэффициенты корреляции первого порядка (табл. 4.10) с одним фиксированным параметром. Проведенные расчеты показали отрицательную корреляцию эффективности трансфекции с соотношением ПЭГ/ПЭИ и положительную корреляцию с соотношением ТАТ/ПЭИ для большинства протестированных линий клеток.



**Рисунок 4.48. Зависимость эффективности трансфекции от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P в полиплексах.** Клетки помещали в 48-луночные планшеты, как указано в разделе «Материалы и методы», трансфицировали полиплексами, несущими ген EGFP, под контролем цитомегаловирусного промотора при указанных соотношениях ПЭГ/ПЭИ и N/P. Долю клеток экспрессирующих EGFP определяли с помощью КЛСМ. Цветовые шкала высот поверхности трехмерной гистограммы приведена на врезках в соответствующие панели. Представлены результаты работ, проведенных совместно с А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым и другими сотрудниками лаборатории.

**Таблица 4.9. Коэффициенты корреляции эффективности трансфекции для различных клеточных линий при соответствующих соотношениях ПЭГ/ПЭИ и N/P.**

Линия	HeLa	H292	A549	Calu-1	A431	M3*	B16-F1	LLC-1
HeLa	1	0,83	0,76	0,70	0,79	0,70	0,77	0,85
H292	0,83	1	0,64	0,74	0,67	0,78	0,67	0,83
A549	0,76	0,64	1	0,66	0,96	0,66	0,87	0,70
Calu-1	0,70	0,74	0,66	1	0,67	0,80	0,62	0,89
A431	0,79	0,67	0,96	0,67	1	0,69	0,91	0,74
M3*	0,70	0,78	0,66	0,80	0,69	1	0,76	0,83
B16-F1	0,77	0,67	0,87	0,62	0,91	0,76	1	0,78
LLC-1	0,85	0,83	0,70	0,89	0,74	0,83	0,78	1

$p < 0,05$  для всех линий клеток; \* - Меланома Клаудмана S91 (клон M3).

**Таблица 4.10.** Коэффициенты частной корреляции между эффективностью трансфекции полиплексов и отношениями ПЭГ/ПЭИ или ТАТ/ПЭИ.

Линия клеток	M3	B16-F1	HeLa	A549	A431	H292	Calu-1	LLC-1
Корреляция трансфекции с ПЭГ/ПЭИ при фиксированном ТАТ/ПЭИ*	-0,32	-0,43	<b>-0,50</b>	<b>-0,69</b>	-0,27	<b>-0,48</b>	<b>-0,72</b>	<b>-0,60</b>
Корреляция трансфекции с ТАТ/ПЭИ при фиксированном ПЭГ/ПЭИ*	0,20	0,34	<b>0,62</b>	<b>0,68</b>	0,35	<b>0,48</b>	<b>0,79</b>	<b>0,66</b>

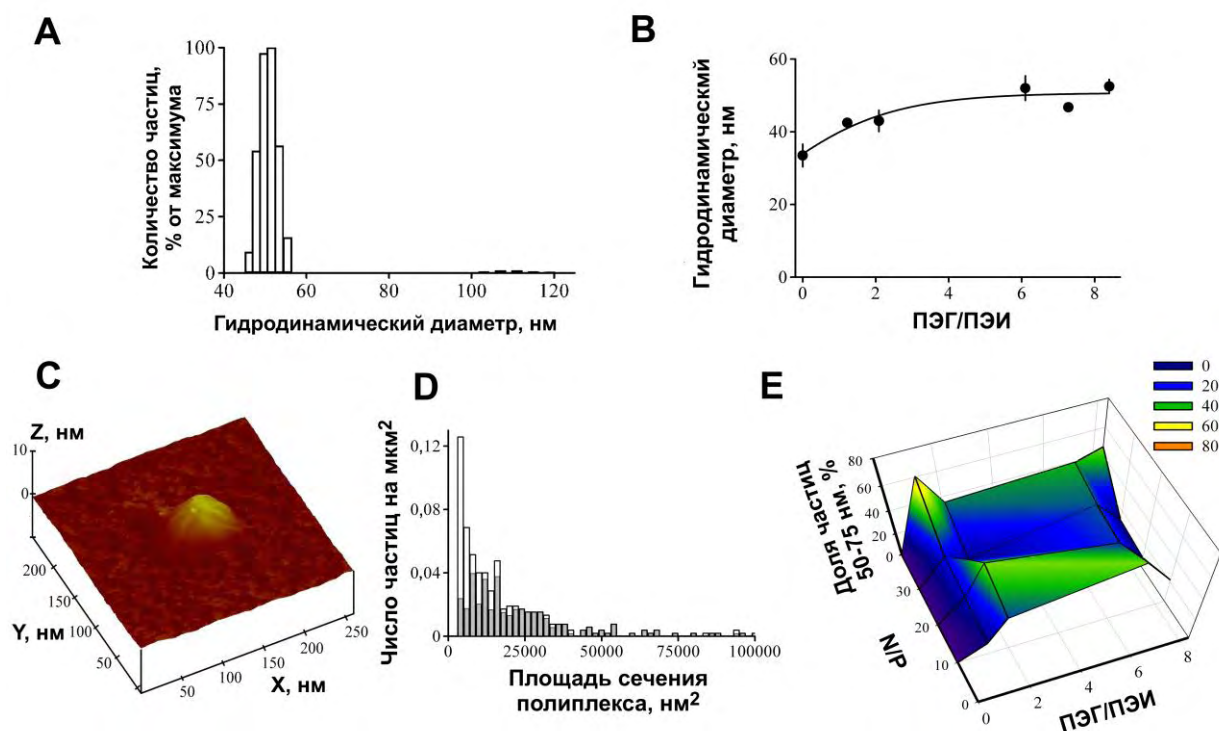
\* - выделены статистически значимые коэффициенты корреляции ( $p < 0,05$ ).

Проведенные эксперименты не выявили значительной токсичности полиплексов при использованных концентрациях и соотношениях ПЭГ/ПЭИ и N/P. Не было обнаружено и корреляции между цитотоксичностью и эффективностью трансфекции.

Измерение электрофоретической подвижности полиплексов не выявило достоверных различий в зависимости от их состава (соотношения ПЭГ/ПЭИ и N/P) в исследованном диапазоне. Получаемые наночастицы были положительно заряжены, рассчитанный по их электрофоретической подвижности  $\zeta$ -потенциал  $+21,2 \pm 1,5$  мВ. Благодаря этому все получаемые полиплексы были устойчивы в водной системе.

Исследование размера полиплексов при помощи динамического светорассеяния показало бимодальное распределение размеров получающихся наночастиц, около 95% из них были представлены меньшей фракцией. Все полиплексы демонстрировали бимодальное распределение своих гидродинамических диаметров. Типичный пример получаемого распределения приведен на рисунке 4.49А. При изменении отношения N/P средние гидродинамические диаметры обеих фракций полиплексов не различались в пределах экспериментальных ошибок их определения. В отличие от этого диаметр наночастиц увеличивался и выходил на плато по мере увеличения отношения ПЭГ/ПЭИ в блок-сополимерах, входящих в состав полиплексов (рис. 4.49В). Этот эффект может быть вызван увеличением гидратной оболочки полиплекса из-за увеличения количества гидрофильных фрагментов ПЭГ на поверхности частиц. Проведенный анализ полученных данных не выявил корреляции между гидродинамическими диаметрами полиплексов и эффективностью трансфекции. Используемые при обработке результатов динамического светорассеяния приближения для определения полидисперсности часто не способны дать

удовлетворительный результат при асимметричных распределениях (например, когда в смеси присутствуют частицы многих различных размеров) (Mailier et al., 2015).



**Рисунок 4.49. Исследование размеров наночастиц полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ.** **А** – типичное распределение гидродинамических диаметров полиплексов, измеренных методом динамического светорассеяния (ПЭГ/ПЭИ – 8,4; ТАТ/ПЭИ – 0,77 и N/P – 30). **В** – средний гидродинамический диаметр меньшей фракции наночастиц полиплексов, содержащих ПЭГ-ПЭИ-ТАТ, с различным соотношением ПЭГ/ПЭИ (в качестве плазмидной ДНК была использована рCMV-EGFP). **С** – Типичный вид полиплексной наночастицы, полученный с помощью АСМ на слюде (ПЭГ/ПЭИ – 1,22; ТАТ/ПЭИ – 0,4; N/P – 30). **Д** – гистограмма частотного распределения площади сечения наночастиц полиплексов ПЭИ-ПЭГ-ТАТ (ПЭГ/ПЭИ – 1,22; ТАТ/ПЭИ – 0,4; N/P – 30) на 1 мкм<sup>2</sup> слюды. Разбиение значений площади поперечного сечения 2000 нм<sup>2</sup>. Серые столбцы представляют сечения наночастиц полиплексов без свободных блок-сополимеров вычетом информации от частиц свободных блок-сополимеров. Общее количество наночастиц в гистограмме 490, количество полиплексных наночастиц без свободных блок-сополимеров составило 214 (серые столбцы), 37 ± 6,5% из них (доверительный интервал ± 95%) составили наночастицы диаметром 50–75 нм. **Е** – Зависимость процентного содержания фракции 50–75 нм в полиплексах ПЭИ-ПЭГ-ТАТ от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P. Цветовая шкала высот поверхности трехмерной гистограммы приведена на врезке в панель. Эксперименты и анализ результатов проведены совместно с Ю.В. Храмовым.

АСМ позволяет более детально исследовать распределение полиплексов по размерам и форме, чем динамическое рассеяние света. Полиплексы оказались слегка вытянутыми наночастицами с соотношением сторон  $1,7 \pm 0,4$  и размером 25–250 нм (типичная наночастица полиплекса приведена на рис. 4.49С). Этот подход позволил выявить диапазон размеров полиплексов, который коррелирует с эффективностью трансфекции. Для этого были построены частотные гистограммы площади поперечного



сечения наночастиц полиплекса (пример такой гистограммы приведен на рисунке 4.49D). Гистограммы были использованы для поиска доли полиплексных наночастиц, коррелирующей с эффективностью трансфекции. Как показали эксперименты, выполненные Ю.В. Храмцовым, с эффективностью трансфекции коррелировала фракция наночастиц с площадью поперечного сечения на слюде от 7000 до 17000 нм<sup>2</sup>, что соответствует эффективному диаметру 50–75 нм. Зависимость доли фракции 50–75 нм в полиплексах от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P оказалась сходной с зависимостями, полученными для эффективности трансфекции (рис. 4.49E и рис. 4.48). Расчеты показали достоверную корреляцию между процентным содержанием фракции 50–75 нм в полиплексах и эффективностью трансфекции, выявленной в разных клеточных линиях (табл. 4.11).

**Таблица 4.11. Линейная корреляция между процентным содержанием фракции 50-75 нм в полиплексах и эффективностью трансфекции полиплексов в различных линиях клеток.**

Линия клеток	<i>r</i>	<i>p</i>
Карцинома шейки матки человека HeLa	0,472	0,018
Мышиная меланома Клаудмана S91 (клон M3)	0,424	0,031
Эмбриональные клетки почки человека HEK 293	0,358	0,061
Меланома мышей B16-F1	0,412	0,035
Легочная карцинома человека Calu-1	0,671	0,00066
Эпидермоидная карцинома человека A431	0,435	0,028
Легочная карцинома человека NCI-H358	0,437	0,035
Легочная карцинома человека NCI-H292	0,413	0,035

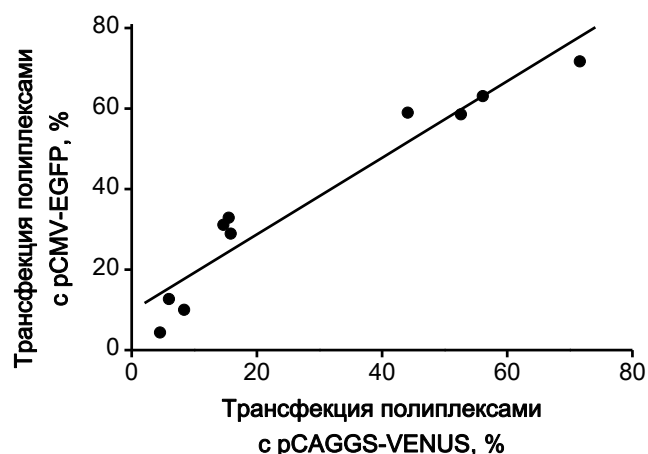
*r* – коэффициент линейной корреляции между эффективностью трансфекции и долей наночастиц полиплексов размером 50 – 75 нм; *p* – достоверность корреляции. Эксперименты и анализ результатов проведены совместно с Ю.В. Храмцовым и другими сотрудниками лаборатории.

Хотя «поверхности трансфекции» были сходными для всех исследованных клеточных линий, достигаемая эффективность трансфекции значительно различалась для различных клеточных линий (рис. 4.48 и табл. 4.12) и варьировала для тестируемых линий от 4,4 до 100%. Это может быть результатом различия уровней экспрессии маркерного гена под контролем цитомегаловирусного промотора в разных клеточных линиях. Для проверки этого было проведено сравнение эффективности трансфекции

клеточных линий между цитомегаловирусным и другим сильным промотором, (куриным  $\beta$ -актиновым/кроличьим  $\beta$ -глобиновым, CAGGS, любезно предоставленного д.б.н. Буздиным А.А. (ИБХ РАН)). Экспрессия генов под CAGGS промотором сопоставима с аналогичной экспрессией под CMV промотором (Lebbink et al., 2011). Полученные результаты продемонстрировали высокую достоверную корреляцию ( $r = 0,962$ ,  $p < 0,0001$ ) величин экспрессии для панели клеточных линий (рис. 4.51). Такая корреляция данных, полученных с разными промоторами делает крайне маловероятным предположение о различии в уровне экспрессии гена под контролем цитомегаловирусного промотора в качестве причины наблюдаемых различий в эффективности трансфекции и положении «поверхности трансфекции».

**Таблица 4.12. Максимальная эффективность трансфекции полиплексами различных клеточных линий.**

№	Линия клеток	Максимальная трансфекция, %
1	Карцинома шейки матки человека HeLa	до 100
2	Мышиная меланома Клаудмана S91 (клон M3)	98
3	Эмбриональные клетки почки человека HEK 293	96
4	Меланома мышей B16-F1	83
5	Легочная карцинома человека Calu-1	63
6	Эпидермоидная карцинома человека A431	50
7	Легочная карцинома человека NCI-H358	46
8	Легочная карцинома человека NCI-H292	42
9	Легочная карцинома мышей LLC-1	35
10	Легочная карцинома человека A549	17,7
11	Рак молочной железы человека BT-474	4,4

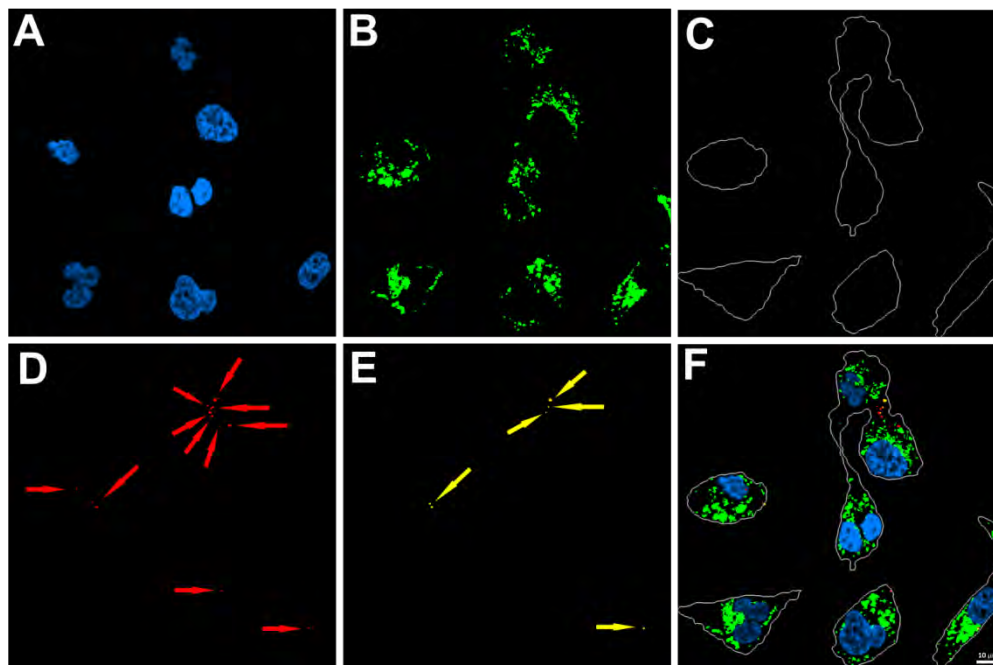


**Рисунок 4.51. Сравнение эффективности трансфекции под контролем промоторов CMV и CAGGS.** На графике представлены данные по клеточным линиям: A549 (30), M3 (30), BT-474 (30 и 40), Calu-1 (30 и 40), в скобках указаны использованные соотношения N/P. Эксперименты и проведены совместно с А.В. Уласовым.

Корреляция эффективности трансфекции с размером наночастиц заставляет предположить, что причиной разницы эффективности трансфекции могут быть процессы взаимодействия с клеткой, в частности эндоцитоз, транспорт внутри клетки и высвобождение ДНК из комплекса с ПЭИ (распаковка). Часто используемым методом исследования транспорта молекул в клетке являются различные варианты флуоресцентной микроскопии с флуоресцентно мечеными молекулами, прежде всего КЛСМ. Для определения образования или распада комплексов в клетке наилучшими возможностями обладает флуоресцентный (или Ферстеровский) резонансный перенос энергии (Förster Resonance Energy Transfer, FRET). Такой подход был успешно опробован для определения состояния полиплексов в клетке (Breunig et al., 2006; Chen et al., 2008; Но et al., 2006). Использование квантовых точек (Qdot) позволяет следить за поведением отдельных наночастиц в клетке (Wegner and Hildebrandt, 2015). Для экспериментов с мечеными полиплексами необходимы препараты меченой плазмидной ДНК без свободных квантовых точек. Оптимальное соотношение Qdot/ДНК было получено из данных электрофореза смеси биотинилированной ДНК и меченой стрептавидином Qdot605: начиная с соотношения 1:2 в смеси не было свободных квантовых точек. В качестве акцептора для этих экспериментов был использован краситель AlexaFluor647, которым был помечен блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ-ТАТ. Используя полиплексы, флуоресцентно меченные квантовыми точками Qdot605 (плазмидная ДНК) и Alexa Fluor647 (блок-сополимеры), можно наблюдать полиплексы с упакованной ДНК (флуоресценция Alexa Fluor647 при возбуждении квантовых точек, FRET) и неупакованную ДНК (отсутствие FRET: свободная плазмидная ДНК и / или продукты ее деградации).

Для изучения кинетики внутриклеточного транспорта и распаковки полиплексов были использованы три линии клеток, существенно различающиеся по эффективности трансфекции (табл. 4.12): карциномы легких человека A549 и Calu-1 и мышьяная меланома Клаудмана S91 (клон M3). Вход полиплексов в клетки начинали регистрировать через 30 минут после их добавления. Общий объем вокселей изображения в канале квантовых точек считали равным количеству поступившей в клетку ДНК. Чтобы учесть деление клеток во время эксперимента, указанный выше объем был домножен на  $2^{t/\tau}$ , где:  $t$  – время, прошедшее с момента добавки;  $\tau$  - время удвоения количества клеток: 22 часа для A549 (Kremer et al., 2004), 60 часов для Calu-1 (ATCC) и 24 часа для M3 (Abdel-Malek et al., 1987). ДНК считали упакованной в полиплексе, если происходил FRET от квантовых точек к AlexaFluor647, и неупакованными, если сигнал FRET не наблюдался. Чтобы учесть разные объемы вокселей квантовых точек, полученных из разных каналов (для

излучений AlexaFluor647 и Qdot605 соответственно), был введен поправочный коэффициент, полученный с помощью микроскопии полиплексных наночастиц. Для выявления ядер использовали Хёхст 33258, эндосом и лизосом краситель LysoTracker Green DND-26, поверхности клеток – лектин из проростков пшеницы (WGA), меченный красителем Cy-3. Типичный пример изображений для анализа приведен на рисунке 4.52.



**Рисунок 4.52. Типичные изображения живых клеток для анализа транспорта и распаковки полиплексных наночастиц.** Меченые полиплексы с N/P – 40 были приготовлены с использованием блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ, меченого Alexa Fluor® 647, и меченой стрептавидиновым конъюгатом Qdot® 605 ИТК™ плазмидной ДНК в 5 мМ HEPES, pH 7, содержащем 5% глюкозы. К клеткам карциномы легких человека Calu-1, инкубированным в течение 8 часов с полиплексами с двойной меткой при 37° С и 5% CO<sub>2</sub> в камерах ROC-mini, добавляли красители для визуализации жизнеспособных клеток и получали набор изображений по вертикальной оси с помощью объектива 63x (NA – 1,4) с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META NLO. **А** – флуоресценция Хёхст 33258, полученное при 5 мкг/мл красителя с использованием возбуждения двухфотонным лазерным лучом при 760 нм с широкополосным Ti:Sapphire лазером MaiTai™; **В** – флуоресценция LysoTracker™ DND-26 при 44 нМ красителя при возбуждении флуоресценции 488 нм; **С** – границы клеток, выявленные анализом флуоресценции Cy3, присоединенного к WGA с использованием лазерной линии 488 нм; **Д** – флуоресценция Qdot605 (упакованная и неупакованная ДНК) с использованием лазерной линии 458 нм и окна регистрации 602 – 612 нм; **Е** – сигнал FRET Qdot605-Alexa647 (упакованные частицы), полученный с использованием лазерной линии 458 нм и окна регистрации от 634 до 719 нм; **Ф** – наложение панелей **А** – **Д**. Стрелки на панелях **Д** и **Е** указывают на наночастицы полиплексов. Масштабная планка – 10 мкм. Представленные данные получены совместно с А.В. Уласовым, Ю.В. Храпцовым, Г.А. Трусовым.

Полученные данные о запакованности ДНК полиплексов, поступлении в клетки и распределении в них были проанализированы с использованием нескольких моделей транспорта.

#### 4.9.2. Анализ внутриклеточного транспорта и распаковки полиплексов

Общее описание кинетики транспорта и распаковки полиплексов в клетке предсказывает, что для оптимальной трансфекции необходимо определенное сочетание скорости входа полиплексов в клетку и скорости распаковки доставляемой ими ДНК (Varga et al., 2001). Этот оптимум может зависеть как от типа используемого в полиплексах полимера, так и от типа клеток. Исходя из этих посылок по предложению А.С. Соболева Ю.В. Храмцовым был проведен анализ транспорта полиплексов в клеточных линиях, существенно различающихся по величине максимальной трансфекции (Приложение 1).

Проведенный анализ выявил статистически значимую отрицательную линейную корреляцию между величиной, обратной скорости входа полиплексов в клетку ( $1/v$ ), и эффективностью трансфекции (табл. 4.13). Достоверная отрицательная линейная корреляция обнаружена также между величиной эффективности трансфекции и константой скорости распаковки в эндосомах/лизосомах ( $k_{unL}$ ). Полученный результат не является неожиданным, поскольку, чем больше полиплексов распаковано в эндосомах и лизосомах, тем больше деградирует в них ДНК, что должно приводить к снижению эффективности трансфекции.

Таблица 4.13. Корреляция между эффективностью трансфекции и параметрами транспорта и распаковки полиплексов.

Время инкубации с полиплексами, часы	Максимальная эффективность трансфекции для линии ( $TE_{max}$ , %)			Коэффициент корреляции, $r$ , между $TE_{max}$ и параметром	
	A549	Calu-1	M3	$1/v$	$k_{unL}$
16	3,9	15,5	25,1	-0,999*	-0,995*
24	5,2	25,6	44,0	-1*	-0,997*
72	17,7	63,2	98,0	-1*	-0,971*

\* $p \leq 0,05$

Приведенные данные и их анализ являются результатом работы, проведенной совместно с Ю.В. Храмцовым, А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым.

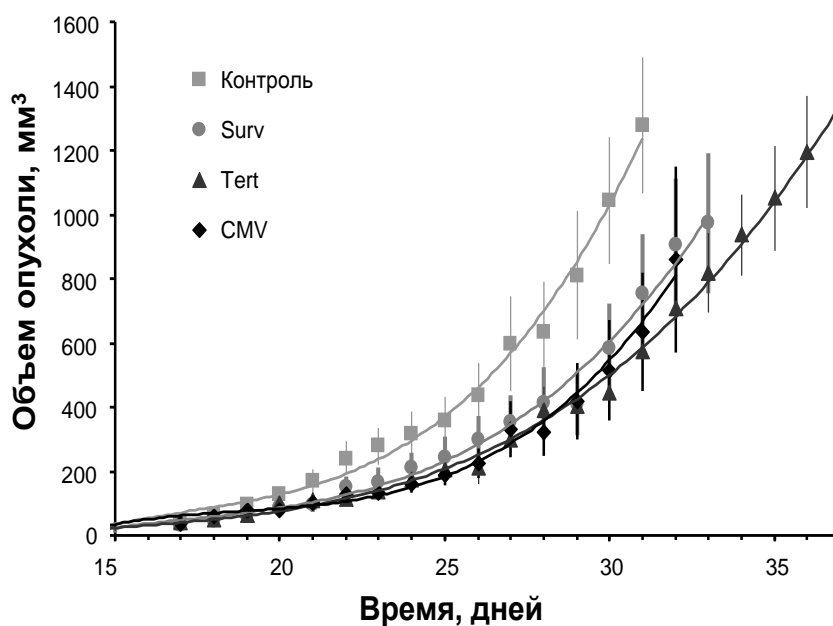
#### 4.9.3. Оценка противоопухолевой эффективности генно-терапевтических продуктов, доставляемых в составе полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ

Для проверки возможности применения полиплексов для противоопухолевой терапии использовали мышей C57black/6J несущих опухоли легкого мыши карциномы Льюиса (LLC1). Для проверки возможности терапии онкологических заболеваний был

выбран ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (*HSVtk*), который широко используется для суицидальной терапии (или, иначе, генно-направленной ферментативной пролекарственной терапии) (Duarte et al., 2012). Этот фермент отвечает за превращение относительно нетоксичного лекарственного препарата ганцикловира в его трифосфорилированную форму, которая препятствует синтезу ДНК, что приводит к гибели трансфицированных клеток. В составе полиплексов использовали плазмиды, несущие ген люциферазы без промотора (pGL3 basic vector), ген *HSVtk* под контролем разных промоторов: промоторной области гена сурвивина человека (pSurv4\_TK\_pGL3), промотора теломеразы человека (phTERT\_TK) и цитомегаловирусного промотора (pCMV\_TK\_pGL3). Полиплексы были приготовлены при помощи быстрого смешивания раствора ПЭИ-ПЭГ-ТАТ с раствором ДНК в изотоническом растворе глюкозы с 10 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоната, рН 7, в конечной концентрации полиплекса 80 мкг ДНК в миллилитре.

Введение полиплекса проводили при помощи внутриопухолевой инъекции на 17 и 21 день после инокуляции клеток LLC1 животным. Каждая опытная группа животных, получавших полиплекс с геном *HSVtk* под контролем различных промоторов и ганцикловир, состояла из 8 животных, в качестве контрольной группы (8 животных) использовали группу, получавшую полиплекс с плазмидной ДНК, не имеющей в своем составе эукариотического промотора (pGL3 basic vector). Животные были равномерно распределены по группам, согласно измеренным размерам опухолей. Средний размер опухолей на момент начала лечения был 38 мм<sup>3</sup>.

Как показали результаты проведенных измерений, рост опухолей у животных, получавших внутриопухолевые инъекции полиплекса с геном *HSVtk*, был заметно медленнее, чем у животных контрольной группы (рис. 4.53). Выраженных отличий в размерах опухолей у животных групп, получавших полиплекс с терапевтическим геном под контролем сурвивинового, теломеразного и цитомегаловирусного промоторов обнаружено не было.



**Рисунок 4.53.** Влияние внутриопухолевой инъекции полиплексов с геном *HSVtk* на скорость роста опухолей, вызванных инокуляцией клеток LLC1 мышам C57black. Введение полиплекса проводили на 17 и 21 день после инокуляции клеток, внутрибрюшинные инъекции ганцикловира в дозе 75 мг/кг (дважды в день) проводили в течение 10 дней, начиная с 19 дня после инокуляции клеток за исключением дня повторного введения полиплексов. Данные представляют собой средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. По оси абсцисс указано время, прошедшее с момента инокуляции клеток. Представленные эксперименты выполнены совместно с А.В. Уласовым, Ю.В. Храпцовым, Г.А. Трусовым и другими сотрудниками лаборатории.

Средние размеры опухоли на момент гибели первого животного в контрольной группе (14 день с момента первого введения полиплекса) приведены в таблице 4.14. Средний размер опухоли у животных, получавших полиплекс с *HSVtk* под контролем теломеразного и цитомегаловирусного промоторов, достоверно отличались от среднего размера опухоли в контрольной группе.

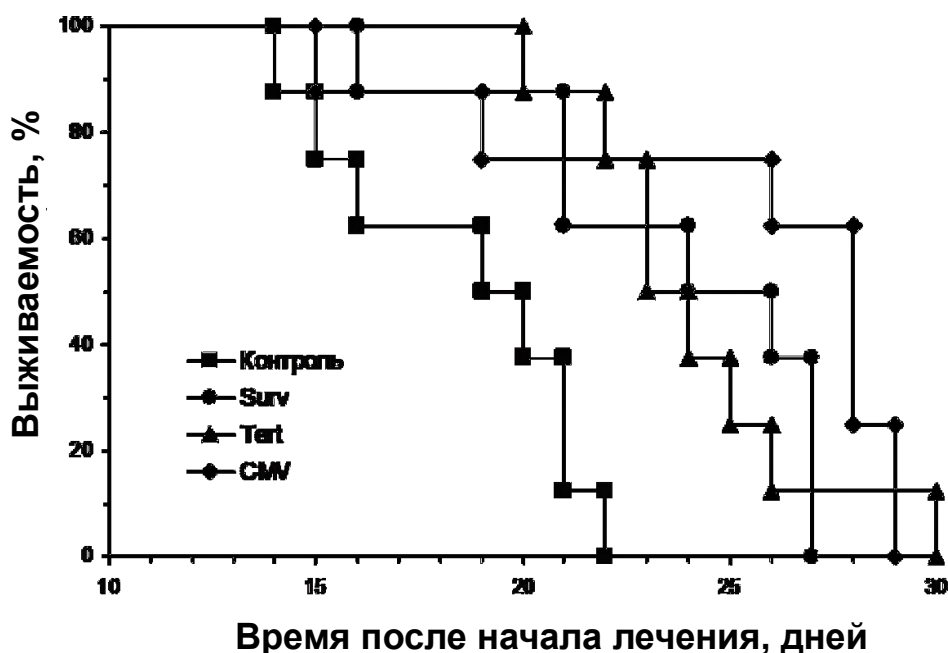
**Таблица 4.14.** Средние размеры опухолей у животных на 14 день с момента первого введения полиплекса.

	Контроль	Полиплекс с <i>HSVtk</i> под контролем различных промоторов		
		Surv	hTert	CMV
Средний объем опухоли, мм <sup>3</sup>	1278 $\pm$ 212	754 $\pm$ 183	576 $\pm$ 100*	636 $\pm$ 184**
Ингибирование роста опухоли, %		41	55	50

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка. Отличие от контроля: \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,05$ .

Анализ данных сравнения выживаемости групп мышей, получавших полиплекс с геном *HSV-tk* с различными промоторами, с контрольной группой подтверждает данные о росте опухоли: все группы, получавшие лечение, заметно отличались от контрольной группы при заметно менее выраженном различии между собой (рис. 4.58).

Средняя продолжительность жизни мышей, получавших лечение полиплексом с геном *HSVtk* и последующим введением ганцикловира, увеличивалась на 30 – 40 процентов по сравнению с контрольной группой и достоверно отличались от нее (табл. 4.15). Группы, получавшие *HSVtk* под контролем различных промоторов, незначительно и недостоверно различались друг от друга. Робастная оценка полученных данных о выживаемости различных групп (суммарно – 25% данных с обеих сторон для каждого из рассматриваемых вариантов) показывает, что средняя продолжительность жизни мышей, получавших *HSVtk* под контролем сурвивинового промотора, составляет 130% по сравнению с контролем, под контролем теломеразного промотора – 128% по сравнению с контролем, и под контролем цитомегаловирусного промотора – 141% по сравнению с контролем.



**Рисунок 4.54.** Влияние внутриопухолевой инъекции полиплекса с геном *HSVtk* на выживаемость мышей с опухолями, вызванных инокуляцией клеток LLC1 мышам C57black/6J. Прочие условия в подписи к рисунку 4.53.



**Таблица 4.15. Влияние введения полиплексов, несущих ген *HSV-tk* под контролем различных промоторов на продолжительность жизни мышей-опухоносителей с момента начала лечения.**

	Контроль	Полиплекс с <i>HSVtk</i> под контролем различных промоторов		
		Сурвивиновый (Surv)	Теломеразный (hTert)	Цитомегаловирусный (CMV)
Средняя продолжительность жизни, дней	18,5±1,1	23,6±1,4*	24,1±1,1**	25,2±1,9*
Средняя продолжительность жизни, % к контролю	100	128	130	136

Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка. Отличие от контроля: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

Полученные данные ясно указывают на наличие противоопухолевого эффекта тимидинкиназы под различными промоторами в сочетании с введением ганцикловира. Обнаружено также, что различия в терапевтическом эффекте, достигнутом при помощи полиплексов с *HSVtk* под контролем разных промоторов, незначительны, и несопоставимы с данными об экспрессии белков под этими промоторами (Konopka et al., 2009; Lu et al., 2005; Wang et al., 2003). Возможным объяснением этого является наличие участков опухоли, в которые не проникают частицы полиплекса при внутриопухолевом введении.

Проведенные эксперименты и их анализ позволяют сделать вывод, что разработана эффективная система доставки генетического материала в клетки, выявлены те характеристики полиплексных наночастиц и трансфицируемых клеток, которые в первую очередь влияют на эффективность трансфекции. Показано, что система доставки может успешно работать *in vivo* и имеет перспективы при разработке противоопухолевых средств.

Результаты раздела 4.8 в основном изложены в статьях: Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. (2011) Properties of PEI-based Polyplex Nanoparticles That Correlate With Their Transfection Efficacy. *Mol. Ther.*, **19**, 103-12 (вклад автора состоит в планировании части работ, в частности, в предложении провести анализ влияния состава полиплексов на эффективность трансфекции, подборе методов анализа состава конъюгатов, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, подбор условий получения

данных по распределению компонентов полиплексов в клетке с помощью КЛСМ и другие работы, анализе результатов и участии в написании); Трусов Г.А., Уласов А.В., Белецкая Е.А., Храмцов Ю.В., Дурыманов М.О., Розенкранц А.А., Свердлов Е.Д., Соболев А.С. (2011) Исследование влияния механизмов транспорта и распаковки полиплексов на эффективность трансфекции различных клеточных линий (вклад автора состоит в планировании части работ, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, анализе результатов и участии в написании). *Докл. АН РФ*, **237**, 266-8; Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rodichenko N., Sobolev A.S. (2016) Chapter 34: Intracellular Transport and Unpacking of Polyplex Nanoparticles. *Handbook of Clinical Nanomedicine – From Bench to Bedside*. R. Bawa, G.F. Audette, B.E. Reese, Eds. Pan Stanford Publishing, Singapore. ISBN 978-981-4669-22-1 (Hardcover), 978-981-4669-23-8 (eBook), 828-47 (вклад автора состоит в проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, подбор условий получения данных по распределению компонентов полиплексов в клетке с помощью КЛСМ анализе результатов и в написании). При помощи созданной полиплексной системы доставки генов на основе ПЭГ-ПЭИ-ТАТ была проведена также работа по терапии экспериментальных опухолей с помощью доставки генов тимидинкиназы и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора: Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P., Pleshkan V.V., Potapov V.K., Sass A.V., Monastyrskaya G.S., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S., Bezborodova O.A., Plyutinskaya A.D., Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I., Sverdlov E.D. (2015) Therapeutic properties of a vector carrying the HSV thymidine kinase and GM-CSF genes and delivered as a complex with a cationic copolymer. *J. Transl. Med.*, **13**, 78, 1-16 (вклад автора состоит в синтезе конъюгатов и определении их состава, подборе условий проведения суицидальной генотерапии экспериментальных опухолей лабораторных животных, участии в написании). Автор признателен всем коллегам-соавторам этих статей, без вклада которых этот комплекс работ не мог бы быть осуществлен.

#### **4.10. Полиплексные конструкции для доставки генетического материала в клетки-мишени на основе полиэтиленimina и лиганда для MC1R**

Для создания специфического для проникновения в опухолевые клетки варианта полиплекса был использован пептид, способный к связыванию с меланокортиновым рецептором перового типа (MC1R), повышенная экспрессия которого наблюдается при большинстве меланом. Природный лиганд этого рецептора,  $\alpha$ -МСГ, представляет собой

пептид, состоящий из 13 аминокислот  $\alpha$ -МСГ представляет собой пептид, состоящий из 13 аминокислот. Его аминокислотная последовательность одинакова у многих видов млекопитающих - человека, мыши, крупного рогатого скота и т.д.  $\alpha$ -МСГ может связываться с четырьмя меланокортиновыми рецепторами человека (кроме MC2R), однако обладает наиболее высоким сродством к MC1R и наиболее специфичен к нему, его сродство к MC3R ниже в 260 раз, к MC4R – в 5500 раз и к MC5R в 47500 раз (Wikberg et al., 2000). Среди других пептидов, существуют лиганды с большей специфичностью, чем  $\alpha$ -МСГ - MS04 и MS05, и сродство одного из них (MS05) для MC1R достаточно высоко ( $0,86 \pm 0,12$  нМ) (Szardenings et al., 2000). Сродство к третьему типу меланокортиновых рецепторов у этого пептида более чем на три порядка, с остальными родственными рецепторами этот пептид не взаимодействует (Szardenings et al., 2000).

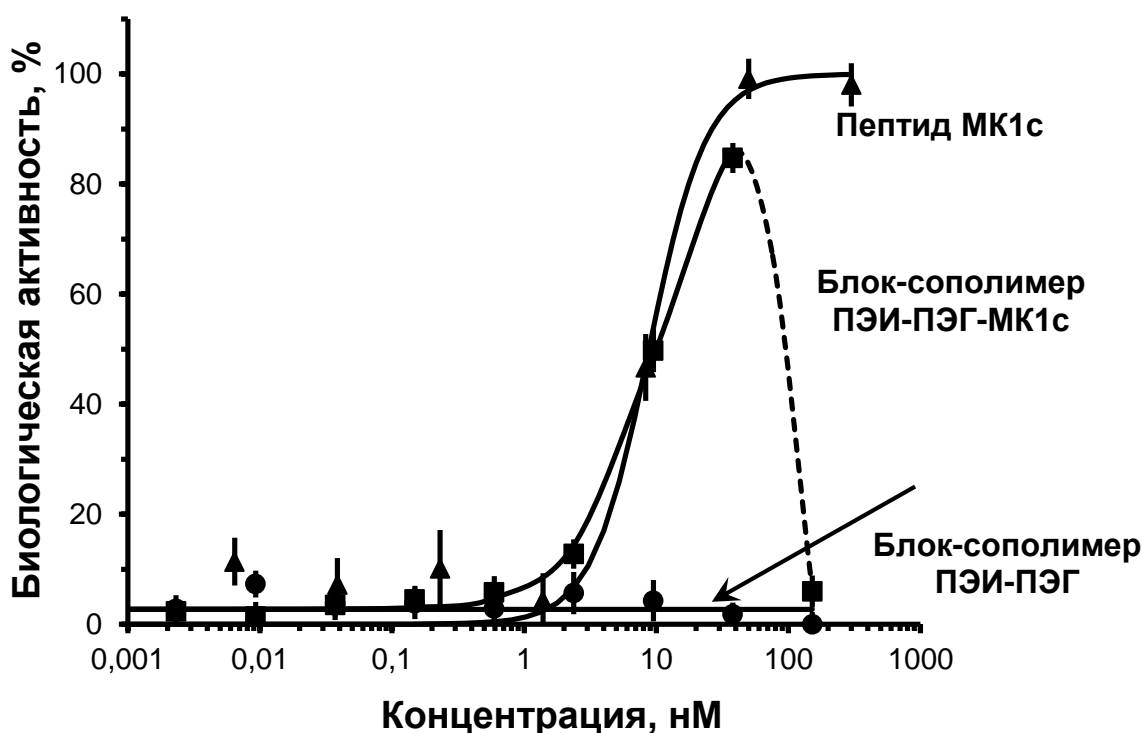
#### **4.10.1. Создание полиплексов на основе полиэтиленimina для рецептор-опосредованной доставки ДНК в клетки меланомы**

На основании сведений о строго специфичных для MC1R лигандах и предыдущим опыте работ с полиплексами для работы с клетками меланомы был синтезирован поликатионный носитель – конъюгат блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ со специально разработанным пептидом МК1с: **CGYGPPKKKRKVSGSG**SSIIISHFRWGKPV****, полужирным шрифтом выделена последовательность, специфичная для связывания с MC1R, подчеркнута минимальная последовательность сигнала ядерной локализации (СЯЛ) большого Т-антигена вируса SV-40. Благодаря своему заряду СЯЛ также способствует экспонированию лигандной последовательности в полиплексе наружу. Смысловые последовательности разделены коротким глицин-сериновым спейсером, N-конец пептида содержит цистеин для осуществления специфического присоединения по сульфгидрильной группе, отделенный от СЯЛ коротким спейсером. Синтез блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-МК1с был осуществлен по той же схеме, что и синтез ПЭИ-ПЭГ-ТАТ. Соотношения ПЭГ/ПЭИ в среднем составили  $6,8 \pm 2,1$ , а МК1с/ПЭИ –  $0,63 \pm 0,22$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение).

Проведенные эксперименты показали, что присоединение МК1с к ПЭИ мало изменяло взаимодействие пептида с рецептором (рис. 4.55). Концентрация полумаксимального эффекта ( $EC_{50}$ ) для свободного пептида была  $8,8 \pm 2,3$  нМ, в то время как для пептида, включенного в состав блок-сополимера (ПЭИ-ПЭГ-МК1с)  $EC_{50}$  составляла  $17 \pm 0,9$  нМ. Необходимо отметить, что при высоких концентрациях (больше 100 нМ) продукции меланина под воздействием блок-сополимера ПЭГ-ПЭИ-МК1с не

было обнаружено, возможно, из-за токсического действия катионного полимера на клетки.

Смешивание плазмидной ДНК с ПЭИ-ПЭГ-МК1с или ПЭИ-ПЭГ (при N/P = 30) приводило к образованию полиплексных наночастиц со средним гидродинамическим диаметром  $47,1 \pm 0,7$  и  $53,6 \pm 1,0$  нм, соответственно ( $\pm$  ст. ошибка, n – 9–10).  $\zeta$ -потенциалы для специфичных к MC1R и неспецифических полиплексов при N/P = 30 составляли  $22,7 \pm 1,0$  и  $19,4 \pm 0,5$  мВ ( $\pm$  ст. ошибка, n – 19-25), соответственно. Избыток свободного  $\alpha$ -МСГ ингибировал поглощение меченных QD полиплексов на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с (рис. 4.56А). Конкурентное ингибирование внутриклеточного поглощения свободным лигандом указывает на высокий вклад рецептор-опосредованного эндоцитоза в проникновение полиплексов в клетки.

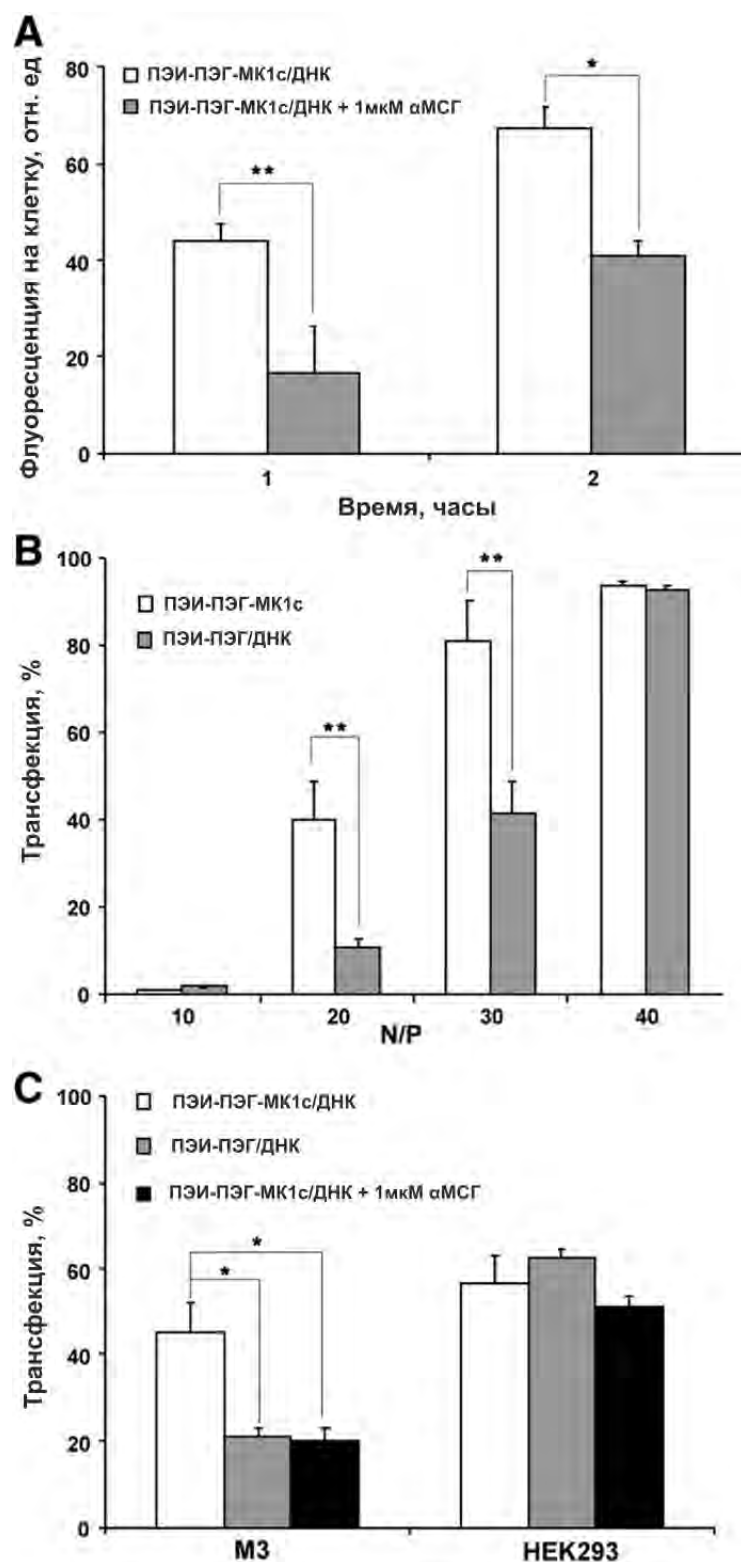


**Рисунок 4.55.** Зависимость продукции меланина клетками мышинной меланомы от концентрации добавленных веществ. Клетки линии B16-F1 были рассеяны в 96-луночную плашку в среде DMEM с 10 % сыворотки плодов крупного рогатого скота, на следующий день была произведена смена среды на среду с добавками пептида МК1с (▲), пептида в составе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-МК1с (■) или блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ (●) в концентрации, эквивалентной концентрации ПЭИ-ПЭГ-МК1с. Кривые зависимости эффекта от концентрации и концентрации полумаксимального эффекта рассчитаны при помощи нелинейной регрессии по четырехпараметрному логистическому уравнению с использованием программы «SigmaPlot 10».

Измерение эффективности трансфекции при разных N/P при помощи плазмиды, несущей ген EGFP выявило значительно более высокую эффективность трансфекции при

N/P 20 и 30 для полиплексов на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с, чем для нецелевых полиплексов на основе ПЭИ-ПЭГ (рис. 4.56В). Добавление избытка  $\alpha$ -МСГ снижало эффективность полиплексов на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с до уровня нецелевых полиплексов на клетках меланомы Клаудмана S91 (МЗ). Этот эффект (увеличение эффективности трансфекции для целевых полиплексами по сравнению с нецелевыми или конкурентное действие  $\alpha$ -МСГ) не был обнаружен на клетках HEK293, не экспрессирующих MC1R (рис. 4.56С) (Mountjoy et al., 2001).

Пептид МК1с содержит также на N-конце, последовательность ядерной локализации большого Т-антигена SV40 (СЯЛ), заряженную положительно. Этот участок был включен, чтобы проверить, может ли СЯЛ в полимерной части полиплексных наночастиц повысить эффективность трансфекции. Для такой проверки был синтезирован также блок-сополимер, в которых МК1с был заменен его аналогом, CGYGPKTKRKVSGSGSSIISHFRWGKPV (МК1с, СЯЛ-), с <sup>7</sup>Thr (T, подчеркнуто) вместо исходного <sup>7</sup>Lys. Эта замена полностью устраняет транспорт в ядро макромолекул с данным СЯЛ (Kalderon et al., 1984). Проведенные эксперименты не показали статистически значимой разницы между полиплексами с функциональным и нефункциональным СЯЛ, доставляющими ген люциферазы. Активность люциферазы после трансфекции полиплексами, содержащими МК1с, составляла  $(4,9 \pm 1,9) \cdot 10^8$  относительных световых единиц (RLU) на мг белка (среднее значение  $\pm$  SEM, n = 5), а для (МК1с, СЯЛ-) - содержащих было  $(6,3 \pm 2,8) \cdot 10^8$  RLU на мг белка (n = 5); N/P = 30, 40-часовая инкубация с клетками МЗ. Этот результат свидетельствует о незначительном вкладе транспорта в ядра нераспакованных полиплексных наночастиц через комплекс ядерной поры для быстро делящихся клеток.

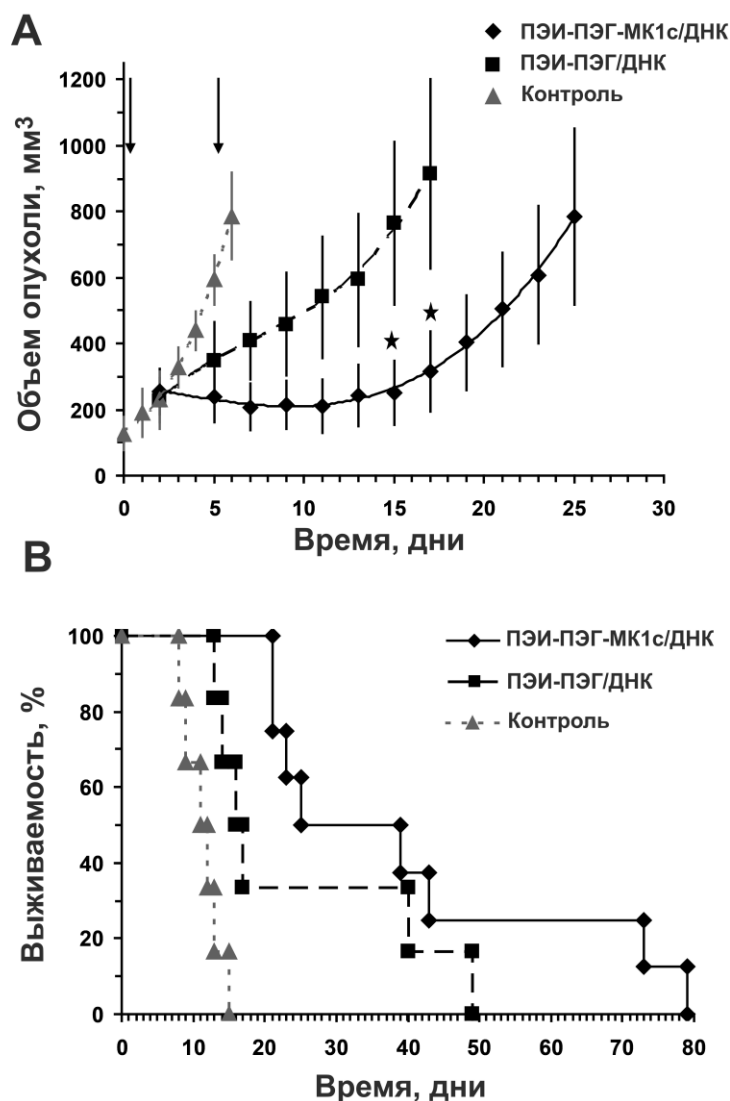


**Рисунок 4.56. Влияние лигандов для MC1R на поглощение клетками полиплексов и эффективность трансфекции клеток в культуре.** **А** – полиплексы на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с с меченной QD605 плазмидной ДНК добавляли к клеткам меланомы Клаудмана S91 (M3) в присутствии или в отсутствие свободного α-МСГ. **В** – Зависимость трансфекции клеток меланомы Клаудмана S91 (M3) от соотношения N/P в полиплексах на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с и ПЭИ-ПЭГ. **С** – сравнение эффективности трансфекции клеток М-3 и HEK293 полиплексами на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с и ПЭИ-ПЭГ и влияние избытка свободного α-МСГ полиплексами на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с (отношение N/P в полиплексах – 20). Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка (n = 6–9). Представленные данные получены совместно с М.О. Дурымановым.

#### **4.10.2. Оценка противоопухолевой эффективности генно-терапевтических продуктов, доставляемых в составе полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ**

На основании полученных данных об эффективности полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-МК1с *in vitro* было проведено исследование возможности терапии экспериментальных меланомных опухолей лабораторных животных. Для этого была проведена доставка терапевтического гена *HSVtk* под контролем цитомегаловирусного промотора путем внутриопухолевой инъекции полиплексов в подкожные опухоли меланомы М3 у мышей DBA/2J. Две внутриопухолевые инъекции полиплексов вместе с последующим внутрибрюшинным введением ганцикловира после каждой привели к значительному ингибированию роста опухоли; более того, целевые полиплексы вызывали регрессию опухоли во время лечения (рис. 4.57А). Обработка полиплексами на основе ПЭИ-ПЭГ-МК1с привела к увеличению продолжительности жизни мышей в 3,6 раза, что в 1,6 раза выше эффекта контрольного полиплекса (рис. 4.57В). Эти данные демонстрируют более высокие значения эффективности трансфекции полиплексов с лигандом, взаимодействующим с MC1R, как *in vitro*, так и *in vivo* по сравнению с контрольными нецелевыми. Данные, особенно полученные *in vitro*, также служат индикатором того, что причины этой разницы можно искать в особенностях проникновения в клетки и перемещения полиплексов.

Проведенные М.О. Дурымановым эксперименты по ингибированию клатрин-зависимого и рафт-зависимого эндоцитоза показали, что включение в состав блок-сополимера пептидного лиганда, специфичного для MC1R приводит к увеличению доли полиплексов, проникающих в клетку путем клатринового эндоцитоза. Анализ проникновения в меланомные клетки-мишени полиплексов с меченой квантовыми точками ДНК показал, что полиплексы без специфического к MC1R лиганда поступают в клетку с задержкой около 2 часов и позже достигают ядра, в отличие от полиплексов с пептидом МК1с в составе, для которых задержки не наблюдается.



**Рисунок 4.57. Терапия экспериментальных опухолей меланомы Клаудмана S91 (M3) у мышей DBA/2J при помощи полиплексов, несущих ген *HSVtk* под контролем цитомегаловирусного промотора. А – рост опухоли; В – выживаемость мышей-опухоленосителей после внутриопухолевых инъекций полиплексов. Инъекции полиплексов ПЭИ-ПЭГ-МК1с/ДНК (n = 8) или ПЭИ-ПЭГ/ДНК (n = 6), обозначены стрелками. После каждой инъекции производили введения ганцикловира (25 мг/кг, внутривенно два раза в день 7 раз). Контрольной группе (n = 6) вводили только ганцикловир. Результаты представляют собой средние значения  $\pm$  стандартная ошибка. \*  $p > 0,05$  для относительного роста опухоли между полиплексами (критерий Манна – Уитни).**

Представленные эксперименты проведены совместно с М.О. Дурымановым и другими сотрудниками лаборатории.

Проведенные исследования показывают, что присутствие лиганда к MC1R обеспечивает более эффективную трансфекцию полиплексами как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Различие в эффективности трансфекции между целевыми и нецелевыми полиплексами может быть объяснено разницей в скорости внутриклеточного накопления наночастиц упакованных полиплексов. Полученные данные свидетельствуют о



значительном вкладе клатрин-зависимого пути эндоцитоза в интернализацию целевых полиплексов с лигандом для MC1R. Этот эндоцитоз обеспечивает быстрое накопление наночастиц полиплекса внутри клеток-мишеней и, по-видимому, позволяет избежать взаимодействия полиплексов с поверхностными протеогликанами, которое может привести к распаковке полиплекса и последующей деградации, доставляемой ДНК.

Результаты, изложенные в разделе 4.10, опубликованы в статье: Durymanov M.O., Beletkaia E.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rodichenko N.S., Slastnikova T.A., Vinogradova T.V., Uspenskaya N.Y., Kopantsev E.P., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. (2012) Subcellular trafficking and transfection efficacy of polyethylenimine-polyethylene glycol polyplex nanoparticles with a ligand to melanocortin receptor-1. *J. Control. Release*, 163, 211-9 (вклад автора состоит в дизайне пептида для получения специфичных для MC1R конъюгатов, в планировании части работ, проведении части экспериментальных работ, в частности, в синтезе конъюгатов и определении их состава, проведении экспериментов по суицидальной генотерапии экспериментальных опухолей лабораторных животных, анализе результатов и участии в написании). Свойства созданных в результате этой работы полиплексов, особенности их функционирования в культивируемых клетках и *in vivo*, а также перспективы использования для диагностики были исследованы также в последующих статьях: Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Kuzmich A.I., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. (2013) Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue. *Biomaterials*, 38, 10209-16 (вклад автора состоит в организации части работ, в планировании части работ, в частности, в дизайне полиплексов, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтезе конъюгатов и определении их состава, проведении томографических исследований, анализе результатов и участии в написании); Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. (2015) Live imaging of transgene expression in Cloudman S91 melanoma cells after polyplex-mediated gene delivery. *J. Control. Release*, 215, 73–81 (вклад автора состоит в дизайне полиплексов, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтезе конъюгатов и определении их состава, анализе результатов и участии в написании). Автор признателен всем соавторам, без вклада которых эти работы не могли бы быть осуществлены.

## 5. Обсуждение результатов

Одной из основных нерешенных проблем медицины является эффективное лечение онкологических заболеваний. Для противоопухолевой терапии интенсивно используются результаты, полученные в результате развития физики и физической химии. В первую очередь это относится к использованию различных видов излучения для лечения и диагностики: ионизирующего излучения для локализации и уничтожения опухолей и излучения в видимой и ближней ИК-области для воздействия на введенные в организм ФС и генерации с их помощью токсичные для клеток АФК. Эти воздействия неспецифичны или малоспецифичны по отношению к клеткам опухолей, что вызывает побочные эффекты из-за повреждения нормальных клеток организма. В то же время к настоящему моменту накоплено большое количество сведений о различиях злокачественных и нормальных клеток на молекулярном уровне. Изучены также многие транспортные процессы внутри клеток. Всё это позволяет поставить вопрос о возможности доставить агент, вызывающий продукцию повреждающих факторов в наиболее подходящее место злокачественной клетки-мишени. Решение этой нетривиальной задачи требует как создания многофункциональных конструкций, так и исследования их функций на молекулярном, клеточном и, в случае успеха, на организменном уровне.

Когда клеточная специфичность не требуется, роль переносчиков лекарств для активного транспорта ограничивается поддержанием терапевтической концентрации или обеспечением проникновения лекарства через липидные мембраны. Ситуация резко меняется, когда необходимо воздействовать только на определенный тип клеток, чтобы избежать нежелательных побочных эффектов для нормальной ткани. Наиболее подходящими веществами для распознавания определенной популяции клеток являются молекулы, которые могут взаимодействовать с рецепторами или антигенами на клеточной поверхности с высоким сродством. Подавляющее большинство таких соединений представляют собой макромолекулы, которые не могут проникать через плазматическую мембрану, и только часть из них способна проникать в клетки достаточно эффективно для эффективной доставки лекарств. Последующий транспорт таких молекул следует естественными внутриклеточными путями, прежде всего, путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Исходя из этих соображений использование активного транспорта для доставки лекарств в клетки желаемого типа посредством связывания с поверхностными рецепторами, запускающих рецептор-опосредованный эндоцитоз и последующий внутриклеточный транспорт в компартмент-мишень, выглядит привлекательным (Bareford and Swaan, 2007; Ju et al., 2020). Наши ранние эксперименты с интернализуемыми

конструкциями с конканавалином А или с инсулином (рис. 4.1) также находятся в русле работ, которые сформировали концепции о возможности использования эндоцитоза для доставки лекарственных веществ и для увеличения эффективности уничтожения злокачественных клеток-мишеней.

Для определения оптимального пути исследования возможности применения внутриклеточной доставки для лечения онкологических заболеваний необходимо было сформировать представления о том,

- какие внутриклеточные мишени являются наиболее перспективными для воздействия с целью специфического уничтожения опухолевых клеток,
- какие действующие агенты могут быть оптимальными для доказательства перспективности направленного внутриклеточного транспорта в клетки-мишени,
- каким должен быть состав конструкций для этого,
- какие молекулярные параметры, отличающие злокачественные клетки от нормальных, могут быть использованы для направленного внутриклеточного транспорта,

Перспективным, скорее всего, наиболее перспективным вариантом внутриклеточной мишени злокачественной клетки является её ядро, в котором находятся уникальные клеточные структуры (Pan et al., 2018). Подавляющая доля традиционных химиотерапевтических средств воздействует на ядро клетки, и применяются они в достаточной высокой концентрации для достижения эффекта. Большинство этих средств являются низкомолекулярными веществами, эффективность действия которых существенно меняется при модификации, в частности при ковалентном присоединении к носителю. Это предопределяет либо использование нековалентного связывания с носителем, либо заключению в некий «контейнер», из которого действующее вещество нужно будет извлечь в соответствующем месте. Альтернативой могут являться агенты, которые способны продуцировать достаточное для эффекта количество действующего начала. К ним относятся ФС, продуцирующие АФК, радионуклиды, испускающие частицы с высокой ЛПЭ, продуктом действия которых является локальное образование ионизированных частиц и вторичных радикальных продуктов. Другим вариантом такого начала можно считать ферменты или их предшественники – нуклеиновые кислоты, РНК и ДНК. Последние имеют то преимущество перед собственно ферментами, что их действие будет происходить только после попадания в клетку или (для ДНК) в клеточное ядро. Такие варианты действующего начала как ФС, радионуклиды, испускающие частицы с

высокой ЛПЭ, ДНК, можно рассматривать как локально действующие агенты для ядра (Sobolev, 2013; Sobolev, 2020).

Проведенные нами работы по созданию синтетических и полусинтетических конструкций для направленного транспорта в ядра клеток с высокой экспрессией инсулинового рецептора (рис. 4.2, - 4.4) привели к заключению, о необходимости как минимум трех компонентов, отвечающих за транспортные функции внутри клетки. Эти компоненты должны обеспечивать:

- рецептор-опосредованный эндоцитоз,
- выход конструкции с присоединенным терапевтическим средством из эндосом в цитозоль,
- транспорт в ядро клетки.

Для решения вопроса о молекулярных параметрах, по которым извне можно отличить злокачественные клетки от нормальных был проведен анализ генов с повышенной экспрессией или изменениями в структуре продукта, которые экспонированы наружу и могут интернализироваться внутрь клетки. Проведенный нами анализ показал наличие сведений о, как минимум, нескольких десятках таких поверхностных белков (см. табл. 2.1, изложено по: Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Modular Nanotransporters for Targeted Intracellular Delivery of Drugs: Folate Receptors as Potential Targets. *Curr. Pharm. Des.* 2015, **21**, 9, 1227-38). Все эти варианты молекулярных мишеней, находящихся на поверхности опухолевых клеток потенциально могут представлять интерес для использования.

Для доказательства работоспособности подхода по созданию и использования механизмов клеточного узнавания одновременно с использованием механизмов внутриклеточного транспорта было выбрано несколько подходящих мишеней. Удобным вариантом для первого шага является MC1R, специфичный лиганд для которого –  $\alpha$ -МСГ – представляет собой короткий 13-членный пептид, одинаковый у людей и мышей. Это делает возможным проведение работ на сингенных опухолях животных с конструкциями, которые, в перспективе, можно использовать и для лечения людей. Свойства этого рецептора, его регуляции и отношение к развитию меланомных опухолей описаны в литературном обзоре (раздел 2.4) и статье: Розенкранц А.А., Слостникова Т.А., Дурьманов М.О., Соболев А.С. Меланокортиновые рецепторы первого типа и меланомы. *Биохимия*, 2013, **78**, 1564-75.

Другим вариантом, потенциально представляющий существенно больший интерес, является использование EGFR, рецептора, экспрессия которого часто увеличена

при многих онкологических заболеваниях эпителиального происхождения. Регуляция этого рецептора, имеющая отношение к развитию онкологических заболеваний, подробно описана в разделе 2.5 и статье: Розенкранц А. А., Слостникова Т. А. (2020). Рецептор эпидермального фактора роста: ключ для селективной доставки в клетки. *Биохимия*, **85**, 1159-88).

Исходя из этих соображений, по предложению А.С. Соболева были созданы конструкции, использующие естественные процессы эндоцитоза и внутриклеточного транспорта макромолекул в клетке на основе последовательностей различных белков, отвечающих за соответствующие транспортные функции. Первая серия таких конструкций была создана при помощи генной инженерии с  $\alpha$ -МСГ в качестве лиганда для узнавания клеток меланомы и рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Отдельные части конструкций или модули, обеспечивающие соответствующие транспортные функции включали также транслокационный домен дифтерийного токсина, и оптимизированный сигнал ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV-40. Эти модули обеспечивали выход конструкции с присоединенным действующим началом из эндосом и транспорт в ядро меланомной клетки-мишени, соответственно. Для обеспечения пространственного разделения модулей и оптимальной наработки конструкции в бактериях-продуцентах в нее был введен еще один компонент – модуль-носитель. Исследование молекулярных взаимодействий транспортных модулей с соответствующими структурами, обеспечивающими их функционирование, показало сохранение необходимых свойств в составе целой конструкции (рис. 4.6, 4.7). Присоединение ФС к таким конструкциям – модульным нанотранспортерам, МНТ – многократно увеличивало эффективность фотодинамического действия на меланомные клетки, но не сказывалось на фибробластах, у которых отсутствует заметная экспрессия МС1R. Проведенные эксперименты показали, что наиболее эффективны те МНТ, в составе которых присутствуют все функциональные транспортные модули (рис. 4.8В). Исследование микроокружения МНТ с присоединенным ФС показало (рис. 4.7), что получающиеся в результате продукции АФК 2',7'-дихлорфлуоресцеин находится в ограниченных участках клетки в кислой среде с pH 5,5 и ниже, если в составе МНТ нет эндосомолитического модуля. При наличии в составе МНТ этого модуля генерация активных форм кислорода происходит более равномерно по клетке, включая ядро, и pH 6-7, который выявляется для микроокружения 2',7'-дихлорфлуоресцеина. Это свидетельствует об эндосомолитическом действии МНТ в клетке и о доставке ФС в ее ядро. Проведенная на двух мышинных моделях меланомных опухолей работа показала, что ФДТ после внутривенного введения МНТ с разными ФС приводила к существенному до

98 %) торможению роста опухолей и достоверному увеличению продолжительности жизни животных (от 160 до 250% по отношению в контролю, в зависимости от используемого ФС и постановки эксперимента).

Чтобы убедиться, что разработанный путь внутриклеточной доставки в ядра опухолевых клеток-мишеней имеет более общее значение, чем разработка одного препарата была создана серия МНТ с ЭФР в качестве лигандного модуля. Проведенные исследования показали, что и в этом случае все модули МНТ способны осуществлять необходимые молекулярные взаимодействия в составе единой конструкции, как *in vitro*, так и в клетке (рис. 4.9 – 4.13). Присоединение ФС к МНТ с ЭФР в качестве лигандного модуля (ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР или МНТ<sub>ЭФР</sub>) увеличивала эффективность фотоцитотоксического действия ФС до 3 000 раз (рис. 4.14). ФДТ ксенографтов эпидермоидной карциномы человека А431 у иммунодефицитных мышей показала, как значительное торможение роста опухолей, так и излечение большей части животных в результате терапии (рис. 4.17).

**Проведенные серии работ позволяют утверждать, что разработан принципиально новый класс средств, позволяющий многократно увеличивать эффективность фотодинамической терапии.**

ФДТ в силу физических особенностей метода имеет ограничения, связанные с глубиной проникновения света в ткани организма (Барун с соавт., 2007; Eichler et al., 1977). Поэтому важным моментов в развитии направления является получение сведений о возможности использования для терапии не ограниченных этим. Альтернативными вариантами цитотоксического действующего начала, которое наиболее эффективно в ядре клетки являются радионуклиды, испускающие ионизирующие частицы с высокой ЛПЭ. Высокой ЛПЭ (25-230 кэВ/мкм) и относительно коротким пробегом (40-100 мкм в тканях) обладают  $\alpha$ -эмиттеры, поэтому из стерических соображений их действие наиболее эффективно в клеточном ядре (Sgouros, 2008; Zalutsky and Pozzi, 2004). Кроме того, их поражающее действие ограничивается несколькими слоями соседних клеток. Для проверки возможности использования такого рода действующего начала в сотрудничестве с лабораторией М. Залуцкого (M.R. Zalutsky), специализирующейся на создании неразлагаемых в клетке вариантов присоединения галогенов были проведены эксперименты с присоединенным к МНТ<sub>ЭФР</sub>  $^{211}\text{At}$ . Эти эксперименты показали, что присоединение  $^{211}\text{At}$  МНТ<sub>ЭФР</sub> более чем на порядок увеличивает его цитотоксичность (рис. 4.19).

Важным для продвижения к практическому применению новых вариантов лекарств является наличие разрешений на применение действующего начала в медицине.

Среди радионуклидов, давно применяемых в медицинской практике –  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ . Все они  $\gamma$ -излучатели и применяются главным образом для диагностики различных заболеваний. Кроме этого все они являются источником низкоэнергетических электронов Оже, которые в основном распространяются на расстояния порядка нескольких десятков нанометров, но обладают достаточно выраженной ЛПЭ, до 26 кэВ/мкм (Boswell and Brechbiel, 2005; Howell, 2008; Ku et al., 2019; Sobolev, 2018). Это делает такого рода радионуклиды привлекательным средством уничтожения опухолевых клеток, что также подробно рассмотрено в наших недавних обзорах: Rosenkranz A. A., Slastnikova T. A., Georgiev G. P., Zalutsky M. R., & Sobolev A. S. (2020). Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters. *Nuclear Medicine and Biology*, 80, 45-56; Rosenkranz A. A., Slastnikova T. A., Durymanov M. O., Georgiev G. P., & Sobolev A. S. (2020). Exploiting active nuclear import for efficient delivery of Auger electron emitters into the cell nucleus. *International Journal of Radiation Biology*, 1-11. DOI: 10.1080/09553002.2020.1815889. Проведенная проверка влияния присоединения  $^{125}\text{I}$  к МНТ<sub>ЭФР</sub> показала, что радионуклид в течение первых часов инкубации появляется в ядре клетки. Это резко увеличивает цитотоксичность препарата, которая возрастает более чем 4000 раз по сравнению с неприсоединенным изотопом (рис. 4.21-4.22). Длительный период полураспада делает  $^{125}\text{I}$  не самым удачным изотопом для медицинского применения, кроме того сложный метод получения  $^{125}\text{I}$ -МНТ<sub>ЭФР</sub> с применением хроматографии высокого давления будет препятствовать продвижению подхода в практику, поэтому были предприняты усилия для создания более технологичного варианта использования эмиттеров ЭО. Более простым оказался разработанный совместно с лабораторией М. Залуцкого (M.R. Zalutsky) метод присоединения к МНТ  $^{67}\text{Ga}$ . Препараты  $^{67}\text{Ga}$ -МНТ<sub>ЭФР</sub> показали значительное усиление цитотоксичности по сравнению с радионуклидом, присоединенным к альбумину или ЭФР. При попытке перенести разработанную методику присоединения в Россию, выяснилось, что доступные коммерческие препараты  $^{67}\text{Ga}$  или похожего по свойствам радионуклида  $^{111}\text{In}$  не могут обеспечить получение меченного эмиттером ЭО МНТ<sub>ЭФР</sub> с достаточной чистотой, выходом и удельной активностью. По этой причине был разработан одностадийный метод получения  $^{111}\text{In}$ -МНТ<sub>ЭФР</sub> с достаточно высокой для применения удельной активностью. Метод не требует очистки получаемого продукта и применения сложного оборудования, что потенциально может быть применено в клинике. Присоединения  $^{111}\text{In}$  к МНТ<sub>ЭФР</sub> или к другому подробно охарактеризованному МНТ с  $\alpha$ -МСГ в качестве лигандного модуля (ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ или МНТ<sub>МСГ</sub>), приводит к значительному усилению цитотоксичности радионуклида (рис. 4.30; 4.31; 4.41, табл. 4.6).

Отдельно был исследован вопрос о возможности модификации безлигандного варианта МНТ низкомолекулярным веществом в качестве лигандного модуля. Проведенные исследования показали, что присоединение фолата к такому МНТ через ПЭГ приводит к получению конструкции (МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub>), сохраняющей все необходимые молекулярные взаимодействия для транспорта эмиттера ЭО в ядро злокачественной клетки-мишени с повышенной экспрессией фолатного рецептора (рис. 4.34-4.36). Полученные сведения расширяют круг возможного применения технологии МНТ для лечения онкологических заболеваний.

Для доказательства возможности применения разработанной технологии для лечения опухолей мы провели несколько серий экспериментов по изучению распределения и эндорadiотерапии экспериментальных опухолей с помощью <sup>111</sup>In-МНТ<sub>МСГ</sub>, <sup>111</sup>In-МНТ-ПЭГ<sub>Ф</sub> и <sup>111</sup>In-МНТ<sub>ЭФР</sub> после внутриопухолевого введения. Проведенные эксперименты показали, что все МНТ хорошо удерживаются в опухоли и обеспечивают достоверный терапевтический эффект после однократного введения (рис. 4.32, 4.33, 4.37, 4.39, 4.42, 4.43).

**Проведенный комплекс исследований МНТ, включающий изучение молекулярных взаимодействий с необходимыми биологическими структурами, экспериментами на культурах клеток и терапии экспериментальных опухолей лабораторных животных с помощью ФС и эмиттеров ЭО позволяет сделать вывод о разработке модульной транспортной платформы для доставки терапевтических агентов в ядра опухолевых клеток-мишеней.**

Необходимо отметить также, что проведенный комплекс исследований является важным шагом для получения новых средств влияния на конкретные процессы в заданном типе клеток в организме. Эта платформа продолжает развиваться и может быть дополнена, расширена и модифицирована с целью как получения новых необходимых свойств МНТ, так и расширения круга веществ, доставляемых МНТ. Об этом свидетельствуют, в частности, недавние экспериментальные работы, проведенные с участием автора: Храмцов Ю.В., Уласов А.В., Цветкова А.Д., Розенкранц А.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. (2017). Характеристика новых модульных нанотранспортеров, содержащих альбуминсвязывающий домен. *Доклады Российской академии наук.* **472**, 730-2; Храмцов Ю.В., Уласов А.В., Розенкранц А.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. (2018). Исследование распределения модульных нанотранспортеров после внутривенного введения мышам с привитой меланомой Клаудмана S91. *Доклады Российской академии наук.* **478**, 720-2; Уласов А.В., Храмцов Ю.В., Лупанова Т.Н., Цветкова А.Д., Розенкранц А.А., Сланикова Т.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. (2018). Оптимизация модульных



нанотранспортеров для внутриклеточной доставки фрагментов антител. *Доклады Российской академии наук*. **479**, 92-5; Камалетдинова Т.Р., Розенкранц А.А., Уласов А.В., Храпцов Ю.В., Цветкова А.Д., Георгиев Г.П., Соболев А.С. (2018) Модульный нанотранспортер с фрагментом белка P21 тормозит репарацию повреждений ДНК, вызванных блеомицином. *Доклады Российской академии наук*. **479**, 456-9, а также рассмотрение ряда возможностей по направленной внутриклеточной регуляции в клетках-мишенях, изложенные в обзорных статьях с участием автора: Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. (2018) Transcription factors: time to deliver. *J. Control. Release*, **269**, 24-35; Slastnikova T.A., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., & Sobolev A.S. (2018). Targeted intracellular delivery of antibodies: The state of the art. *Front. Pharmacol.*, **9**, Paper № 1208. DOI: 10.3389/fphar.2018.01208.

Другим важным классом веществ, нуждающимся в направленной внутриклеточной доставке в ядра клеток-мишеней, является ДНК. Проведенный комплекс работ по созданию такого рода конструкций с плазмидой, несущий соответствующий ген, полилизином в качестве ДНК-связывающего и компактизирующего компонента и инсулином, в качестве интернализуемого лиганда показал возможность такого пути доставки генов и трансфекции клеток (раздел 4.8). Созданные варианты конструкций обеспечивали создание трансфицирующих наночастиц, которые впоследствии получили название полиплексов. Как показали проведенные эксперименты, которые согласуются с работами других лабораторий (Wagner et al., 1998), для эффективной трансфекции клеток необходим эндосомолитический компонент, в качестве которого может быть эффективно использован аденовирус (FitzGerald et al., 1983). Добавление эндосомолитического компонента в состав полиплекса способно многократно увеличивать трансфекцию клеток (рис. 4.45). Для трансфекции молочных желез конструкция с аденовирусом в качестве эндосомолитического компонента не имела преимуществ по сравнению с увеличенной дозой более простым вариантом полиплекса (рис. 4.46). С помощью разработанных полиплексов с эндосомолитическим компонентом была также успешно осуществлена трансфекция ранних эмбрионов: Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. (1999) Receptor-mediated transport of foreign DNA into preimplantation mammalian embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 112-20.

Другим вариантом полиплексов являются наноконструкции на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ. В этих блок-сополимерах ПЭИ выполняет функции связывания и компактизации ДНК, а также работает как эндосомолитический компонент конструкции, ПЭГ обеспечивает пространственное разделение ПЭИ и ТАТ и

гидрофильность наночастицы, а ТАТ используется для усиления взаимодействия с поверхностью клетки и входа в цитозоль. Проведенный анализ состава этих конструкций позволил выявить наиболее эффективные варианты (рис. 4.48) и связать их с долей наночастиц диаметром 50-75 нм (рис. 4.49). Большая панель используемых вариантов позволила получить для ряда клеточных линий эффективность трансфекции приближающуюся к 100%. Подробный анализ транспорта и распаковки наночастиц полиплексов в клетках и их моделирование в клеточных линиях, с различающихся по эффективности трансфекции, выявил значимую положительную корреляцию между эффективностью трансфекции и скоростью поступления ДНК в клетки, а также отрицательную корреляцию между эффективностью трансфекции и скоростью распаковки доставляемой ДНК в эндолизосомных компартментах.

Использование такого метода трансфекции для доставки гена тимидинкиназы вируса герпеса (*HSVtk*) в клетки опухоли и суицидной генотерапии показало ингибирование роста опухолей и увеличение продолжительности жизни животных (рис. 4.53-4.54). С помощью разработанного метода трансфекции с участием автора и других сотрудников лаборатории была проведена успешная работа по генотерапии экспериментальных опухолей карциномы легкого мышей с использованием генов *HSVtk* и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора: Alekseenko I.V., Snezhkov E.V., Chernov I.P., Pleshkan V.V., Potapov V.K., Sass A.V., Monastyrskaya G.S., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S., Bezborodova O.A., Plyutinskaya A.D., Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I., Sverdlov E.D. (2015) Therapeutic properties of a vector carrying the HSV thymidine kinase and GM-CSF genes and delivered as a complex with a cationic copolymer. *J. Transl. Med.*, **13**, 78.

Для транспорта ДНК в ядра меланомных клеток была создана полиплексная конструкция с блок-сополимером, состоящим из ПЭИ, ПЭГ и пептида, несущего последовательности высокоспецифичного лиганда для MC1R и СЯЛ SV-40. Проведенные эксперименты показали специфичную для рецептора трансфекцию клеток и увеличение продолжительности жизни животных-опухоленосителей в 3,5 раза в результате суицидной генотерапии с использованием *HSVtk* и ганцикловира (рис. 4.56, 4.67). В последующих работах с этой системой с участием автора и других коллег из лаборатории было изучено микрораспределение MC1R-специфичных полиплексов в опухоли и возможность использования трансфекции геном натрий-иодидного транспортера с последующим введением <sup>123</sup>I для диагностики меланомы: Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Kuzmich A.I., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. (2013) Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue.

*Biomaterials*. **38**, 10209-16. Кроме этого была исследована зависимость трансфекции меланомных клеток с помощью разработанных полиплексов от деления клеток: Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. (2015) Live imaging of transgene expression in Cloudman S91 melanoma cells after polyplex-mediated gene delivery. *J. Control. Release.*, **215**, 73–81, в результате чего было выявлено, что около 90% трансфекции обеспечивает разборка ядерной мембраны в процессе митоза и около 10% вход полиплексов в ядра через ядерный поры, что опосредуется наличием СЯЛ. Еще одним применением разработанного варианта многофункциональных полиплексных наночастиц явилась работа по использованию вазоактивных средств и средств, изменяющих межклеточную среду, на эффективность трансфекции: Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Bagrov D.V., Klinov D.V., Kedrov A.V., Chemeris N.K., Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. (2016). Application of vasoactive and matrix-modifying drugs can improve polyplex delivery to tumors upon intravenous administration. *J. Control. Release*. **232**, 20-28.

Общим итогом проведенной работы, включающей в себя разработку многофункциональной транспортной платформы МНТ для доставки лекарственных веществ в ядра клеток-мишеней, а также создание и исследование свойств многофункциональных полиплексов для доставки генов в клетки-мишени, является выявление и характеристика работы на уровне межмолекулярных взаимодействий минимально необходимых компонентов транспортной системы для доставки различных веществ в ядра опухолевых клеток-мишеней.

## 6. Выводы

1. Разработаны конструкции – модульные нанотранспортеры – для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней, с повышенной экспрессией ряда рецепторов (EGFR, MC1R, рецептор фолата) и изучено их молекулярное взаимодействие:

- с целевыми рецепторами, обеспечивающими узнавание данного типа опухолевых клеток и рецептор-опосредуемый эндоцитоз конструкций;
- с липидным бислоем, обеспечивающее рН-зависимый выход из эндосом в цитозоль;
- с комплексом белков импортинов  $\alpha/\beta$  обеспечивающих транспорт из цитозоля в ядро.

Экспериментально показано, что эти конструкции, способны взаимодействовать с интернализуемыми целевыми рецепторами на поверхности клеток-мишеней, вызывать рН-зависимые нарушения липидного бислоя в диапазоне рН 5-6, взаимодействовать с комплексом импортинов  $\alpha/\beta$ , обеспечивающих транспорт через ядерную пору.

2. Показано, что модульные нанотранспортеры для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней с присоединенными активными агентами – фотосенсибилизаторами и радионуклидами – способны эффективно взаимодействовать с интернализуемыми целевыми рецепторами на поверхности клеток-мишеней, вызывать рН-зависимые нарушения липидного бислоя в диапазоне рН 5-6, взаимодействовать с комплексом импортинов  $\alpha/\beta$ , обеспечивающих транспорт через ядерную пору.

3. Показано, что большая часть агентов, присоединенных к модульным нанотранспортерам для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней, достигает ядра в первые часы добавления конструкций к клеткам.

4. Показано, что присоединение фотосенсибилизаторов и радионуклидов, испускающих частицы с коротким пробегом, к модульным нанотранспортерам для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней вызывает многократное, до трех порядков, увеличение цитотоксичности.

5. На нескольких моделях экспериментальных опухолей лабораторных животных показано, что эффективность противоопухолевых средств – фотосенсибилизаторов и эмиттеров электронов Оже – многократно увеличивается, в результате присоединения

к модульным нанотранспортерам для направленного транспорта в ядра опухолевых клеток-мишеней, что выражается в значительном, до 98%, торможении роста опухолей, увеличении продолжительности жизни животных и их излечении.

6. Выявлены оптимальные для трансфекции соотношения компонентов (азота полиэтиленимина к фосфату ДНК и полиэтиленгликоля к полиэтиленимину) в модульных полиплексных конструкциях для доставки генетического материала в клетки-мишени.
7. Определены основные факторы, влияющие на эффективность доставки генетического материала в клетки-мишени: скорость поступления полиплексов в клетки, которая положительно влияет на эффективность трансфекции и скорость распаковки полиплексов в эндосомах, которая отрицательно влияет на эффективность трансфекции.
8. На экспериментальных опухолях лабораторных животных показан терапевтический эффект конструкций, несущих ген, обуславливающий цитотоксичность, выражающийся в увеличении продолжительности жизни животных-опухоленосителей в 3,6 раза.

## **Заключение**

Общим итогом проведенной работы, включающей в себя разработку и исследование свойств многофункциональной транспортной платформы для доставки биологически активных веществ в ядра клеток-мишеней. Охарактеризованы молекулярные взаимодействия компонентов транспортных систем для доставки различных веществ в ядра клеток-мишеней с клеточными компонентами, обеспечивающими этапы транспорта. Выявлены минимально необходимые компоненты транспортных систем. На примере биологически активных агентов: фотосенсибилизаторов, радионуклидов, испускающих частицы с коротким пробегом, а также ДНК, несущей целевой ген, показан внутриклеточный транспорт в ядра опухолевых клеток-мишеней. Показано усиление эффекта доставляемых веществ в результате присоединения их к многофункциональным транспортным конструкциям на культурах опухолевых клеток и при терапии экспериментальных опухолей лабораторных животных.

## Приложение 1.

Представление о внутриклеточных процессах, которые влияют на доставку гена к его месту назначения можно получить, последовательно рассматривая происходящие при этом процессы.

Вход ДНК полиплексов в клетку можно описать уравнениями:

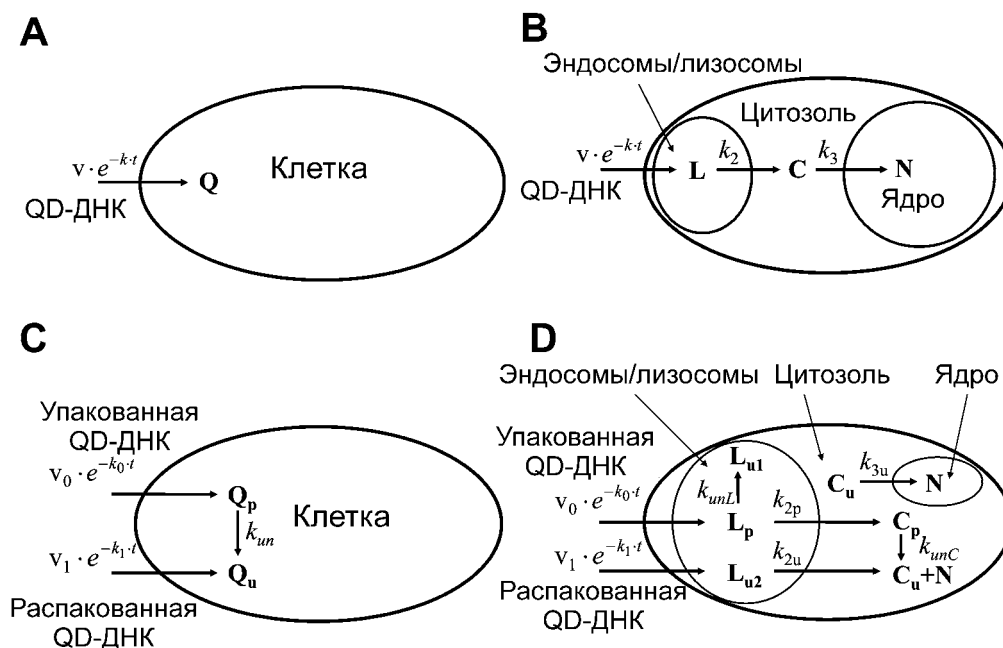
$$\frac{dS}{dt} = -k_{in} \cdot S$$

$$\frac{dQ}{dt} = k_{in} \cdot S \quad (\text{П1})$$

где:  $Q$  - общий воксельный объем квантовых точек на клетку;  $S$  - эффективная концентрация квантовых точек на поверхности клетки;  $k_{in}$  - константа скорости входа квантовых точек в клетку. Решение системы дает следующее выражение:

$$Q(t) = \frac{v}{k} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (\text{П2})$$

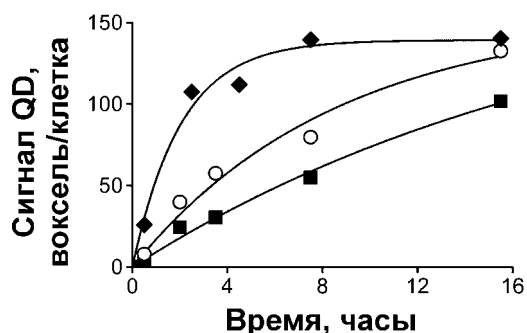
где:  $v = k_{in} \cdot S$  - начальная скорость входа квантовых точек и  $k$ , константа скорости входа квантовых точек в клетки. Происходящий процесс может быть проиллюстрирован простой схемой (модель 1, рис. П1А).



**Рисунок П1. Схемы транспорта ДНК в составе полиплексов, меченной квантовыми точками (QD).** **А** – вход в клетку QD-ДНК (модель 1),  $Q$  – общий воксельный объем квантовых точек на клетку;  $v$  - начальная скорость входа квантовых точек в клетку,  $k$  - константа скорости входа квантовых точек в клетку. **В** – вход в клетку и внутриклеточный транспорт QD-ДНК полиплексов согласно модели 2;  $L$ ,  $C$  и  $N$  – воксельные объемы сигнала квантовых точек на клетку в эндосомах и лизосомах, цитозоле и ядрах, соответственно;  $k_2$  - константы скорости выхода полиплекса из эндо / лизосом;  $k_3$  - константа скорости входа QD-ДНК в ядро. **С** – распаковка QD-ДНК из полиплексов

согласно модели 3;  $Q_p$ , общий воксельный объем сигнала квантовых точек упакованной QD-ДНК на клетку (на основании наличия FRET) и  $Q_u$ , общий воксельный объем неупакованной QD-ДНК квантовых точек на ячейку (FRET не наблюдался);  $k_{um}$  – константа скорости распаковки;  $v_0$  и  $v_1$  – скорости проникновения в клетку упакованных и неупакованных QD-ДНК, соответственно;  $k_0$  и  $k_1$  – константы скорости входа упакованной и неупакованной QD-ДНК, соответственно. **D** – Внутриклеточный транспорт и распаковка полиплексов в клеточных компартментах согласно модели 4.  $L_{u1}$  – воксельный объем квантовых точек, подвергшихся распаковке внутри эндосом и лизосом;  $L_{u2}$  – воксельный объем на клетку распакованной QD-ДНК, которая попала в эндосомы и лизосомы после предварительной распаковки на клеточной поверхности;  $N$  – воксельный объем квантовых точек на клетку в ядрах;  $C_p$  и  $L_p$  – воксельные объемы сигнала упакованной QD-ДНК в цитозоле и эндосомах и лизосомах, соответственно;  $v_0$  и  $v_1$  – скорости входа в клетку упакованной и неупакованной QD-ДНК, соответственно;  $k_0$  и  $k_1$  – константы скорости входа упакованной и неупакованной QD-ДНК, соответственно;  $k_{umL}$  – константа скорости распаковки в эндосомах и лизосомах;  $k_{umC}$  – константа скорости распаковки в цитозоле;  $k_{2p}$  и  $k_{2u}$  – константы скорости выхода упакованной и неупакованной QD-ДНК из эндосом и лизосом соответственно;  $k_{3u}$  – константа скорости входа в ядра.

Полученные с помощью КЛСМ данные были обработаны согласно (4.2), результат обработки представлен на рисунке рис. П2, а расчетные параметры приведены в таблице 4.13.



**Рисунок П2. Кинетика накопления в клетках квантовых точек, присоединенных к ДНК в полиплексах (QD-ДНК).** А – изменение воксельного объема QD-ДНК на клетку: в клетках A549 (■), Calu-1 (○) и M3 (◆) и соответствующие теоретические кривые, полученные по модели 1 (коэффициенты корреляции  $r$  – 0,996, 0,991 и 0,993 для A549, Calu-1 и меланомы Клаудмана S91 (M3), соответственно).

Опираясь на определенное в результате интерполяции значение константы входа полиплексов в клетку и данные о воксельных объемах квантовых точек на клетку в эндосомах и лизосомах (L), цитозоле (C) и ядрах (N) о можно описать внутриклеточный транспорт полиплексов (модель 2, рис. П1В)

$$\begin{aligned} \frac{dL}{dt} &= v \cdot e^{-k \cdot t} - k_2 \cdot L, \\ \frac{dC}{dt} &= k_2 \cdot L - k_3 \cdot C, \\ \frac{dN}{dt} &= k_3 \cdot C \end{aligned} \quad (\text{П3})$$

где:  $k_2$  and  $k_3$  – константы скорости выхода полиплексов из эндосом/лизосом и входа в ядро, соответственно. Решение этой системы уравнений дает следующие выражения

$$L(t) = \frac{v \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t})}{k_2 - k},$$



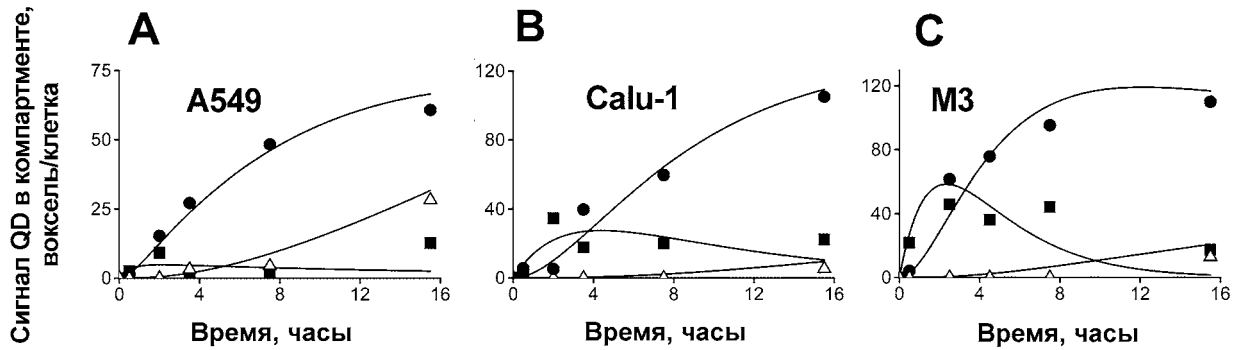
$$C(t) = \frac{k_2 \cdot v}{(k_2 - k) \cdot (k_3 - k)} \cdot (e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t}) + \frac{k_2 \cdot v}{(k_2 - k) \cdot (k_2 - k_3)} \cdot (e^{-k_2 \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t}),$$

$$N(t) = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot v}{(k_2 - k) \cdot (k_3 - k)} \cdot \left( \frac{e^{-k_3 \cdot t} - 1}{k_3} - \frac{e^{-k \cdot t} - 1}{k} \right) +$$

$$+ \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot v}{(k_2 - k) \cdot (k_2 - k_3)} \cdot \left( \frac{e^{-k_3 \cdot t} - 1}{k_3} - \frac{e^{-k_2 \cdot t} - 1}{k_2} \right)$$

(П4)

которые были использованы для оценки экспериментальных данных (рис. П3А-С, таблица П1).



**Рисунок П3. Кинетика изменения сигнала от QD-ДНК в клеточных компартментах.** Сигнал QD-ДНК в эндосомах и лизосомах (■), цитозоле (●) и в ядрах (Δ) представлен в виде воксельных объемов на клетку. **А** – A549, **В** – Calu-1, **С** – меланома Клаудмана S91 (клон М3). Линии представляют собой теоретические кривые, полученные по модели, представленной на рисунке П1В;  $r = 0,978, 0,970$  и  $0,956$  для A549, Calu-1 и М3, соответственно.

Воксельный объем флуоресценции квантовых точек на клетку  $Q$ , состоит из  $Q_p$ , воксельного объема квантовых точек, упакованных в полиплекс (канал FRET) и  $Q_u$ , воксельного объема квантовых точек, не находящихся в составе полиплексов (FRET не наблюдалось). Эксперименты показали, что квантовые точки, не находящиеся в составе полиплексов, появляются в клетках A549 и М3 раньше, чем упакованные, что свидетельствует о попадании в клетку не только упакованных, но и неупакованных (или частично неупакованных) квантовых точек с поверхности клетки. В этом случае процесс распаковки ДНК может быть описан следующим образом:

$$\frac{dQ_p}{dt} = v_0 \cdot e^{-k_0 \cdot t} - k_{un} \cdot Q_p,$$

$$\frac{dQ_u}{dt} = v_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} + k_{un} \cdot Q_p$$

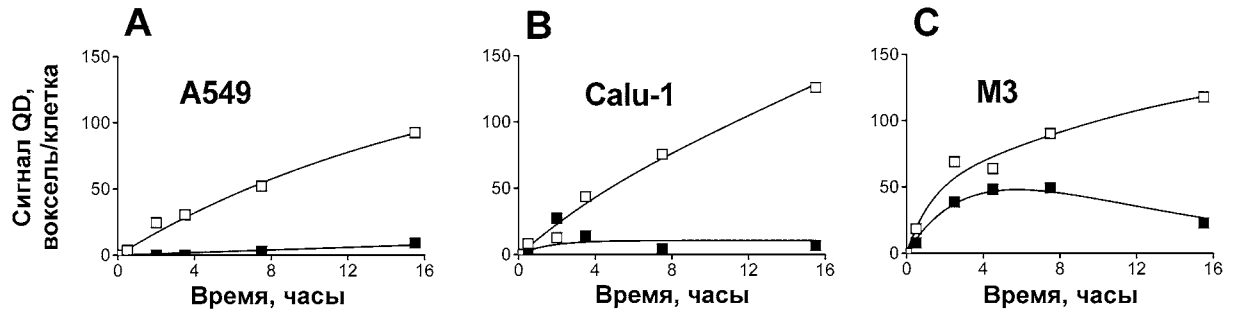
(П5)

где:  $k_{un}$ , константа скорости распаковки;  $v_0$  и  $v_1$ , скорости входа в клетку квантовых точек в полиплексах и в распакованной ДНК, соответственно ( $v_0 + v_1 = v$ ;  $v$  уже было рассчитано выше);  $k_0$  и  $k_1$ , константы скорости входа в клетку для упакованных и неупакованных в полиплексы квантовых точек, соответственно и для packed and unpacked quantum dots, respectively. Решение этой системы:

$$Q_p(t) = \frac{v_0 \cdot (e^{-k_0 t} - e^{-k_{un} t})}{k_{un} - k_0},$$

$$Q_u(t) = \frac{k_{un} \cdot v_0}{k_{un} - k_0} \cdot \left( \frac{e^{-k_{un} t} - 1}{k_{un}} - \frac{e^{-k_0 t} - 1}{k_0} \right) + \frac{v_1}{k_1} \cdot (1 - e^{-k_1 t}) \quad (П6)$$

было использовано для интерполяции экспериментальных данных, полученных КЛСМ (рис. П4, табл. П1).



**Рисунок П5. Кинетика распаковки QD-ДНК в клетках.** Сигнал от упакованной в полиплексы QD-ДНК (■) и неупакованной QD-ДНК (□) в клетках. **А** – A549, **В** – Calu-1, **С** – меланома Клаудмана S91 (клон М3). Линии представляют собой теоретические кривые, полученные по модели, представленной на рисунке П1С;  $r = 0,996, 0,981$  и  $0,991$  для A549, Calu-1 и М3, соответственно.

Исходя из проведенного теоретического анализа (Varga et al., 2001), оптимальная скорость распаковки ДНК из полиплексов должна быть около  $10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ , или  $0,6 \text{ ч}^{-1}$ . Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что распаковка полиплекса может происходить в разных клеточных компартментах (рис. 4D), Воксельный объем флуоресценции квантовых точек на клетку  $Q$ , состоит из  $Q_p$ , воксельного объема квантовых точек, упакованных в полиплекс (канал FRET) и  $Q_u$ , воксельного объема квантовых точек не находящихся в составе полиплексов (FRET не наблюдалось). Эксперименты показали, что квантовые точки, не находящиеся в составе полиплексов, появляются в клетках A549 и М3 раньше, чем упакованные, что свидетельствует о попадании в клетку не только упакованных, но и неупакованных (или частично неупакованных) квантовых точек с поверхности клетки. Данная модель призвана разграничить распаковку квантовых точек на клетку, которые попали в эндосомы и лизосомы после предварительной распаковки на поверхности клетки,  $L_{u2}$ , и объем квантовых точек, которые подверглись распаковке внутри эндосом и лизосом,  $L_{u1}$ . Модель учитывает общий воксельный объем квантовых точек на клетку в ядрах,  $N$ , и воксельный объем упакованных квантовых точек в цитозоле и эндосомах и лизосомах,  $C_p$  и  $L_p$ , соответственно. Величины  $v_0, k_0, v_1$  и  $k_1$  были описаны и рассчитаны выше. В результате были оценены значения следующих параметров:  $k_{unL}$  – константа скорости распаковки в

эндосомах и лизосомах;  $k_{unC}$  – константа скорости распаковки в цитозоле;  $k_{2p}$  и  $k_{2u}$  – константы скорости выхода упакованных и неупакованных квантовых точек из эндосом и лизосом соответственно;  $k_{3u}$  – константа скорости входа в ядра. Модель описывает следующая система дифференциальных уравнений. В этом случае процесс распаковки ДНК с использованием информации о распределении флуоресценции квантовых точек и переноса энергии на меченый блок-сополимер может быть описан следующим образом:

$$\begin{aligned}
 \frac{dL_{u1}}{dt} &= k_{unL} \cdot L_p, \\
 \frac{dL_{u2}}{dt} &= v_1 \cdot e^{-k_1 t} - k_{2u} \cdot L_{u2}, \\
 \frac{dL_p}{dt} &= v_0 \cdot e^{-k_0 t} - k_{unL} \cdot L_p - k_{2p} \cdot L_p, \\
 \frac{d(C_u + N)}{dt} &= k_{unC} \cdot C_p + k_{2u} \cdot L_{u2}, \\
 \frac{dC_p}{dt} &= k_{2p} \cdot L_p - k_{unC} \cdot C_p, \\
 \frac{dN}{dt} &= k_{3u} \cdot C_u
 \end{aligned} \tag{П7}$$

или в интегральном виде

$$\begin{aligned}
 L_u(t) &= \frac{v_1}{k_1} \cdot (1 - e^{-k_1 t}) + k_{unL} \cdot \int_0^t L_p \cdot dt - k_{2u} \cdot \int_0^t L_u \cdot dt + k_{2u} \cdot k_{unL} \cdot \int_0^t \int_0^t L_p \cdot dt, \\
 L_p(t) &= \frac{v_0}{k_0} \cdot (1 - e^{-k_0 t}) - (k_{unL} + k_{2p}) \cdot \int_0^t L_p \cdot dt, \\
 C_u + N(t) &= k_{unC} \cdot \int_0^t C_p \cdot dt + k_{2u} \cdot \int_0^t L_u \cdot dt - k_{2u} \cdot k_{unL} \cdot \int_0^t \int_0^t L_p \cdot dt, \\
 C_p(t) &= k_{2p} \cdot \int_0^t L_p \cdot dt - k_{unC} \cdot \int_0^t C_p \cdot dt, \\
 N(t) &= k_{3u} \cdot \int_0^t C_u \cdot dt
 \end{aligned} \tag{П8}$$

Уравнения 4.8 соответствовали экспериментальным данным с коэффициентами корреляции  $r$ : 0,975 (A549), 0,833 (Calu-1) и 0,941 (M3). Рассчитанные параметры приведены в таблице П1.

**Таблица III. Параметры транспорта QD-ДНК оцененные по моделям, представленным на рисунке 4.53.**

Параметр <sup>a</sup>	Линия клеток <sup>b</sup>		
	A549	Calu-1	M3
$TE_{\max}^b$ (%)	$17,7 \pm 5,2$	$63,2 \pm 1,8$	$98,0 \pm 0,8$
$v$ (vxл/ч)	$9,4 \pm 1,0$	$18 \pm 2$	$68 \pm 10$
$k$ (ч <sup>-1</sup> )	$0,051 \pm 0,017$	$0,12 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,08$
$1/v$ (ч/vxl)	$0,107 \pm 0,011$	$0,055 \pm 0,008$	$0,015 \pm 0,002$
$v_0$ (vxл/ч)	$0,49 \pm 0,15$	$7 \pm 2$	$24 \pm 4$
$k_0$ (ч <sup>-1</sup> )	0	0	$0,28 \pm 0,08$
$v_1$ (vxл/ч)	$8,9 \pm 1,0$	$11 \pm 3$	$44 \pm 10$
$k_1$ (ч <sup>-1</sup> )	$0,056 \pm 0,005$	$0,3 \pm 0,2$	$0,73 \pm 0,12$
$k_2$ (ч <sup>-1</sup> )	$1,7 \pm 0,6$	$0,39 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,05$
$k_{2p}$ (ч <sup>-1</sup> )	$0,2 \pm 0,2$	$0,52 \pm 0,09$	$0,24 \pm 0,02$
$k_{2u}$ (ч <sup>-1</sup> )	$2,21 \pm 0,13$	$3,9 \pm 1,7$	$0,60 \pm 0,06$
$k_3$ (ч <sup>-1</sup> )	$0,049 \pm 0,005$	$0,010 \pm 0,005$	$0,015 \pm 0,006$
$k_{3u}$ (ч <sup>-1</sup> )	$0,047 \pm 0,004$	$0,0061 \pm 0,0007$	$0,013 \pm 0,002$
$k_{un}$ (ч <sup>-1</sup> )	$\leq 0,84^c$	$0,6 \pm 0,4$	$0,10 \pm 0,02$
$k_{unL}$ (ч <sup>-1</sup> )	$0,49 \pm 0,05$	$0,217 \pm 0,007$	$0,063 \pm 0,006$
$k_{unC}$ (ч <sup>-1</sup> )	$\leq 0,95^b$	$1,5 \pm 0,3$	$0,14 \pm 0,03$

<sup>a</sup>vxl – воксель;  $TE_{\max}$  – максимальная эффективность трансфекции; <sup>c</sup>оценка верхнего предела.

## Список литературы

1. Мировая статистика здравоохранения . Мировая статистика здравоохранения, 2020 г: мониторинг показателей здоровья в отношении ЦУР, целей в области устойчивого развития [World health statistics 2020: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals]. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2020. 77 с. // 2020. -
2. Барун В.В., Иванов А.П., Вологовская А.В., Улащик В.С. Спектры поглощения и глубина проникновения света в нормальную и патологически измененную кожу человека // Журнал прикладной спектроскопии - 2007. - V. 74. - P. 387-381.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Злокачественные новообразования в России в 2019 году (Заболеваемость и смертность) // М. : МНИОИ им. П. А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 250 с. - 2020.
4. Клементьева О.Е., Брускин А.Б., Лунёва К.А., Бубенщиков В.Б., Терновская К.Э., Лунёв А.С., Кодина Г.Е. Разработка состава радиофармпрепарата для радионуклидной диагностики злокачественной меланомы // Разработка и регистрация лекарственных средств - 2020. - V. 9. - P. 66-71.
5. Abdel-Malek Z.A. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists // Cell Mol Life Sci - 2001. - V. 58. - P. 434-441.
6. Abdel-Malek Z.A. Development of alpha-melanocortin analogs for melanoma prevention and targeting // Adv. Exp. Med. Biol. - 2010. - V. 681. - P. 126-132.
7. Abdel-Malek Z.A., Knittel J., Kadekaro A.L., Swope V.B., and Starner R. The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes--a shift in paradigm // Photochem. Photobiol. - 2008. - V. 84. - P. 501-508.
8. Abdel-Malek Z.A., Swope V.B., Amornsiripanitch N., and Nordlund J.J. In vitro modulation of proliferation and melanization of S91 melanoma cells by prostaglandins // Cancer Res. - 1987. - V. 47. - P. 3141-3146.
9. Abrisqueta M., Herraiz C., Perez Oliva A.B., Sanchez-Laorden B.L., Olivares C., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borron J.C. Differential and competitive regulation of human melanocortin 1 receptor signaling by beta-arrestin isoforms // J. Cell Sci. - 2013. - V. 126 – P. 3724-3737.
10. Adotevi O., Vingert B., Freyburger L., Shrikant P., Lone Y.C., Quintin-Colonna F., Haicheur N., Amessou M., Herbelin A., Langlade-Demoyen P., Fridman W.H., Lemonnier F., Johannes L., and Tartour E. B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with

- alpha-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity // *J. Immunol.* - 2007. - V. 179. - P. 3371-3379.
11. Agard D.A., Hiraoka Y., Shaw P., and Sedat J.W. Fluorescence microscopy in three dimensions // *Methods Cell Biol.* - 1989. - V. 30. - P. 353-377.
  12. Aggarwal S., Gupta S., Pabla D., and Murthy R.S. Gemcitabine-loaded PLGA-PEG immunonanoparticles for targeted chemotherapy of pancreatic cancer // *Cancer Nanotechnol.* - 2013. - V. 4. - P. 145-157. DOI: 10.1007/s12645-013-0046-3.
  13. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., and Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA Cancer J. Clin.* - 2011. - V. 61. - P. 250-281.
  14. Akita H., Ito R., Khalil I.A., Futaki S., and Harashima H. Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy // *Mol. Ther.* - 2004. - V. 9. - P. 443-451.
  15. Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprpto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B.T., Sali A., and Rout M.P. The molecular architecture of the nuclear pore complex // *Nature* - 2007. - V. 450. - P. 695-701.
  16. Allen T.M. and Cullis P.R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2013. - V. 65. - P. 36-48.
  17. Ambrosini V., Fani M., Fanti S., Forrer F., and Maecke H.R. Radiopeptide imaging and therapy in Europe // *J. Nucl. Med.* - 2011. - V. 52 Suppl 2. - P. 42S-55S.
  18. Amessou M., Carrez D., Patin D., Sarr M., Grierson D.S., Croisy A., Tedesco A.C., Maillard P., and Johannes L. Retrograde delivery of photosensitizer (TPPp-O-beta-GluOH)<sub>3</sub> selectively potentiates its photodynamic activity // *Bioconjug. Chem.* - 2008. - V. 19. - P. 532-538.
  19. Andrae J., Gallini R., and Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine // *Genes Dev.* - 2008. - V. 22. - P. 1276-1312.
  20. Angeles-Boza A.M., Erazo-Oliveras A., Lee Y.J., and Pellois J.P. Generation of endosomolytic reagents by branching of cell-penetrating peptides: tools for the delivery of bioactive compounds to live cells in cis or trans // *Bioconjug. Chem.* - 2010. - V. 21. - P. 2164-2167.
  21. Anthony A.C. Folate receptors // *Annu. Rev. Nutr.* - 1996. - V. 16. - P. 501-521.

22. Arkhipov A., Shan Y., Das R., Endres N.F., Eastwood M.P., Wemmer D.E., Kuriyan J., and Shaw D.E. Architecture and membrane interactions of the EGF receptor // *Cell* - 2013. - V. 152. - P. 557-569. DOI: 10.1016/j.cell.2012.12.030.
23. Arteaga C.L. and Engelman J.A. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics // *Cancer Cell* - 2014. - V. 25. - P. 282-303.
24. Ashman L.K. and Griffith R. Therapeutic targeting of c-KIT in cancer // *Expert. Opin. Investig. Drugs*. - 2013. - V. 22. - P. 103-115.
25. Atkins D., Reiffen K.A., Tegtmeyer C.L., Winther H., Bonato M.S., and Storkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections // *J. Histochem. Cytochem.* - 2004. - V. 52. - P. 893-901.
26. Autenrieth M.E., Seidl C., Bruchertseifer F., Horn T., Kurtz F., Feurecker B., D'Alessandria C., Pfob C., Nekolla S., Apostolidis C., Mirzadeh S., Gschwend J.E., Schwaiger M., Scheidhauer K., and Morgenstern A. Treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder with an alpha-emitter immunoconjugate targeting the epidermal growth factor receptor: a pilot study // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* - 2018. - V. 45. - P. 1364-1371. DOI: 10.1007/s00259-018-4003-6.
27. Backendorf C., Visser A.E., de Boer A.G., Zimmerman R., Visser M., Voskamp P., Zhang Y.H., and Noteborn M. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2008. - V. 48. - P. 143-169.
28. Bagley S.J. and O'Rourke D.M. Clinical investigation of CAR T cells for solid tumors: Lessons learned and future directions // *Pharmacol. Ther.* - 2020. - V. 205. - P. 107419. DOI:10.1016/j.pharmthera.2019.107419.
29. Bapst J.P. and Eberle A.N. Receptor-Mediated Melanoma Targeting with Radiolabeled alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone: Relevance of the Net Charge of the Ligand // *Front. Endocrinol. (Lausanne)* - 2017. - V. 8. - №. 93. DOI: 10.3389/fendo.2017.00093.
30. Bareford L.M. and Swaan P.W. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev* - 2007. - V. 59. - P. 748-758.
31. Beatty M.S. and Curiel D.T. Chapter two--Adenovirus strategies for tissue-specific targeting // *Adv. Cancer Res.* - 2012. - V. 115. - P. 39-67.
32. Beaumont K.A., Liu Y.Y., and Sturm R.A. The melanocortin-1 receptor gene polymorphism and association with human skin cancer // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* - 2009. - V. 88. - P. 85-153.

33. Beaumont K.A., Wong S.S., Ainger S.A., Liu Y.Y., Patel M.P., Millhauser G.L., Smith J.J., Alewood P.F., Leonard J.H., and Sturm R.A. Melanocortin MC(1) receptor in human genetics and model systems // *Eur. J. Pharmacol.* - 2011. - V. 660. - P. 103-110.
34. Becker T., Bottinger L., and Pfanner N. Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network // *Trends Biochem. Sci.* - 2012. - V. 37. - P. 85-91.
35. Belfiore A. and Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer // *Endocrine-related cancer* - 2011. - V. 18. - P. R125-R147.
36. Benjaminsen R.V., Matthebjerg M.A., Henriksen J.R., Moghimi S.M., and Andresen T.L. The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH // *Mol. Ther.* - 2013. - V. 21. - P. 149-157.
37. Berg K., Selbo P.K., Prasmickaite L., and Hogset A. Photochemical drug and gene delivery // *Curr. Opin. Mol. Ther.* - 2004. - V. 6. - P. 279-287.
38. Berg K., Selbo P.K., Prasmickaite L., Tjelle T.E., Sandvig K., Moan J., Gaudernack G., Fodstad O., Kjolsrud S., Anholt H., Rodal G.H., Rodal S.K., and Hogset A. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol // *Cancer Res.* - 1999. - V. 59. - P. 1180-1183.
39. Berg K., Weyergang A., Prasmickaite L., Bonsted A., Hogset A., Strand M.T., Wagner E., and Selbo P.K. Photochemical internalization (PCI): a technology for drug delivery // *Methods Mol. Biol.* - 2010. - V. 635. - P. 133-145.
40. Bhattacharyya S., Singh R.D., Pagano R., Robertson J.D., Bhattacharya R., and Mukherjee P. Switching the targeting pathways of a therapeutic antibody by nanodesign // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2012. - V. 51. - P. 1563-1567. DOI: 10.1002/anie.201105432.
41. Binder Z.A., Thorne A.H., Bakas S., Wileyto E.P., Bilello M., Akbari H., Rathore S., Ha S.M., Zhang L., Ferguson C.J., Dahiya S., Bi W.L., Reardon D.A., Idbaih A., Felsberg J., Hentschel B., Weller M., Bagley S.J., Morrissette J.J.D., Nasrallah M.P., Ma J., Zanca C., Scott A.M., Orellana L., Davatzikos C., Furnari F.B., and O'Rourke D.M. Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Mutations in Glioblastoma Present Opportunities for Clinical Imaging and Therapeutic Development // *Cancer Cell* - 2018. - V. 34. - P. 163-177.
42. Bisland S.K., Singh D., and Garipey J. Potentiation of chlorin e6 photodynamic activity in vitro with peptide-based intracellular vehicles // *Bioconjug. Chem.* - 1999. - V. 10. - P. 982-992.
43. Biswas S. and Torchilin V.P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2014. - V. 66. - P. 26-41.



44. Black P.C., Brown G.A., Dinney C.P., Kassouf W., Inamoto T., Arora A., Gallagher D., Munsell M.F., Bar-Eli M., McConkey D.J., and Adam L. Receptor heterodimerization: a new mechanism for platelet-derived growth factor induced resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy for bladder cancer // *J. Urol.* - 2011. - V. 185. - P. 693-700. DOI: 10.1016/j.juro.2010.09.082.
45. Boccaccio C. and Comoglio P.M. The MET Oncogene in Glioblastoma Stem Cells: Implications as a Diagnostic Marker and a Therapeutic Target // *Cancer Res.* - 2013. - V. 73. - P. 3193-3199.
46. Bohm M., Metze D., Schulte U., Becher E., Luger T.A., and Brzoska T. Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ // *Exp. Dermatol.* - 1999. - V. 8. - P. 453-461.
47. Boland W.K. and Bebb G. Nimotuzumab: a novel anti-EGFR monoclonal antibody that retains anti-EGFR activity while minimizing skin toxicity // *Expert Opin. Biol. Ther.* - 2009. - V. 9. - P. 1199-1206. DOI: 10.1517/14712590903110709.
48. Borgia F., Giuffrida R., Caradonna E., Vaccaro M., Guarneri F., and Cannavo S.P. Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy // *Biomedicines.* - 2018. - V. 6. - P. 1-16.
49. Boswell C.A. and Brechbiel M.W. Auger electrons: lethal, low energy, and coming soon to a tumor cell nucleus near you // *J. Nucl. Med.* - 2005. - V. 46. - P. 1946-1947.
50. Boucrot E., Ferreira A.P., Almeida-Souza L., Debard S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnnet N., and McMahon H.T. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway // *Nature* - 2015. - V. 517. - P. 460-465. DOI: 10.1038/nature14067.
51. Bouras A., Kaluzova M., and Hadjipanayis C.G. Radiosensitivity enhancement of radioresistant glioblastoma by epidermal growth factor receptor antibody-conjugated iron-oxide nanoparticles // *J. Neurooncol.* - 2015. - V. 124. - P. 13-22. DOI: 10.1007/s11060-015-1807-0.
52. Bousquet C. and Melmed S. Critical role for STAT3 in murine pituitary adrenocorticotropin hormone leukemia inhibitory factor signaling // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274. - P. 10723-10730.
53. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., and Behr J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine // *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* - 1995. - V. 92. - P. 7297-7301.
54. Breunig M., Lungwitz U., Liebl R., and Goepferich A. Fluorescence resonance energy transfer: evaluation of the intracellular stability of polyplexes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2006. - V. 63. - P. 156-165.

55. Broekgaarden M., van V.R., Oliveira S., Roovers R.C., van Bergen en Henegouwen PM, Pieters R.J., Van Gulik T.M., Breukink E., and Heger M. Site-specific conjugation of single domain antibodies to liposomes enhances photosensitizer uptake and photodynamic therapy efficacy // *Nanoscale* - 2016. - V. 8. - P. 6490-6494. DOI: 10.1039/c6nr00014b.
56. Brom M., Joosten L., Oyen W.J., Gotthardt M., and Boerman O.C. Improved labelling of DTPA-and DOTA-conjugated peptides and antibodies with <sup>111</sup>In in HEPES and MES buffer // *EJNMMI Res.* - 2012. - V. 2. – P. 1-11.
57. Buchegger F., Perillo-Adamer F., Dupertuis Y.M., and Delaloye A.B. Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* - 2006. - V. 33. - P. 1352-1363.
58. Bueno R., Appasani K., Mercer H., Lester S., and Sugarbaker D. The alpha folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* - 2001. - V. 121. - P. 225-233.
59. Burrell R.A., McGranahan N., Bartek J., and Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution // *Nature* - 2013. - V. 501. - P. 338-345.
60. Butler M.G., Dagenais S.L., Rockson S.G., and Glover T.W. A novel VEGFR3 mutation causes Milroy disease // *Am. J. Med. Genet. A.* - 2007. - V. 143. - P. 1212-1217.
61. Byrne J.D., Betancourt T., and Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2008. - V. 60. - P. 1615-1626.
62. Cagle P.T., Zhai Q.J., Murphy L., and Low P.S. Folate receptor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: potential target for folate-linked therapeutic agents // *Arch. Pathol. Lab. Med.* - 2013. - V. 137. - P. 241-244.
63. Cahill K. Molecular electroporation and the transduction of oligoarginines // *Phys. Biol.* - 2009. - V. 7. - №. 16001. DOI: 10.1088/1478-3975/7/1/016001
64. Caldieri G., Malabarba M.G., Di Fiore P.P., and Sigismund S. EGFR Trafficking in Physiology and Cancer // *Prog. Mol. Subcell. Biol.* - 2018. - V. 57. - P. 235-272. DOI: 10.1007/978-3-319-96704-2\_9.
65. Campbell E.M. and Hope T.J. Role of the cytoskeleton in nuclear import // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2003. - V. 55. - P. 761-771.
66. Cantorias M.V., Figueroa S.D., Quinn T.P., Lever J.R., Hoffman T.J., Watkinson L.D., Carmack T.L., and Cutler C.S. Development of high-specific-activity (<sup>68</sup>Ga)-labeled DOTA-rhenium-cyclized alpha-MSH peptide analog to target MC1 receptors overexpressed by melanoma tumors // *Nucl. Med. Biol.* - 2009. - V. 36. - P. 505-513.

67. Cao X., Zhu H., Ali-Osman F., and Lo H.W. EGFR and EGFRvIII undergo stress- and EGFR kinase inhibitor-induced mitochondrial translocalization: a potential mechanism of EGFR-driven antagonism of apoptosis // *Mol. Cancer* - 2011. - V. 10. - P. 26.  
DOI:10.1186/1476-4598-10-26.
68. Carlsson J., Wester K., De La Torre M., Malmstrom P.U., and Gardmark T. EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides // *Radiol. Oncol.* - 2015. - V. 49. - P. 50-58. DOI: 10.2478/raon-2014-0015.
69. Cautain B., Hill R., de P.N., and Link W. Components and regulation of nuclear transport processes // *FEBS J.* - 2015. - V. 282. - P. 445-462.
70. Chakraborty A.K., Funasaka Y., Pawelek J.M., Nagahama M., Ito A., and Ichihashi M. Enhanced expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R) in normal human keratinocytes during differentiation: evidence for increased expression of POMC peptides near suprabasal layer of epidermis // *J. Invest. Dermatol.* - 1999. - V. 112. - P. 853-860.
71. Chakraborty A.K., Funasaka Y., Slominski A., Ermak G., Hwang J., Pawelek J.M., and Ichihashi M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B // *Biochim. Biophys. Acta* - 1996. - V. 1313. - P. 130-138.
72. Chan C., Cai Z., Su R., and Reilly R.M. <sup>111</sup>In- or <sup>99m</sup>Tc-labeled recombinant VEGF bioconjugates: in vitro evaluation of their cytotoxicity on porcine aortic endothelial cells overexpressing Flt-1 receptors // *Nucl. Med. Biol.* - 2010. - V. 37. - P. 105-115.
73. Chan C.K., Hubner S., Hu W., and Jans D.A. Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery // *Gene Ther.* - 1998. - V. 5. - P. 1204-1212.
74. Chan C.K. and Jans D.A. Enhancement of MSH receptor- and GAL4-mediated gene transfer by switching the nuclear import pathway // *Gene Ther.* - 2001. - V. 8. - P. 166-171.
75. Chan K.T., Choi M.Y., Lai K.K., Tan W., Tung L.N., Lam H.Y., Tong D.K., Lee N.P., and Law S. Overexpression of transferrin receptor CD71 and its tumorigenic properties in esophageal squamous cell carcinoma // *Oncology Rep.* - 2014. - V. 31. - P. 1296-1304.
76. Chan L.F., Webb T.R., Chung T.T., Meimaridou E., Cooray S.N., Guasti L., Chapple J.P., Egertova M., Elphick M.R., Cheetham M.E., Metherell L.A., and Clark A.J. MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* - 2009. - V. 106. - P. 6146-6151.
77. Chancy C.D., Kekuda R., Huang W., Prasad P.D., Kuhnel J.M., Sirotnak F.M., Roon P., Ganapathy V., and Smith S.B. Expression and differential polarization of the reduced-

- folate transporter-1 and the folate receptor alpha in mammalian retinal pigment epithelium // *J. Biol. Chem.* - 2000. - V. 275. - P. 20676-20684.
78. Chandramohan V., Bao X., Keir S.T., Pegram C.N., Szafranski S.E., Piao H., Wikstrand C.J., McLendon R.E., Kuan C.T., Pastan I.H., and Bigner D.D. Construction of an immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, targeting EGFRwt and EGFRvIII for brain tumor therapy // *Clin. Cancer Res.* - 2013. - V. 19. - P. 4717-4727. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3891.
79. Chandramohan V., Bao X., Yu X., Parker S., McDowall C., Yu Y.R., Healy P., Desjardins A., Gunn M.D., Gromeier M., Nair S.K., Pastan I.H., and Bigner D.D. Improved efficacy against malignant brain tumors with EGFRwt/EGFRvIII targeting immunotoxin and checkpoint inhibitor combinations // *J. Immunother. Cancer* - 2019. - V. 7. - P. 142. DOI: 10.1186/s40425-019-0614-0.
80. Chandramohan V., Pegram C.N., Piao H., Szafranski S.E., Kuan C.T., Pastan I.H., and Bigner D.D. Production and quality control assessment of a GLP-grade immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, for a phase I/II clinical trial // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. - V. 101. - P. 2747-2766. DOI: 10.1007/s00253-016-8063-x.
81. Chatalic K.L., Kwekkeboom D.J., and de J.M. Radiopeptides for Imaging and Therapy: A Radiant Future // *J Nucl. Med* - 2015. - V. 56. - P. 1809-1812.
82. Chaumet A., Wright G.D., Seet S.H., Tham K.M., Goukko N.V., and Bard F. Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus // *Nat. Commun.* - 2015. - V. 6. - P. 8218. DOI: 10.1038/ncomms9218.
83. Chaux A., Cohen J.S., Schultz L., Albadine R., Jadallah S., Murphy K.M., Sharma R., Schoenberg M.P., and Netto G.J. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues // *Hum. Pathol.* - 2012. - V. 43. - P. 1590-1595. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.11.016.
84. Che T.F., Lin C.W., Wu Y.Y., Chen Y.J., Han C.L., Chang Y.L., Wu C.T., Hsiao T.H., Hong T.M., and Yang P.C. Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC // *Oncotarget* - 2015. - V. 6. - P. 37349-37366. DOI: 10.18632/oncotarget.5736.
85. Chen C.H., Wu Y.J., and Chen J.J. Photo-thermal therapy of bladder cancer with Anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles // *Front. Biosci. (Landmark Ed)* - 2016. - V. 21. - P. 1211-1221.

86. Chen C., Ke J., Zhou X.E., Yi W., Brunzelle J.S., Li J., Yong E.L., Xu H.E., and Melcher K. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors // *Nature* - 2013. - V. 500. - P. 486-489.
87. Chen H.H., Ho Y.P., Jiang X., Mao H.Q., Wang T.H., and Leong K.W. Quantitative comparison of intracellular unpacking kinetics of polyplexes by a model constructed from quantum dot-FRET // *Mol. Ther.* - 2008. - V. 16. - P. 324-332.
88. Chen J., Cheng Z., Miao Y., Jurisson S.S., and Quinn T.P. Alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide analogs labeled with technetium-99m and indium-111 for malignant melanoma targeting // *Cancer* - 2002. - V. 94. - P. 1196-1201.
89. Chen J., Cheng Z., Owen N.K., Hoffman T.J., Miao Y., Jurisson S.S., and Quinn T.P. Evaluation of an (111)In-DOTA-rhenium cyclized alpha-MSH analog: a novel cyclic-peptide analog with improved tumor-targeting properties // *J. Nucl. Med.* - 2001. - V. 42. - P. 1847-1855.
90. Chen J., Ouyang J., Chen Q., Deng C., Meng F., Zhang J., Cheng R., Lan Q., and Zhong Z. EGFR and CD44 Dual-Targeted Multifunctional Hyaluronic Acid Nanogels Boost Protein Delivery to Ovarian and Breast Cancers In Vitro and In Vivo // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2017. - V. 9. - P. 24140-24147. DOI: 10.1021/acsami.7b06879.
91. Chen P., Wang J., Hope K., Jin L., Dick J., Cameron R., Brandwein J., Minden M., and Reilly R.M. Nuclear localizing sequences promote nuclear translocation and enhance the radiotoxicity of the anti-CD33 monoclonal antibody HuM195 labeled with 111In in human myeloid leukemia cells // *J. Nucl. Med.* - 2006. - V. 47. - P. 827-836.
92. Cheng N., Cai W., Ren S., Li X., Wang Q., Pan H., Zhao M., Li J., Zhang Y., Zhao C., Chen X., Fei K., Zhou C., and Hirsch F.R. Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/mTOR pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer // *Oncotarget* - 2015. - V. 6. - P. 23582-23593. DOI: 10.18632/oncotarget.4361.
93. Cheng Z., Chen J., Miao Y., Owen N.K., Quinn T.P., and Jurisson S.S. Modification of the structure of a metallopeptide: synthesis and biological evaluation of (111)In-labeled DOTA-conjugated rhenium-cyclized alpha-MSH analogues // *J. Med. Chem.* - 2002. - V. 45. - P. 3048-3056.
94. Cheng Z., Zhang L., Graves E., Xiong Z., Dandekar M., Chen X., and Gambhir S.S. Small-animal PET of melanocortin 1 receptor expression using a 18F-labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone analog // *J. Nucl. Med.* - 2007. - V. 48. - P. 987-994.

95. Chia P.L., Scott A.M., and John T. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted therapies in mesothelioma // *Expert Opin. Drug. Deliv.* - 2019. - V. 16. - P. 441-451. DOI: 10.1080/17425247.2019.1598374.
96. Chia P. L., Parakh S., Russell P., Gan H. K., Asadi K., Gebesk, V., Murone C., Walkiewicz M., Liu Z. Thapa B., Scott F.E., and John, T. Expression of EGFR and conformational forms of EGFR in malignant pleural mesothelioma and its impact on survival // *Lung Cancer* – 2021. - V. 153 – P. 35-41.
97. Chitambar C.R. Medical applications and toxicities of gallium compounds // *Int. J. Environ. Res. Public Health* - 2010. - V. 7. - P. 2337-2361.
98. Chook Y.M. and Suel K.E. Nuclear import by karyopherin-betas: recognition and inhibition // *Biochim. Biophys. Acta* - 2011. - V. 1813. - P. 1593-1606.
99. Chua D.T., Nicholls J.M., Sham J.S., and Au G.K. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* - 2004. - V. 59. - P. 11-20. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2003.10.038.
100. Chung H., Lee J.H., Jeong D., Han I.O., and Oh E.S. Melanocortin 1 receptor regulates melanoma cell migration by controlling syndecan-2 expression // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 19326-19335.
101. Ciardiello F. and Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment // *N. Engl. J. Med.* - 2008. - V. 358. - P. 1160-1174. DOI: 10.1056/NEJMra0707704.
102. Clarke D.T. and Martin-Fernandez M.L. A Brief History of Single-Particle Tracking of the Epidermal Growth Factor Receptor // *Methods Protoc.* - 2019. - V. 2. – P. 12. DOI: 10.3390/mps2010012.
103. Cohenuram M. and Saif M.W. Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic // *Anticancer Drugs* - 2007. - V. 18. - P. 7-15. DOI: 10.1097/CAD.0b013e32800feecb.
104. Cook J.A. and Mitchell J.B. Viability measurements in mammalian cell systems // *Anal. Biochem.* - 1989. - V. 179. - P. 1-7.
105. Cook N., Frese K.K., and Moore M. Assessing the role of the EGF receptor in the development and progression of pancreatic cancer // *Gastrointest Cancer: Targets and Therapy* - 2014. - V. 4. - P. 23-37.
106. Cornelissen B. and Vallis K.A. Targeting the nucleus: an overview of Auger-electron radionuclide therapy // *Curr. Drug Discov. Technol.* - 2010. - V. 7. - P. 263-279.

107. Cornelissen B., Waller A., Able S., and Vallis K.A. Molecular radiotherapy using cleavable radioimmunoconjugates that target EGFR and gammaH2AX // *Mol. Cancer Ther.* - 2013. - V. 12. - P. 2472-2482. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0369.
108. Costantini D.L., Bateman K., McLarty K., Vallis K.A., and Reilly R.M. Trastuzumab-resistant breast cancer cells remain sensitive to the auger electron-emitting radiotherapeutic agent <sup>111</sup>In-NLS-trastuzumab and are radiosensitized by methotrexate // *J. Nucl. Med.* - 2008. - V. 49. - P. 1498-1505.
109. Costantini D.L., Villani D.F., Vallis K.A., and Reilly R.M. Methotrexate, paclitaxel, and doxorubicin radiosensitize HER2-amplified human breast cancer cells to the Auger electron-emitting radiotherapeutic agent (<sup>111</sup>In-NLS-trastuzumab // *J. Nucl. Med.* - 2010. - V. 51. - P. 477-483.
110. Cruickshank C.C., Minchin R.F., Le Dain A.C., and Martinac B. Estimation of the pore size of the large-conductance mechanosensitive ion channel of *Escherichia coli* // *Biophys. J.* - 1997. - V. 73. - P. 1925-1931.
111. Cunningham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I., and Van C.E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer // *N. Engl. J. Med.* - 2004. - V. 351. - P. 337-345. DOI: 10.1056/NEJMoa033025.
112. Curiel D.T. High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus-polylysine-DNA complexes // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1994. - V. 716. - P. 36-56.
113. D'Angelica M., Ammori J., Gonen M., Klimstra D.S., Low P.S., Murphy L., Weiser M.R., Paty P.B., Fong Y., and DeMatteo R.P. Folate receptor-alpha expression in resectable hepatic colorectal cancer metastases: patterns and significance // *Mod. Pathol.* - 2011. - V. 24. - P. 1221-1228.
114. D'Orazio J.A., Nobuhisa T., Cui R., Arya M., Spry M., Wakamatsu K., Igras V., Kunisada T., Granter S.R., Nishimura E.K., Ito S., and Fisher D.E. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning // *Nature* - 2006. - V. 443. - P. 340-344.
115. Dagogo-Jack I. and Shaw A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* - 2018. - V. 15. - P. 81-94.
116. Dalziel M., Kolesnichenko M., das Neves R.P., Iborra F., Goding C., and Furger A. Alpha-MSH regulates intergenic splicing of MC1R and TUBB3 in human melanocytes // *Nucl. Acids Res.* - 2011. - V. 39. - P. 2378-2392.

117. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? // *J. Control. Release* - 2016. - V. 244. - P. 108-121. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.11.015.
118. Davies T.F., Ando T., Lin R.Y., Tomer Y., and Latif R. Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease // *J. Clin. Invest.* - 2005. - V. 115. - P. 1972-1983.
119. Davies T.F., Yin X., and Latif R. The genetics of the thyroid stimulating hormone receptor: history and relevance // *Thyroid* - 2010. - V. 20. - P. 727-736.
120. De Angelis Campos A.C., Rodrigues M.A., de A.C., de Goes A.M., Nathanson M.H., and Gomes D.A. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2011. - V. 412. - P. 341-346. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100.
121. De Vogelaere K., Aerts M., Haentjens P., De Greve J., and Delvaux G. Gastrointestinal stromal tumor of the stomach: progresses in diagnosis and treatment // *Acta Gastroenterol. Belg.* - 2013. - V. 76. - P. 403-406.
122. de Wet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D.R., and Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells // *Mol. Cell Biol.* - 1987. - V. 7. - P. 725-737.
123. Demenais F., Mohamdi H., Chaudru V., Goldstein A.M., Newton Bishop J.A., Bishop D.T., Kanetsky P.A., Hayward N.K., Gillanders E., Elder D.E., Avril M.F., Azizi E., van Belle P., Bergman W., Bianchi-Scarra G., Bressac-de Paillerets B., Calista D., Carrera C., Hansson J., Harland M., Hogg D., Hoiom V., Holland E.A., Ingvar C., Landi M.T., Lang J.M., Mackie R.M., Mann G.J., Ming M.E., Njauw C.J., Olsson H., Palmer J., Pastorino L., Puig S., Randerson-Moor J., Stark M., Tsao H., Tucker M.A., van d., V, Yang X.R., and Gruis N. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study // *J. Natl. Cancer Inst.* - 2010. - V. 102. - P. 1568-1583.
124. Demory M.L., Boerner J.L., Davidson R., Faust W., Miyake T., Lee I., Huttemann M., Douglas R., Haddad G., and Parsons S.J. Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect // *J. Biol. Chem.* - 2009. - V. 284. - P. 36592-36604. DOI: 10.1074/jbc.M109.000760.
125. Deng C., Xiong J., Gu X., Chen X., Wu S., Wang Z., Wang D., Tu J., and Xie J. Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency in vitro // *Oncotarget* - 2017. - V. 8. - P. 38568-38580. DOI: 10.18632/oncotarget.16930.



126. Dolmans D.E., Fukumura D., and Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // *Nat. Rev. Cancer* - 2003. - V. 3. - P. 380-387.
127. Dong C., Li Z., Alvarez R., Jr., Feng X.H., and Goldschmidt-Clermont P.J. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity // *Mol. Cell* - 2000. - V. 5. - P. 27-34.
128. Drutsa V.L., Kaberdin V.R., Koroleva O.N., and Shilov I.A. [An effective method for site-directed mutagenesis in plasmids and cloning single-stranded DNA fragments] // *Bioorg. Khim.* - 1991. - V. 17. - P. 1487-1493.
129. Duarte S., Carle G., Faneca H., de Lima M.C., and Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? // *Cancer Lett.* - 2012. - V. 324. - P. 160-170.
130. Eberle A.N., Bapst J.P., Calame M., Tanner H., and Froidevaux S. MSH radiopeptides for targeting melanoma metastases // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2010. - V. 681. - P. 133-142.
131. Eberle A.N., Siegrist W., Bagutti C., Chluba-De Tapia J., Solca F., Wikberg J.E., and Chhajlani V. Receptors for melanocyte-stimulating hormone on melanoma cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci* - 1993. - V. 680. - P. 320-341.
132. Eckerman K.F. and Endo A. MIRD: radionuclide data and decay schemes // 2007. - 670 P. SNM, Reston.
133. Egorov S.Yu., Kamalov V.F., Koroteev N.I., Krasnovsky A.A., Toleutaev B.N., and Zinukov S.V. Rise and decay kinetics of photosensitized singlet oxygen luminescence in water. Measurements with nanosecond time-correlated single photon counting technique // *Chem. Phys. Lett.* - 1989. - V. 163. - P. 421-424.
134. Eichler J., Knof J., and Lenz H. Measurements on the depth of penetration of light (0.35--1.0 microgram) in tissue // *Radiat. Environ. Biophys.* - 1977. - V. 14. - P. 239-242.
135. El A.A., Schmidt F., Amessou M., Sarr M., Decaudin D., Florent J.C., and Johannes L. Shiga toxin-mediated retrograde delivery of a topoisomerase I inhibitor prodrug // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* - 2007. - V. 46. - P. 6469-6472.
136. El A.A., Schmidt F., Sarr M., Decaudin D., Florent J.C., and Johannes L. Synthesis and properties of a mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor conjugate // *Chem. Med. Chem.* - 2008. - V. 3. - P. 1687-1695.
137. El-Sayed I.H., Huang X., and El-Sayed M.A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles // *Cancer Lett.* - 2006. - V. 239. - P. 129-135. DOI: doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.035.
138. Elnakat H. and Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2004. - V. 56. - P. 1067-1084.

139. Emrich J.G., Bender H., Class R., Eshleman J., Miyamoto C., and Brady L.W. In vitro evaluation of iodine-125-labeled monoclonal antibody (MAb 425) in human high-grade glioma cells // *Am. J. Clin. Oncol.* - 1996. - V. 19. - P. 601-608. DOI: 10.1097/00000421-199612000-00015.
140. Erazo-Oliveras A., Muthukrishnan N., Baker R., Wang T.Y., and Pellois J.P. Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos: Strategies and Challenges // *Pharmaceuticals*. (Basel) - 2012. - V. 5. - P. 1177-1209.
141. Euhus D.M., Timmons C.F., and Tomlinson G.E. ETV6-NTRK3 □□Trk-ing the primary event in human secretory breast cancer // *Cancer Cell* - 2002. - V. 2. - P. 347-348.
142. Eves P.C. and Haycock J.W. Melanocortin signalling mechanisms // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2010. - V. 681. - P. 19-28.
143. Fahrenkrog B. and Aebi U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2003. - V. 4. - P. 757-766.
144. Falini B., Agostinelli C., Bigerna B., Pucciarini A., Pacini R., Tabarrini A., Falcinelli F., Piccioli M., Paulli M., and Gambacorta M. IRTA1 is selectively expressed in nodal and extranodal marginal zone lymphomas // *Histopathology* - 2012. - V. 61. - P. 930-941.
145. Faria J.A.Q.A., de A.C., Goes A.M., Rodrigues M.A., and Gomes D.A. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2016. - V. 478. - P. 39-45. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.097.
146. Fasih A., Fonge H., Cai Z., Leyton J.V., Tikhomirov I., Done S.J., and Reilly R.M. (1)(1)(1)In-Bn-DTPA-nimotuzumab with/without modification with nuclear translocation sequence (NLS) peptides: an Auger electron-emitting radioimmunotherapeutic agent for EGFR-positive and trastuzumab (Herceptin)-resistant breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* - 2012. - V. 135. - P. 189-200.
147. Fast J., Mossberg A.K., Nilsson H., Svanborg C., Akke M., and Linse S. Compact oleic acid in HAMLET // *FEBS Lett.* - 2005. - V. 579. - P. 6095-6100.
148. Favaro M.T., de Toledo M.A., Alves R.F., Santos C.A., Beloti L.L., Janissen R., de la Torre L.G., Souza A.P., and Azzoni A.R. Development of a non-viral gene delivery vector based on the dynein light chain Rp3 and the TAT peptide // *J. Biotechnol.* - 2014. - V. 173. - P. 10-18.
149. Fazel J., Rotzer S., Seidl C., Feuerecker B., Autenrieth M., Weirich G., Bruchertseifer F., Morgenstern A., and Senekowitsch-Schmidtke R. Fractionated intravesical radioimmunotherapy with (213)Bi-anti-EGFR-MAb is effective without toxic side-effects in a nude mouse model of advanced human bladder carcinoma // *Cancer Biol. Ther.* - 2015. - V. 16. - P. 1526-1534. DOI: 10.1080/15384047.2015.1071735.

150. Fernandes S.R.G., Fernandes R., Sarmiento B., Pereira P.M.R., and Tome J.P.C. Photoimmunoconjugates: novel synthetic strategies to target and treat cancer by photodynamic therapy // *Org. Biomol. Chem.* - 2019. - V. 17. - P. 2579-2593. DOI: 10.1039/c8ob02902d.
151. Finlay G.J., Baguley B.C., and Wilson W.R. A semiautomated microculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells // *Anal. Biochem.* - 1984. - V. 139. - P. 272-277.
152. FitzGerald D.J., Padmanabhan R., Pastan I., and Willingham M.C. Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis // *Cell* - 1983. - V. 32. - P. 607-617.
153. Flaherty K.T., Hodi F.S., and Fisher D.E. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma // *Nat. Rev. Cancer* - 2012. - V. 12. - P. 349-361.
154. Flores K. and Seger R. Stimulated nuclear import by beta-like importins // *F1000Prime. Rep.* - 2013. - V. 5. - P. 41. DOI: 10.12703/P5-41.
155. Foote C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation // *Photochem. Photobiol.* - 1991. - V. 54. - P. 659.
156. Forrest M.L., Meister G.E., Koerber J.T., and Pack D.W. Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery // *Pharm. Res.* - 2004. - V. 21. - P. 365-371.
157. Fowler P.A., Knight C.H., and Foster M.A. In-vivo magnetic resonance imaging studies of mammary gland development in non-pregnant goats treated with exogenous steroids // *J. Dairy Res.* - 1991. - V. 58. - P. 151-157.
158. Franovic A., Gunaratnam L., Smith K., Robert I., Patten D., and Lee S. Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - V. 104. - P. 13092-13097. DOI: 10.1073/pnas.0702387104.
159. Frederick L., Wang X.Y., Eley G., and James C.D. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas // *Cancer Res.* - 2000. - V. 60. - P. 1383-1387.
160. Freed D.M., Bessman N.J., Kiyatkin A., Salazar-Cavazos E., Byrne P.O., Moore J.O., Valley C.C., Ferguson K.M., Leahy D.J., Lidke D.S., and Lemmon M.A. EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics // *Cell* - 2017. - V. 171. - P. 683-695. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.017.
161. Frolov A., Schuller K., Tzeng C.W., Cannon E.E., Ku B.C., Howard J.H., Vickers S.M., Heslin M.J., Buchsbaum D.J., and Arnoletti J.P. ErbB3 expression and dimerization with

- EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib // *Cancer Biol. Ther.* - 2007. - V. 6. - P. 548-554. DOI: 10.4161/cbt.6.4.3849.
162. Funasaka Y., Sato H., Chakraborty A.K., Ohashi A., Chrousos G.P., and Ichihashi M. Expression of proopiomelanocortin, corticotropin-releasing hormone (CRH), and CRH receptor in melanoma cells, nevus cells, and normal human melanocytes // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* - 1999. - V. 4. - P. 105-109.
163. Funhoff A.M., van Nostrum C.F., Koning G.A., Schuurmans-Nieuwenbroek N.M., Crommelin D.J., and Hennink W.E. Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH // *Biomacromolecules.* - 2004. - V. 5. - P. 32-39.
164. Gabrielson N.P. and Pack D.W. Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions // *Biomacromolecules.* - 2006. - V. 7. - P. 2427-2435.
165. Gao F., Sihver W., Bergmann R., Walther M., Stephan H., Belter B., Neuber C., Haase-Kohn C., Bolzati C., Pietzsch J., and Pietzsch H.J. Radiochemical and radiopharmacological characterization of a (64) Cu-labeled alpha-MSH analog conjugated with different chelators // *J. Labelled Comp. Radiopharm.* - 2019. - V. 62. - P. 495-509.
166. Gao J., Xia Y., Chen H., Yu Y., Song J., Li W., Qian W., Wang H., Dai J., and Guo Y. Polymer-lipid hybrid nanoparticles conjugated with anti-EGF receptor antibody for targeted drug delivery to hepatocellular carcinoma // *Nanomedicine (Lond)* - 2014. - V. 9. - P. 279-293. DOI: 10.2217/nmm.13.20.
167. Garcia-Borron J.C., Sanchez-Laorden B.L., and Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation // *Pigment Cell Res.* - 2005. - V. 18. - P. 393-410.
168. Garrido G., Tikhomirov I.A., Rabasa A., Yang E., Gracia E., Iznaga N., Fernandez L.E., Crombet T., Kerbel R.S., and Perez R. Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile // *Cancer Biol. Ther.* - 2011. - V. 11. - P. 373-382. DOI: 10.4161/cbt.11.4.14097.
169. Gatalica Z., Millis S.Z., Vranic S., Bender R., Basu G.D., Voss A., and Von Hoff D.D. Comprehensive tumor profiling identifies numerous biomarkers of drug response in cancers of unknown primary site: analysis of 1806 cases // *Oncotarget* - 2014. - V. 5. - P. 12440-12447.
170. Gener P., Gouveia L.P., Sabat G.R., de Sousa Rafael D.F., Fort N.B., Arranja A., Fernandez Y., Prieto R.M., Ortega J.S., Arango D., Abasolo I., Videira M., and Schwartz S Jr. Fluorescent CSC models evidence that targeted nanomedicines improve treatment

- sensitivity of breast and colon cancer stem cells // *Nanomedicine* - 2015. - V. 11. - P. 1883-1892.
171. Genta I., Chiesa E., Colzani B., Modena T., Conti B., and Dorati R. GE11 Peptide as an Active Targeting Agent in Antitumor Therapy: A Minireview // *Pharmaceutics* - 2017. - V. 10. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010002.
172. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Math M., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N.Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C.R., Nohadani M., Eklund A.C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P.A., and Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing // *N. Engl. J. Med.* - 2012. - V. 366. - P. 883-892.
173. Ghanem G.E., Libert A., Arnould R., Vercammen A., and Lejeune F. Human melanoma targeting with alpha-MSH-melphalan conjugate // *Melanoma Res.* - 1991. - V. 1. - P. 105-114.
174. Giacomini K.M., Huang S.M., Tweedie D.J., Benet L.Z., Brouwer K.L., Chu X., Dahlin A., Evers R., Fischer V., Hillgren K.M., Hoffmaster K.A., Ishikawa T., Keppler D., Kim R.B., Lee C.A., Niemi M., Polli J.W., Sugiyama Y., Swaan P.W., Ware J.A., Wright S.H., Yee S.W., Zamek-Gliszczyński M.J., and Zhang L. Membrane transporters in drug development // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2010. - V. 9. - P. 215-236.
175. Giannakakou P., Sackett D.L., Ward Y., Webster K.R., Blagosklonny M.V., and Fojo T. p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein // *Nat. Cell Biol.* - 2000. - V. 2. - P. 709-717.
176. Gillenwater A.M., Johnson J.M., Curry J.M., Kochuparambil S.T., McDonald D., Fidler M., Stenson K.M., Vasan N.R., Razaq M.A., and Campana J. Survival Following Photoimmunotherapy in Patients (Pts) with Recurrent Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (rHNSCC) // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* - 2020. - V. 106. - P. 1180-1180.
177. Gilmore J.L., Gallo R.M., and Riese D.J. The epidermal growth factor receptor (EGFR)-S442F mutant displays increased affinity for neuregulin-2beta and agonist-independent coupling with downstream signalling events // *Biochem. J.* - 2006. - V. 396. - P. 79-88. DOI: 10.1042/BJ20051687.
178. Girard N. Thymic tumors: relevant molecular data in the clinic // *J. Thorac. Oncol.* - 2010. - V. 5. - P. S291-S295. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181f209b9.
179. Glover D.J. Artificial viruses: exploiting viral trafficking for therapeutics // *Infect. Disord. Drug Targets.* - 2012. - V. 12. - P. 68-80.

180. Goetsch L., Caussanel V., and Corvaia N. Biological significance and targeting of c-Met tyrosine kinase receptor in cancer // *Front. Biosci. (Landmark Ed. )*. - 2012. - V. 18. - P. 454-473.
181. Goffin J.R. and Zbuk K. Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline // *Clin. Ther.* - 2013. - V. 35. - P. 1282-1303.
182. Goh L.K., Huang F., Kim W., Gygi S., and Sorkin A. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor // *J. Cell Biol.* - 2010. - V. 189. - P. 871-883. DOI: 10.1083/jcb.201001008.
183. Goh L.K. and Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2013. - V. 5, a017459. doi: 10.1101/cshperspect.a017459.
184. Goldoni S., Iozzo R.A., Kay P., Campbell S., McQuillan A., Agnew C., Zhu J.X., Keene D.R., Reed C.C., and Iozzo R.V. A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer cell growth by attenuating basal and ligand-dependent EGFR activity // *Oncogene* - 2007. - V. 26. - P. 368-381.
185. Golombek S.K., May J.N., Theek B., Appold L., Drude N., Kiessling F., and Lammers T. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2018. - V. 130. - P. 17-38. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.007.
186. Gong X.W., Wei D.Z., He M.L., and Xiong Y.C. Discarded free PEG-based assay for obtaining the modification extent of pegylated proteins // *Talanta* - 2007. - V. 71. - P. 381-384.
187. Gonzalez-Conchas G.A., Rodriguez-Romo L., Hernandez-Barajas D., Gonzalez-Guerrero J.F., Rodriguez-Fernandez I.A., Verdines-Perez A., Templeton A.J., Ocana A., Seruga B., Tannock I.F., Amir E., and Vera-Badillo F.E. Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis // *Cancer Treat. Rev.* - 2018. - V. 62. - P. 1-8. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.10.008.
188. Gostring L., Chew M.T., Orlova A., Hoiden-Guthenberg I., Wennborg A., Carlsson J., and Frejd F.Y. Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: Methodological aspects // *Int. J. Oncol.* - 2010. - V. 36. - P. 757-763. DOI: 10.3892/ijo\_00000551.
189. Graham M.M. and Menda Y. Radiopeptide imaging and therapy in the United States // *J. Nucl. Med.* - 2011. - V. 52 Suppl 2. - P. 56S-63S.
190. Grandis J.R. and Tweardy D.J. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer // *Cancer Res.* - 1993. - V. 53. - P. 3579-3584.

191. Grapa C.M., Mocan T., Gonciar D., Zdrehus C., Mosteanu O., Pop T., and Mocan L. Epidermal Growth Factor Receptor and Its Role in Pancreatic Cancer Treatment Mediated by Nanoparticles // *Int. J. Nanomed.* - 2019. - V. 14. - P. 9693-9706. DOI: 10.2147/IJN.S226628.
192. Greaves M. and Maley C.C. Clonal evolution in cancer // *Nature* - 2012. - V. 481. - P. 306-313.
193. Greco A., Miranda C., and Pierotti M.A. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2010. - V. 321. - P. 44-49.
194. Green M. and Loewenstein P.M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein // *Cell* - 1988. - V. 55. - P. 1179-1188.
195. Greulich H. and Pollock P.M. Targeting mutant fibroblast growth factor receptors in cancer // *Trends Mol. Med.* - 2011. - V. 17. - P. 283-292.
196. Grobe A., Eichhorn W., Fraederich M., Kluwe L., Vashist Y., Wikner J., Smeets R., Simon R., Sauter G., Heiland M., and Blessmann M. Immunohistochemical and FISH analysis of EGFR and its prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma // *J. Oral. Pathol. Med.* - 2014. - V. 43. - P. 205-210. DOI: 10.1111/jop.12111.
197. Grossman E., Medalia O., and Zwerger M. Functional architecture of the nuclear pore complex // *Annu. Rev. Biophys.* - 2012. - V. 41. - P. 557-584.
198. Gui T. and Shen K. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer // *Cancer Epidemiol.* - 2012. - V. 36. - P. 490-496. DOI: 10.1016/j.canep.2012.06.005.
199. Guidotti G., Brambilla L., and Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics // *Trends Pharmacol Sci* - 2017. - V. 38. - P. 406-424.
200. Guo H., Shenoy N., Gershman B.M., Yang J., Sklar L.A., and Miao Y. Metastatic melanoma imaging with an (111)In-labeled lactam bridge-cyclized alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide // *Nucl. Med. Biol.* - 2009a. - V. 36. - P. 267-276.
201. Guo H., Yang J., Gallazzi F., and Miao Y. Reduction of the ring size of radiolabeled lactam bridge-cyclized alpha-MSH peptide, resulting in enhanced melanoma uptake // *J. Nucl. Med.* - 2010. - V. 51. - P. 418-426.
202. Guo H., Yang J., Gallazzi F., and Miao Y. Effects of the amino acid linkers on the melanoma-targeting and pharmacokinetic properties of 111In-labeled lactam bridge-cyclized alpha-MSH peptides // *J. Nucl. Med.* - 2011. - V. 52. - P. 608-616.
203. Guo H., Yang J., Gallazzi F., Prossnitz E.R., Sklar L.A., and Miao Y. Effect of DOTA position on melanoma targeting and pharmacokinetic properties of 111In-labeled lactam

- bridge-cyclized alpha-melanocyte stimulating hormone peptide // *Bioconjug. Chem.* - 2009b. - V. 20. - P. 2162-2168.
204. Guo H., Yang J., Shenoy N., and Miao Y. Gallium-67-labeled lactam bridge-cyclized alpha-melanocyte stimulating hormone peptide for primary and metastatic melanoma imaging // *Bioconjug. Chem.* - 2009c. - V. 20. - P. 2356-2363.
205. Gustafsson L., Hallgren O., Mossberg A.K., Pettersson J., Fischer W., Aronsson A., and Svanborg C. HAMLET kills tumor cells by apoptosis: structure, cellular mechanisms, and therapy // *J. Nutr.* - 2005. - V. 135. - P. 1299-1303.
206. Habeshaw J.A., Lister T.A., Stansfeld A.G., and Greaves M.F. Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma // *Lancet* - 1983. - V. 321. - P. 498-501.
207. Haeri A., Zalba S., Ten Hagen T.L., Dadashzadeh S., and Koning G.A. EGFR targeted thermosensitive liposomes: A novel multifunctional platform for simultaneous tumor targeted and stimulus responsive drug delivery // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* - 2016. - V. 146. - P. 657-669. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.012.
208. Hallgren O., Aits S., Brest P., Gustafsson L., Mossberg A.K., Wullt B., and Svanborg C. Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2008. - V. 606. - P. 217-240.
209. Han W. and Lo H.W. Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations // *Cancer Lett.* - 2012. - V. 318. - P. 124-134. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.01.011.
210. Hanzlikova M., Soinen P., Lampela P., Mannisto P.T., and Raasmaja A. The role of PEI structure and size in the PEI/liposome-mediated synergism of gene transfection // *Plasmid* - 2009. - V. 61. - P. 15-21.
211. Harrison A. and Royle L. Preparation of a <sup>211</sup>At-IgG conjugate which is stable in vivo // *The International journal of applied radiation and isotopes* - 1984. - V. 35. - P. 1005-1008.
212. Hartman T., Lundqvist H., Westlin J.E., and Carlsson J. Radiation doses to the cell nucleus in single cells and cells in micrometastases in targeted therapy with (<sup>131</sup>I) labeled ligands or antibodies // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* - 2000. - V. 46. - P. 1025-1036.
213. Hartmann L.C., Keeney G.L., Lingle W.L., Christianson T.J., Varghese B., Hillman D., Oberg A.L., and Low P.S. Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer // *Int. J. Cancer* - 2007. - V. 121. - P. 938-942.
214. Hartmeyer M., Scholzen T., Becher E., Bhardwaj R.S., Schwarz T., and Luger T.A. Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1



- and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone // *J. Immunol.* - 1997. - V. 159. - P. 1930-1937.
215. Harvey T.J., Burdon D., Steele L., Ingram N., Hall G.D., Selby P.J., Vile R.G., Cooper P.A., Shnyder S.D., and Chester J.D. Retargeted adenoviral cancer gene therapy for tumour cells overexpressing epidermal growth factor receptor or urokinase-type plasminogen activator receptor // *Gene Ther.* - 2010. - V. 17. - P. 1000-1010. DOI: 10.1038/gt.2010.45.
216. Haskell-Luevano C., Nikiforovich G., Sharma S.D., Yang Y.K., Dickinson C., Hruby V.J., and Gantz I. Biological and conformational examination of stereochemical modifications using the template melanotropin peptide, Ac-Nle-c[Asp-His-Phe-Arg-Trp-Ala-Lys]-NH<sub>2</sub>, on human melanocortin receptors // *J. Med. Chem.* - 1997. - V. 40. - P. 1738-1748.
217. He L., Gunn T.M., Bouley D.M., Lu X.Y., Watson S.J., Schlossman S.F., Duke-Cohan J.S., and Barsh G.S. A biochemical function for attractin in agouti-induced pigmentation and obesity // *Nat. Genet.* - 2001. - V. 27. - P. 40-47.
218. Heilman D.W., Teodoro J.G., and Green M.R. Apoptin nucleocytoplasmic shuttling is required for cell type-specific localization, apoptosis, and recruitment of the anaphase-promoting complex/cyclosome to PML bodies // *J. Virol.* - 2006. - V. 80. - P. 7535-7545.
219. Heitzer E., Ulz P., and Geigl J.B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer // *Clin. Chem.* - 2015. - V. 61. - P. 112-123. DOI: 10.1373/clinchem.2014.222679.
220. Heldin C.H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment // *Cell. Commun. Signal.* - 2013. - V. 11. - №. 97. – P. 1-18.
221. Helmuth J.A., Burckhardt C.J., Greber U.F., and Sbalzarini I.F. Shape reconstruction of subcellular structures from live cell fluorescence microscopy images // *J. Struct. Biol.* - 2009. - V. 167. - P. 1-10.
222. Henriksen L., Grandal M.V., Knudsen S.L., van D.B., and Grovdal L.M. Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands // *PLoS One* - 2013. - V. 8. - P. e58148. DOI: 10.1371/journal.pone.0058148-
223. Herbst R.S. and Shin D.M. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy // *Cancer* - 2002. - V. 94. - P. 1593-1611. DOI: 10.1002/cncr.10372.
224. Herraiz C., Jimenez-Cervantes C., Zanna P., and Garcia-Borrón J.C. Melanocortin 1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways // *FEBS Lett.* - 2009. - V. 583. - P. 3269-3274.
225. Herraiz C., Journe F., Abdel-Malek Z., Ghanem G., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borrón J.C. Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2

- mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT // *Mol Endocrinol.* - 2011. - V. 25. - P. 138-156.
226. Herraiz C., Journe F., Ghanem G., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borron J.C. Functional status and relationships of melanocortin 1 receptor signaling to the cAMP and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 pathways in human melanoma cells // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2012. - V. 44. - P. 2244-2252.
227. Ho C.S.J., Rydstrom A., Trulsson M., Balfors J., Storm P., Puthia M., Nadeem A., and Svanborg C. HAMLET: functional properties and therapeutic potential // *Future. Oncol.* - 2012. - V. 8. - P. 1301-1313.
228. Ho Y.P., Chen H.H., Leong K.W., and Wang T.H. Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET // *J. Control. Release* - 2006. - V. 116. - P. 83-89.
229. Holbro T. and Hynes N.E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2004. - V. 44. - P. 195-217. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440.
230. Hondermarck H. Neurotrophins and their receptors in breast cancer // *Cytokine Growth Factor Rev.* - 2012. - V. 23. - P. 357-365.
231. Hong L., Han Y., Liu J., and Brain L. Fibroblast growth factor receptor 2: a therapeutic target in gastric cancer // *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* - 2013. - V. 7. - P. 759-765.
232. Howell R.W. Auger processes in the 21st century // *Int. J. Radiat. Biol.* - 2008. - V. 84. - P. 959-975.
233. Hsu S.C. and Hung M.C. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family // *J. Biol. Chem.* - 2007. - V. 282. - P. 10432-10440. DOI: 10.1074/jbc.M610014200.
234. Hsu W.C., Cheng C.N., Lee T.W., and Hwang J.J. Cytotoxic Effects of PEGylated Anti-EGFR Immunoliposomes Combined with Doxorubicin and Rhenium-188 Against Cancer Cells // *Anticancer Res.* - 2015. - V. 35. - P. 4777-4788.
235. Huang C.W., Chen Y.T., Tsai H.L., Yeh Y.S., Su W.C., Ma C.J., Tsai T.N., and Wang J.Y. EGFR expression in patients with stage III colorectal cancer after adjuvant chemotherapy and on cancer cell function // *Oncotarget* - 2017. - V. 8. - P. 114663-114676. DOI: 10.18632/oncotarget.23072.
236. Huang F., Goh L.K., and Sorkin A. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization // *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* - 2007. - V. 104. - P. 16904-16909.
237. Huang H., Bhat A., Woodnutt G., and Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy // *Nat. Rev. Cancer* - 2010. - V. 10. - P. 575-585.

238. Huang S. and Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy // *Biotechnol. Adv.* - 2013. - V. 31. - P. 208-223.
239. Huang Z., Wang Y., Nayak P.S., Dammann C.E., and Sanchez-Esteban J. Stretch-induced fetal type II cell differentiation is mediated via ErbB1-ErbB4 interactions // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 18091-18102. DOI: 10.1074/jbc.M111.313163.
240. Hubner S., Xiao C.Y., and Jans D.A. The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin // *J Biol. Chem.* - 1997. - V. 272. - P. 17191-17195.
241. Hui Q., Ma J., Song J., Liu Z., Ren H., Jiang W., Wang Y., Xu Y., Guo D., Zhang X., and Lu S. In vitro and in vivo studies of antitumor effects of the recombinant immunotoxin MSH-PE38KDEL on melanoma // *Neoplasma* - 2014. - V. 61. - P. 392-400.
242. Hurley L.H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy // *Nat. Rev. Cancer* - 2002. - V. 2. - P. 188-200.
243. Ibach J., Radon Y., Gelleri M., Sonntag M.H., Brunsveld L., Bastiaens P.I., and Verweir P.J. Single Particle Tracking Reveals that EGFR Signaling Activity Is Amplified in Clathrin-Coated Pits // *PLoS One* - 2015. - V. 10. - P. e0143162-
244. Ibraheem D., Elaissari A., and Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems // *Int. J. Pharm.* - 2014. - V. 459. - P. 70-83.
245. Ibrahim N. and Haluska F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms // *Annu. Rev. Pathol.* - 2009a. - V. 4. - P. 551-579.
246. Ibrahim N. and Haluska F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms // *Annu. Rev. Pathol.* - 2009b. - V. 4. - P. 551-579.
247. Jackson M.R., Falzone N., and Vallis K.A. Advances in anticancer radiopharmaceuticals // *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol. )* - 2013. - V. 25. - P. 604-609.
248. Jang H., Ryoo S.R., Kostarelos K., Han S.W., and Min D.H. The effective nuclear delivery of doxorubicin from dextran-coated gold nanoparticles larger than nuclear pores // *Biomaterials* - 2013. - V. 34. - P. 3503-3510.
249. Jans D.A., Ackermann M.J., Bischoff J.R., Beach D.H., and Peters R. p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins // *J. Cell Biol.* - 1991. - V. 115. - P. 1203-1212.
250. Jaramillo M.L., Leon Z., Grothe S., Paul-Roc B., Abulrob A., and O'Connor M.M. Effect of the anti-receptor ligand-blocking 225 monoclonal antibody on EGF receptor endocytosis and sorting // *Exp. Cell Res.* - 2006. - V. 312. - P. 2778-2790. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.05.008.

251. Jiang J., Chen H., Yu C., Zhang Y., Chen M., Tian S., and Sun C. The promotion of salinomycin delivery to hepatocellular carcinoma cells through EGFR and CD133 aptamers conjugation by PLGA nanoparticles // *Nanomedicine (Lond)* - 2015. - V. 10. - P. 1863-1879. DOI: 10.2217/nmm.15.43.
252. Jiang X., Huang F., Marusyk A., and Sorkin A. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits // *Mol. Biol. Cell* - 2003. - V. 14. - P. 858-870. DOI: 10.1091/mbc.e02-08-0532.
253. Johannes L. and Romer W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2010. - V. 8. - P. 105-116.
254. Jones A.V. and Cross N.C. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2004. - V. 61. - P. 2912-2923.
255. Jorissen R.N., Walker F., Pouliot N., Garrett T.P., Ward C.W., and Burgess A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling // *Exp. Cell Res.* - 2003. - V. 284. - P. 31-53. DOI:10.1016/s0014-4827(02)00098-8.
256. Ju Y., Guo H., Edman M., and Hamm-Alvarez S.F. Application of advances in endocytosis and membrane trafficking to drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev* - 2020. - V. 157. - P. 118-141.
257. Jung G., Kohnlein W., and Luders G. Biological activity of the antitumor protein neocarzinostatin coupled to a monoclonal antibody by N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1981. - V. 101. - P. 599-606.
258. Jung J., Jeong S.Y., Park S.S., Shin S.H., Ju E.J., Choi J., Park J., Lee J.H., Kim I., Suh Y.A., Hwang J.J., Kuroda S., Lee J.S., Song S.Y., and Choi E.K. A cisplatinincorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity // *Int. J. Oncol.* - 2015. - V. 46. - P. 1268-1274. DOI: 10.1007/s12645-013-0046-3.
259. Kakimoto S., Hamada T., Komatsu Y., Takagi M., Tanabe T., Azuma H., Shinkai S., and Nagasaki T. The conjugation of diphtheria toxin T domain to poly(ethylenimine) based vectors for enhanced endosomal escape during gene transfection // *Biomaterials* - 2009. - V. 30. - P. 402-408.
260. Kakimoto S., Tanabe T., Azuma H., and Nagasaki T. Enhanced internalization and endosomal escape of dual-functionalized poly(ethyleneimine)s polyplex with diphtheria toxin T and R domains // *Biomed. Pharmacother.* - 2010. - V. 64. - P. 296-301.
261. Kalderon D., Richardson W.D., Markham A.F., and Smith A.E. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen // *Nature* - 1984. - V. 311. - P. 33-38.

262. Kalyankrishna S. and Grandis J.R. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer // *J. Clin. Oncol.* - 2006. - V. 24. - P. 2666-2672. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.8306.
263. Kameyama K., Montague P.M., and Hearing V.J. Expression of melanocyte stimulating hormone receptors correlates with mammalian pigmentation, and can be modulated by interferons // *J. Cell Physiol.* - 1988. - V. 137. - P. 35-44.
264. Kan S.h., Elanko N., Johnson D., Cornejo-Roldan L., Cook J., Reich E.W., Tomkins S., Verloes A., Twigg S.R., and Rannan-Eliya S. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis // *Am. J. Hum. Genet.* - 2002. - V. 70. - P. 472-486.
265. Kang S.J., Jeong H.Y., Kim M.W., Jeong I.H., Choi M.J., You Y.M., Im C.S., Song I.H., Lee T.S., and Park Y.S. Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis // *Nanoscale.* - 2018. - V. 10. - P. 19338-19350. DOI: 10.1039/c8nr05099f.
266. Karandish F. and Mallik S. Biomarkers and targeted therapy in pancreatic cancer // *Biomarkers in cancer* - 2016. - V. 8. - P. BIC-S34414.
267. Karjoo Z., Chen X., and Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev* - 2016. - V. 99. - P. 113-128.
268. Karra N., Nassar T., Ripin A.N., Schwob O., Borlak J., and Benita S. Antibody conjugated PLGA nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel palmitate: efficacy and biofate in a lung cancer mouse model // *Small* - 2013. - V. 9. - P. 4221-4236. DOI: 10.1002/sml.201301417.
269. Katoh M. FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies // *J. Invest. Dermatol.* - 2009. - V. 129. - P. 1861-1867.
270. Kelleher F.C., O'Sullivan H., Smyth E., McDermott R., and Viterbo A. Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease // *Carcinogenesis* - 2013. - V. 34. - P. 2198-2205.
271. Kelley K.M., Rowan B.G., and Ratnam M. Modulation of the Folate Receptor-alpha Gene by the Estrogen Receptor Mechanism and Implications in Tumor Targeting // *Cancer Res.* - 2003. - V. 63. - P. 2820-2828.
272. Keston A.S. and Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide // *Anal. Biochem.* - 1965. - V. 11. - P. 1-5.
273. Kim B.K., Kang H., Doh K.O., Lee S.H., Park J.W., Lee S.J., and Lee T.J. Homodimeric SV40 NLS peptide formed by disulfide bond as enhancer for gene delivery // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2012. - V. 22. - P. 5415-5418.

274. Kim D.H., Kim D.K., Zhou K., Park S., Kwon Y., Jeong M.G., Lee N.K., and Ryu S.H. Single particle tracking-based reaction progress kinetic analysis reveals a series of molecular mechanisms of cetuximab-induced EGFR processes in a single living cell // *Chem. Sci.* - 2017. - V. 8. - P. 4823-4832. DOI: 10.1039/c7sc01159h.
275. Kim I.Y., Kang Y.S., Lee D.S., Park H.J., Choi E.K., Oh Y.K., Son H.J., and Kim J.S. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice // *J. Control. Release* - 2009. - V. 140. - P. 55-60. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.07.005.
276. Kim J.S., Jun S.Y., and Kim Y.S. Critical Issues in the Development of Immunotoxins for Anticancer Therapy // *J. Pharm. Sci.* - 2020. - V. 109. - P. 104-115. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.10.037.
277. Kleemann E., Neu M., Jekel N., Fink L., Schmehl T., Gessler T., Seeger W., and Kissel T. Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG-PEI // *J. Control. Release* - 2005. - V. 109. - P. 299-316.
278. Klemm A.R., Young D., and Lloyd J.B. Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability // *Biochem. Pharmacol.* - 1998. - V. 56. - P. 41-46.
279. Konopka K., Spain C., Yen A., Overlid N., Gebremedhin S., and Duzgunes N. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells // *Cell Mol. Biol. Lett.* - 2009. - V. 14. - P. 70-89.
280. Korner M., Waser B., Schonbrunn A., Perren A., and Reubi J.C. Somatostatin receptor subtype 2A immunohistochemistry using a new monoclonal antibody selects tumors suitable for in vivo somatostatin receptor targeting // *Am. J. Surg. Pathol.* - 2012. - V. 36. - P. 242-252.
281. Koshkaryev A., Piroyan A., and Torchilin V.P. Increased apoptosis in cancer cells in vitro and in vivo by ceramides in transferrin-modified liposomes // *Cancer Biol. Ther.* - 2012. - V. 13. - P. 50-60.
282. Koshkaryev A., Thekkedath R., Pagano C., Meerovich I., and Torchilin V.P. Targeting of lysosomes by liposomes modified with octadecyl-rhodamine B // *J. Drug Target* - 2011. - V. 19. - P. 606-614.
283. Krantz B.A., Dave N., Komatsubara K.M., Marr B.P., and Carvajal R.D. Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease // *Clin. Ophthalmol.* - 2017. - V. 11. - P. 279-289.
284. Krejci P. The paradox of FGFR3 signaling in skeletal dysplasia: Why chondrocytes growth arrest while other cells over proliferate // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* - 2014. - V. 759. - P. 40-48.

285. Kremer T.M., Rinne M.L., Xu Y., Chen X.M., and Kelley M.R. Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase // *Respir. Res* - 2004. - V. 5. - P. 16-
286. Ku A., Facca V.J., Cai Z., and Reilly R.M. Auger electrons for cancer therapy - a review // *EJNMMI Radiopharm. Chem.* - 2019. - V. 4. - № 27. - P. 1-36. DOI.org/10.1186/s41181-019-0075-2.
287. Kucharski T.J., Gamache I., Gjoerup O., and Teodoro J.G. DNA damage response signaling triggers nuclear localization of the chicken anemia virus protein Apoptin // *J. Virol.* - 2011. - V. 85. - P. 12638-12649.
288. Kunath K., von H.A., Petersen H., Fischer D., Voigt K., Kissel T., and Bickel U. The structure of PEG-modified poly(ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kappaB decoy in mice // *Pharm. Res* - 2002. - V. 19. - P. 810-817.
289. Kurz T., Terman A., Gustafsson B., and Brunk U.T. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis // *Biochim. Biophys. Acta* - 2008. - V. 1780. - P. 1291-1303.
290. Kutty R.V., Chia S.L., Setyawati M.I., Muthu M.S., Feng S.S., and Leong D.T. In vivo and ex vivo proofs of concept that cetuximab conjugated vitamin E TPGS micelles increases efficacy of delivered docetaxel against triple negative breast cancer // *Biomaterials* - 2015. - V. 63. - P. 58-69. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.06.005.
291. Kuusisto H.V., Wagstaff K.M., Alvisi G., and Jans D.A. The C-terminus of apoptin represents a unique tumor cell-enhanced nuclear targeting module // *Int. J. Cancer* - 2008. - V. 123. - P. 2965-2969.
292. Ladokhin A.S. pH-triggered conformational switching along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain // *Toxins. (Basel)* - 2013. - V. 5. - P. 1362-1380.
293. Lakadamyali M. Navigating the cell: how motors overcome roadblocks and traffic jams to efficiently transport cargo // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2014. - V. 16. - P. 5907-5916.
294. Lam M.H., Thomas R.J., Loveland K.L., Schilders S., Gu M., Martin T.J., Gillespie M.T., and Jans D.A. Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules // *Mol. Endocrinol.* - 2002. - V. 16. - P. 390-401.
295. Lamouille S., Xu J., and Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2014. - V. 15. - P. 178-196.
296. Lebbink R.J., Lowe M., Chan T., Khine H., Wang X., and McManus M.T. Polymerase II promoter strength determines efficacy of microRNA adapted shRNAs // *PLoS One* - 2011. - V. 6. - № e26213. doi: 10.1371/journal.pone.0026213.

297. LeBel C. P., Ischiropoulos H., Bondy S. C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – V. 5. – P. 227-231.
298. Lee H.J., Xu X., Choe G., Chung D.H., Seo J.W., Lee J.H., Lee C.T., Jheon S., Sung S.W., and Chung J.H. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study // *Lung Cancer* - 2010. - V. 68. - P. 375-382. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1281.
299. Lee B. Q., Kibédi T., Stuchbery A. E. Auger yield calculations for medical radioisotopes // *EPJ Web of Conferences.* – EDP Sci. – 2015. – V. 91. – № 00007. DOI: 10.1051/epjconf/20159100007.
300. Lee J.K., Lee J., Kim S., Kim S., Youk J., Park S., An Y., Keam B., Kim D.W., Heo D.S., Kim Y.T., Kim J.S., Kim S.H., Lee J.S., Lee S.H., Park K., Ku J.L., Jeon Y.K., Chung D.H., Park P.J., Kim J., Kim T.M., and Ju Y.S. Clonal History and Genetic Predictors of Transformation Into Small-Cell Carcinomas From Lung Adenocarcinomas // *J. Clin. Oncol.* - 2017. - V. 35. - P. 3065-3074. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.9096.
301. Lee Y.H., Cheng C.M., Chang Y.F., Wang T.Y., and Yuo C.Y. Apoptin T108 phosphorylation is not required for its tumor-specific nuclear localization but partially affects its apoptotic activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2007. - V. 354. - P. 391-395.
302. Lejeune F.J. and Ghanem G.E. Attempts to use alpha-melanotropin-containing melphalan in melanoma patients // *Ann. N. Y. Acad. Sci* - 1993. - V. 680. - P. 391-400.
303. Lemmon M.A. and Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // *Cell* - 2010. - V. 141. - P. 1117-1134. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
304. Lemmon M.A., Schlessinger J., and Ferguson K.M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2014. - V. 6. - № a020768. DOI: 10.1101/cshperspect.a020768.
305. Li G. and Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development // *Mol. Med. Today* - 2000. - V. 6. - P. 163-169.
306. Li H.J., Chang C., and Weiskopf M. Helix-coil transition in nucleoprotein-chromatin structure // *Biochemistry* - 1973. - V. 12. - P. 1763-1772.
307. Li J. and Yan H. Skin toxicity with anti-EGFR monoclonal antibody in cancer patients: a meta-analysis of 65 randomized controlled trials // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 2018. - V. 82. - P. 571-583. DOI: 10.1007/s00280-018-3644-2.



308. Li L., Quang T.S., Gracely E.J., Kim J.H., Emrich J.G., Yaeger T.E., Jenrette J.M., Cohen S.C., Black P., and Brady L.W. A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme // *J. Neurosurg.* - 2010. - V. 113. - P. 192-198. DOI: 10.3171/2010.2.JNS091211.
309. Li N., Nguyen H.H., Byrom M., and Ellington A.D. Inhibition of cell proliferation by an anti-EGFR aptamer // *PLoS One* - 2011. - V. 6. - P. e20299. DOI: 10.1371/journal.pone.0020299.
310. Li Q., Tang Y., Cheng X., Ji J., Zhang J., and Zhou X. EGFR protein expression and gene amplification in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* - 2014. - V. 7. - P. 733-741.
311. Li R., Zhou X., Yao H., and Li L. Four generations of EGFR TKIs associated with different pathogenic mutations in non-small cell lung carcinoma // *J. Drug Target* - 2020. - P. 1-12. DOI: 10.1080/1061186X.2020.1737934.
312. Li S., Goins B., Hrycushko B.A., Phillips W.T., and Bao A. Feasibility of eradication of breast cancer cells remaining in postlumpectomy cavity and draining lymph nodes following intracavitary injection of radioactive immunoliposomes // *Mol. Pharm.* - 2012. - V. 9. - P. 2513-2522. DOI: 10.1021/mp300132f.
313. Li W., Nicol F., and Szoka F.C., Jr. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2004. - V. 56. - P. 967-985.
314. Liang H., Do T., Kasravi S., Aurasteh P., Nguyen A., Huang A., Wang Z., and Berns M.W. Chromosomes are target sites for photodynamic therapy as demonstrated by subcellular laser microirradiation // *J. Photochem. Photobiol. B* - 2000a. - V. 54. - P. 175-184.
315. Liang H., Shin D.S., Lee Y.E., Nguyen D.C., Kasravi S., Aurasteh P., and Berns M.W. Subcellular phototoxicity of photofrin-II and lutetium texaphyrin in cells in vitro. // *Lasers Med. Sci.* - 2000b. - V. 15. - P. 109-122.
316. Liang H., Shin D.S., Lee Y.E., Nguyen D.C., Trang T.C., Pan A.H., Huang S.L., Chong D.H., and Berns M.W. Subcellular phototoxicity of 5-aminolaevulinic acid (ALA) // *Lasers Surg. Med.* - 1998. - V. 22. - P. 14-24. DOI: 10.1002/(sici)1096-9101(1998)22:1<14::aid-lsm6>3.0.co;2-#.
317. Liang J., Wu Y.L., Chen B.J., Zhang W., Tanaka Y., and Sugiyama H. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases // *Int. J. Biol. Sci.* - 2013. - V. 9. - P. 435-443.
318. Liang Y., Peng J., Li N., Yu-Wai-Man C., Wang Q., Xu Y., Wang H., Tagalakakis A.D., and Du Z. Smart nanoparticles assembled by endogenous molecules for siRNA delivery and

- cancer therapy via CD44 and EGFR dual-targeting // *Nanomedicine* - 2019. - V. 15. - P. 208-217. DOI: 10.1016/j.nano.2018.09.018.
319. Liao H.J. and Carpenter G. Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression // *Mol. Biol. Cell* - 2007. - V. 18. - P. 1064-1072. DOI: 10.1091/mbc.e06-09-0802.
320. Liao H.J. and Carpenter G. Cetuximab/C225-induced intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor // *Cancer Res.* - 2009. - V. 69. - P. 6179-6183. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0049.
321. Liao H.W., Hsu J.M., Xia W., Wang H.L., Wang Y.N., Chang W.C., Arold S.T., Chou C.K., Tsou P.H., Yamaguchi H., Fang Y.F., Lee H.J., Lee H.H., Tai S.K., Yang M.H., Morelli M.P., Sen M., Ladbury J.E., Chen C.H., Grandis J.R., Kopetz S., and Hung M.C. PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response // *J. Clin. Invest.* - 2015. - V. 125. - P. 4529-4543. DOI: 10.1172/JCI82826.
322. Lim S.M., Kim H.R., Shim H.S., Soo R.A., and Cho B.C. Role of FGF receptors as an emerging therapeutic target in lung squamous cell carcinoma // *Future Oncol.* - 2013. - V. 9. - P. 377-386.
323. Lin J.R. and Hu J. SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring // *PLoS One.* - 2013. - V. 8. - P. e76864-
324. Ling D., Bae B.C., Park W., and Na K. Photodynamic efficacy of photosensitizers under an attenuated light dose via lipid nano-carrier-mediated nuclear targeting // *Biomaterials* - 2012. - V. 33. - P. 5478-5486.
325. Liu K.W., Hu B., and Cheng S.Y. Platelet-derived growth factor receptor alpha in glioma: a bad seed // *Chin. J. Cancer* - 2011. - V. 30. - P. 590-602.
326. Liu X., Li H., Cong X., Huo D., Cong L., and Wu G. alpha-MSH-PE38KDEL Kills Melanoma Cells via Modulating Erk1/2/MITF/TYR Signaling in an MC1R-Dependent Manner // *Onco. Targets Ther.* - 2020. - V. 13. - P. 12457-12469.
327. Liu X., Wang P., Zhang C., and Ma Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer // *Oncotarget* - 2017. - V. 8. - P. 50209-50220.
328. Liu Z., Zhang Z., Zhou C., and Jiao Y. Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery // *Progr. Polymer. Sci.* - 2010. - V. 35. - P. 1144-1162.
329. Lo H.W. Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications // *Discov. Med.* - 2010. - V. 10. - P. 44-51.

330. Lo H.W., Ali-Seyed M., Wu Y., Bartholomeusz G., Hsu S.C., and Hung M.C. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1 // *J. Cell Biochem.* - 2006. - V. 98. - P. 1570-1583. DOI: 10.1002/jcb.20876.
331. Loir B., Perez S.C., Ghanem G., Lozano J.A., Garcia-Borron J.C., and Jimenez-Cervantes C. Expression of the MC1 receptor gene in normal and malignant human melanocytes. A semiquantitative RT-PCR study // *Cell Mol Biol. (Noisy. -le-grand)* - 1999. - V. 45. - P. 1083-1092.
332. London M. and Gallo E. Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in epithelial-derived cancers and its current antibody-based immunotherapies // *Cell Biol. Int.* - 2020. - V. 44. - P. 1267-1282. DOI: 10.1002/cbin.11340.
333. Lopez M.N., Pereda C., Ramirez M., Mendoza-Naranjo A., Serrano A., Ferreira A., Poblete R., Kalergis A.M., Kiessling R., and Salazar-Onfray F. Melanocortin 1 receptor is expressed by uveal malignant melanoma and can be considered a new target for diagnosis and immunotherapy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* - 2007. - V. 48. - P. 1219-1227.
334. Lopez-Perez M. and Salazar E.P. A role for the cytoskeleton in STAT5 activation in MCF7 human breast cancer cells stimulated with EGF // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2006. - V. 38. - P. 1716-1728.
335. Los M., Panigrahi S., Rashedi I., Mandal S., Stetefeld J., Essmann F., and Schulze-Osthoff K. Apoptin, a tumor-selective killer // *Biochim. Biophys. Acta* - 2009. - V. 1793. - P. 1335-1342.
336. Lott K. and Cingolani G. The importin beta binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport // *Biochim Biophys Acta* - 2011. - V. 1813. - P. 1578-1592.
337. Lu B., Makhija S.K., Nettelbeck D.M., Rivera A.A., Wang M., Komarova S., Zhou F., Yamamoto M., Haisma H.J., Alvarez R.D., Curiel D.T., and Zhu Z.B. Evaluation of tumor-specific promoter activities in melanoma // *Gene Ther.* - 2005. - V. 12. - P. 330-338.
338. Lu W., Xiong C., Zhang R., Shi L., Huang M., Zhang G., Song S., Huang Q., Liu G.Y., and Li C. Receptor-mediated transcytosis: a mechanism for active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors // *J. Control. Release* - 2012. - V. 161. - P. 959-966.
339. Lu Y., Zhao X., Liu Q., Li C., Graves-Deal R., Cao Z., Singh B., Franklin J.L., Wang J., Hu H., Wei T., Yang M., Yeatman T.J., Lee E., Saito-Diaz K., Hinger S., Patton J.G., Chung C.H., Emmrich S., Klusmann J.H., Fan D., and Coffey R.J. lncRNA MIR100HG-derived miR-100 and miR-125b mediate cetuximab resistance via Wnt/beta-catenin signaling // *Nat. Med.* - 2017. - V. 23. - P. 1331-1341. DOI: 10.1038/nm.4424.
340. Lu Y. and Low P.S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2012. - V. 64. - P. 342-352.

341. Luby-Phelps K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area // *Int. Rev. Cytol.* - 2000. - V. 192. - P. 189-221.
342. Luby-Phelps K. The physical chemistry of cytoplasm and its influence on cell function: an update // *Mol. Biol. Cell* - 2013. - V. 24. - P. 2593-2596.
343. Luger T.A., Scholzen T.E., Brzoska T., and Bohm M. New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2003. - V. 994. - P. 133-140.
344. Luscher B. and Eisenman R.N. Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb // *J. Cell Biol.* - 1992. - V. 118. - P. 775-784.
345. Lux M.L., Rubin B.P., Biase T.L., Chen C.J., Maclure T., Demetri G., Xiao S., Singer S., Fletcher C.D., and Fletcher J.A. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors // *Am. J. Pathol.* - 2000. - V. 156. - P. 791-795.
346. Ma C.C., Wang Z.L., Xu T., He Z.Y., and Wei Y.Q. The approved gene therapy drugs worldwide: from 1998 to 2019 // *Biotechnol. Adv.* - 2020. - V. 40. - P. 107502. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.107502.
347. Macdonald J.L. and Pike L.J. Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - V. 105. - P. 112-117. DOI: 10.1073/pnas.0707080105.
348. Macdonald-Obermann J.L. and Pike L.J. Different epidermal growth factor (EGF) receptor ligands show distinct kinetics and biased or partial agonism for homodimer and heterodimer formation // *J. Biol. Chem.* - 2014. - V. 289. - P. 26178-26188. DOI: 10.1074/jbc.M114.586826.
349. Madani F., Abdo R., Lindberg S., Hirose H., Futaki S., Langel U., and Graslund A. Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides using a transmembrane pH gradient // *Biochim. Biophys. Acta* - 2013. - V. 1828. - P. 1198-1204.
350. Maddika S., Mendoza F.J., Hauff K., Zamzow C.R., Paranjothy T., and Los M. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action // *Cancer Biol. Ther.* - 2006. - V. 5. - P. 10-19.
351. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., and Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review // *J. Control. Release* - 2000. - V. 65. - P. 271-284. DOI: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5.
352. Mailer A.G., Clegg P.S., and Pusey P.N. Particle sizing by dynamic light scattering: non-linear cumulant analysis // *J. Phys.: Condensed Matter* - 2015. - V. 27. - № 145102. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0953-8984/27/14/145102/meta>.

353. Mamot C., Drummond D.C., Noble C.O., Kallab V., Guo Z., Hong K., Kirpotin D.B., and Park J.W. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo // *Cancer Res.* - 2005. - V. 65. - P. 11631-11638. DOI: 10.7150/thno.37198.
354. Mamot C., Ritschard R., Wicki A., Stehle G., Dieterle T., Bubendorf L., Hilker C., Deuster S., Herrmann R., and Rochlitz C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study // *Lancet Oncol.* - 2012. - V. 13. - P. 1234-1241. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70476-X.
355. Mancheno-Corvo P. and Martin-Duque P. Viral gene therapy // *Clin. Transl. Oncol.* - 2006. - V. 8. - P. 858-867.
356. Mandrika I., Petrovska R., and Wikberg J. Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2005. - V. 326. - P. 349-354.
357. Marfori M., Mynott A., Ellis J.J., Mehdi A.M., Saunders N.F., Curmi P.M., Forwood J.K., Boden M., and Kobe B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization // *Biochim. Biophys. Acta* - 2011. - V. 1813. - P. 1562-1577.
358. Markwalder R. and Reubi J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation // *Cancer Res.* - 1999. - V. 59. - P. 1152-1159.
359. Martin M.E., Sue O.M., Leverich W.M., Kloetting K.C., Walsh S.A., and Schultz M.K. "Click"-cyclized (68)Ga-labeled peptides for molecular imaging and therapy: synthesis and preliminary in vitro and in vivo evaluation in a melanoma model system // *Recent Results Cancer Res.* - 2013. - V. 194. - P. 149-175.
360. Martin V., Liu D., Fueyo J., and Gomez-Manzano C. Tie2, a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond // *Histol. Histopathol.* - 2008. - V. 23. - P. 773-780.
361. Matsumura I., Mizuki M., and Kanakura Y. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies // *Cancer Sci.* - 2008. - V. 99. - P. 479-485.
362. McGranahan N. and Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future // *Cell* - 2017. - V. 168. - P. 613-628. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.018.
363. McQuade P., Miao Y., Yoo J., Quinn T.P., Welch M.J., and Lewis J.S. Imaging of melanoma using <sup>64</sup>Cu- and <sup>86</sup>Y-DOTA-ReCCMSH(Arg11), a cyclized peptide analogue of alpha-MSH // *J. Med. Chem.* - 2005. - V. 48. - P. 2985-2992.
364. Meacham C.E. and Morrison S.J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity // *Nature* - 2013. - V. 501. - P. 328-337.

365. Meier O. and Greber U.F. Adenovirus endocytosis // *J. Gene Med.* - 2004. - V. 6 Suppl 1. - P. S152-S163.
366. Melnick A. Targeting APL fusion proteins by peptide interference // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 2007. - V. 313. - P. 221-243.
367. Mew D., Wat C.K., Towers G.H., and Levy J.G. Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates // *J. Immunol.* - 1983. - V. 130. - P. 1473-1477.
368. Miao Y., Benwell K., and Quinn T.P. <sup>99m</sup>Tc- and <sup>111</sup>In-labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides as imaging probes for primary and pulmonary metastatic melanoma detection // *J. Nucl. Med.* - 2007. - V. 48. - P. 73-80.
369. Miao Y., Gallazzi F., Guo H., and Quinn T.P. <sup>111</sup>In-labeled lactam bridge-cyclized alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues for melanoma imaging // *Bioconjug. Chem.* - 2008. - V. 19. - P. 539-547.
370. Miao Y., Whitener D., Feng W., Owen N.K., Chen J., and Quinn T.P. Evaluation of the human melanoma targeting properties of radiolabeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues // *Bioconjug. Chem.* - 2003. - V. 14. - P. 1177-1184.
371. Michael S.I. and Curiel D.T. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway // *Gene Ther.* - 1994. - V. 1. - P. 223-232.
372. Michiue H., Tomizawa K., Wei F.Y., Matsushita M., Lu Y.F., Ichikawa T., Tamiya T., Date I., and Matsui H. The NH<sub>2</sub> terminus of influenza virus hemagglutinin-2 subunit peptides enhances the antitumor potency of polyarginine-mediated p53 protein transduction // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280. - P. 8285-8289.
373. Milenic D.E., Baidoo K.E., Kim Y.S., and Brechbiel M.W. Evaluation of cetuximab as a candidate for targeted alpha-particle radiation therapy of HER1-positive disseminated intraperitoneal disease // *MAbs* - 2015. - V. 7. - P. 255-264. DOI: 10.4161/19420862.2014.985160.
374. Misale S., Yaeger R., Hobor S., Scala E., Janakiraman M., Liska D., Valtorta E., Schiavo R., Buscarino M., Siravegna G., Bencardino K., Cercek A., Chen C.T., Veronese S., Zanon C., Sartore-Bianchi A., Gambacorta M., Gallicchio M., Vakiani E., Boscaro V., Medico E., Weiser M., Siena S., Di N.F., Solit D., and Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer // *Nature* - 2012. - V. 486. - P. 532-536. DOI: 10.1038/nature11156.
375. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., Yang C.H., Chu D.T., Saijo N., Sunpaweravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y., Nishiwaki Y., Ohe Y., Yang J.J., Chewaskulyong B., Jiang H., Duffield E.L., Watkins C.L., Armour A.A., and Fukuoka M. Gefitinib or

- carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma // *N. Engl. J. Med.* - 2009. - V. 361. - P. 947-957. DOI: 10.1056/NEJMoa0810699.
376. Mondal G., Almawash S., Chaudhary A.K., and Mahato R.I. EGFR-Targeted Cationic Polymeric Mixed Micelles for Codelivery of Gemcitabine and miR-205 for Treating Advanced Pancreatic Cancer // *Mol. Pharm.* - 2017. - V. 14. - P. 3121-3133. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00355.
377. Morais M., Oliveira B.L., Correia J.D., Oliveira M.C., Jimenez M.A., Santos I., and Raposinho P.D. Influence of the bifunctional chelator on the pharmacokinetic properties of  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -labeled cyclic alpha-melanocyte stimulating hormone analog // *J. Med. Chem.* - 2013. - V. 56. - P. 1961-1973.
378. Morfin J.F. and Toth E. Kinetics of Ga(NOTA) formation from weak Ga-citrate complexes // *Inorg. Chem.* - 2011. - V. 50. - P. 10371-10378.
379. Morgillo F., Woo J.K., Kim E.S., Hong W.K., and Lee H.Y. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib // *Cancer Res.* - 2006. - V. 66. - P. 10100-10111. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1684.
380. Moseley G.W., Leyton D.L., Glover D.J., Filmer R.P., and Jans D.A. Enhancement of protein transduction-mediated nuclear delivery by interaction with dynein/microtubules // *J. Biotechnol.* - 2010. - V. 145. - P. 222-225.
381. Mountjoy K.G., Kong P.L., Taylor J.A., Willard D.H., and Wilkison W.O. Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells // *Physiol. Genomics* - 2001. - V. 5. - P. 11-19.
382. Mukhopadhyay S. and Linstedt A.D. Manganese blocks intracellular trafficking of Shiga toxin and protects against Shiga toxicosis // *Science* - 2012. - V. 335. - P. 332-335.
383. Mukhopadhyay S. and Linstedt A.D. Retrograde trafficking of AB(5) toxins: mechanisms to therapeutics // *J. Mol. Med. (Berl)* - 2013. - V. 91. - P. 1131-1141.
384. Muller R.H., Struthers H., Winiger C., Zhernosekov K., and Schibli R. DOTA Conjugate with an Albumin-Binding Entity Enables the First Folic Acid-Targeted  $^{177}\text{Lu}$ -Radionuclide Tumor Therapy in Mice // *J. Nucl. Med.* - 2013. - V. 54. - P. 124-131.
385. Mulligan L.M. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio // *Nat. Rev. Cancer* - 2014. - V. 14. - P. 173-186.
386. Mullighan C.G. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* - 2011. - V. 24. - P. 489-503.
387. Muro S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems // *J. Control Release* - 2012. - V. 164. - P. 125-137.

388. Murphy J.R., Bishai W., Borowski M., Miyanohara A., Boyd J., and Nagle S. Genetic construction, expression, and melanoma-selective cytotoxicity of a diphtheria toxin-related alpha-melanocyte-stimulating hormone fusion protein // *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* - 1986. - V. 83. - P. 8258-8262.
389. Murtuza A., Bulbul A., Shen J.P., Keshavarzian P., Woodward B.D., Lopez-Diaz F.J., Lippman S.M., and Husain H. Novel Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors and Strategies to Overcome Therapeutic Resistance in Lung Cancer // *Cancer Res.* - 2019. - V. 79. - P. 689-698. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1281.
390. Nagano T., Tachihara M., and Nishimura Y. Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy // *Cells* - 2018. - V. 7, DOI: 10.3390/cells7110212.
391. Needham S.R., Roberts S.K., Arkhipov A., Mysore V.P., Tynan C.J., Zanetti-Domingues L.C., Kim E.T., Losasso V., Korovesis D., Hirsch M., Rolfe D.J., Clarke D.T., Winn M.D., Lajevardipour A., Clayton A.H., Pike L.J., Perani M., Parker P.J., Shan Y., Shaw D.E., and Martin-Fernandez M.L. EGFR oligomerization organizes kinase-active dimers into competent signalling platforms // *Nat. Commun.* - 2016. - V. 7. - P. 13307-
392. Negrini S., Gorgoulis V.G., and Halazonetis T.D. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2010. - V. 11. - P. 220-228. DOI: 10.1038/nrm2858.
393. Nelson C.E., Kintzing J.R., Hanna A., Shannon J.M., Gupta M.K., and Duvall C.L. Balancing cationic and hydrophobic content of PEGylated siRNA polyplexes enhances endosome escape, stability, blood circulation time, and bioactivity in vivo // *ACS Nano* - 2013. - V. 7. - P. 8870-8880.
394. Nir S. and Nieva J.L. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion // *Prog. Lipid Res.* - 2000. - V. 39. - P. 181-206.
395. O'Hare K.B., Duncan R., Strohalm J., Ulbrich K., and Kopeckova P. Polymeric drug-carriers containing doxorubicin and melanocyte-stimulating hormone: in vitro and in vivo evaluation against murine melanoma // *J. Drug Target* - 1993. - V. 1. - P. 217-229.
396. O'Shannessy D.J., Somers E.B., Smale R., and Fu Y.S. Expression of Folate Receptor-[alpha](FRA) in Gynecologic Malignancies and its Relationship to the Tumor Type // *Int. J. Gynecol. Pathol.* - 2013. - V. 32. - P. 258-268.
397. Ocana A. and Pandiella A. Targeting HER receptors in cancer // *Curr. Pharm. Des.* - 2013. - V. 19. - P. 808-817.
398. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* - 1997. - V. 39. - P. 1-18.



399. Ogawa Y., Kawahara H., Yagi N., Kodaka M., Tomohiro T., Okada T., Konakahara T., and Okuno H. Synthesis of a novel lipopeptide with alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide ligand and its effect on liposome stability // *Lipids* - 1999. - V. 34. - P. 387-394.
400. Ogbah Z., Puig-Butille J.A., Simonetta F., Badenas C., Cervera R., Mila J., Benitez D., Malveyh J., Vilella R., and Puig S. Molecular characterization of human cutaneous melanoma-derived cell lines // *Anticancer Res.* - 2012. - V. 32. - P. 1245-1251.
401. Olzmann J.A., Kopito R.R., and Christianson J.C. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2013. - V. 5. -
402. Orth J.D., Krueger E.W., Weller S.G., and McNiven M.A. A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization // *Cancer Res.* - 2006. - V. 66. - P. 3603-3610. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2916.
403. Othman M.F., Mitry N.R., Lewington V.J., Blower P.J., and Terry S.Y. Re-assessing gallium-67 as a therapeutic radionuclide // *Nucl. Med. Biol.* - 2017. - V. 46. - P. 12-18.
404. Oved S., Mosesson Y., Zwang Y., Santonico E., Shtiegman K., Marmor M.D., Kochupurakkal B.S., Katz M., Lavi S., Cesareni G., and Yarden Y. Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases // *J. Biol. Chem.* - 2006. - V. 281. - P. 21640-21651. DOI: 10.1083/jcb.201001008.
405. Oxnard G.R., Hu Y., Mileham K.F., Husain H., Costa D.B., Tracy P., Feeney N., Sholl L.M., Dahlberg S.E., Redig A.J., Kwiatkowski D.J., Rabin M.S., Paweletz C.P., Thress K.S., and Janne P.A. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients With EGFR T790M-Positive Lung Cancer and Acquired Resistance to Osimertinib // *JAMA Oncol.* - 2018. - V. 4. - P. 1527-1534. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.2969.
406. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., and Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery // *Nat Rev Drug Discov* - 2005. - V. 4. - P. 581-593.
407. Pan X. and Lee R.J. Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate-folate binding protein affinity // *Int. J. Pharm.* - 2007. - V. 336. - P. 276-283. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.12.007.
408. Pan X., Wu G., Yang W., Barth R.F., Tjarks W., and Lee R.J. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR // *Bioconjug. Chem.* - 2007. - V. 18. - P. 101-108. DOI: 10.1021/bc060174r.
409. Pan L., Liu J., Shi J. Cancer cell nucleus-targeting nanocomposites for advanced tumor therapeutics // *Chem. Soc. Rev.* - 2018. - V. 47. - P. 6930-6946.
410. Panosa C., Fonge H., Ferrer-Batalle M., Menendez J.A., Massaguer A., De L.R., and Reilly R.M. A comparison of non-biologically active truncated EGF (EGFt) and full-length hEGF for delivery of Auger electron-emitting <sup>111</sup>In to EGFR-positive breast cancer cells

- and tumor xenografts in athymic mice // Nucl. Med. Biol. - 2015. - V. 42. - P. 931-938.  
DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2015.08.003.
411. Pansky A., Peng F., Eberhard M., Baselgia L., Siegrist W., Baumann J.B., Eberle A.N., Beglinger C., and Hildebrand P. Identification of functional GRP-preferring bombesin receptors on human melanoma cells // Eur. J Clin. Invest - 1997. - V. 27. - P. 69-76.
412. Pante N. and Kann M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm // Mol. Biol. Cell - 2002. - V. 13. - P. 425-434.
413. Pao W., Miller V.A., Politi K.A., Riely G.J., Somwar R., Zakowski M.F., Kris M.G., and Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain // PLoS Med. - 2005. - V. 2. - P. e73. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020073.
414. Park J., Choi Y., Chang H., Um W., Ryu J.H., and Kwon I.C. Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment // Theranostics. - 2019. - V. 9. - P. 8073-8090. DOI: 10.7150/thno.37198.
415. Park M.S., Ravi V., and Araujo D.M. Inhibiting the VEGF□VEGFR pathway in angiosarcoma, epithelioid hemangioendothelioma, and hemangiopericytoma/solitary fibrous tumor // Curr. Opin. Oncol. - 2010. - V. 22. - P. 351-355.
416. Park S.J., Gu M.J., Lee D.S., Yun S.S., Kim H.J., and Choi J.H. EGFR expression in pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma // Int. J. Clin. Exp. Pathol. - 2015. - V. 8. - P. 8298-8304.
417. Parker N., Turk M.J., Westrick E., Lewis J.D., Low P.S., and Leamon C.P. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay // Anal. Biochem. - 2005. - V. 338. - P. 284-293.
418. Passoni L., Longo L., Collini P., Coluccia A.M., Bozzi F., Podda M., Gregorio A., Gambini C., Garaventa A., and Pistoia V. Mutation-independent anaplastic lymphoma kinase overexpression in poor prognosis neuroblastoma patients // Cancer Res. - 2009. - V. 69. - P. 7338-7346.
419. Patel J., Amrutiya J., Bhatt P., Javia A., Jain M., and Misra A. Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells // J. Microencapsul. - 2018. - V. 35. - P. 204-217. DOI: 10.1080/02652048.2018.1453560.
420. Paulos C.M., Reddy J.A., Leamon C.P., Turk M.J., and Low P.S. Ligand binding and kinetics of folate receptor recycling in vivo: impact on receptor-mediated drug delivery // Mol. Pharmacol. - 2004. - V. 66. - P. 1406-1414.

421. Peace B.E., Hill K.J., Degen S.J., and Waltz S.E. Cross-talk between the receptor tyrosine kinases Ron and epidermal growth factor receptor // *Exp. Cell Res.* - 2003. - V. 289. - P. 317-325. DOI: 10.1016/s0014-4827(03)00280-5.
422. Perez-Oliva A.B., Olivares C., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borron J.C. Mahogunin ring finger-1 (MGRN1) E3 ubiquitin ligase inhibits signaling from melanocortin receptor by competition with Galphas // *J. Biol. Chem.* - 2009. - V. 284. - P. 31714-31725.
423. Perez-Vargas J.C.S., Biondani P., Maggi C., Gariboldi M., Gloghini A., Inno A., Volpi C.C., Gualeni A.V., di Bartolomeo M., and de Braud F. Role of cmet in the development and progression of colorectal cancer // *Internat. J. Mol. Sci.* - 2013. - V. 14. - P. 18056-18077.
424. Perren T.J. Mucinous epithelial ovarian carcinoma // *Ann. Oncol.* - 2016. - V. 27 Suppl 1. - P. i53-i57. DOI: 10.1093/annonc/mdw087.
425. Peters E.M., Tobin D.J., Seidah N.G., and Schallreuter K.U. Pro-opiomelanocortin-related peptides, prohormone convertases 1 and 2 and the regulatory peptide 7B2 are present in melanosomes of human melanocytes // *J. Invest. Dermatol.* - 2000. - V. 114. - P. 430-437.
426. Petrilli R., Eloy J.O., Saggiaro F.P., Chesca D.L., de Souza M.C., Dias M.V.S., daSilva L.L.P., Lee R.J., and Lopez R.F.V. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection // *J. Control. Release* - 2018. - V. 283. - P. 151-162. DOI: 10.1039/c6nr00014b.
427. Pfof B., Seidl C., Autenrieth M., Saur D., Bruchertseifer F., Morgenstern A., Schwaiger M., and Senekowitsch-Schmidtke R. Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice // *J Nucl. Med.* - 2009. - V. 50. - P. 1700-1708. DOI: 10.2967/jnumed.109.065961.
428. Pinkas-Kramarski R., Shelly M., Guarino B.C., Wang L.M., Lyass L., Alroy I., Alimandi M., Kuo A., Moyer J.D., Lavi S., Eisenstein M., Ratzkin B.J., Seger R., Bacus S.S., Pierce J.H., Andrews G.C., and Yarden Y. ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network // *Mol. Cell Biol.* - 1998. - V. 18. - P. 6090-6101. DOI: 10.1128/mcb.18.10.6090.
429. Piotrowska Z., Isozaki H., Lennerz J.K., Gainor J.F., Lennes I.T., Zhu V.W., Marcoux N., Banwait M.K., Digumarthy S.R., Su W., Yoda S., Riley A.K., Nangia V., Lin J.J., Nagy R.J., Lanman R.B., Dias-Santagata D., Mino-Kenudson M., Iafrate A.J., Heist R.S., Shaw A.T., Evans E.K., Clifford C., Ou S.I., Wolf B., Hata A.N., and Sequist L.V. Landscape of Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutant NSCLC and Clinical Validation of Combined EGFR and RET Inhibition with Osimertinib and BLU-667 for Acquired RET

- Fusion // *Cancer Discov.* - 2018. - V. 8. - P. 1529-1539. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-18-1022.
430. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., and Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects // *Lasers Med. Sci.* - 2009. - V. 24. - P. 259-268.
431. Politi A., Tsiambas E., Mastronikolis N.S., Peschos D., Asproudis I., Kyrodimos E., Armata I.E., Chrysovergis A., Asimakopoulos A., Papanikolaou V.S., Batistatou A., and Ragos V. Combined EGFR/ALK Expression Analysis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma // *In Vivo* - 2019. - V. 33. - P. 815-819. DOI: 10.21873/invivo.11544.
432. Poon I.K., Oro C., Dias M.M., Zhang J.P., and Jans D.A. A tumor cell-specific nuclear targeting signal within chicken anemia virus VP3/apoptin // *J. Virol.* - 2005. - V. 79. - P. 1339-1341.
433. Preusser M., Berghoff A.S., Ilhan-Mutlu A., Magerle M., Dinhof C., Widhalm G., Dieckmann K., Marosi C., W+|hrer A., and Hackl M. ALK gene translocations and amplifications in brain metastases of non-small cell lung cancer // *Lung Cancer* - 2013. - V. 80. - P. 278-283.
434. Price E.W. and Orvig C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals // *Chem. Soc. Rev.* - 2014. - V. 43. - P. 260-290.
435. Purba E.R., Saita E.I., and Maruyama I.N. Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model" // *Cells* - 2017. - V. 6. -
436. Quinn T., Zhang X., and Miao Y. Targeted melanoma imaging and therapy with radiolabeled alpha-melanocyte stimulating hormone peptide analogues // *G. Ital. Dermatol. Venereol.* - 2010. - V. 145. - P. 245-258.
437. Raju M.R., Eisen Y., Carpenter S., and Inkret W.C. Radiobiology of alpha particles. III. Cell inactivation by alpha-particle traversals of the cell nucleus // *Radiat. Res.* - 1991. - V. 128. - P. 204-209.
438. Ramachandrappa S., Gorrigan R.J., Clark A.J., and Chan L.F. The melanocortin receptors and their accessory proteins // *Front. Endocrinol. (Lausanne)* - 2013. - V. 4. - P. 9. Doi: 10.3389/fendo.2013.00009.
439. Ramalingam S.S., Vansteenkiste J., Planchard D., Cho B.C., Gray J.E., Ohe Y., Zhou C., Reungwetwattana T., Cheng Y., Chewaskulyong B., Shah R., Cobo M., Lee K.H., Cheema P., Tiseo M., John T., Lin M.C., Imamura F., Kurata T., Todd A., Hodge R., Saggese M., Rukazenzov Y., and Soria J.C. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC // *N. Engl. J. Med.* - 2020. - V. 382. - P. 41-50. DOI: 10.1056/NEJMoa1913662.

440. Raposinho P.D., Correia J.D., Alves S., Botelho M.F., Santos A.C., and Santos I. A (99m)Tc(CO)(3)-labeled pyrazolyl-alpha-melanocyte-stimulating hormone analog conjugate for melanoma targeting // Nucl. Med. Biol. - 2008. - V. 35. - P. 91-99.
441. Reddy J.A., Haneline L.S., Srour E.F., Antony A.C., Clapp D.W., and Low P.S. Expression and functional characterization of the beta-isoform of the folate receptor on CD34+ cells // Blood - 1999. - V. 93. - P. 3940-3948.
442. Reilly R.M., Chen P., Wang J., Scollard D., Cameron R., and Vallis K.A. Preclinical pharmacokinetic, biodistribution, toxicology, and dosimetry studies of <sup>111</sup>In-DTPA-human epidermal growth factor: an auger electron-emitting radiotherapeutic agent for epidermal growth factor receptor-positive breast cancer // J. Nucl. Med. - 2006. - V. 47. - P. 1023-1031.
443. Ren G., Liu Z., Miao Z., Liu H., Subbarayan M., Chin F.T., Zhang L., Gambhir S.S., and Cheng Z. PET of malignant melanoma using <sup>18</sup>F-labeled metalloptides // J. Nucl. Med. - 2009. - V. 50. - P. 1865-1872.
444. Richard J.P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., and Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake // J. Biol. Chem. - 2003. - V. 278. - P. 585-590.
445. Richardson S.C., Patrick N.G., Lavignac N., Ferruti P., and Duncan R. Intracellular fate of bioresponsive poly(amidoamine)s in vitro and in vivo // J. Control. Release - 2010. - V. 142. - P. 78-88.
446. Riese D.J. and Stern D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network // Bioessays - 1998. - V. 20. - P. 41-48. DOI: 10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<41::AID-BIES7>3.0.CO;2-V.
447. Roberts D.W., Newton R.A., Beaumont K.A., Helen L.J., and Sturm R.A. Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures // Pigment Cell Res. - 2006. - V. 19. - P. 76-89.
448. Robertson S.C., Meyer A.N., Hart K.C., Galvin B.D., Webster M.K., and Donoghue D.J. Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1998. - V. 95. - P. 4567-4572.
449. Robinson M., Schor S., Barouch-Bentov R., and Einav S. Viral journeys on the intracellular highways // Cell Mol. Life Sci. - 2018. - V. 75. - P. 3693-3714.
450. Rogers S.L. and Gelfand V.I. Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton // Curr. Opin. Cell Biol. - 2000. - V. 12. - P. 57-62.

451. Rokita M., Stec R., Bodnar L., Charkiewicz R., Korniluk J., Smoter M., Cichowicz M., Chyczewski L., Niklinski J., Kozlowski W., and Szczylik C. Overexpression of epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in colorectal cancer on the basis of the Allred scoring system // *Onco. Targets Ther.* - 2013. - V. 6. - P. 967-976. DOI: 10.2147/OTT.S42446.
452. Roos W.P. and Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis // *Cancer Lett.* - 2013. - V. 332. - P. 237-248.
453. Roskoski R., Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer // *Pharmacol. Res.* - 2014. - V. 79. - P. 34-74. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.11.002.
454. Roskoski R., Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update // *Pharmacol. Res.* - 2020. - V. 152. - P. 104609. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104609.
455. Ross J.F., Wang H., Behm F.G., Mathew P., Wu M., Booth R., and Ratnam M. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia // *Cancer* - 1999. - V. 85. - P. 348-357.
456. Roth D.M., Moseley G.W., Glover D., Pouton C.W., and Jans D.A. A microtubule-facilitated nuclear import pathway for cancer regulatory proteins // *Traffic.* - 2007. - V. 8. - P. 673-686.
457. Roth D.M., Moseley G.W., Pouton C.W., and Jans D.A. Mechanism of microtubule-facilitated "fast track" nuclear import // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V. 286. - P. 14335-14351.
458. Rouzaud F., Annereau J.P., Valencia J.C., Costin G.E., and Hearing V.J. Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist // *FASEB J.* - 2003. - V. 17. - P. 2154-2156.
459. Rouzaud F., Kadekaro A.L., Abdel-Malek Z.A., and Hearing V.J. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation // *Mutat. Res.* - 2005. - V. 571. - P. 133-152.
460. Rusch V.W., Klimstra D.S., and Venkatraman E.S. Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors // *Ann. Thorac. Surg.* - 1996. - V. 62. - P. 798-809. DOI: 10.1016/s0003-4975(96)00435-3.
461. Russell L.J., Capasso M., Vater I., Akasaka T., Bernard O.A., Calasanz M.J., Chandrasekaran T., Chapiro E., Gesk S., and Griffiths M. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia // *Blood* - 2009. - V. 114. - P. 2688-2698.
462. Sadasivan E., da Costa M., Rothenberg S.P., and Brink L. Purification, properties, and immunological characterization of folate-binding proteins from human leukemia cells // *Biochim. Biophys. Acta* - 1987. - V. 925. - P. 36-47.

463. Sadasivan E., Rothenberg S.P., da Costa M., and Brink L. Characterization of multiple forms of folate-binding protein from human leukemia cells // *Biochim. Biophys. Acta* - 1986. - V. 882. - P. 311-321.
464. Sahm U.G., Olivier G.W., Branch S.K., Moss S.H., and Pouton C.W. Influence of alpha-MSH terminal amino acids on binding affinity and biological activity in melanoma cells // *Peptides* - 1994. - V. 15. - P. 441-446.
465. Saito Y., Haendeler J., Hojo Y., Yamamoto K., and Berk B.C. Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation // *Mol. Cell Biol.* - 2001. - V. 21. - P. 6387-6394. DOI: 10.1128/mcb.21.19.6387-6394.2001.
466. Salazar M.D. and Ratnam M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? // *Cancer Metastasis Rev.* - 2007. - V. 26. - P. 141-152.
467. Salazar-Onfray F., Lopez M., Lundqvist A., Aguirre A., Escobar A., Serrano A., Korenblit C., Petersson M., Chhajlani V., Larsson O., and Kiessling R. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker // *Br. J. Cancer* - 2002. - V. 87. - P. 414-422.
468. Sampson J.H., Akabani G., Archer G.E., Berger M.S., Coleman R.E., Friedman A.H., Friedman H.S., Greer K., Herndon J.E., Kunwar S., McLendon R.E., Paolino A., Petry N.A., Provenzale J.M., Reardon D.A., Wong T.Z., Zalutsky M.R., Pastan I., and Bigner D.D. Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors // *Neuro. Oncol.* - 2008. - V. 10. - P. 320-329. DOI: 10.1215/15228517-2008-012.
469. Sanchez-del-Campo L., Montenegro M.F., Cabezas-Herrera J., and Rodriguez-Lopez J.N. The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate // *Pigment Cell Melanoma Res.* - 2009. - V. 22. - P. 588-600.
470. Sanchez-Laorden B.L., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borrón J.C. Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer // *J. Biol. Chem.* - 2007. - V. 282. - P. 3241-3251.
471. Sanchez-Mas J., Guillo L.A., Zanna P., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borrón J.C. Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors // *Mol. Endocrinol.* - 2005. - V. 19. - P. 1035-1048.
472. Sandoval M.A., Sloat B.R., Lansakara P., Kumar A., Rodriguez B.L., Kiguchi K., Digiovanni J., and Cui Z. EGFR-targeted stearyl gemcitabine nanoparticles show enhanced anti-tumor activity // *J. Control. Release* - 2012. - V. 157. - P. 287-296. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.08.015.

473. Santra M., Reed C.C., and Iozzo R.V. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope // *J Biol. Chem.* - 2002. - V. 277. - P. 35671-35681.
474. Sapra P. and Allen T.M. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs // *Cancer Res.* - 2002. - V. 62. - P. 7190-7194.
475. Savage N., George T.I., and Gotlib J. Myeloid neoplasms associated with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, and FGFR1: a review // *Int. J. Lab. Hematol.* - 2013. - V. 35. - P. 491-500.
476. Scaranti M., Cojocaru E., Banerjee S., and Banerji U. Exploiting the folate receptor alpha in oncology // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* - 2020. - V. 17. - P. 349-359.
477. Scherer D. and Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer--a review // *Mutat. Res.* - 2010. - V. 705. - P. 141-153.
478. Schoenfeld A.J., Chan J.M., Kubota D., Sato H., Rizvi H., Daneshbod Y., Chang J.C., Paik P.K., Offin M., Arcila M.E., Davare M.A., Shinde U., Pe'er D., Rekhtman N., Kris M.G., Somwar R., Riely G.J., Ladanyi M., and Yu H.A. Tumor Analyses Reveal Squamous Transformation and Off-Target Alterations As Early Resistance Mechanisms to First-line Osimertinib in EGFR-Mutant Lung Cancer // *Clin. Cancer Res.* - 2020. - V. 26. - P. 2654-2663. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3563.
479. Schrevel M., Gorter A., Kolkman-Uljee S.M., Trimbos J.B., Fleuren G.J., and Jordanova E.S. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with cervical cancer // *Mod. Pathol.* - 2011. - V. 24. - P. 720-728. DOI: 10.1038/modpathol.2010.239.
480. Scott M.C., Suzuki I., and Abdel-Malek Z.A. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation // *Pigment Cell Res.* - 2002. - V. 15. - P. 433-439.
481. Sequist L.V., Waltman B.A., Dias-Santagata D., Digumarthy S., Turke A.B., Fidias P., Bergethon K., Shaw A.T., Gettinger S., Cospers A.K., Akhavanfard S., Heist R.S., Temel J., Christensen J.G., Wain J.C., Lynch T.J., Vernovsky K., Mark E.J., Lanuti M., Iafrate A.J., Mino-Kenudson M., and Engelman J.A. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors // *Sci. Transl. Med.* - 2011. - V. 3. - P. 75ra26. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002003.
482. Sgouros G. Alpha-particles for targeted therapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2008. - V. 60. - P. 1402-1406.



483. Sgouros G., Roeske J.C., McDevitt M.R., Palm S., Allen B.J., Fisher D.R., Brill A.B., Song H., Howell R.W., Akabani G., Bolch W.E., Brill A.B., Fisher D.R., Howell R.W., Meredith R.F., Sgouros G., Wessels B.W., and Zanzonico P.B. MIRD Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of alpha-particle emitters for targeted radionuclide therapy // *J Nucl. Med* - 2010. - V. 51. - P. 311-328.
484. Shah P., Chaumet A., Royle S.J., and Bard F.A. The NAE Pathway: Autobahn to the Nucleus for Cell Surface Receptors // *Cells* - 2019. - V. 8. - P. doi:10.3390/cells8080915-.
485. Shechter Y., Schlessinger J., Jacobs S., Chang K.J., and Cuatrecasas P. Fluorescent labeling of hormone receptors in viable cells: preparation and properties of highly fluorescent derivatives of epidermal growth factor and insulin // *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* - 1978. - V. 75. - P. 2135-2139.
486. Shen F., Ross J.F., Wang X., and Ratnam M. Identification of a novel folate receptor, a truncated receptor, and receptor type beta in hematopoietic cells: cDNA cloning, expression, immunoreactivity, and tissue specificity // *Biochemistry* - 1994. - V. 33. - P. 1209-1215.
487. Shen F., Wu M., Ross J.F., Miller D., and Ratnam M. Folate receptor type gamma is primarily a secretory protein due to lack of an efficient signal for glycosylphosphatidylinositol modification: protein characterization and cell type specificity // *Biochemistry* - 1995. - V. 34. - P. 5660-5665.
488. Sheng Q. and Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer // *Br. J. Cancer* - 2011. - V. 104. - P. 1241-1245. DOI: 10.1038/bjc.2011.62.
489. Shi H., Huang Y., Zhou H., Song X., Yuan S., Fu Y., and Luo Y. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin // *Blood* - 2007. - V. 110. - P. 2899-2906.
490. Shia J., Klimstra D.S., Nitzkorski J.R., Low P.S., Gonen M., Landmann R., Weiser M.R., Franklin W.A., Prendergast F.G., and Murphy L. Immunohistochemical expression of folate receptor-alpha in colorectal carcinoma: patterns and biological significance // *Hum. Pathol.* - 2008. - V. 39. - P. 498-505.
491. Shinojima N., Tada K., Shiraishi S., Kamiryo T., Kochi M., Nakamura H., Makino K., Saya H., Hirano H., Kuratsu J., Oka K., Ishimaru Y., and Ushio Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme // *Cancer Res.* - 2003. - V. 63. - P. 6962-6970.
492. Siegrist W. and Eberle A.N. In situ melanin assay for MSH using mouse B16 melanoma cells in culture // *Anal. Biochem.* - 1986. - V. 159. - P. 191-197.

493. Siegrist W., Solca F., Stutz S., Giuffre L., Carrel S., Girard J., and Eberle A.N. Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells // *Cancer Res.* - 1989. - V. 49. - P. 6352-6358.
494. Siegrist W., Stutz S., and Eberle A.N. Homologous and heterologous regulation of alpha-melanocyte-stimulating hormone receptors in human and mouse melanoma cell lines // *Cancer Res.* - 1994. - V. 54. - P. 2604-2610.
495. Sigismund S., Algisi V., Nappo G., Conte A., Pascolutti R., Cuomo A., Bonaldi T., Argenzio E., Verhoef L.G., Maspero E., Bianchi F., Capuani F., Ciliberto A., Polo S., and Di Fiore P.P. Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate // *EMBO J.* - 2013. - V. 32. - P. 2140-2157. DOI: 10.1038/emboj.2013.149.
496. Sigismund S., Argenzio E., Tosoni D., Cavallaro E., Polo S., and Di Fiore P.P. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation // *Dev. Cell* - 2008. - V. 15. - P. 209-219. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.06.012.
497. Sigismund S., Avanzato D., and Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer // *Mol. Oncol.* - 2018. - V. 12. - P. 3-20.
498. Silver R.B. Ratio imaging: practical considerations for measuring intracellular calcium and pH in living tissue // *Methods Cell Biol.* - 1998. - V. 56. - P. 237-251.
499. Simon N. and FitzGerald D. Immunotoxin Therapies for the Treatment of Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Cancers // *Toxins. (Basel)* - 2016. - V. 8. doi:10.3390/toxins8050137.
500. Siravegna G., Mussolin B., Buscarino M., Corti G., Cassingena A., Crisafulli G., Ponzetti A., Cremolini C., Amatu A., Lauricella C., Lamba S., Hobor S., Avallone A., Valtorta E., Rospo G., Medico E., Motta V., Antoniotti C., Tatangelo F., Bellosillo B., Veronese S., Budillon A., Montagut C., Racca P., Marsoni S., Falcone A., Corcoran R.B., Di N.F., Loupakis F., Siena S., Sartore-Bianchi A., and Bardelli A. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients // *Nat. Med.* - 2015. - V. 21. - P. 795-801. DOI: 10.1038/nm.3870.
501. Smalley K.S., Sondak V.K., and Weber J.S. c-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas // *Histol. Histopathol.* - 2009. - V. 24. - P. 643-650.
502. Sobolev A.S. Modular nanotransporters of anticancer drugs conferring cell specificity and higher efficiency // *Biochemistry (Mosc. )* - 2009. - V. 74. - P. 1567-1574.
503. Sobolev A.S. Modular nanotransporters: A multitarget platform for anticancer drug delivery // *Herald Rus. Acad. Sci.* - 2013. - V. 83. - P. 324-335.
504. Sobolev A.S. Modular Nanotransporters for Nuclear-Targeted Delivery of Auger Electron Emitters // *Front. Pharmacol.* - 2018. - V. 9. - № 952. DOI: 10.3389/fphar.2018.00952.

505. Sobolev A.S. The Delivery of Biologically Active Agents into the Nuclei of Target Cells for the Purposes of Translational Medicine // *Acta Naturae*. - 2020. - V. 12. - P. 47-56.
506. Sobolev A.S., Aliev R.A., and Kalmykov S.N. Radionuclides emitting short-range particles and modular nanotransporters for their delivery to target cancer cells // *Rus. Chem. Rev.* - 2016. - V. 85. - P. 1011-1032.
507. Sonawane N.D., Szoka F.C., Jr., and Verkman A.S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes // *J. Biol. Chem.* - 2003. - V. 278. - P. 44826-44831.
508. Song H., Hedayati M., Hobbs R.F., Shao C., Bruchertseifer F., Morgenstern A., Dewese T.L., and Sgouros G. Targeting aberrant DNA double-strand break repair in triple-negative breast cancer with alpha-particle emitter radiolabeled anti-EGFR antibody // *Mol. Cancer Ther.* - 2013. - V. 12. - P. 2043-2054. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0108.
509. Sordella R., Bell D.W., Haber D.A., and Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways // *Science* - 2004. - V. 305. - P. 1163-1167. DOI: 10.1126/science.1101637.
510. Soria J.C., Ohe Y., Vansteenkiste J., Reungwetwattana T., Chewaskulyong B., Lee K.H., Dechaphunkul A., Imamura F., Nogami N., Kurata T., Okamoto I., Zhou C., Cho B.C., Cheng Y., Cho E.K., Voon P.J., Planchard D., Su W.C., Gray J.E., Lee S.M., Hodge R., Marotti M., Rukazenzov Y., and Ramalingam S.S. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer // *N. Engl. J. Med.* - 2018. - V. 378. - P. 113-125. DOI: 10.1056/NEJMoa1713137.
511. Sorkin A. and Goh L.K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs // *Exp. Cell Res.* - 2008. - V. 314. - P. 3093-3106. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.08.013.
512. Sorkin A., Krolenko S., Kudrjavitceva N., Lazebnik J., Teslenko L., Soderquist A.M., and Nikolsky N. Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways // *J. Cell. Biol.* - 1991. - V. 112. - P. 55-63.
513. Soubeyran P., Kowanetz K., Szymkiewicz I., Langdon W.Y., and Dikic I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors // *Nature* - 2002. - V. 416. - P. 183-187. DOI: 10.1038/416183a.
514. Sreeranganathan M., Uthaman S., Sarmiento B., Mohan C.G., Park I.K., and Jayakumar R. In vivo evaluation of cetuximab-conjugated poly(gamma-glutamic acid)-docetaxel nanomedicines in EGFR-overexpressing gastric cancer xenografts // *Int. J. Nanomed.* - 2017. - V. 12. - P. 7165-7182. DOI: 10.2147/IJN.S143529.

515. Srirajaskanthan R., Shah T., Watkins J., Marelli L., Khan K., and Caplin M.E. Expression of the HER-1-4 family of receptor tyrosine kinases in neuroendocrine tumours // *Oncol. Rep.* - 2010. - V. 23. - P. 909-915. DOI: 10.3892/or\_00000714.
516. Sturm R.A. Molecular genetics of human pigmentation diversity // *Hum. Mol. Genet.* - 2009. - V. 18. - P. R9-17.
517. Subramanian A., Ranganathan P., and Diamond S.L. Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells // *Nat. Biotechnol.* - 1999. - V. 17. - P. 873-877.
518. Sui M., Liu W., and Shen Y. Nuclear drug delivery for cancer chemotherapy // *J. Control. Release* - 2011. - V. 155. - P. 227-236.
519. Sun X., Li Y., Liu T., Li Z., Zhang X., and Chen X. Peptide-based imaging agents for cancer detection // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2017. - V. 110-111. - P. 38-51.
520. Suzuki I., Cone R.D., Im S., Nordlund J., and Abdel-Malek Z.A. Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis // *Endocrinology* - 1996. - V. 137. - P. 1627-1633.
521. Swope V.B., Jameson J.A., McFarland K.L., Supp D.M., Miller W.E., McGraw D.W., Patel M.A., Nix M.A., Millhauser G.L., Babcock G.F., and Abdel-Malek Z.A. Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist alpha-melanocortin and antagonists agouti signaling protein and beta-defensin 3 // *J. Invest. Dermatol.* - 2012. - V. 132. - P. 2255-2262.
522. Swords R., Freeman C., and Giles F. Targeting the FMS-like tyrosine kinase 3 in acute myeloid leukemia // *Leukemia* - 2012. - V. 26. - P. 2176-2185.
523. Szardenings M., Muceniece R., Mutule I., Mutulis F., and Wikberg J.E. New highly specific agonistic peptides for human melanocortin MC(1) receptor // *Peptides* - 2000. - V. 21. - P. 239-243.
524. Szoka F., Jr. and Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* - 1978. - V. 75. - P. 4194-4198.
525. Tada A., Suzuki I., Im S., Davis M.B., Cornelius J., Babcock G., Nordlund J.J., and Abdel-Malek Z.A. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation // *Cell Growth Differ.* - 1998. - V. 9. - P. 575-584.
526. Takeuchi K., Soda M., Togashi Y., Suzuki R., Sakata S., Hatano S., Asaka R., Hamanaka W., Ninomiya H., and Uehara H. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer // *Nat. Med.* - 2012. - V. 18. - P. 378-381.

527. Tal N., Shochat C., Geron I., Bercovich D., and Izraeli S. Interleukin 7 and thymic stromal lymphopoietin: from immunity to leukemia // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2014. - V. 71. - P. 365-378.
528. Talelli M., Oliveira S., Rijcken C.J., Pieters E.H., Etrych T., Ulbrich K., van Nostrum R.C., Storm G., Hennink W.E., and Lammers T. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy // *Biomaterials* - 2013. - V. 34. - P. 1255-1260. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.064.
529. Tanizaki J., Okamoto I., Sakai K., and Nakagawa K. Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification // *Br. J. Cancer* - 2011. - V. 105. - P. 807-813. DOI: 10.1038/bjc.2011.322.
530. Tarrago-Trani M.T., Jiang S., Harich K.C., and Storrie B. Shiga-like toxin subunit B (SLTB)-enhanced delivery of chlorin e6 (Ce6) improves cell killing // *Photochem. Photobiol.* - 2006. - V. 82. - P. 527-537.
531. Tatro J.B., Atkins M., Mier J.W., Hardarson S., Wolfe H., Smith T., Entwistle M.L., and Reichlin S. Melanotropin receptors demonstrated in situ in human melanoma // *J. Clin. Invest.* - 1990. - V. 85. - P. 1825-1832.
532. Tatro J.B., Wen Z., Entwistle M.L., Atkins M.B., Smith T.J., Reichlin S., and Murphy J.R. Interaction of an alpha-melanocyte-stimulating hormone-diphtheria toxin fusion protein with melanotropin receptors in human melanoma metastases // *Cancer Res.* - 1992. - V. 52. - P. 2545-2548.
533. Terai H., Soejima K., Yasuda H., Nakayama S., Hamamoto J., Arai D., Ishioka K., Ohgino K., Ikemura S., Sato T., Yoda S., Satomi R., Naoki K., and Betsuyaku T. Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC // *Mol. Cancer Res.* - 2013. - V. 11. - P. 759-767. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0652.
534. Testa U., Riccioni R., Diverio D., Rossini A., Lo Coco F., and Peschle C. Interleukin-3 receptor in acute leukemia // *Leukemia* - 2004. - V. 18. - P. 219-226.
535. Thatcher N., Hirsch F.R., Luft A.V., Szczesna A., Ciuleanu T.E., Dediu M., Ramlau R., Galiulin R.K., Balint B., Losonczy G., Kazarnowicz A., Park K., Schumann C., Reck M., Depenbrock H., Nanda S., Kruljac-Letunic A., Kurek R., Paz-Ares L., and Socinski M.A. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial // *Lancet Oncol.* - 2015. - V. 16. - P. 763-774. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00021-2.

536. Therkildsen C., Bergmann T.K., Henrichsen-Schnack T., Ladelund S., and Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis // *Acta Oncol.* - 2014. - V. 53. - P. 852-864. DOI: 10.3109/0284186X.2014.895036.
537. Thornwall M., Dimitriou A., Xu X., Larsson E., and Chhajlani V. Immunohistochemical detection of the melanocortin 1 receptor in human testis, ovary and placenta using specific monoclonal antibody // *Horm. Res.* - 1997. - V. 48. - P. 215-218.
538. Tian W.J., Huang M.L., Qin Q.F., Chen Q., Fang K., and Wang P.L. Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression in Patients with Cervical Cancer: A Meta-Analysis // *PLoS One* - 2016. - V. 11. - № e0158787. DOI: 10.1371/journal.pone.0158787.
539. Timney B.L., Raveh B., Mironska R., Trivedi J.M., Kim S.J., Russel D., Wente S.R., Sali A., and Rout M.P. Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex // *J. Cell Biol.* - 2016. - V. 215. - P. 57-76.
540. Toffoli G., Cernigoi C., Russo A., Gallo A., Bagnoli M., and Boiocchi M. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers // *Internat. J. Cancer* - 1997. - V. 74. - P. 193-198.
541. Tolmachev V. and Orlova A. Affibody Molecules as Targeting Vectors for PET Imaging // *Cancers.* (Basel) - 2020. - V. 12. DOI:10.3390/cancers12030651.
542. Tomas A., Futter C.E., and Eden E.R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer // *Trends Cell Biol.* - 2014. - V. 24. - P. 26-34.
543. Tomayko M.M. and Reynolds C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 1989. - V. 24. - P. 148-154.
544. Torchilin V.P. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* - 2006. - V. 8. - P. 343-375.
545. Tortorella S. and Karagiannis T.C. Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy // *J. Membr. Biol.* - 2014. - V. 247. - P. 291-307.
546. Tran T., Shatnawi A., Zheng X., Kelley K.M., and Ratnam M. Enhancement of folate receptor alpha expression in tumor cells through the glucocorticoid receptor: a promising means to improved tumor detection and targeting // *Cancer Res.* - 2005. - V. 65. - P. 4431-4441.
547. Trivedi S., Srivastava R.M., Concha-Benavente F., Ferrone S., Garcia-Bates T.M., Li J., and Ferris R.L. Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients // *Clin. Cancer Res.* - 2016. - V. 22. - P. 5229-5237. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2971.

548. Turgay Y., Eibauer M., Goldman A.E., Shimi T., Khayat M., Ben-Harush K., Dubrovsky-Gaupp A., Sapra K.T., Goldman R.D., and Medalia O. The molecular architecture of lamins in somatic cells // *Nature* - 2017. - V. 543. - P. 261-264.
549. Urnauer S., Muller A.M., Schug C., Schmohl K.A., Tutter M., Schwenk N., Rodl W., Morys S., Ingrisich M., Bertram J., Bartenstein P., Clevert D.A., Wagner E., and Spitzweg C. EGFR-targeted nonviral NIS gene transfer for bioimaging and therapy of disseminated colon cancer metastases // *Oncotarget* - 2017. - V. 8. - P. 92195-92208. DOI: 10.18632/oncotarget.21028.
550. Vaidyanathan G., Affleck D.J., Li J., Welsh P., and Zalutsky M.R. A polar substituent-containing acylation agent for the radioiodination of internalizing monoclonal antibodies: N-succinimidyl 4-guanidinomethyl-3-[<sup>131</sup>I]iodobenzoate ([<sup>131</sup>I]SGMIB) // *Bioconjug. Chem.* - 2001. - V. 12. - P. 428-438.
551. Vaidyanathan G. and Zalutsky M.R. Fluorine-18-labeled [Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]-alpha-MSH, an alpha-melanocyte stimulating hormone analogue // *Nucl. Med. Biol.* - 1997. - V. 24. - P. 171-178.
552. Vaidyanathan G. and Zalutsky M.R. Applications of <sup>211</sup>At and <sup>223</sup>Ra in targeted alpha-particle radiotherapy // *Curr. Radiopharm.* - 2011. - V. 4. - P. 283-294.
553. Vainchenker W. and Constantinescu S.N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies // *Oncogene* - 2012. - V. 32. - P. 2601-2613.
554. Vallis K.A., Reilly R.M., Scollard D., Merante P., Brade A., Velauthapillai S., Caldwell C., Chan I., Freeman M., Lockwood G., Miller N.A., Cornelissen B., Petronis J., and Sabate K. Phase I trial to evaluate the tumor and normal tissue uptake, radiation dosimetry and safety of (<sup>111</sup>In)-DTPA-human epidermal growth factor in patients with metastatic EGFR-positive breast cancer // *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* - 2014. - V. 4. - P. 181-192.
555. van Grotel M., Blanco E., Sebire N.J., Slater O., Chowdhury T., and Anderson J. Distant Metastatic Spread of Molecularly Proven Infantile Fibrosarcoma of the Chest in a 2-month-old Girl: Case Report and Review of Literature // *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* - 2014. - V. 36. - P. 231-233.
556. van Straten D., Mashayekhi V., de Bruijn H.S., Oliveira S., and Robinson D.J. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions // *Cancers*. (Basel) - 2017. - V. 9. - P. 1-54.
557. Vannucci L., Falvo E., Fornara M., Di Micco P., Benada O., Krizan J., Svoboda J., Hulikova-Capkova K., Morea V., Boffi A., and Ceci P. Selective targeting of melanoma by PEG-masked protein-based multifunctional nanoparticles // *Int. J. Nanomed.* - 2012. - V. 7. - P. 1489-1509.

558. Varga C.M., Hong K., and Lauffenburger D.A. Quantitative analysis of synthetic gene delivery vector design properties // *Mol. Ther.* - 2001. - V. 4. - P. 438-446.
559. Vazquez-Becerra H., Perez-Cardenas E., Muniz-Hernandez S., Izquierdo-Sanchez V., and Medina L.A. Characterization and in vitro evaluation of nimotuzumab conjugated with cisplatin-loaded liposomes // *J. Liposome Res.* - 2017. - V. 27. - P. 274-282. DOI: 10.1080/08982104.2016.1207665.
560. Verhaak R.G., Hoadley K.A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M.D., Miller C.R., Ding L., Golub T., Mesirov J.P., Alexe G., Lawrence M., O'Kelly M., Tamayo P., Weir B.A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., Jakkula L., Feiler H.S., Hodgson J.G., James C.D., Sarkaria J.N., Brennan C., Kahn A., Spellman P.T., Wilson R.K., Speed T.P., Gray J.W., Meyerson M., Getz G., Perou C.M., and Hayes D.N. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 // *Cancer Cell* - 2010. - V. 17. - P. 98-110.
561. Vingert B., Adotevi O., Patin D., Jung S., Shrikant P., Freyburger L., Eppolito C., Sapoznikov A., Amessou M., Quintin-Colonna F., Fridman W.H., Johannes L., and Tartour E. The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity // *Eur. J. Immunol.* - 2006. - V. 36. - P. 1124-1135.
562. Voisey J. and Van Daal A. Agouti: from mouse to man, from skin to fat // *Pigment Cell Res.* - 2002. - V. 15. - P. 10-18.
563. Vyse S. and Huang P.H. Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer // *Signal. Transduct. Target Ther.* - 2019. - V. 4. - P. 5. DOI: 10.1038/s41392-019-0038-9-
564. Wadas T.J., Wong E.H., Weisman G.R., and Anderson C.J. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease // *Chem. Rev.* - 2010. - V. 110. - P. 2858-2902.
565. Wagner E., Ogris M., and Zauner W. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 1998. - V. 30. - P. 97-113.
566. Walicka M.A., Vaidyanathan G., Zalutsky M.R., Adelstein S.J., and Kassis A.I. Survival and DNA damage in Chinese hamster V79 cells exposed to alpha particles emitted by DNA-incorporated astatine-211 // *Radiat. Res.* - 1998. - V. 150. - P. 263-268.
567. Wang C., Zhao T., Li Y., Huang G., White M.A., and Gao J. Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobe // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2017a. - V. 113. - P. 87-96.



568. Wang J., Yao M., Zhang Z., Gu J., Zhang Y., Li B., Sun L., and Liu X. Enhanced suicide gene therapy by chimeric tumor-specific promoter based on HSF1 transcriptional regulation // *FEBS Lett.* - 2003. - V. 546. - P. 315-320.
569. Wang J.k., Zhou Y.y., Guo S.j., Wang Y.y., Nie C.j., Wang H.l., Wang J.l., Zhao Y., Li X.y., and Chen X.j. Cetuximab conjugated and doxorubicin loaded silica nanoparticles for tumor-targeting and tumor microenvironment responsive binary drug delivery of liver cancer therapy // *Materials Science and Engineering: C* - 2017b. - V. 76. - P. 944-950.
570. Wang K., Li D., and Sun L. High levels of EGFR expression in tumor stroma are associated with aggressive clinical features in epithelial ovarian cancer // *Onco. Targets Ther.* - 2016a. - V. 9. - P. 377-386. DOI: 10.2147/OTT.S96309.
571. Wang Q., Yang S., Wang K., and Sun S.Y. MET inhibitors for targeted therapy of EGFR TKI-resistant lung cancer // *J. Hematol. Oncol.* - 2019a. - V. 12. - P. 63. DOI: 0.1186/s13045-019-0759-9.
572. Wang S., Song Y., and Liu D. EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance // *Cancer Lett.* - 2017c. - V. 385. - P. 51-54.
573. Wang T.H., Lin Y.H., Yang S.C., Chang P.C., Wang T.C., and Chen C.Y. Tid1-S regulates the mitochondrial localization of EGFR in non-small cell lung carcinoma // *Oncogenesis.* - 2017d. - V. 6. - № e361. DOI: 10.1038/oncsis.2017.62.
574. Wang W.J., Hsu J.M., Wang Y.N., Lee H.H., Yamaguchi H., Liao H.W., and Hung M.C. An essential role of PRMT1-mediated EGFR methylation in EGFR activation by ribonuclease 5 // *Am. J. Cancer Res.* - 2019b. - V. 9. - P. 180-185.
575. Wang X., Niu H., Fan Q., Lu P., Ma C., Liu W., Liu Y., Li W., Hu S., Ling Y., Guo L., Ying J., and Huang J. Predictive value of EGFR overexpression and gene amplification on icotinib efficacy in patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma // *Oncotarget* - 2016b. - V. 7. - P. 24744-24751. DOI: 10.18632/oncotarget.8271.
576. Wang X., Zhang S., MacLennan G.T., Eble J.N., Lopez-Beltran A., Yang X.J., Pan C.X., Zhou H., Montironi R., and Cheng L. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder // *Clin. Cancer Res.* - 2007. - V. 13. - P. 953-957. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2167.
577. Wang Y.N. and Hung M.C. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family // *Cell Biosci.* - 2012. - V. 2. - P. 13-
578. Wang Y.N., Lee H.H., Chou C.K., Yang W.H., Wei Y., Chen C.T., Yao J., Hsu J.L., Zhu C., Ying H., Ye Y., Wang W.J., Lim S.O., Xia W., Ko H.W., Liu X., Liu C.G., Wu X., Wang H., Li D., Prakash L.R., Katz M.H., Kang Y., Kim M., Fleming J.B., Fogelman D., Javle M., Maitra A., and Hung M.C. Angiogenin/Ribonuclease 5 Is an EGFR Ligand and a

- Serum Biomarker for Erlotinib Sensitivity in Pancreatic Cancer // *Cancer Cell* - 2018a. - V. 33. - P. 752-769. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.012.
579. Wang Y.N., Lee H.H., and Hung M.C. A novel ligand-receptor relationship between families of ribonucleases and receptor tyrosine kinases // *J. Biomed. Sci.* - 2018b. - V. 25. - № 83. doi: 10.1186/s12929-018-0484-7.
580. Wang Y.N., Yamaguchi H., Huo L., Du Y., Lee H.J., Lee H.H., Wang H., Hsu J.M., and Hung M.C. The translocon Sec61beta localized in the inner nuclear membrane transports membrane-embedded EGF receptor to the nucleus // *J. Biol. Chem.* - 2010. - V. 285. - P. 38720-38729. DOI: 10.1074/jbc.M110.158659.
581. Wang Y.P., Liu I.J., Chung M.J., and Wu H.C. Novel anti-EGFR scFv human antibody-conjugated immunoliposomes enhance chemotherapeutic efficacy in squamous cell carcinoma of head and neck // *Oral Oncol.* - 2020. - V. 106. – № 104689. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2020.104689.
582. Waterman H., Levkowitz G., Alroy I., and Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274. - P. 22151-22154. DOI: 10.1074/jbc.274.32.22151.
583. Watson P., Jones A.T., and Stephens D.J. Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2005. - V. 57. - P. 43-61.
584. Wegner K.D. and Hildebrandt N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors // *Chem. Soc. Rev.* - 2015. - V. 44. - P. 4792-4834.
585. Wei L., Butcher C., Miao Y., Gallazzi F., Quinn T.P., Welch M.J., and Lewis J.S. Synthesis and biologic evaluation of <sup>64</sup>Cu-labeled rhenium-cyclized alpha-MSH peptide analog using a cross-bridged cyclam chelator // *J. Nucl. Med.* - 2007a. - V. 48. - P. 64-72.
586. Wei L., Zhang X., Gallazzi F., Miao Y., Jin X., Brechbiel M.W., Xu H., Clifford T., Welch M.J., Lewis J.S., and Quinn T.P. Melanoma imaging using (111)In-, (86)Y- and (68)Ga-labeled CHX-A"-Re(Arg11)CCMSH // *Nucl. Med. Biol.* - 2009. - V. 36. - P. 345-354.
587. Wei Q., Chen L., Sheng L., Nordgren H., Wester K., and Carlsson J. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases // *Int. J. Oncol.* - 2007b. - V. 31. - P. 493-499.
588. Weitman S.D., Weinberg A.G., Coney L.R., Zurawski V.R., Jennings D.S., and Kamen B.A. Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis // *Cancer Res.* - 1992. - V. 52. - P. 6708-6711.
589. Wellstein A. ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers // *Front. Oncol.* - 2012. - V. 2. - P. 192-

590. Wen Z.L., Tao X., Lakkis F., Kiyokawa T., and Murphy J.R. Diphtheria toxin-related alpha-melanocyte-stimulating hormone fusion toxin. Internal in-frame deletion from Thr387 to His485 results in the formation of a highly potent fusion toxin which is resistant to proteolytic degradation // *J. Biol. Chem.* - 1991a. - V. 266. - P. 12289-12293.
591. Wen Z.L., Tao X., Lakkis F., Kiyokawa T., and Murphy J.R. Diphtheria toxin-related alpha-melanocyte-stimulating hormone fusion toxin. Internal in-frame deletion from Thr387 to His485 results in the formation of a highly potent fusion toxin which is resistant to proteolytic degradation // *J. Biol. Chem.* - 1991b. - V. 266. - P. 12289-12293.
592. Werner H. and Bruchim I. The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene // *Arch. Physiol. Biochem.* - 2009. - V. 115. - P. 58-71.
593. Wesche J., Rapak A., and Olsnes S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol // *J. Biol. Chem.* - 1999. - V. 274. - P. 34443-34449.
594. West M.A., Bretscher M.S., and Watts C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells // *J. Cell Biol.* - 1989. - V. 109. - P. 2731-2739. DOI: 10.1083/jcb.109.6.2731.
595. Westphal M., Maire C.L., and Lamszus K. EGFR as a Target for Glioblastoma Treatment: An Unfulfilled Promise // *CNS Drugs* - 2017. - V. 31. - P. 723-735. DOI: 10.1007/s40263-017-0456-6.
596. Wharton S.A., Martin S.R., Ruigrok R.W., Skehel J.J., and Wiley D.C. Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin // *J. Gen. Virol.* - 1988. - V. 69. - P. 1847-1857.
597. Wibowo A.S., Singh M., Reeder K.M., Carter J.J., Kovach A.R., Meng W., Ratnam M., Zhang F., and Dann C.E., III. Structures of human folate receptors reveal biological trafficking states and diversity in folate and antifolate recognition // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* - 2013. - V. 110. - P. 15180-15188.
598. Wikberg J.E. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs // *Eur. J. Pharmacol.* - 1999. - V. 375. - P. 295-310.
599. Wikberg J.E., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., and Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors // *Pharmacol. Res.* - 2000. - V. 42. - P. 393-420.
600. Wikstrand C.J., Hale L.P., Batra S.K., Hill M.L., Humphrey P.A., Kurpad S.N., McLendon R.E., Moscatello D., Pegram C.N., and Reist C.J. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas // *Cancer Res.* - 1995. - V. 55. - P. 3140-3148.

601. Williams J.M. and Tsai B. Intracellular trafficking of bacterial toxins // *Curr. Opin. Cell Biol.* - 2016. - V. 41. - P. 51-56.
602. Wiseman H. and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer // *Biochem. J.* - 1996. - V. 313. - P. 17-29.
603. Woll S., Bachran C., Schiller S., Schroder M., Conrad L., Swee L.K., and Scherliess R. Sortagable liposomes: Evaluation of reaction conditions for single-domain antibody conjugation by Sortase-A and targeting of CD11b(+) myeloid cells // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2018. - V. 133. - P. 138-150. DOI: 10.1016/j.ejpb.2018.09.017.
604. Wong W. and Minchin R.F. Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle4, D-Phe7] alpha-MSH in B16 melanoma cells // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 1996. - V. 28. - P. 1223-1232.
605. Wood B., Sikdar S., Choi S.J., Virk S., Alhejaily A., Baetz T., and LeBrun D.P. Abundant expression of interleukin-21 receptor in follicular lymphoma cells is associated with more aggressive disease // *Leuk. Lymphoma.* - 2013. - V. 54. - P. 1212-1220.
606. Wu G.Y. and Wu C.H. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system // *J. Biol. Chem.* - 1987. - V. 262. - P. 4429-4432.
607. Wu M., Gunning W., and Ratnam M. Expression of folate receptor type alpha in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix // *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.* - 1999. - V. 8. - P. 775-782.
608. Xia Y., Muceniece R., and Wikberg J.E. Immunological localisation of melanocortin 1 receptor on the cell surface of WM266-4 human melanoma cells // *Cancer Lett.* - 1996. - V. 98. - P. 157-162.
609. Xia Y., Skoog V., Muceniece R., Chhajlani V., and Wikberg J.E. Polyclonal antibodies against human melanocortin MC1 receptor: preliminary immunohistochemical localisation of melanocortin MC1 receptor to malignant melanoma cells // *Eur. J. Pharmacol.* - 1995. - V. 288. - P. 277-283.
610. Xie M., Zhang H., Xu Y., Liu T., Chen S., Wang J., and Zhang T. Expression of folate receptors in nasopharyngeal and laryngeal carcinoma and folate receptor-mediated endocytosis by molecular targeted nanomedicine // *Int. J. Nanomed.* - 2013. - V. 8. - P. 2443-2451.
611. Xu D., Farmer A., and Chook Y.M. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2010. - V. 20. - P. 782-790.

612. Xu L. and Anchordoquy T. Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics // *J. Pharm. Sci.* - 2011. - V. 100. - P. 38-52.
613. Xu M.J., Johnson D.E., and Grandis J.R. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era // *Cancer Metastasis Rev.* - 2017. - V. 36. - P. 463-473. DOI: 10.1007/s10555-017-9687-8.
614. Xu Y. and Szoka F.C., Jr. Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection // *Biochemistry* - 1996. - V. 35. - P. 5616-5623.
615. Yamazaki T., Zaal K., Hailey D., Presley J., Lippincott-Schwartz J., and Samelson L.E. Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization // *J. Cell Sci* - 2002. - V. 115. - P. 1791-1802.
616. Yang J., Guo H., Gallazzi F., Berwick M., Padilla R.S., and Miao Y. Evaluation of a novel Arg-Gly-Asp-conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone hybrid peptide for potential melanoma therapy // *Bioconjug. Chem.* - 2009. - V. 20. - P. 1634-1642.
617. Yang J., Guo H., Padilla R.S., Berwick M., and Miao Y. Replacement of the Lys linker with an Arg linker resulting in improved melanoma uptake and reduced renal uptake of Tc-99m-labeled Arg-Gly-Asp-conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone hybrid peptide // *Bioorg. Med. Chem.* - 2010. - V. 18. - P. 6695-6700.
618. Yang J. and Miao Y. Substitution of Gly with Ala enhanced the melanoma uptake of technetium-99m-labeled Arg-Ala-Asp-conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone peptide // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2012. - V. 22. - P. 1541-1545.
619. Yang J.J., Zhou C., Huang Y., Feng J., Lu S., Song Y., Huang C., Wu G., Zhang L., Cheng Y., Hu C., Chen G., Zhang L., Liu X., Yan H.H., Tan F.L., Zhong W., and Wu Y.L. Icotinib versus whole-brain irradiation in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer and multiple brain metastases (BRAIN): a multicentre, phase 3, open-label, parallel, randomised controlled trial // *Lancet Respir. Med.* - 2017. - V. 5. - P. 707-716. DOI: 10.1016/S2213-2600(17)30262-X.
620. Yang Y., Tian Z., Ding Y., Li X., Zhang Z., Yang L., Zhao F., Ren F., and Guo R. EGFR-Targeted Immunotoxin Exerts Antitumor Effects on Esophageal Cancers by Increasing ROS Accumulation and Inducing Apoptosis via Inhibition of the Nrf2-Keap1 Pathway // *J. Immunol. Res.* - 2018. - V. 2018. - P. 1090287. DOI: 10.1155/2018/1090287-
621. Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S., Isakoff S.J., and Chen S.T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* - 2019. - V. 35. - P. 295-303.
622. Yarden Y. and Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology // *Nat Rev Cancer* - 2012. - V. 12. - P. 553-563.

623. Yen L.C., Uen Y.H., Wu D.C., Lu C.Y., Yu F.J., Wu I.C., Lin S.R., and Wang J.Y. Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab // *Ann. Surg.* - 2010. - V. 251. - P. 254-260.
624. Yessine M.A. and Leroux J.C. Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2004. - V. 56. - P. 999-1021.
625. Yewale C., Baradia D., Vhora I., Patil S., and Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies // *Biomaterials* - 2013. - V. 34. - P. 8690-8707.
626. Ymer S.I., Greenall S.A., Cvrljevic A., Cao D.X., Donoghue J.F., Epa V.C., Scott A.M., Adams T.E., and Johns T.G. Glioma specific extracellular missense mutations in the first cysteine rich region of epidermal growth factor receptor (EGFR) initiate ligand independent activation // *Cancers* - 2011. - V. 3. - P. 2032-2049.
627. Yohe S. and Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing // *Arch. Pathol. Lab. Med.* - 2017. - V. 141. - P. 1544-1557. DOI: 10.5858/arpa.2016-0501-RA.
628. Yoo H.S. and Park T.G. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate // *J Control Release* - 2004. - V. 100. - P. 247-256.
629. Yoon I., Li J.Z., and Shim Y.K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy // *Clin. Endoscopy* - 2013. - V. 46. - P. 7-
630. Yu J., Xie X., Zheng M., Yu L., Zhang L., Zhao J., Jiang D., and Che X. Fabrication and characterization of nuclear localization signal-conjugated glycol chitosan micelles for improving the nuclear delivery of doxorubicin // *Int. J. Nanomed.* - 2012. - V. 7. - P. 5079-5090.
631. Yun S., Kwak Y., Nam S.K., Seo A.N., Oh H.K., Kim D.W., Kang S.B., and Lee H.S. Ligand-Independent Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression Correlates with Poor Prognosis in Colorectal Cancer // *Cancer Res. Treat.* - 2018. - V. 50. - P. 1351-1361. DOI: 10.4143/crt.2017.487.
632. Zalba S., Contreras A.M., Merino M., Navarro I., de Ilarduya C.T., Troconiz I.F., Koning G., and Garrido M.J. EGF-liposomes promote efficient EGFR targeting in xenograft colocal carcinoma model // *Nanomedicine (Lond)* - 2016. - V. 11. - P. 465-477. DOI: 10.2217/nnm.15.208.
633. Zalutsky M.R., Boskovitz A., Kuan C.T., Pegram C.N., Ayriss J., Wikstrand C.J., Buckley A.F., Lipp E.S., Herndon J.E., McLendon R.E., and Bigner D.D. Radioimmunotargeting of

- malignant glioma by monoclonal antibody D2C7 reactive against both wild-type and variant III mutant epidermal growth factor receptors // *Nucl. Med. Biol.* - 2012. - V. 39. - P. 23-34. DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2011.06.005.
634. Zalutsky M.R. and Pozzi O.R. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radionuclides // *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* - 2004. - V. 48. - P. 289-296.
635. Zalutsky M.R. and Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy // *Curr. Pharm. Des.* - 2000. - V. 6. - P. 1433-1455.
636. Zanna P.T., Sanchez-Laorden B.L., Perez-Oliva A.B., Turpin M.C., Herraiz C., Jimenez-Cervantes C., and Garcia-Borron J.C. Mechanism of dimerization of the human melanocortin 1 receptor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2008. - V. 368. - P. 211-216.
637. Zhai J., Luwor R.B., Ahmed N., Escalona R., Tan F.H., Fong C., Ratcliffe J., Scoble J.A., Drummond C.J., and Tran N. Paclitaxel-Loaded Self-Assembled Lipid Nanoparticles as Targeted Drug Delivery Systems for the Treatment of Aggressive Ovarian Cancer // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2018. - V. 10. - P. 25174-25185. DOI: 10.1021/acsami.8b08125.
638. Zhang C., Lin K.S., and Benard F. Molecular Imaging and Radionuclide Therapy of Melanoma Targeting the Melanocortin 1 Receptor // *Mol. Imaging* - 2017. - V. 16. - №. 1536012117737919. DOI: 10.1177/1536012117737919.
639. Zhang C., Zhang Z., Lin K.S., Lau J., Zeisler J., Colpo N., Perrin D.M., and Benard F. Melanoma Imaging Using (18)F-Labeled alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Derivatives with Positron Emission Tomography // *Mol. Pharm.* - 2018. - V. 15. - P. 2116-2122.
640. Zhang C., Zhang Z., Merkens H., Zeisler J., Colpo N., Hundal-Jabal N., Perrin D.M., Lin K.S., and Benard F. (18)F-Labeled Cyclized alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone Derivatives for Imaging Human Melanoma Xenograft with Positron Emission Tomography // *Sci. Rep.* - 2019. - V. 9. - №. 13575. DOI: 10.1038/s41598-019-50014-5
641. Zhang X., Oulad-Abdelghani M., Zelkin A.N., Wang Y., Haikel Y., Mainard D., Voegel J.C., Caruso F., and Benkirane-Jessel N. Poly(L-lysine) nanostructured particles for gene delivery and hormone stimulation // *Biomaterials* - 2010. - V. 31. - P. 1699-1706.
642. Zhang Z.Y. and Smith B.D. High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model // *Bioconjug. Chem.* - 2000. - V. 11. - P. 805-814.

643. Zhao L.L., Xu K.L., Wang S.W., Hu B.L., and Chen L.R. Pathological significance of epidermal growth factor receptor expression and amplification in human gliomas // *Histopathology* - 2012. - V. 61. - P. 726-736. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04354.x.
644. Zheng Y., Li X., Qian X., Wang Y., Lee J.H., Xia Y., Hawke D.H., Zhang G., Lyu J., and Lu Z. Secreted and O-GlcNAcylated MIF binds to the human EGF receptor and inhibits its activation // *Nat. Cell Biol.* - 2015. - V. 17. - P. 1348-1355. DOI: 10.1038/ncb3222.
645. Zhong J., Sharma J., Raju R., Palapetta S.M., Prasad T.K., Huang T.C., Yoda A., Tyner J.W., van Bodegom D., and Weinstock D.M. TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling // *Database* - 2014. - V. 2014. - № 13575. DOI: 10.1038/s41598-019-50014-5.
646. Zhu J.X., Goldoni S., Bix G., Owens R.T., McQuillan D.J., Reed C.C., and Iozzo R.V. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis // *J. Biol. Chem.* - 2005. - V. 280. - P. 32468-32479.
647. Zhu S., Belkhiri A., and El-Rifai W. DARPP-32 increases interactions between epidermal growth factor receptor and ERBB3 to promote tumor resistance to gefitinib // *Gastroenterology* - 2011. - V. 141. - P. 1738-1748. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.06.070.
648. Zhu V.W., Klempner S.J., and Ou S.I. Receptor Tyrosine Kinase Fusions as an Actionable Resistance Mechanism to EGFR TKIs in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer // *Trends Cancer* - 2019. - V. 5. - P. 677-692. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.09.008.
649. Zidenberg-Cherr S., Parks N.J., and Keen C.L. Tissue and subcellular distribution of bismuth radiotracer in the rat: considerations of cytotoxicity and microdosimetry for bismuth radiopharmaceuticals // *Radiat. Res.* - 1987. - V. 111. - P. 119-129.
650. Zuhorn I.S., Bakowsky U., Polushkin E., Visser W.H., Stuart M.C., Engberts J.B., and Hoekstra D. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency // *Mol. Ther.* - 2005. - V. 11. - P. 801-810.
651. Zuleger N., Kerr A.R., and Schirmer E.C. Many mechanisms, one entrance: membrane protein translocation into the nucleus // *Cell Mol. Life Sci.* - 2012. - V. 69. - P. 2205-2216.



## **Благодарности**

Представленная работа производилась в течение многих лет совместно с многими сотрудниками разных учреждений. Они перечислены в тексте диссертации и в виде соавторов совместных работ. Автор считает своим долгом еще раз высказать им свою признательность. Не могу также не высказать благодарности всем тем научным учреждениям, в которых выполнялась данная работа и их руководству: прежде всего – Московскому государственному университету имени М.В. Ломоносова и Институту биологии гена РАН.

Особая роль в данной работе принадлежит научному консультанту и моему учителю Александру Сергеевичу Соболеву, без чьих идей, энергии и целеустремленности сделанная работа не могла бы быть осуществлена и кому автор искренне признателен.

Автор искренне признателен за долговременное плодотворное сотрудничество сотрудникам лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта ИБГ РАН Т.А. Слестниковой, Ю.В. Храмцову, А.В. Уласову, М.О. Дурыманову, а также Д.Г. Гилязовой, О.А. Смирновой, Т.В. Ахлыниной, С.В. Ячменеву, работавших в коллективе ранее, без участия которых данная работа не могла быть выполнена в представляемом виде, а также В.Г. Лунину, О.В. Сергиенко и О.Л. Ворониной за дизайн и создание конструкций МНТ, Е.Д. Свердлову и его коллегам за плодотворное сотрудничество при создании полиплексных конструкций. Автор благодарен также руководству кафедры биофизики, биологического факультета МГУ, программе развития МГУ и руководству ИБГ РАН за возможность использовать их ресурсы для проведения работы, а также фондам РФФИ, РФФИ, CRDF, INTAS, поддержка которых была существенна на разных стадиях работы.