

На правах рукописи

Кострюкова Любовь Викторовна

ФОСФОЛИПИДНАЯ НАНОСИСТЕМА НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА  
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРИНА Е6  
К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ

1.5.4. - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Торховская Татьяна Ивановна**

**Официальные оппоненты:** **Посыпанова Галина Ароновна,**  
доктор биологических наук,  
ФГБУ «Национальный исследовательский центр  
«Курчатовский институт», вед. научн.сотр. лаборатории  
клеточной биологии и молекулярной медицины

**Покровский Вадим Сергеевич,**  
доктор медицинских наук,  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ,  
зав. лабораторией комбинированной терапии опухолей

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования РФ.

Защита состоится 11 ноября 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте [www.ibmc.msk.ru](http://www.ibmc.msk.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
24.1.172.01 (Д 001.010.01)  
кандидат химических наук

Карпова Е.А

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность** данной работы обусловлена большим вниманием, уделяемым в мировых исследованиях разработке систем доставки лекарств с использованием возможностей современных нанотехнологий, в том числе подходов к адресной, направленной доставке. Особенно это актуально для противоопухолевой терапии. В последние годы в ней большое место занимает метод фотодинамической терапии (ФДТ) [Moghissi et al. 2000, Cramer et al. 2020]. Это введение в организм особого типа веществ - фотосенсибилизаторов (ФС) [Yanovsky et al 2019] с последующим локальным облучением, которое индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), повреждающих опухолевые клетки. Одним из наиболее распространенных ФС является хлорин еб (Ce6), относящийся к порфиринам. Для преодоления его низкой растворимости были разработаны липосомальные формы [Houle, Strong 2002] и получены водорастворимые производные. В частности, разработана и используется форма Ce6 в виде соли с N-метил-глюкамином [Пономарев Г.В. и др., 2011].

В то же время недостатком Ce6, как и других ФС, является попадание некоторого его количества в здоровые ткани, в том числе в кожу, при котором воздействие света оказывает негативное влияние [Kim J. et al., 2020]. Поэтому целесообразна разработка лекарственных форм с большей направленностью и накоплением в опухолях. Этому может способствовать использование недавно выявленных свойств веществ, в основном пептидов, - опухолевая направленность благодаря аффинности к ряду белков, повышенно экспрессирующихся на опухолевых клетках. Для повышения накопления лекарства в клетке исследуется также возможность использования клеточно проникающих пептидов [Horpenz P. et al. 2020], способных проходить внутрь клетки, внося с собой присоединённые к ним лекарственные фрагменты. В отношении ФС, в частности хлорина еб, проводились исследования только по включению его в наночастицы, в основном липосомы [Зорина Т.Е. и др. 2015, Szurko A. et al. 2020], практически без использования специфических пептидов, оптимизирующих доставку. Таким образом, проблема повышения избирательности ФС, их большего накопления в опухолевых клетках остается актуальной. Значимым фактором является и размер транспортирующих частиц. Используемые в большинстве случаев липосомы с диаметром обычно более 100 нм быстро поглощаются клетками РЭС. Частицы с диаметром в нанодиапазоне <100 нм, с включенным лекарством, циркулируют дольше. Такие наночастицы с размером 20-30 нм на основе соевого фосфатидилхолина были разработаны в серии исследований в ИБМХ, показана их высокая эффективность как систем доставки ряда лекарств [Арчаков А.И. 2010, Ипатова О.М. и др. 2012]. Подтверждена стабильность такой системы при длительном хранении в форме дозированного сухого лиофилизированного порошка с полным восстановлением свойств при его регидратации, что является дополнительным преимуществом, в частности, при проведении ФДТ.

**Цель диссертационной работы** – исследование возможности использования наночастиц из соевого фосфатидилхолина для повышения направленности доставки, накопления фотосенсибилизатора хлорина еб в опухолевых клетках и тем самым увеличения его эффективности путем присоединения к наночастицам специфических адресных и клеточно проникающих пептидов.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить с использованием разработанной в лаборатории технологии ультрамалые фосфолипидные наночастицы с включением хлорина еб; оценить их физико-химические, в т. ч. спектральные свойства;
2. Исследовать свойства полученной фосфолипидной наноконструкции хлорина еб в сравнении со свободным хлорином еб *in vitro* и *in vivo*:
  - а) биохимические и цитостатические эффекты АФК, продуцируемых при облучении системы: окисление ненасыщенных ЖК и глутатиона и действие на культуру опухолевых клеток (HepG2);
  - б) динамику накопления хлорина еб в опухоли и коже, а также фармакокинетику при внутривенном введении мышам с опухолью LLC;
  - в) динамику накопления и выведения хлорина еб из органов и тканей интактных животных.
3. Оптимизировать разработанную фосфолипидную наносистему путем присоединения к НЧ пептидов, обладающих клеточно проникающими или адресными свойствами, соответственно, гептааргина (R7) и пептида с последовательностью NGR (Asn-Gly-Arg), аффинного к белку CD13 опухолевых клеток.
4. Исследовать влияние присоединения пептидов к НЧ на общее накопление хлорина еб в клетках, отличающихся по экспрессии CD13 (HepG2, HT-1080, MCF-7), а также в отдельности на его присоединение к поверхности и проникновение в клетки (интернализацию).
5. Исследовать цитотоксичность фотоиндуцированную и без облучения светом, токсичность трёх разработанных наносистем в сравнении с исходной композицией Себ в фосфолипидных НЧ.

**Научная новизна.** Впервые получены и детально охарактеризованы по физико-химическим свойствам и воздействию *in vitro* и *in vivo* ультрамалые фосфолипидные НЧ с включенным в них Себ.

За счёт включения в фосфолипидные НЧ впервые выявлена возможность повышения накопления хлорина еб в опухоли при в/в введении животным и ускоренного выведения из здоровых органов.

Впервые получены три фосфолипидные композиции Себ в фосфолипидных НЧ со специфическим и клеточно проникающим пептидами, повышающими доставку лекарств в опухолевую клетку, и изучено влияние присоединения пептидов на взаимодействие Себ с тремя

линиями опухолевых клеток: на присоединение ФС к клеткам, проникновение в них и проявление цитотоксического действия.

По результатам работы получено 3 патента.

**Теоретическая и практическая значимость.** Показана возможность проявления активности Себ при присоединении транспортирующих его ультрамалых НЧ к клеточной поверхности, что дополняет имеющиеся представления о механизмах его цитотоксического действия. Результаты дают предпосылки для создания новых эффективных стабильных препаратов Себ в фосфолипидных НЧ с повышенной направленностью на опухолевые клетки и ускоренным выведением из здоровых тканей путем подбора комбинаций клеточно проникающих и адресных пептидов.

**Личный вклад** автора – участие в планировании экспериментов, их осуществление, проведение необходимых расчетов и статистической обработки результатов и их анализ, участие в написании статей, представление результатов на научных конференциях.

#### **Положения, выносимые на защиту**

- Встраивание хлорина еб в ультрамалые фосфолипидные НЧ существенно повышает его фотодинамическую активность *in vitro* и *in vivo*, не влияя на «темновую» цитотоксичность;

- Присоединение к НЧ клеточно проникающего пептида R7, адресного пептида с NGR-мотивом или их сочетания повышает общее накопление встроенного Себ в опухолевых клетках; при этом пептид с NGR оказывает влияние только на клетки с экспрессией аминопептидазы N (CD13);

- Гептааргинин R7 при присоединении к фосфолипидным наночастицам практически не проявляет свойственного ему клеточно проникающего действия (повышая интернализацию хлорина только в сочетании с NGR). Основным его эффектом на трёх линиях опухолевых клеток оказалось повышение присоединения встроенного в наночастицы хлорина еб к клеточной поверхности;

- Индуцированное включением гептааргинаина в наночастицы повышение присоединения хлорина еб к клеточной поверхности сопряжено с выраженным повышением его фотоиндуцированного цитотоксического действия на опухолевые клетки.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных результатов была обеспечена применением современных высокоточных аналитических методов, адекватных поставленным задачам и измеряемым параметрам. Представленные научные положения и выводы получены на основе достоверных данных. Достоверность результатов обусловлена необходимым числом повторений, а также использованием современных статистических методов обработки данных.

Основные положения диссертационной работы были доложены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2013); X Молодёжной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука XXI века: новый подход» (Санкт-Петербург 2014); Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014); I Всероссийской конференции с международным участием «ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И МЕДИЦИНА» (Москва, 2015); IV Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Санкт-Петербург, 2015); XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015); III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2018).

**Сведения о публикациях по теме диссертации.** Результаты исследований опубликованы в 17 печатных работах, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, 3 патента РФ и 8 работ в материалах российских и международных конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 118 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы и списка сокращений. Работа содержит 8 таблиц, 25 рисунков и 3 приложения. Библиографический указатель включает 239 литературных источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 1.1. Материалы и реактивы

**Реактивы и субстанции.** В работе были использованы соевый фосфатидилхолин марки Lipoid S100 (Lipoid, Германия), мальтозы моногидрат (MERCK, Германия), ди-N-метил-D-глюкаминная соль хлорина е6 (Ивановский институт, Россия), глутатион восстановленный (Глувосст) (L-glutathione, AppliChem, Darmstadt, Germany), DSPE-Peg(2000)-Maleimide (Avanti, США); пептид с NGR-мотивом (NH<sub>2</sub>-Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys-COOH) (ООО «СинтонЛаб», Санкт-Петербург, Россия); пептид гептааргинин (R7), синтезирован в лаборатории пептидной инженерии ИБМХ. Строение и чистота пептидов подтверждена методами ЯМР и МС.

**Опухолевые клеточные линии.** Использовали клеточные культуры, полученные из Американской коллекции типовых культур и поддерживаемые в коллекции клеточных культур ИБМХ: HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), HT-1080 (клетки фибросаркомы); MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека). Культивация клеток проводилась в

лаборатории биосинтеза белка ИБМХ, а также в МНИОИ им. П.А.Герцена, филиале ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

**Экспериментальные животные.** Были использованы мыши и крысы, полученные из питомника «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Крысы-самцы породы Wistar массой  $250 \pm 20$  г, мыши-самки BDF1 массой  $25 \pm 3$  г, мыши-самцы C57BL/6 массой  $25 \pm 3$  г для перевивки опухоли.

**Модель опухоли.** Карциному легкого Льюиса (LLC) прививали и поддерживали на мышах C57BL/6 самцах. Работы проводились самостоятельно в лаборатории фосфолипидных нанолечарств и транспортных систем сотрудниками ИБМХ.

## 1.2. Методы

### 1.2.1. Получение композиций хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы

#### 1.2.1.1. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб (NPh-Себ)

Соевый фосфолипид Lipoid S100 диспергировали в 1%-ном водном растворе Себ (при соотношении Lipoid S100:Себ 10:1) с последующими гомогенизацией на ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin Sonopuls (Германия) и фильтрацией полученной эмульсии через фильтр 0,22 мкм. Для экспериментов *in vivo* в раствор для диспергирования добавляли мальтозу в качестве криопротектора и полученную после встряхивания грубую фосфолипидную эмульсию Себ обрабатывали с использованием микрофлюидайзера M110EN30K (США): 5-7 циклов гомогенизации при 1000 атм., затем фильтровали (фильтр 0,22 мкм) и высушивали на лиофильной сушке Virtis Ad Vantage XL. Хранили при  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 1.2.1.2. Фосфолипидная наноконпозиция Себ с адресным пептидом с NGR-мотивом (NPh-Себ NGR)

Для получения фосфолипидных наночастиц с присоединенным к их поверхности пептидом, содержащим последовательность аминокислот Asn-Gly-Arg (NGR), сначала получали конъюгат этого пептида с фосфолипидом DSPE с использованием реактива DSPE-Peg(2000)-Maleimid, согласно методике (Yang et al., 2014) с небольшой модификацией. Полученный конъюгат DSPE-PEG2000-NGR растворяли в 1 мл этилового спирта и добавляли его в спиртовой раствор Lipoid S100. После упаривания спирта в вакууме полученную плёнку регидратировали 5 мл водного раствора хлорина еб (25 мг по хлорину еб), затем грубую эмульсию гомогенизировали на ультразвуковой установке Bandelin Sonopuls с последующей фильтрацией, как описано выше (п.1.2.1.1).

### *1.2.1.3. Фосфолипидная наноконпозиция Себ с клеточно проникающим пептидом R7 (NPh-Ce6-R7)*

Предварительно полученную (п. 1.2.1.1) эмульсию NPh-Ce6 добавляли постепенно по каплям к водному раствору гептааргина (R7), перемешивая на шейкере IKA MS 3 basic до конечного соотношения Себ:R7 1:6. Процент присоединенного к наночастицам пептида R7, определенный методом ВЭЖХ после ультрафильтрации с использованием Ultrafree-MC (Millipore), составлял 83%.

### *1.2.1.4. Фосфолипидная наноконпозиция Себ с пептидами NGR и R7 (NPh-Ce6-NGR-R7).*

Композицию Себ с двумя пептидами получали так же, как описано в п. 1.2.1.3, используя вместо NPh-Ce6 предварительно полученную эмульсию NPh-Ce6-NGR (при добавлении её к раствору гептааргина в соотношении Себ:R7 1:6).

## ***1.2.2. Изучение физико-химических свойств композиций Себ в фосфолипидных наночастицах***

*Количественное определение* содержания хлора еб в исследуемых фосфолипидных композициях проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100. *Определение процента встраивания хлора еб в наночастицы* проводили с помощью ультрафильтрации с использованием фильтров Ultrafree-MC (Millipore Corporation, США) на центрифуге Eppendorf 5810 R 10000 об/мин в течение 20 мин. *Размер и ζ-потенциал наночастиц* определяли методом лазерного корреляционного светорассеяния на приборе Zetasizer Nano series Nano-ZS Malvern (Великобритания). *Определение светопропускания и спектра поглощения* проводили на спектрофотометре Agilent 8453.

### ***1.2.3. Оценка сохранения окислительной способности Себ в наночастицах (NPh-Ce6)***

Окислительную способность Себ в фосфолипидных НЧ оценивали после воздействия света по окислению ненасыщенных ЖК фосфолипидов, а также по изменению уровня Глу<sub>восст</sub>. Действие на ЖК оценивали методом ГЖХ/МС, определяя состав метиловых эфиров ЖК с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 6890 N, с МС детектором 5973 и автоматическим инжектором в токе гелия на капиллярной колонке HP-INNOWAX 19091N-133 (Agilent Technologies, США). Для окисления Глу вносили Глу<sub>восст</sub> в среду с композицией NPh-Ce6 в ФСБ или плазме крови человека (ГБУЗ МО «МОСПК»), облучали лазером ( $\lambda=650\text{nm}$ ) и в отбираемых пробах проводили анализ его содержания методом LC/MS на хроматографе Agilent Technologies 1200.

#### ***1.2.4. Оценка влияния присоединения пептидов к наночастицам с хлорином еб на его накопление и проникновение в опухолевые клетки***

*1.2.4.1. Определение экспрессии на клетках аминопептидазы N (CD13) как белка-мишени для адресного пептида NGR in vitro*

Исследование проводили совместно с лабораторией клеточной биологии ИБМХ с использованием специального набора, включающего антитела к CD13, конъюгированные с флуорохромом (реагент PE), позволяющие идентифицировать популяцию клеток, экспрессирующих антиген CD13. Определение проводили путём фиксации флуоресценции присоединившегося к клеткам флуорохрома на проточном цитометре-сортере FACS Aria (BD Biosciences, США).

*1.2.4.2. Оценка клеточного накопления хлорина еб, включённого в фосфолипидные наночастицы*

Клетки HepG2, HT-1080 и MCF-7 ( $10^6$  клеток/лунка) инкубировали в 6-луночных планшетах в стандартных условиях 24 ч. После удаления ростовой среды и промывки клеток вносили образцы Себ – **NPh-Себ**, **NPh-Себ-R7**, **NPh-Себ-NGR** или **NPh-Себ-NGR-R7** – до концентрации 20 мкг/мл (по Себ). Инкубировали 4 ч при 37°C (CO<sub>2</sub>-инкубатор “Sanyo”) и при 4°C. После удаления среды с наночастицами и промывки экстрагировали Себ из клеток метанолом с 0,1% муравьиной кислоты. Экстракты центрифугировали при 10000 об/мин 10 мин при 4°C (Eppendorf 5810R, ротор FA-45-30-11). Содержание Себ определяли методом LC/MS, как описано ниже (в разделе 1.2.6.1). Содержание Себ в клетках нормировали на уровень белка. Полное проникновение Себ в клетку (интернализацию) рассчитывали по разности его содержания при 37°C (общее накопление в клетках) и при 4°C (присоединение к клеточной поверхности) (Chen et al., 2011).

#### ***1.2.5. Оценка цитотоксического действия и фотоиндуцированной активности хлорина еб в фосфолипидных наночастицах in vitro***

Работы проводились совместно с МНИОИ им. П.А.Герцена, филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

*1.2.5.1. Цитотоксическое действие Себ без облучения.* Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-инкубатор Binder, Германия), в планшеты вносили композиции Себ и инкубировали 24 ч в тех же условиях. Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ теста (Sigma, США) (Goiato et al., 2015), регистрируя при 550 нм поглощение формазана (фиксирующего содержание живых клеток) на фотометре Multiscan FC, ThermoSpectronic (США).

*1.2.5.2. Фотоиндуцированная активность Себ.* Клетки после инкубации с Себ подвергали облучению светом (источник облучения - галогеновая лампа с широкополосным фильтром КС-13 ( $\lambda \geq 640$  нм (Россия), мощность 500 Вт), оставляли при стандартных условиях (при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>) на 24-28 ч, затем проводили оценку выживаемости опухолевых клеток с использованием МТТ-теста, как описано выше. Критерием оценки специфической активности являлась величина ИК<sub>50</sub> – концентрация Себ, вызывающая 50% гибель опухолевых клеток (Якубовская с соавт., 2012).

### ***1.2.6. Накопление хлорина еб в органах животных при внутривенном введении в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Себ)***

#### *1.2.6.1. Накопление хлорина еб в ткани опухоли.*

Мышам с опухолью LLC вводили в/в Себ свободный и в составе фосфолипидных НЧ (NPh-Себ) по 5 мг/кг. Через интервалы 0,25; 0,5; 1; 3 и 24 ч животных декапитировали. Образцы ткани опухоли гомогенизировали с помощью ультразвуковой установки Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия), экстрагировали Себ 9-кратным объемом метанола с 0,1% муравьиной кислоты, центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли количество Себ методом LC/MS с использованием системы Agilent 1200 Series с МС детектором 6130 Quadrupole. Подвижная фаза включала 0,1% муравьиную кислоту в воде (А)/0,1% муравьиную кислоту в ацетонитриле (В); хлорин еб детектировали при m/z 597,7.

#### *1.2.6.2. Фармакокинетика Себ в крови при введении мышам с опухолью LLC*

Забор крови проводили в пробирки с ЭДТА. Себ экстрагировали 9-кратным объемом метанола с 0,1% муравьиной кислоты. Содержание Себ анализировали LC/MS, как описано выше (1.2.6.1).

#### *1.2.6.3. Динамика уровня хлорина еб в печени и почках здоровых животных (методом LC/MS)*

Исследование накопления Себ в органах (печень, почки) на здоровых крысах и пробоподготовку образцов проводили как описано выше для ткани опухоли в разделе 1.2.6.1.

#### *1.2.6.4. Динамика распределения Себ по органам и тканям (кожа, мышцы, жировая ткань и селезенка) на мышах методом контактной флуориметрии*

Мышам (18-20г) с опухолью LLC (1.2.5.1) и здоровым вводили в/в Себ, свободный или в составе фосфолипидных НЧ (NPh-Себ), в дозе 5 мг/кг. Оценка содержания Себ в тканях проводили методом контактной флуориметрии путём регистрации флуоресценции Себ на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля ФДТ «ЛЭСА-06». Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne лазера (длина волны 632,8 нм).

### 1.2.7. Статистическая обработка результатов

Для оценки достоверности различий характеристик в исследованиях *in vitro* и *in vivo* применяли критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

## 2. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 2.1. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб (NPh-Себ)

#### 2.1.1. Физико-химические свойства наночастиц, спектр поглощения включенного Себ

На основе разработанной ранее в лаборатории технологии путем гомогенизации при высоком давлении или обработки ультразвуком, была получена фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб (NPh-Себ) с соотношением Себ : соевый фосфолипид 1:10 и размером наночастиц менее 30 нм, с высокой загрузкой в них Себ. Методом ультрафильтрации показано, что **97,4±4,1** % взятого Себ оказывается встроенным в фосфолипидные НЧ (табл. 1). При этом, как видно из таблицы 1, характеристики НЧ сохраняются и в процессе лиофилизации, и последующей регидратации. Отрицательное значение  $\zeta$ -потенциала (поверхностного заряда) обусловлено карбоксильными группами Себ на поверхности НЧ. Величина его свидетельствует о противоагрегационной стабильности частиц (Heurtault V. et al., 2003).

Таблица 1. Физико-химические показатели эмульсии фосфолипидной наноконпозиции хлорина еб (NPh-Себ) до сушки и после регидратации лиофилизированного порошка

	Эмульсия без криопротектора	Эмульсия с криопротектором	
		До лиофильного высушивания	После лиофилизации и регидратации
Включение хлорина еб в наночастицы (% от внесенного количества Себ)	94,6 ±2,17	97,4±4,1	96,5±7,3
Размер частиц (d), нм	18±1,7	19,3±1,2	24±2,5
$\zeta$ -потенциал, mV	-22,4±1,5	-24,1±4,5	-23,3±6,6

Оценка существенных для ФДТ спектральных характеристик (Лукьянец, 2013, Low & Bhuvaneshwari 2016) Себ при его включении в фосфолипидные НЧ показала отсутствие существенных изменений в сравнении со свободной формой: поглощение в районе 400 нм, характерное для порфиринов, для Себ в составе НЧ не изменилось (рис. 1).

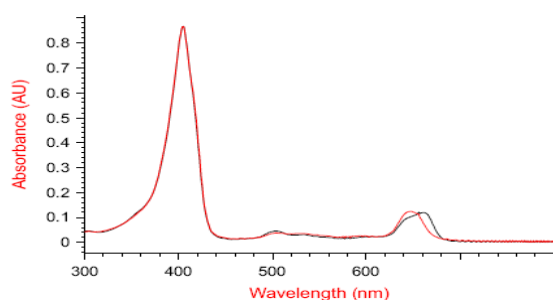


Рисунок 1

Спектры поглощения ди-N-метил-D-глюкаминовой соли хлорина е6 (красная кривая) и NPh-Ce6 (черная кривая) в фосфатно-солевом буфере (pH= 7,4) (концентрация по Ce6 5 мкг/мл).

Небольшой сдвиг для NPh-Ce6 в области  $\lambda=650$  нм (Q-полосы) в длинноволновую область должен способствовать увеличению ответа ФС на действие более глубоко проникающего в ткани длинноволнового света и, следовательно, повышению эффективности ФДТ (Mallidi et al., 2016).

### 2.1.2. Оценка *in vitro* индуцированной светом окислительной способности хлорина е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы (NPh-Ce6)

Действующими противоопухолевыми факторами, лежащими в основе эффекта Ce6 как ФС, являются генерируемые им при облучении свободные радикалы и активные формы кислорода (АФК). Мы проверили сохранение этой способности для композиции Ce6 в фосфолипидных НЧ (NPh-Ce6). В качестве доступных для анализа «ловушек» свободных радикалов использовали две системы: ненасыщенные ЖК, входящие в состав формирующего наночастицы соевого фосфатидилхолина, а также глутатион как эффектор глутатионовой редокс-системы плазмы крови - защитной антиоксидантной системы организма (Rebrin & Sohal 2008). Определяли анализируемые показатели в исследуемых образцах с Ce6 до и после облучения светом (табл. 2).

Таблица 2. Снижение уровня окисляемых субстратов в присутствии хлорина е6 после облучения

Объект исследования	Определяемый параметр	До облучения	После облучения
Ненасыщенные ЖК в NPh-Ce6 (отн. ед. *)			
Фосфолипидная наноэмульсия Ce6 (NPh-Ce6)	Олеиновая (C18:1)	0,39±0,032	0,33±0,031
	Линолевая (C18:2)	1,72±0,125	1,21±0,006
	Линоленовая (C18:3)	0,11±0,009	0,07±0,003
Уровень Глу <sub>восст</sub> в образце (% от исходного уровня)			
Плазма крови (с Глу <sub>восст</sub> ):			
• Се6 свободный	Уровень Глу <sub>восст</sub>	100	10 ± 3
• NPh-Ce6		100	15 ± 3,5

\* за единицы принимали отношение площади пика ЖК при ГЖХ к таковой для внутреннего стандарта

Как видно из таблицы 2, Себ в обеих системах под действием облучения становится источником АФК, инициирующих окисление. В композиции NPh-Себ содержание ЖК - олеиновой, линолевой и особенно линоленовой (моно-, ди- и триненасыщенной) снижается, на 16%, 29% и 37%, соответственно, что свидетельствует об окислении их двойных связей под действием АФК, генерируемых хлорином еб при облучении светом. Облучение образцов плазмы крови с добавленным в неё Глу<sub>восст</sub> и внесёнными Себ или NPh-Себ в обоих случаях приводит к существенному снижению уровня Глу<sub>восст</sub>, свидетельствующее о его окислении АФК, продуцируемыми хлорином еб при облучении. Таким образом, включение Себ в фосфолипидные НЧ не снижает его способность генерировать АФК. При этом, в результате облучения источником АФК становится не только сам Себ, но и продукты перекисного окисления ненасыщенных ЖК фосфолипидов. Этот эффект способен увеличить фоточитотоксичность встроенного Себ. Подобный эффект увеличения фоточитотоксичности был показан для липосомальных форм производных Себ (Szurko et al., 2020).

### 2.1.3. Действие хлорина еб в фосфолипидных НЧ (NPh-Себ) на опухолевые клетки *in vitro*

Для разработанной транспортной системы Себ в фосфолипидных наночастицах - **NPh-Себ**, была проведена оценка цитотоксичности в сравнении со свободным Себ. При этом наряду с фотодинамическим эффектом при облучении светом оценивали также и неспецифическое цитотоксическое действие без облучения («темновую» цитотоксичность). Определяли процент гибели клеток HepG2 после инкубации с различными концентрациями **NPh-Себ** с использованием МТТ-теста (табл. 3). Для фотоиндуцированной активности приведены величины ИК<sub>50</sub> (концентрация Себ, вызывающая гибель 50% клеток). Для «темновой» токсичности – это количество оставшихся живых клеток в среде в процентах от такового в контроле (без добавления Себ).

Таблица 3. Цитотоксичность Себ в фосфолипидных НЧ (NPh-Себ) и в свободной формой

Измеряемый параметр	Образцы	
	Себ	NPh-Себ
Фотоиндуцированная активность, ИК <sub>50</sub> , мкг/мл	4,0 ±0,1	2,3±0,2
«Темновая» цитотоксичность (количество живых клеток <b>HepG2</b> , % от контроля, при Себ 5 мкг/мл)	85±3,4	100±0,7

Как видно из таблицы 3, для хлорина еб в наночастицах величина ИК<sub>50</sub> оказалась почти в 1,5 раза ниже, чем для свободного (2,3 мкг/мл по сравнению с 4 мкг/мл), что указывает на более высокую фотоиндуцированную активность. В то же время свойственная этому ФС небольшая

«темновая» токсичность (Зорина с соавт., 2015) не увеличивается. Немного большее (в среднем на 10%) количество живых клеток в этом случае может быть вызвано проявлением известного защитного влияния фосфолипидов, предохраняющих клеточные мембраны. То есть, включение Себ в фосфолипидные наночастицы значительно повышает его специфическое фотоиндуцированное действие на опухолевые клетки, не увеличивая «темновой» цитотоксичности – косвенного показателя риска побочных эффектов (Mahmoud et al., 2015; Мищенко с соавт, 2019).

#### 2.1.4. Внутривенное введение фосфолипидной наноконструкции Себ мышам с опухолью LLC.

На рисунке 2 приведены сравнительные данные по изменению уровня Себ после введения его свободного и в NPh-Себ мышам с карциномой LLC - в опухоли, а также в коже, как ткани, наиболее подверженной побочным эффектам.

Как видно из рисунка 2А, накопление ФС в опухоли в течение нескольких часов после введения в составе НЧ (NPh-Себ) практически вдвое превышало таковое для свободного Себ ( $0,01 \leq p \leq 0,05$ ). В коже мышей с опухолью (рис. 2Б) различие имело обратный характер. Флуоресценция Себ (значит и его содержание в ткани) была ниже для Себ в НЧ, чем для свободного, что говорит о его меньшем поступлении и более быстром выведении, которое может быть следствием изменения фармакокинетики в крови.

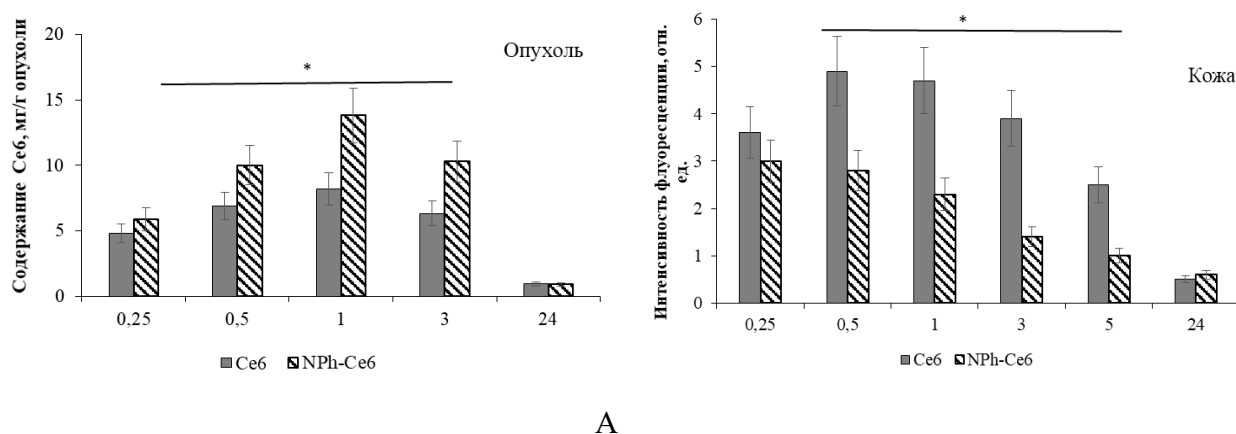


Рисунок 2. Динамика изменения содержания хлорина еб в ткани опухоли (А, масс-спектрометрией) и кожи (Б, контактной флуориметрией) мышей с карциномой LLC после введения его в свободном виде (Себ) и в фосфолипидных наночастицах (NPh-Себ). Доза – 5 мг/кг. На оси X – время после введения, час.

В таблице 4 приведены фармакокинетические параметры Себ в фосфолипидных НЧ в сравнении со свободной субстанцией, ди-N-метил-D-глюкаминовой солью хлорина еб.

**Таблица 4.** Значения фармакокинетических параметров после внутривенного введения мышам с опухолью LLC хлорина еб в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Ce6) и свободного (Ce6)

Препарат	NPh-Ce6	Ce6
Параметр		
$T_{1/2}$ , мин	8,46	17,5
Клиренс (Cl), мл/мин	3,825	1,621
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ , мин×мкг/мл	1307,1	3084,0

Из таблицы 4 видно, что у Ce6, введенного в составе фосфолипидных НЧ, период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) в 2 раза короче и более быстрый клиренс, чем у свободной субстанции. Это указывает на бóльшую скорость выведения ФС хлорина еб из организма. Данный эффект проявляется в меньшей (более чем в 2 раза) величине AUC (площадь под кривой «концентрация - время»), то есть, в меньшем (по времени и по количеству) пребывании Ce6 в кровяном русле и, следовательно, в снижении возможности его проникновения в здоровые ткани и развития побочных эффектов.

#### 2.1.5. Динамика изменения содержания хлорина еб в здоровых тканях после его внутривенного введения в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Ce6)

Было проведено также детальное исследование динамики накопления и выведения Ce6 из других органов и тканей. Для наиболее активно кровоснабжаемых органов, осуществляющих экскрецию лекарства из организма (печени и почек) определяли непосредственное его количество в экстрактах образцов тканей методом LC/MS. Результаты приведены на рисунке 3.

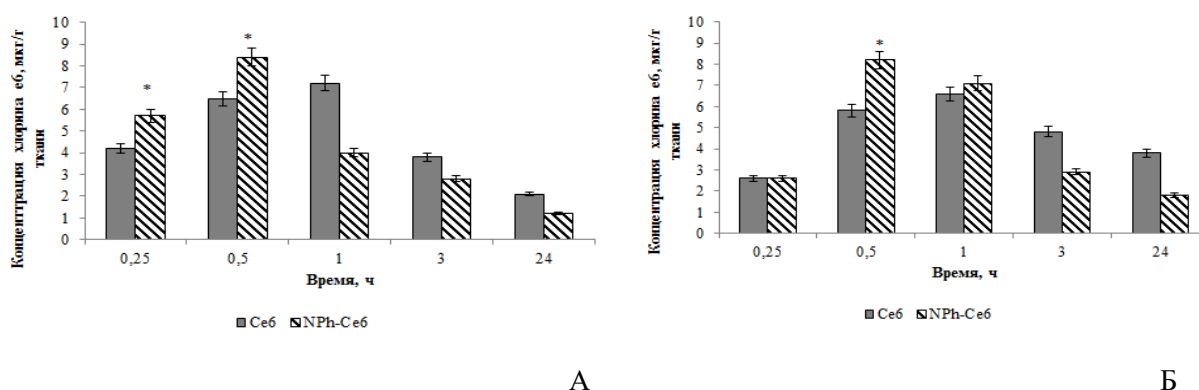


Рисунок 3. Содержание хлорина еб в печени (А) и почках (Б) крыс при его введении в составе наночастиц (NPh-Ce6) и в свободном виде (Ce6) в дозе 5 мг/кг (\*P < 0.05, n = 3).

Как видно из рисунка 3А, Себ, введенный внутривенно крысам в составе фосфолипидных НЧ, быстрее поступает в печень, но и раньше из неё выводится. Изменение содержания Себ в почках крыс (рис. 3Б) носило такой же характер: более быстрое поступление и выведение из ткани для **NPh-Себ**.

Для других здоровых тканей (жировой ткани, селезенки, мышц) определение проводили на здоровых мышах при той же схеме эксперимента, но уровень Себ оценивали методом контактной флуориметрии; также анализировали и ткань кожи. По результатам исследований было показано, что **в коже** динамика изменений флуоресценции Себ сходна с таковой, продемонстрированной выше для кожи мышей с опухолью (рис 2Б), с несколько бóльшими величинами для обеих форм ФС (что может быть связано с активным захватом ФС опухолевой тканью). Содержание хлорина еб при введении фосфолипидной формы (NPh-Себ) было вдвое ниже, чем после свободного Себ, заметный выход которого достигался только через сутки (в отличие от 5 ч для NPh-Себ). Подобная ситуация наблюдается и при исследовании накопления в ткани **мышц**, но с более ранним (через 5 ч) выравниванием концентраций для обеих форм Себ.

В **жировой ткани** содержание Себ, введенного в НЧ, было на максимуме накопления (через 15 минут после введения) бóльше, чем при введении в свободном виде, что, вероятно, обусловлено аффинностью к этой ткани фосфолипидной поверхности наночастиц. Далее эти различия сглаживаются, выравниваясь к 1 часу после введения. В **селезёнке** разницы практически не наблюдалось.

Таким образом, сопоставление свойств полученной композиции хлорина еб с его обычно используемой свободной формой показывает сохранение спектральных характеристик и свойственной ему способности к генерации АФК, повышение цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеткам, большее накопление в опухоли и меньшее в здоровых тканях, более быстрое выведение. Некоторое, хоть и меньшее, поступление Себ в здоровые ткани всё же остаётся. Следует подчеркнуть, что создание данной композиции (NPh-Себ), несмотря на оптимизацию в ней свойств хлорина еб, в настоящей работе было не конечной целью, а промежуточным этапом для разработки ожидаемых и впоследствии полученных более совершенных композиций Себ, путем включения в неё дополнительных, относительно недавно выявленных специфических пептидных фрагментов.

## **2.2. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб с адресным и проникающим пептидными фрагментами для повышения транспорта к опухолевым клеткам**

### **2.2.1. Получение и характеристика композиций с адресными фрагментами**

В последние годы для улучшения клеточной доставки лекарственных соединений, наряду с включением в транспортные системы (чаще всего НЧ), применяют и новые дополнительные

подходы, основанные на свойствах ряда специфических пептидов. Мы применили это к разработанному фосфолипидным НЧ с включенным хлорином е6 (NPh-Ce6). Было использовано два таких пептида. Один пептид, содержащий последовательность аминокислот Asp-Gly-Arg (NGR), аффинную к белку, повышенно экспрессируемому на ряде опухолевых клеток, аминопептидазе N (CD13) (Wickstrom et al., 2011; Прозоровский и др., 2018). Второй пептид - гептааргинин R7, обладающий «клеточно проникающими» свойствами (Ramsey & Flynn, 2015). Пептид с NGR-мотивом способствует опухолевой направленности, присоединяемых к нему лекарств или НЧ (Wickstrom et al., 2011), а клеточно проникающие, богатые аргинином пептиды обладают способностью к т. н. «интернализации» – проникновению внутрь клетки, внося и присоединяемые вещества (Heitz et al., 2009). Было разработано три варианта композиций Се6 в наночастицах: с присоединённым NGR (NPh-Ce6-NGR) или R7 (NPh-Ce6-R7) или с их сочетанием (NPh-Ce6-NGR-R7).

Для встраивания пептида с NGR сначала получали с помощью DSPE-Peg(2000)-Maleimid, его фосфолипид-содержащий конъюгат - DSPE-Peg(2000)-NGR (Yang et al., 2014), подтверждая его образование с помощью МС (детально описано в диссертации). Конъюгат вводили в исходную смесь для получения НЧ и после обычной обработки гомогенизацией получали композицию NPh-Ce6-NGR. Присоединение R7 к поверхности НЧ осуществляли путем инкубации его с уже приготовленной системой NPh-Ce6 или NPh-Ce6-NGR, получая при этом композиции NPh-Ce6-R7 или NPh-Ce6-NGR-R7, соответственно. Физико-химические характеристики полученных композиций хлорина е6 приведены в таблице 5.

Таблица 5 Физико-химические характеристики композиций хлорина е6 с пептидами

Параметры	NPh-Ce6-R7	NPh-Ce6-NGR	NPh-Ce6-NGR-R7	NPh-Ce6 (без пептидов)
Размер частиц, нм	29,5±2,2	25,3±5,05	30,8±2,2	18,1±4,9
% частиц данного размера	85,2±8,5	90,1±6,3	77,0±9,6	96,4±3,2
ζ-потенциал, mV	4,97±3,4	-20,0±4,3	6,21±2,0	-23,3±6,6
Процент включения Се6 в наночастицы, %	99,9±0,2	98,9±0,7	99,9±0,14	96,5±7,3

Как видно из таблицы, размер НЧ для всех трёх композиций оставался в пределах 30 нм, с таким же высоким (в среднем ~ 90%) процентом частиц данного размера. Высоким был и процент включения хлорина е6 в наночастицы. Положительный заряд (ζ-потенциал) наночастиц двух композиций – NPh-Ce6-R7 и NPh-Ce6-NGR-R7 обусловлен присутствием в них гептааргина (R7). Спектры поглощения Се6 в составе трёх композиций были аналогичны таковым для исходной системы, приведённым выше, на рис. 1 (представлено в диссертации).

### 2.2.2. Взаимодействие разработанных пептид-содержащих нанофосфолипидных композиций хлорина еб с опухолевыми клетками

При выборе опухолевых клеток для оценки взаимодействия разработанных композиций хлорина еб исходили из различий экспрессии на клетках белка CD13 – мишени для пептида с последовательностью NGR (Schreiber & Smith, 2018). Использовали клеточные линии HepG2 и HT-1080 с выявленной экспрессией этого белка (Fontaine S.D. et al., 2015, Pasqualini R. et al., 2000), а также клетки MCF-7, для которых эта информация освещена противоречиво (Dixon et al., 1994, Hou et al., 2011).

Предварительно на этих трёх линиях опухолевых клеток было проведено определение экспрессии этого белка методом проточной цитометрии. Результаты представлены на рисунке 4.

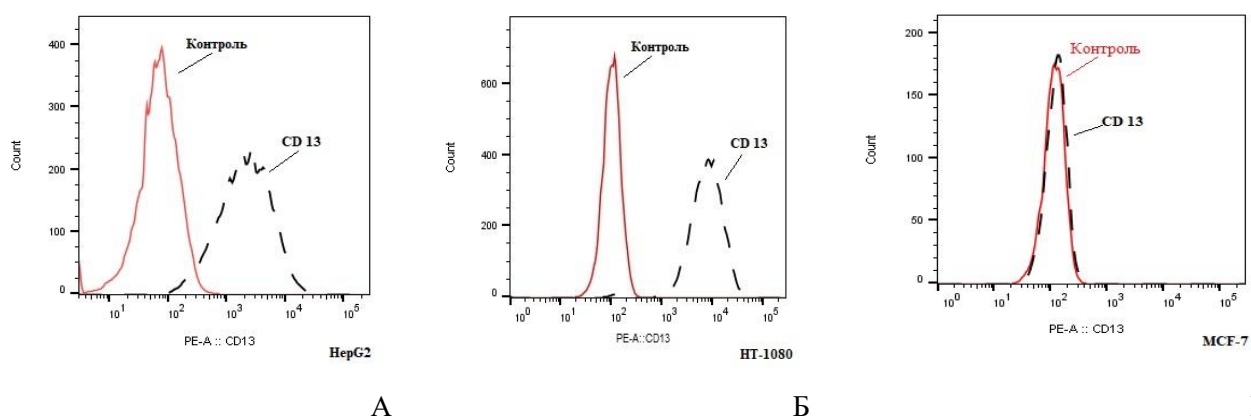


Рисунок 4. Гистограммы определения CD13 мечеными флуорохромом антителами методом проточной цитометрии в клеточных линиях HepG2 (А), HT-1080(Б) и MCF-7(В) (ось X - интенсивность флуоресценции, отн. ед., ось Y – количество клеток в потоке, шт.)

Для всех видов клеток в контроле (без добавления антител) наблюдалось относительно небольшое свечение (с интенсивностью в среднем,  $10^3$  отн. ед.) за счет свойства самих клеток, т.н. аутофлуоресценции. На клетках HepG2 и HT-1080 (рис. 4А и 4Б) при добавлении реагента наблюдается появление второго пика с большей флуоресценцией -  $10^4$  отн. ед. за счёт флуоресценции флуорохрома, связанного с присоединившимся к клеткам антителом. На клетках MCF-7 (рис. 4В) этот эффект отсутствует, что говорит об отсутствии присоединения антитела к CD13, т. е. об отсутствии на них экспрессии данного белка. Следовательно, можно ожидать специфических различий в ответе взятых клеточных линий на присутствие аффинного к CD13 пептида NGR, что должно сказаться на взаимодействии клеток с фосфолипидными наночастицами, снабженными этим пептидом и содержащими хлорин еб.

Эти различия были выявлены в последующих экспериментах, путем определения содержания хлорина еб в клетках после их инкубации с исследуемыми системами, включая исходную без пептидов (**NPh-Ce6**). Оценивали не только общее накопление ФС в клетках, но и в отдельности присоединение к клеточной поверхности (при 4°C) и проникновение внутрь клетки («интернализацию») при 37 °C (Chen et al., 2011) как разность этих двух величин. При этом в общем накоплении в большинстве случаев приблизительно равный вклад приходился на количество Себ, присоединенного к клеточной поверхности и проникшего внутрь клетки (т. е. способного к интернализации). Результаты приведены на рисунке 5.

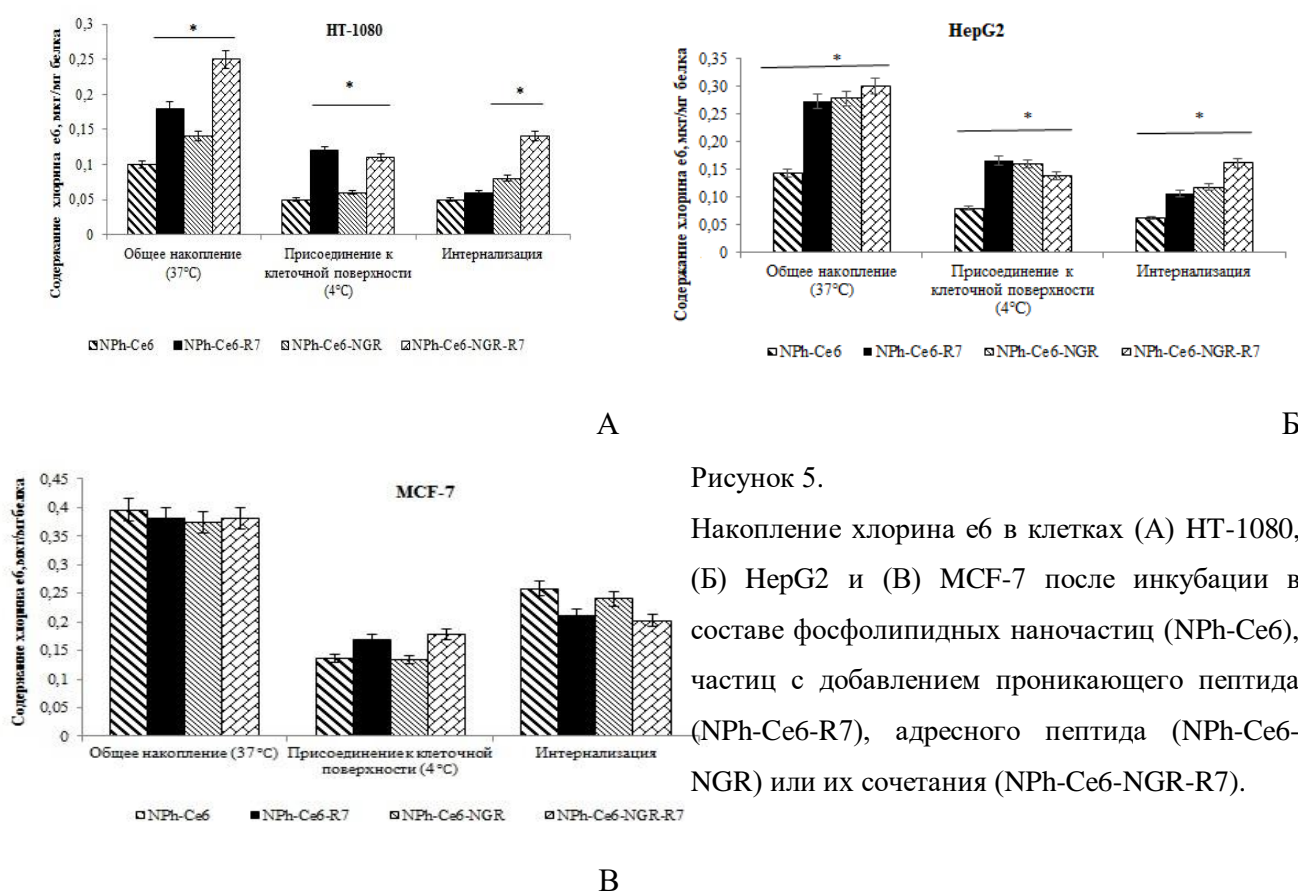


Рисунок 5.

Накопление хлорина еб в клетках (А) HT-1080, (Б) HepG2 и (В) MCF-7 после инкубации в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Ce6), частиц с добавлением проникающего пептида (NPh-Ce6-R7), адресного пептида (NPh-Ce6-NGR) или их сочетания (NPh-Ce6-NGR-R7).

**Присоединение Себ** для клеток HT-1080 (рис. 5А) максимально **возрастало** по сравнению с **NPh-Ce6** для обеих систем с **R7** и не **менялось** для **NGR**. Для HepG2 (Рис. 5Б) все 3 системы оказали одинаковое (в среднем двукратное) стимулирующее действие, также без влияния **NGR**. **Интернализация Себ** для клеток HT-1080 и HepG2 (рис 5А и 5Б) была максимальной **при сочетании** обоих пептидов (**NPh-Ce6-NGR-R7**). Использование пептида R7 в данном случае дополняет действие наночастиц с **NGR**-пептидом, что можно объяснить влиянием гуанидиновой группы аргинина, которая может, как полагают (Miyayama et al., 2017), образовывать локальные микроповреждения в клеточной мембране, тем самым увеличивая проникновение хлорина еб в опухолевую клетку. Результаты показывают бóльшее действие

клеточно проникающего пептида не на интернализацию Себ, а на присоединение к клеточной поверхности. Это может быть связано с тем, что размер этого микроповреждения оказывается недостаточным для прохождения НЧ, и она (вместе с Себ) как бы «застревает» в мембране. Для клеток **MCF-7** (рис 5B) наблюдалось лишь небольшое (на 20-30%) повышение присоединения Себ к клеточной поверхности для композиций с **R7**, однако это **никак не сказалось** на его **интернализации** в клетки.

Таким образом, присоединение векторного (NGR) и клеточно проникающего (R7) пептидов и особенно их сочетания к фосфолипидным НЧ, с включённым хлорином еб, повышает его накопление и интернализацию в опухолевых клетках, экспрессирующих аминопептидазу N (HT-1080 и HerG2), не оказывая, однако, влияния на клетки, не экспрессирующие этот фермент (MCF-7).

### **2.2.3. Оценка фотоиндуцированного действия на опухолевые клетки хлорина еб в различных системах доставки.**

Световое облучение клеток, инкубированных с содержащими Себ композициями, приводило к подавлению роста и гибели клеток. Величины ИК<sub>50</sub> (обратные активности ФС) приведены в таблице 6.

Таблица 6. Фотоиндуцированная активность хлорина еб в фосфолипидных наночастицах с добавлением специфического адресного (NGR) или/и проникающего (R7) пептидов

Композиция хлорина еб	Величина ИК <sub>50</sub> (мкг/мл) для культур клеток:		
	HT-1080	HerG2	MCF-7
NPh-Себ	2,5±0,2	2,3±0,2	3,0±0,9
NPh-Себ –R7	0,8±0,1	0,8±0,2	1,4±0,4
NPh-Себ-NGR	2,6±0,1	1,9±0,3	3,8±0,2
NPh-Себ -NGR–R7	0,7±0,1	0,8±0,2	1,3±0,3

Как видно, при использовании исходных НЧ с Себ (NPh-Себ) величины ИК<sub>50</sub> для всех трёх клеточных линий составляли в среднем 2,6 мкг/мл. Для систем же с пептидами ИК<sub>50</sub> существенно снижалась, указывая на их более высокую активность. Минимальные значения ИК<sub>50</sub> (0,8-1,4 мкг/мл) наблюдались для двух систем, **включающих проникающий пептид (R7)** один или в сочетании с NGR. Для клеток HT-1080 и HerG2 снижение было наибольшим, в 3 раза (до 0,7-0,8 мкг/мл). На клетках MCF-7 снижение было в 2 раза (до 1,3-1,4 мкг/мл). **Добавление NGR** к системе с R7 не повышало эффективности ФС ни на одной из культур. Не было обнаружено также ожидаемого активирующего влияния NGR для системы, содержащей только этот пептид, без R7.

Сравнение этих результатов с вышеприведенными данными по клеточному накоплению (рис. 5), где наибольшую интернализацию в клетки HT-1080 и HepG2 (экспрессирующие CD13) давало сочетание R7 и NGR (NPh-Ce6-NGR-R7) Себ, показывает, что в данном случае интернализация в клетки не сыграла ожидаемой решающей роли для проявления активности Себ. Больше влияние оказало его присоединение к клеточной поверхности. По-видимому, это обусловлено проникновением внутрь клетки не самого Себ, а продуктов его фотоиндуцированной реакции, АФК, инициирующих процессы клеточной гибели. Отсутствие влияния адресного пептида с NGR-мотивом на клетках HT-1080 и HepG2 не исключает проявления его избирательного действия в условиях *in vivo* путём возможного снижения поступления в здоровые клетки, не экспрессирующие белок CD13.

Таким образом, добавление специфических пептидов, в частности R7, к транспортирующим Себ фосфолипидным НЧ и повышающим его активность (табл.3), ещё больше усиливает ее. В отношении пептида, содержащего NGR-мотив, более детальное выяснение его влияния в условиях *in vivo* может быть установлено в дальнейших экспериментах на моделях опухолей у животных.

#### 2.2.4. Оценка цитотоксического действия фосфолипидных композиций хлорина еб без воздействия света

Важным для использования ФС в ФДТ является также проявление цитотоксичности без облучения светом, дающее информацию о риске побочного действия на здоровые ткани. Оценка её была проведена для разработанных наноконпозиций Себ при концентрациях хлорина еб в среде 1,25; 5,0 и 20 мкг/мл. Определяли с помощью МТТ теста по количеству оставшихся в среде живых клеток после инкубации (в % от контроля, без добавления исследуемых образцов). В отсутствие светового воздействия не происходит существенной гибели для всех систем (рис.6).

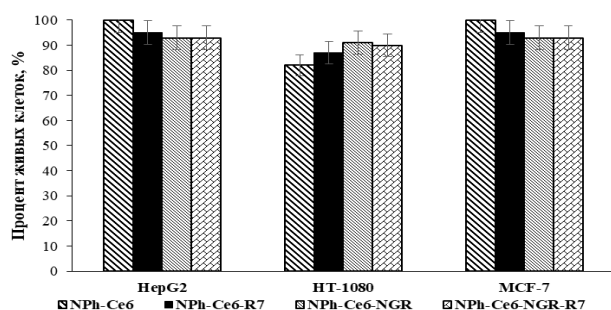


Рисунок 6.

Цитотоксичность (без воздействия света) хлорина еб при концентрации 5 мкг/мл в различных системах доставки на клеточных линиях HepG2, HT-1080 и MCF-7 (% живых клеток в среде, по сравнению с контролем – без добавления композиций Себ).

Следует отметить также, что «темновая» цитотоксичность не увеличивалась даже при 4х-кратном повышении концентраций (до 20 мкг/мл). Наряду с этим, обеспечиваемое включением

указанных пептидов бóльшее накопление ФС в опухолевых клетках, особенно с проникающим пептидом R7 (рис. 5), и повышенная активность этих систем доставки (табл. 6) позволят вводить меньшие дозы, что также снизит проявления побочной неспецифической цитотоксичности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ограничения, существующие для применения в противоопухолевой ФДТ фотосенсибилизатора хлорина еб, - недостаточная селективность, фототоксический эффект и относительно низкая фотоиндуцированная активность, - могут быть преодолены путём включения его в ультрамалые НЧ из соевого фосфолипида, в основном, фосфатидилхолина, с диаметром менее 30 нм. Себ, включенный в такие НЧ, сохраняет спектральные характеристики, способность к генерации АФК, проявляет бóльшую фотоиндуцированную активность по отношению к опухолевым клеткам. При внутривенном введении мышам с опухолью LLC он показывает бóльшее накопление в опухоли и более быстрый клиренс, чем свободный ФС. Показано также его меньшее поступление в здоровые ткани и ускоренное выведение из них.

Присоединение к таким НЧ специфических пептидов способствовало направленному транспорту и большему накоплению Себ в опухолевых клетках. Был использован пептид с NGR-мотивом, выполняющий за счёт аффинности к экспрессируемому на ряде опухолей белку CD13 векторную роль, и клеточно проникающий пептид гептааргинин (R7). На трёх линиях клеток показано стимулирующее влияние присоединения этих пептидов (в отдельности и в сочетании) на накопление Себ в клетках и его действие. Характер влияния – присоединение к клеточной поверхности, проникновение внутрь клетки (интернализация) и степень активации фотоиндуцируемого эффекта – зависел от включённого пептида и отличался для разных культур. Так, NGR повышал накопление и интернализацию только для клеток с экспрессией CD13 (HT-1080 и HerG2). Основным же эффектом гептааргинина (R7) для всех трёх видов клеток оказалось повышение присоединения хлорина еб к клеточной поверхности, сопряженное с наибольшей стимуляцией его фотоиндуцируемого действия. Вклад в него неспецифической цитотоксичности, без воздействия света, был небольшим и одинаковым для всех разработанных композиций.

Проведение в дальнейшем экспериментов на различных моделях опухолей *in vivo* позволит выявить наиболее эффективную из разработанных систем. Дополнительным их преимуществом является удобство использования и стабильность при длительном хранении в форме дозированного сухого лиофилизированного порошка с полным восстановлением свойств при регидратации. Полученные данные о повышении фотоиндуцированной активности хлорина еб при его включении в фосфолипидные наночастицы, снабжённые специфическими пептидами

с клеточно проникающими и адресными свойствами, свидетельствуют о перспективности разработанных направленных систем для повышения эффективности фотодинамической терапии.

## ВЫВОДЫ

1. На основе разработанной ранее технологии получена композиция хлорина еб, включенного в наночастицы из соевых фосфолипидов с диаметром менее 30 нм с сохранением фотодинамических свойств этого фотосенсибилизатора и повышенным действием на опухолевые клетки в культуре, что подтверждено снижением величины ИК<sub>50</sub>.

2. При внутривенном введении фосфолипидных наночастиц с хлорином еб мышам с опухолью LLC наблюдалось большее его накопление в опухолевой ткани и меньшее в коже и ускоренное выведение из крови по сравнению со свободным хлорином еб. При введении здоровым животным препарат раньше поглощался печенью и почками и быстрее выводился, а также меньше проникал в ткани кожи и мышц.

3. Разработаны оптимизированные варианты композиции с присоединением к наночастицам с хлорином еб клеточно проникающего пептида гептааргинина (R7), векторного пептида с NGR-мотивом (Asn-Gly-Arg), аффинного к белку CD13 опухолей, или их сочетания.

4. Для систем с NGR показано повышенное накопление хлорина еб и интернализация в опухолевых клетках с экспрессией CD13 (HT-1080 и HerG2) и отсутствие эффекта в клетках без неё (MCF-7). Включение гептааргинина (R7) повышало присоединение хлорина еб к поверхности всех трёх видов клеток.

5. Присоединение к наночастицам гептаргинина или его сочетание с NGR повышало фотоиндуцированную активность включенного хлорина еб на трёх видах опухолевых клеток (HT-1080, HerG2 и MCF-7), приводя к дополнительному снижению величин ИК<sub>50</sub> по сравнению с фосфолипидной нанокомпозицией без пептидов.

6. Включение хлорина еб в фосфолипидные наночастицы, как и присоединение к ним пептидов R7 и/или NGR, не влияло на неспецифическую, без облучения светом, цитотоксичность хлорина еб.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Публикации:*

1. **Kostryukova L.V.**, Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Ipatova O.M. Comparison of a new nanoform of the photosensitizer chlorin e6, based on plant phospholipids, with its free form // FEBS Open Bio. – 2018. – V. 8. – № 2. – P. 201-210.

2. Прозоровский В.Н., Торховская Т.И., **Кострюкова Л.В.**, Ипатова О.М. Использование специфических пептидов для адресной доставки наночастиц с противоопухолевыми лекарствами (обзор) // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 3-18;
3. Прозоровский В.Н., **Кострюкова Л.В.**, Короткевич Е.И., Торховская Т.И., Морозевич Г.Е., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. Проникновение в опухолевые клетки фото-сенситизатора хлорина е6 в составе фосфолипидных наночастиц, при конъюгации с гексапептидом, содержащим последовательность NGR //Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – Т. 1.– № 4. – С.00063;
4. а) **Кострюкова Л.В.**, Короткевич Е.И., Морозевич Г.Е., Колесанова Е.Ф., Мельникова М. В., Филатова Ю. В., Торховская Т.И., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. Влияние клеточно-проникающего аргининового пептида на взаимодействие с опухолевыми клетками фотосенситизатора хлорина е6, включенного в фосфолипидные наночастицы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167. – № 3. – С. 319-323;  
б) **Kostryukova L.V.**, Korotkevich E.I., Morozevich G.E., Kolesanova E.F., Mel'nikova M.V., Filatova Y.V., Torkhovskaya T.I., Prozorovskii V.N., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. Effect of Cell-Penetrating Arginine Peptide on Interaction of Photosensitizer Chlorin e6 Incorporated into Phospholipid Nanoparticles with Tumor Cells//Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2019. – V.167 – №3. – P.347-350;
5. а) **Кострюкова Л.В.**, Плютинская А.Д., Панкратов А.А., Короткевич Е.И., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Торховская Т.И., Терешкина Ю.А. Хлорин е6 в фосфолипидных наночастицах со специфическими адресными и проникающими пептидами как перспективная композиция для фотодинамической терапии злокачественных новообразований//Биомедицинская химия. – 2019. – Т.65 – №6. – С. 507-512;  
б) **Kostryukova L.V.**, Plyutinskaya A.D., Pankratov A.A., Korotkevich E.I., Prozorovskiy V.N., Tikhonova E.G., Torkhovskaya T.I., Teryoshkina Yu.A. Chlorine e6 in Phospholipid Nanoparticles with Specific Targeting and Penetrating Peptides as Prospective Composition for Photodynamic Therapy of Malignant Neoplasms // Biochem. Moscow Suppl. Ser. B. – 2020. – V. 14. – № 1. – P. 174 – 179;
6. Torkhovskaya T.I., **Kostryukova L.V.**, Tereshkina Yu.A., Tikhonova E.G., Morozevich G.E., Plyutinskaya A.D., Lupatov A.Yu., Pankratov A.A. Chlorin e6 embedded in phospholipid nanoparticles equipped with specific peptides: Interaction with tumor cells with different aminopeptidase N expression // Biomedicine &Pharmacotherapy. – 2021. – V. 134. – P. 111154.
7. Патент РФ № 2535054, МПК А61К 31/409, А61К 47/26, А61К 47/30, А61К 47/44, В82В 1/00, В82У 5/00. Способ получения композиции для фотодинамической терапии на основе хлорина е6, включенного в фосфолипидные наночастицы / Арчаков А.И., Ипатова О.М.,

- Прозоровский В.Н., Пономарев Г.В., Стрекалова О.С., Медведева Н.В., Тихонова Е.Г., Кострюкова Л.В.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «ИБМХ» РАМН - № 2013123762/15; заявл. 24.05.2013, опубл. 10.12.2014, Бюл. №34.
8. Патент РФ №2576025, МПК А61К 31/409, А61К 47/26, А61К 47/30, А61К 47/44, В82В 1/00, В82У 5/00, А61J 3/00. Способ получения композиции для фотодинамической терапии в форме фосфолипидных наночастиц на основе глюкаминовой соли хлорина Е6, мальтозы и фосфатидилхолина / Арчаков А.И., Ипатова О.М., Прозоровский В.Н., Дружиловская О.С., Медведева Н.В., Тихонова Е.Г., Кострюкова Л.В., Кудинов В.А., Санжаков М.А.; заявитель и патентообладатель ФГБУ «ИБМХ» РАМН - №2014131601/15, заявл. 30.07.2014, опубл. 27.02.2016, Бюл. №6.
9. Патент РФ №2747485, МПК А61К 31/409, А61К 47/30, А61К 47/62, В82В 1/00, В82У 5/00. Фармацевтическая композиция, включающая хлорин е6 в составе фосфолипидных наночастиц, с использованием специфического и проникающего пептидов как адресных молекул для направленного транспорта / Прозоровский В.Н., **Кострюкова Л.В.**, Короткевич Е.И., Терешкина Ю.А., Тихонова Е.Г., Худоклинова Ю.Ю.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» - №2020116793, заявл. 18.05.2020, опубл. 05.05.2021, Бюл. №13.

***Материалы конференций:***

10. **Кострюкова Л.В.**, Медведева Н.В., Тихонова Е.Г., Прозоровский В.Н., Ипатова О.М. «Изменение некоторых фармакокинетических свойств хлорина Е6 при включении в фосфолипидные наночастицы» // Сборник трудов Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности», 18-20 сентября 2013 года, г. Санкт-Петербург – СПб.: ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА России, 2013. – С. 65-66.
11. **Кострюкова Л.В.**, Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Вахрушева С.И., Тихонова Е.Г. Нано-форма хлорина Е6: физико-химические и биологические свойства // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни», 18-20 марта 2014 года, Москва. – М: Издательство: Закрытое акционерное общество М., Издательство:"Экспо-биохим-технологии" – С. 50-51.
12. **Кострюкова Л.В.**, Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г. «Некоторые фармакокинетические свойства композиции хлорина Е6, включенного в фосфолипидные наночастицы» //Материалы X Молодёжной Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука XXI века:

новый подход», 23-24 июля 2014, г. Санкт-Петербург. – СПб.: Научно-издательский центр «Открытие», 2014. – С.43-47.

13. **Кострюкова Л.В.**, Ипатова О.М., Прозоровский В.Н., Медведева Н.В., Тихонова Е.Г., Изменение кожной фототоксичности хлорина Е6 при его введении в фосфолипидных наночастицах» // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», 31 марта и 1 апреля 2015, Москва: Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14(1). – С.97.
14. Кудинов В.А., **Кострюкова Л.В.**, Прозоровский В.Н., Ипатова О.М., Медведева Н.В. «Фармакокинетические свойства хлорина е6, включенного в состав фосфолипидных наночастиц» // Материалы IV Всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика», 25-26 сентября 2015, г. Санкт-Петербург: Фотодинамическая терапия и фотодиагностика. – 2015. – Специальный выпуск – С.17.
15. **Кострюкова Л.В.**, Прозоровский В.Н., Ипатова О.М., Медведева Н.В. «Оценка окислительных свойств хлорина Е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы» // Сборник тезисов I Всероссийской конференции с международным участием «ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И МЕДИЦИНА», 09–12 ноября 2015, г. Москва – М.: Печатный дом «КАСКОН», 2015. – С. 126.
16. **Кострюкова Л.В.**, Короткевич Е.И., Прозоровский В.Н., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Ипатова О.М. «Эффективность новой композиции наноформы хлорина е6 с проникающим пептидом в экспериментах *in vitro*» // Сборник трудов III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности», 05–07 сентября 2018, г. Санкт-Петербург – СПб.: ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА России, 2018. – С.107-108.
17. **Кострюкова Л.В.**, Терешкина Ю.А. Эффективность системы адресной доставки на основе специфических пептидов для хлорина е6 в эксперименте *ex vivo* // Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2019». Москва. Россия, 2019. [Электронный ресурс].

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ:** Се6 - хлорин е6; АФК-активные формы кислорода; ВЭЖХ – высоко эффективная жидкостная хроматография, ГЖХ – газо-жидкостная хроматография, Глу<sub>восст</sub>- глутатион восстановленный, ЖК - жирные кислоты, МС – масс-спектрометрия, НЧ – наночастицы, ТФУ - трифторуксусная кислота; ФДТ-фотодинамическая терапия; ФС - фотосенсибилизатор; ФСБ - фосфатно-солевой буфер, DSPE – дистеароилфосфатидилэтаноламин, Peg –полиэтиленгликоль. LLC-карцинома легкого Льюиса; LC/MS – жидкостная хроматография с масс-спектрометрией.