

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ
В.Н. ОРЕХОВИЧА»

На правах рукописи

Кострюкова Любовь Викторовна

ФОСФОЛИПИДНАЯ НАНОСИСТЕМА НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРИНА E6 К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ

Специальность 03.01.04. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
Торховская Т.И.

Москва - 2021

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Фотодинамическая терапия и ее применение при лечении онкологических заболеваний	12
<i>1.1.1. Принцип фотодинамической терапии и механизм её противоопухолевого действия</i>	<i>12</i>
<i>1.1.2. Биологические эффекты фотохимических реакций</i>	<i>15</i>
<i>1.1.3. Фотосенсибилизаторы (ФС)</i>	<i>15</i>
<i>1.1.3.1. Выявление фотодинамических свойств и возможности использования в онкологии. Первые практически используемые фотосенсибилизаторы</i>	<i>15</i>
<i>1.1.3.2. Требования к свойствам фотосенсибилизатора для использования в ФДТ</i>	<i>18</i>
<i>1.1.3.3. Расширение спектра используемых фотосенсибилизаторов – фотосенсибилизаторы с оптимизированными свойствами («фотосенсибилизаторы II поколения»)</i>	<i>18</i>
<i>1.1.3.4. Недостатки имеющихся ФС, ограничивающие их клиническое применение</i>	<i>23</i>
1.2. Фотосенсибилизаторы, снабженные системой доставки в опухоли («ФС III поколения»)	24
<i>1.2.1. Конъюгаты хлорина еб. Направленная («таргетная») доставка ФС в опухоли</i>	<i>24</i>
<i>1.2.2. Включение хлорина еб в транспортные системы</i>	<i>26</i>
<i>1.2.2.1. Хлорин еб в липосомальных системах</i>	<i>26</i>
<i>1.2.2.2. Различные варианты наночастиц с хлорином еб. Использование адресных фрагментов</i>	<i>30</i>
1.3. Использование специфических пептидов как эффективный путь развития систем доставки лекарств в опухоли	32
<i>1.3.1. Адресные (аффинные к опухолям) пептиды</i>	<i>33</i>
<i>1.3.2. Клеточно проникающие пептиды</i>	<i>37</i>
<i>1.3.3. Сочетание клеточно проникающих и адресных пептидов</i>	<i>38</i>
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Основные материалы. Используемые реагенты и растворители	40
2.2. Биологические объекты	41

2.2.1. Клеточные культуры	41
2.2.2. Животные	41
2.2.3. Модель опухоли	42
2.3. Методы	42
2.3.1. Получение композиций хлорина еб	42
2.3.1.1. Получение композиции хлорина еб, снабженного фосфолипидной системой транспорта (фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб) - NPh-Себ	42
2.3.1.2. Получение композиции хлорина еб в фосфолипидных наночастицах, снабженных адресным пептидом с NGR мотивом - NPh-Себ-NGR	43
2.3.1.3. Получение композиции хлорина еб в фосфолипидных наночастицах, снабженных клеточно-проникающим пептидом гептааргинином - NPh-Себ-R7	45
2.3.1.4. Получение композиции хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы с адресным и проникающим пептидными фрагментами - NPh-Себ-NGR-R7	45
2.3.2. Изучение физико-химических свойств композиций хлорина еб	45
2.3.2.1. Определение размера частиц и дзета-потенциала	45
2.3.2.2. Определение спектров поглощения композиций хлорина еб	46
2.3.2.3. Количественное определение содержания хлорина еб в фосфолипидных наноконпозициях методом ВЭЖХ	46
2.3.2.4. Определение эффективности встраивания хлорина еб в наночастицы	47
2.3.3. Изучение окислительной способности хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы	47
2.3.3.1. Анализ жирных кислот методом ГЖХ-МС	47
2.3.3.2. Определение окислительной способности хлорина еб в системе глутатиона восстановленного методом LC/MS	48
2.3.4. Определение влияния присоединения пептидов к наночастицам с хлорином еб на его накопление и проникновение в опухолевые клетки	49
2.3.4.1. Определение экспрессии аминопептидазы N (CD13) на поверхности культивируемых опухолевых клеток как белка-мишени для адресного пептида NGR	49
2.3.4.2. Определение накопления в культивируемых клетках Себ, вносимого в составе композиций с фосфолипидными наночастицами	50
2.3.5. Определение цитотоксичности и фотоиндуцированной активности хлорина еб в фосфолипидных наночастицах in vitro	51
2.3.5.1. Исследование цитотоксического действия хлорина еб (без воздействия света) ..	51

2.3.5.2. <i>Определение фотоиндуцированной активности</i>	52
2.3.6. Анализ накопления хлорина еб в органах животных	52
2.3.6.1. <i>Определение накопления хлорина еб в ткани опухоли</i>	52
2.3.6.2. <i>Исследование фармакокинетики хлорина еб в крови при введении мышам с опухолью</i>	53
2.3.6.3. <i>Исследование динамики распределения хлорина еб по органам и тканям мыши по анализу флуоресценции</i>	54
2.3.6.4. <i>Определение динамики накопления хлорина еб в печени и почках здоровых животных, в экспериментах на крысах методом масс-спектрометрии</i>	54
2.3.7. Статистическая обработка результатов	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	56
3.1. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб	56
3.1.1. Конпозиция хлорина еб, снабженного фосфолипидной системой транспорта - физические свойства	56
3.1.2. Фотодинамическая активность хлорина еб в фосфолипидных наночастицах	58
3.1.2.1. <i>Окисление ненасыщенных жирных кислот ФЛ в содержащих хлорин еб наночастицах как показатель образования активных форм кислорода</i>	59
3.1.2.2. <i>Оценка окислительной способности хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы, по действию на восстановленный глутатион</i>	60
3.1.3. Влияние встраивания хлорина еб в фосфолипидные наночастицы на его действие на опухолевые клетки <i>in vitro</i> (фотоиндуцированное и неспецифическое цитотоксическое действие)	62
3.1.4. Исследование накопления хлорина еб в тканях мышей с опухолью LLC при его внутривенном введении в составе композиции с ФЛ наночастицами (NPh-Se6)	64
3.1.4.1. <i>Накопление хлорина еб в ткани опухоли</i>	64
3.1.4.2. <i>Фармакокинетика хлорина еб в крови</i>	64
3.1.4.3. <i>Динамика содержания хлорина еб в коже мышей с опухолью LLC, определенная по его флуоресценции</i>	66
3.1.5. Распределение хлорина еб по органам и тканям при введении в составе ФЛ НЧ	68
3.1.5.1. <i>Динамика содержания хлорина еб в коже, жировой ткани, селезенке и мышцах у мышей, определённая по его флуоресценции</i>	68

3.1.5.2. Масс-спектрометрическое определение содержания хлорина еб в печени и почках у крыс	70
3.2. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб с адресным и проникающим пептидными фрагментами для повышенной доставки к опухолевым клеткам	72
3.2.1. Получение и характеристика композиций	72
3.2.1.1. Выбор адресных фрагментов и их комбинаций для направленного транспорта фосфолипидных наночастиц с хлорином еб.....	73
3.2.1.2. Присоединение специфических пептидов к фосфолипидным наночастицам.....	74
3.2.1.3. Физико-химические характеристики фосфолипидных наночастиц с хлорином еб, снабженных пептидными фрагментами.....	77
3.2.2. Взаимодействие разработанных пептид-содержащих фосфолипидных наноконпозиций хлорина еб с опухолевыми клетками	79
3.2.2.1. Выбор клеточных линий для оценки взаимодействия с клетками векторных композиций хлорина еб на основании экспрессии аминопептидазы N/CD13	79
3.2.2.2. Эффективность накопления хлорина еб в опухолевых клетках при его включении в фосфолипидные наночастицы с пептидными фрагментами	81
3.2.2.3. Оценка фотоиндуцированной активности образцов хлорина еб в различных системах доставки <i>in vitro</i>	85
3.2.2.4. Оценка цитотоксического действия фосфолипидных композиций хлорина еб без воздействия света	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ.....	92
ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ.....	93
БЛАГОДАРНОСТИ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- APN (CD13) – аминопептидаза N
- AUC_{0→∞} – площадь под кривой «концентрация-время» (area under curve)
- Се6 – хлорин е6
- Cl – клиренс
- DSPE – дистеароилфосфатидилэтаноламин
- LLC- карцинома легкого Льюиса
- LC/MS – жидкостная хроматография с масс-спектрометрией
- NPh-Се6 – композиция хлорина е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы
- NPh-Се6-R7 – композиция хлорина е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы с клеточно-проникающим пептидом (гептааргинином)
- NPh-Се6-NGR – композиция хлорина, е6 встроенного в фосфолипидные наночастицы со специфическим пептидом, содержащим NGR-мотив
- NPh-Се6NGR-R7 – композиция хлорина е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы со специфическим, содержащим NGR-мотив, и проникающим (гептааргинин) пептидами
- АФК – активные формы кислорода
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- В/в – внутривенное введение
- ГЖХ – газо-жидкостная хроматография
- ГЛУ_{восст} – глутатион восстановленный
- ЖК – жирные кислоты
- ИК₅₀ – ингибирующая концентрация, вызывающая 50% гибель клеток в культуре
- МС – масс-спектрометрия
- НЧ – наночастицы
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ТФУ – трифторуксусная кислота
- ФДТ – фотодинамическая терапия
- ФЛ – фосфолипиды
- ФСБ – фосфатно-солевой буфер
- ФХ – фосфатидилхолин
- ФС – фотосенсибилизатор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы данной работы обусловлена двумя факторами. Во-первых, это чрезвычайно высокая частота онкологических заболеваний и вызванной ими высокой смертности населения. Во-вторых, большое внимание, уделяемое в мировых исследованиях развитию и совершенствованию новых эффективных систем доставки лекарств, особенно противоопухолевых, с использованием современных нанотехнологий и специфических, недавно выявленных веществ, в основном пептидов, с адресными и клеточно-проникающими свойствами, повышающих направленное клеточное накопление транспортируемого лекарственного агента.

Среди различных терапевтических подходов противоопухолевой терапии всё большее место занимает относительно новый метод – фотодинамическая терапия (ФДТ) [1, 2]. Он заключается во введении в организм особого типа веществ, называемых фотосенсибилизаторами (ФС) [3] и последующем локальном облучении места опухоли. Под действием облучения ФС подвергается специфическим реакциям, инициируя цепь процессов, приводящих к образованию различных активных форм кислорода (АФК). Последние оказывают повреждающее действие на клеточные структуры, приводя к гибели опухолевых клеток. Различные типы ФС представляют собой в основном соединения на основе порфиринов – цикла из четырех пиррольных колец (ароматических пятичленных азотистых гетероциклов), с разными заместителями и их сочетаниями. Исследования последних десятилетий позволили выбрать из них наиболее эффективные, получить их наиболее активные производные, что привело к созданию ряда используемых в медицинской практике лекарственных препаратов [4]. При этом для преодоления трудностей, связанных с низкой растворимостью, для некоторых ФС разрабатывались липосомальные формы [5] или получали водорастворимые производные. В частности, для одного из наиболее распространённых и широко используемых ФС - хлорина еб, содержащего тетрапиррольное ядро с тремя карбоксильными группами [6], - разработана и используется его форма в виде соли с N-метил-глюкамином [7].

В то же время недостатком хлорина еб, как и других ФС, является попадание некоторого его количества в здоровые ткани, в том числе и кожу, и в течение некоторого времени воздействие света оказывает негативное действие [8]. Поэтому для улучшения его свойств целесообразна разработка лекарственных форм со значительно бóльшим накоплением в опухолях, что позволило бы снизить вводимые дозы лекарства. Эффективным путем для этого было бы повышение направленности вводимого препарата, бóльшего его проникновения в опухолевые клетки. Такие разработки проводятся в настоящее время для других противоопухолевых лекарств, в основном цитостатиков. В их основе лежит выявленная

относительно недавно для клеток многих опухолей и опухолевых сосудов повышенная по сравнению с нормальными клетками экспрессия ряда белков. Впоследствии был обнаружен ряд короткоцепочечных специфических пептидов, обладающих аффинностью к ним [9]. Эти пептиды в ряде работ использовали в качестве адресных, векторных фрагментов, конъюгируемых с противоопухолевым лекарством или транспортирующим его переносчиком – наночастицами или липосомами [9, 10]. На сегодняшний день больше всего исследований в этой области посвящено липосомам, и в ряде работ авторы пытались улучшить их транспортирующие свойства путем присоединения упомянутых пептидов. При этом наряду с адресными пептидами, исследуются также пептиды с другой специфичностью – клеточно-проникающие [11], способные проходить внутрь клетки через мембрану, внося с собой и присоединённые к ним лекарственные фрагменты.

В отношении ФДТ и используемых в ней ФС, в частности хлорина еб, из названных подходов на сегодняшний день проводились исследования только по включению его в различные наночастицы, в основном липосомы [12, 13, 14]. Возможности, предоставляемые присоединением к ним специфических пептидов, почти не исследовались. Вместе с тем, проблема повышения избирательности ФС, их большего накопления в опухолевых клетках остается актуальной. В немногих проводимых в этой области работах проводили конъюгацию с антителами, аптамерами и в нескольких случаях с рядом пептидов [15-18]. Полученные позитивные результаты, позволили продолжить исследования в этой области. Значимым фактором является и размер транспортирующих частиц: используемые в большинстве случаев липосомы с диаметром обычно более 100 нм быстро поглощаются клетками РЭС и выводятся из циркуляции, поэтому размер частиц оптимальной транспортной системы должен быть минимальным, по возможности в нанодиапазоне. Такими переносчиками могли бы быть, в частности, наночастицы из соевого фосфатидилхолина с размером 20-30, показавшие себя в разработанных в ИБМХ композициях [19, 20] как эффективная система доставки ряда лекарств. Показана 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 в них фотосенсибилизатора 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 липидов 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, гептааргинаина (R7) и пептида с последовательностью NGR (Asn-Gly-Arg), аффинного к белку CD13 опухолевых клеток. Исследовать их физико-химические, в т. ч. спектральные характеристики;

4. На трех линиях опухолевых клеток, отличающихся по экспрессии CD13 (HepG2, HT-1080, MCF-7), исследовать влияние присоединения к наночастицам пептидов R7, NGR или их сочетания на общее накопление хлорина еб в клетках, а также в отдельности на его присоединение к поверхности и проникновение в клетки (интернализацию).

5. Исследовать фотоиндуцированную и «темновую» (без облучения светом) токсичность трёх разработанных пептид-содержащих наносистем в сравнении с исходной композицией хлорина еб в фосфолипидных наночастицах.

Научная новизна.

Впервые получены и детально охарактеризованы по физико-химическим свойствам и воздействию *in vitro* и *in vivo* ультрамалые фосфолипидные наночастицы с включенным в них ФС хлорином еб.

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

Впервые получены три фосфолипидные композиции хлорина еб в фосфолипидных НЧ с включенными специфическими и клеточно-проникающими пептидами, повышающими доставку лекарств в опухолевую клетку.

Впервые изучено влияние присоединения выбранных пептидов к наночастицам на взаимодействие транспортируемого ими хлорина еб с тремя линиями опухолевых клеток: на

присоединение фотосенсибилизатора к клеткам, проникновение в них и проявления цитостатического действия, как фотоиндуцированного, так и неспецифического (без облучения).

По результатам работы получено 3 патента.

Теоретическая и практическая значимость

На примере гептааргинаина (R7) показана возможность присоединения к содержащим хлорин еб наночастицам положительно заряженных пептидов, что, по всей вероятности, обусловлено электростатическим взаимодействием аргинина с карбоксильными группами встроенного в НЧ хлорина еб. Помимо известного клеточно-проникающего действия олигоаргининов, показано, что, будучи встроенным в фосфолипидные наночастицы, пептид R7 способствует в основном их присоединению к клеточной поверхности, о чём свидетельствовало повышение уровня присоединенного к клеткам хлорина еб. Наблюдаемый параллелизм степени присоединения хлорина еб и увеличения индуцируемой последующим облучением гибели клеток подтверждает, что основной точкой приложения его повреждающего действия, как и других ФС, является клеточная мембрана [21, 22] с определённым вкладом и внутриклеточных повреждений, возможно, за счёт проникновения в клетку образующихся активных форм кислорода [23]. Полученные результаты дают предпосылки для создания новых улучшенных стабильных при хранении эффективных препаратов хлорина еб с повышенной направленностью на опухолевые клетки и ускоренным выведением из здоровых тканей путем подбора комбинаций клеточно-проникающих и адресных пептидов, присоединённых к транспортирующим его фосфолипидным НЧ.

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

- Присоединение к наночастицам клеточно-проникающего пептида R7, адресного пептида, содержащего NGR-мотив, или их сочетания повышает общее накопление встроенного хлорина еб в опухолевых клетках; при этом пептид, содержащий NGR-мотив, оказывает влияние только для клеток 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 гептааргина 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 в работе современных высокоточных аналитических методов, адекватных поставленным задачам и измеряемым параметрам. Научные положения и выводы, представленные в работе, 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 Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2013); на X молодёжной международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука XXI века: новый подход» (Санкт-Петербург 2014); на Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014); на I Всероссийской конференции с международным участием «ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И МЕДИЦИНА» (Москва, 2015); на IV всероссийской конференции «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Санкт-Петербург, 2015); на XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015); на 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 3 статьи в рецензируемых базах данных РИНЦ, Web of Science и Scopus, 3 статьи в журналах из перечня рецензируемых научных журналов ВАК Минобрнауки РФ, 3 патента РФ и 8 тезисов в материалах российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фотодинамическая терапия и ее применение при лечении онкологических заболеваний

Онкологические болезни являются одними из распространенных заболеваний в мире и занимают второе место среди причин смертности. Ежегодно примерно у 10 млн. человек в мире диагностируются онкологические заболевания, а 8 млн. умирает от них. Заболевания включают в себя опухолевые процессы различной локализации и этиологии. В настоящее время болезнь «омолодилась» и несёт серьезную угрозу человечеству, поэтому поиск путей профилактики, раннего выявления и лечения представляет актуальную проблему. Несмотря на огромные усилия исследователей и достигнутые в результате этого некоторые позитивные результаты – проявляющиеся в увеличении частоты случаев повышения продолжительности жизни пациентов –, на сегодняшний день не существует универсальных, достаточно эффективных подходов для лечения этой группы заболеваний [2, 24, 25].

В последние два десятилетия, наряду с хирургическими методами и наиболее используемым терапевтическим подходом, с применением ряда цитостатических препаратов, постепенно входит в практику метод фотодинамической терапии (ФДТ) [1-3]. Его преимуществами перед общепринятыми методами лечения злокачественных новообразований считают избирательность локального воздействия, допустимость многократного применения, относительно низкую стоимость. Однако, широкому применению его на сегодняшний день препятствует ряд методических проблем из-за некоторых побочных эффектов, на решение которых направлены исследования многих лабораторий.

1.1.1. Принцип фотодинамической терапии и механизм её противоопухолевого действия

ФДТ является разновидностью химиотерапии. Этот подход основан на уникальном свойстве ряда веществ, в основном из группы порфиринов - циклических соединений, образованных четырьмя пиррольными кольцами (каждый из 4х атомов углерода, и одного атома азота – рис. 1), - подвергаться под действием света модификациям, с индукцией активных форм кислорода (АФК), оказывающих цитотоксическое действие [3]. Последствия таких реакций задолго до выявления их механизма наблюдались ещё несколько десятилетий назад. В ряде работ наблюдалось их антимикробное действие [26-28], а в 1972 г. был показан противоопухолевый эффект *in vivo* - введение гематопорфирина крысам с экспериментальной глиомой с последующим воздействием суммарным белым светом вызывало регрессию опухоли [29]. Сходные результаты наблюдали впоследствии на других видах опухолей с

использованием производных гематопорфирина и с воздействием света разной длины волны [30-32].

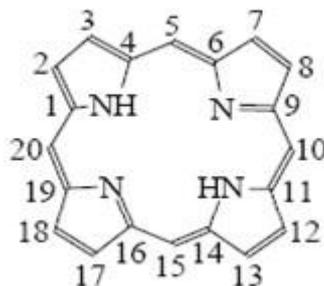


Рисунок 1. Структурная формула порфирина, по международной номенклатуре IUPAC [33]

Было обнаружено, что ответственным за возникающее при облучении цитотоксическое действие гематопорфиринов является в основном образующийся **синглетный кислород** [34]. Цепь реакций, приводящая к его образованию и детально исследованная в дальнейшем, получила название «фотосенсибилизации», а сами вещества, подвергающиеся ей под действием света, называют фотосенсибилизаторами [35-37].

В исследованиях многих авторов были выяснены реакции, приводящие к образованию синглетного кислорода, а также других активных форм кислорода (АФК), также оказывающих токсическое действие на опухолевые клетки [38]. Схема процессов, происходящих с фотосенсибилизатором при действии облучения, представлена на рисунке 2.

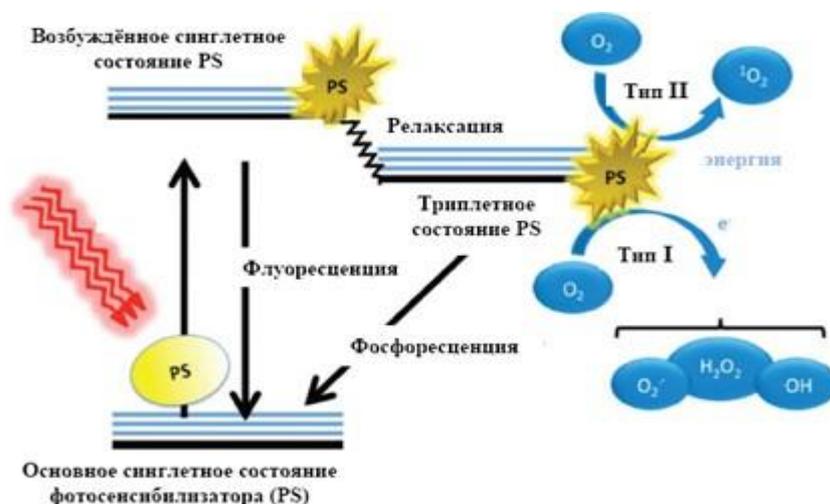


Рисунок 2. Схема процесса фотосенсибилизации [39]

Обычно молекула фотосенсибилизатора находится в стабильном синглетном электронном состоянии, т. е. представляет собой систему с суммарным спином электронов, равным 0. (PS на рисунке 2). При поглощении кванта света она переходит сначала в короткоживущее возбуждённое синглетное, а затем в более долгоживущее триплетное возбуждённое состояние.

Далее возможны два типа реакций [40]. В реакциях первого типа (**Тип I** на рис. 2) фотосенсибилизатор в возбужденном состоянии реагирует непосредственно с субстратом тканей, вызывая генерацию цитотоксических свободных радикалов) [41, 42]. Эти процессы включают реакции возбужденного ФС, протекающие с межмолекулярным переносом электрона или атома водорода и приводящие к образованию различных токсичных для клетки активных форм кислорода (АФК). Начальной формой активного кислорода, образующегося в фотоокислительных процессах первого типа, является супероксид анион радикал (O_2^-). Помимо наличия собственного окислительного потенциала, главная его опасность для живых систем заключается в генерации им других АФК, особенно, высоко реакционноспособных гидроксильных радикалов H_2O_2 и OH . Таким образом, в результате реакций радикалов с кислородом генерируется сложная смесь активных интермедиатов, вызывающих окислительную деструкцию биомолекул. Образующиеся АФК вызывают неспецифическое повреждение всех клеточных компонентов, потенциально подверженных окислительным реакциям.

Основное же значение в фотодинамических процессах придается реакциям второго типа (**Тип II** на рисунке 2), по которому работает большинство фотосенсибилизаторов, применяющихся сегодня в медицинской практике в ФДТ. При этих реакциях происходит перенос энергии от возбужденного ФС на молекулярный кислород, находящийся в основном триплетном состоянии (соответствующем двум неспаренным электронным спинам). При этом происходит образование его **синглетного возбужденного состояния** (1O_2), которое является основным активным цитотоксическим фактором в ФДТ [40]. Источником синглетного кислорода является молекулярный кислород, постоянно присутствующий в живых биологических тканях. Молекула ФС снова переходит в основное невозбужденное состояние и может далее участвовать в фотохимической реакции, запускающей цепь процессов клеточного повреждения. Помимо мишеней в клетках, синглетный кислород может реагировать с самим фотосенсибилизатором, приводя к его необратимой деструкции (реакция фотообесцвечивания, фотобликинг (photobleaching) и уменьшению его активности, а, следовательно, и результативности ФДТ. Этот недостаток компенсируется правильным выбором дозы облучения [43-45], которая зависит от интенсивности облучающего света (падающего потока фотонов), концентрации фотосенсибилизатора, времени облучения и свойств ткани. При наличии в среде эффективных фотосенсибилизаторов синглетный кислород образуется под действием света в количестве, достаточном для проявления цитотоксического действия. При этом большинство реакций, которые идут с участием синглетного кислорода и других АФК, необратимы и приводят к повреждению межклеточного матрикса, к клеточной гибели путем апоптоза или некроза [15, 46].

1.1.2. Биологические эффекты фотохимических реакций

К биологическим эффектам ФДТ относятся как прямое цитотоксическое действие на опухолевую клетку в пределах зоны облучения, так и не прямое, на клетки сосудов опухоли, что приводит к нарушению микроциркуляции, вызывающему гипоксию опухолевой ткани [41]. На основании исследований механизмов повреждений, возникающих на ультраструктурном уровне, было показано, что основной точкой приложения повреждающего действия облучаемых светом фотосенсибилизаторов на клетки является клеточная мембрана. Повреждение её вызывает лизис клеток. При этом прекращается и их деление, так как, помимо цитоплазматической мембраны, под действием ФДТ могут повреждаться мембраны клеточных органелл: оболочка ядра, ядрышек, митохондрий, а также лизосомы, аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Под действием света в присутствии фотосенсибилизаторов происходит набухание митохондрий и их деструкция. Биохимические исследования выявили существенную инактивацию ферментов, ингибирование реакций окислительного фосфорилирования и снижение уровня АТФ-аз, обеспечивающих энергоснабжение клетки. Нарушение целостности лизосом и выход лизосомальных ферментов, разрушение митохондрий и связанные с этим нарушения окислительно-восстановительных процессов в клетке становятся причиной ее гибели. При этом наиболее восприимчивыми объектами в клетке, реагирующими с синглетным кислородом и подверженными действию образующихся АФК, являются ненасыщенные липиды мембран, холестерин, α -аминокислоты (триптофан) и нуклеиновые кислоты (содержащийся в них гуанин) [47]. В опытах *in vitro* показано, что локализация повреждения клеток при фотодинамическом воздействии зависит от продолжительности инкубации в среде с фотосенсибилизатором. После короткой обработки (1-2 часа) происходит нарушение целостности цитоплазматической мембраны, а при увеличении времени инкубации развиваются внутриклеточные повреждения [21, 22]. Степень их возрастает с интенсивностью возбуждающего света. При этом увеличивается общее потребление кислорода, с расходом некоторого его количества, содержавшегося в ткани, что тормозит клеточное дыхание, также способствуя тканевой гибели.

1.1.3. Фотосенсибилизаторы (ФС)

1.1.3.1. Выявление фотодинамических свойств и возможности использования в онкологии. Первые практически используемые фотосенсибилизаторы

Специфическая способность ряда веществ поглощать свет обусловлена наличием в их молекулах ряда хромофорных группировок. Это, в частности, азо-группа ($-N=N-$), нитрогруппа ($-NO_2$), нитрозогруппа ($-N=O$), в небольшой степени - сопряженные системы двойных связей и

ароматические группировки. К фотосенсибилизаторам относят те из содержащих их соединений, ответ которых на действие света связан с генерацией синглетного кислорода. Известно более сотни веществ, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами. Среди природных веществ фотосенсибилизаторами являются хлорофиллы, фикобилины, порфирины и промежуточные продукты их синтеза, ряд антибиотиков, хинин, рибофлавин и другие [48, 49]. Для целей ФДТ используют несколько типов ФС, представляющих собой различные варианты производных порфиринов. Это природные и синтетические тетрапиррольные соединения, производные порфина (макроцикла, образованного четырьмя пиррольными ядрами, связанными метиленовыми мостиками). Общая схема их строения представлена выше, на рисунке 1. Помимо самих порфиринов применяют также различные родственные им производные - на основе хлоринов (хлорины, бактериохлорины), а также фталоцианины и нафталоцианины [50].

Из всех порфиринов возможность применения для диагностики и терапии рака была ранее других исследована для **гематопорфиринов** – на моделях опухолей при облучении светом. Гематопорфирин — пигмент пурпурного цвета; образуется при действии на гемоглобин и гемоглобиногенные пигменты сильных кислот. В незначительных количествах он может встречаться в моче здорового человека. Формула его приведена на рисунке 3.

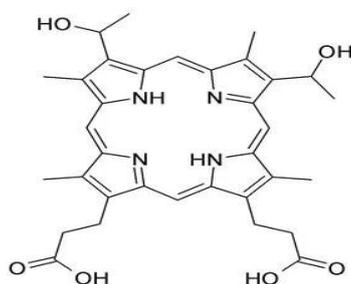


Рисунок 3. Структурная формула гематопорфирина

На его основе в 1960 году Липсон с сотрудниками получили так называемое "производное гематопорфирина" (HpD) [51]. Было показано, что этот продукт состоит из мономерных порфиринов, димеров и высокомолекулярных олигомеров. При попадании в клетку они подвергаются расщеплению по сложноэфирной и эфирной связям, высвобождая мономерные порфирины и вступая при действии света в фотохимические реакции [52].

Позднее, путем фракционирования гематопорфиринов был получен фотосенсибилизатор **Фотофрин**, представляющий собой смесь олигомеров гематопорфирина с числом мономеров от 2 до 6 [53]. Это первый препарат на основе гематопорфиринов, получивший официальное разрешение на применение в ФДТ [54, 55]. Впервые он был использован при лечении онкологических больных в 70-х гг. [56] и с тех пор широко используется [4], как и другие

аналогичные ему гематопорфирины [57]. В настоящее время на фармацевтическом рынке имеется несколько аналогов Фотофрина разной степени очистки: Фотокарцинорин (Китай), Фотосан (Германия), Фотогем (Россия) и Гематодрекс (Болгария). Препарат одобрен для лечения некоторых видов рака - рака пищевода, гортани; немелкоклеточного рака лёгкого и дисплазии высокой степени при пищеводе Барретта (предраковое заболевание, при котором плоский эпителий пищевода замещается нехарактерными цилиндрическими клетками). Преимуществами Фотофрина и его аналогов являются возможность их изготовления из широкодоступных растительных веществ и беспорная эффективность в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ [58].

Существенным вопросом, рассматривавшимся при исследовании гематопорфиринов и противоречиво освещаемым в литературе, является степень избирательности их накопления. В ряде работ отмечена способность производных гематопорфирина в большей степени накапливаться и удерживаться в опухолях, чем в других тканях [59]. При введении мышам с меланомой B16-F10 родственного гематопорфирина конъюгированного порфиринового димера (Oxdime) показано 5-10 кратное преобладание его уровня в плазме по сравнению с таковым в тканях, и отмечается существенное накопление ФС в опухолях [60]. Показано, что в крови производное гематопорфирина связывается с сывороточными белками, включая глобулины, альбумины и липопротеины, в том числе **липопротеины низкой плотности (ЛНП)**, способствующими через участие специфических рецепторов преимущественному связыванию с опухолевыми клетками [61]. В то же время доля фотосенсибилизатора, связывающегося с ЛНП, особенно для гидрофильных ФС, к которым относятся производные гематопорфирина, невелика [62]. В некоторой степени повышенном и более раннем накоплению его в опухолях может способствовать повышенная проницаемость и дефектность опухолевых сосудов [63]. Основная же роль в избирательности воздействия ФДТ принадлежит применяемому локальному облучению, запускающему фотохимическую реакцию.

Несмотря на продолжающееся использование производных гематопорфирина (Фотофрина и его аналогов) [57], отмечают и ряд их **недостатков**, из которых наиболее существенным является пик поглощения при относительно коротких длинах волн - 630 нм. Такой свет проникает в организм лишь на небольшую глубину, порядка 1 см, что недостаточно для поражения обширных и глубоко расположенных опухолей. Отмечают также (1) их сложный, трудно воспроизводимый состав; (2) относительно невысокую фотодинамическую активность; (3) недостаточную селективность; (4) длительный период выведения препарата (от 7 до 14 дней), что ввиду его фототоксичности, особенно для клеток кожи требует ограничения подверженности световому воздействию. Наличие этих **недостатков** стимулировало разработку

новых фотосенсибилизаторов, с оптимизированными свойствами, для повышения эффективности ФДТ и более удобного её практического осуществления.

1.1.3.2. Требования к свойствам фотосенсибилизатора для использования в ФДТ

Первые исследования используемых ФС, их позитивные результаты, а также трудности и проблемы, возникающие при их терапевтическом применении, позволили выявить основные необходимые их качества и свойства, которые способствовали бы получению оптимальных результатов при использовании в ФДТ. Для получения идеального фотосенсибилизатора были сформулированы следующие требования [64]:

Фотофизические: высокая абсорбция при длинах волн в диапазоне 700-850 нм, для максимального проникновения света в ткани, при отсутствии поглощения эндогенными хромофорами в клетке, включая некоторые аминокислоты и нуклеиновые кислоты [8].

Фотохимические:

- высокий квантовый выход синглетного кислорода (для высокой эффективности ФДТ);
- наличие флуоресцентных свойств, для возможности мониторинга его биораспределения.

Химические: высокая стабильность; однородность молекулярных видов, легкость синтеза; растворимость в воде (для обеспечения системного введения, без использования систем доставки).

Биологические: низкая темновая токсичность; фармакокинетика, соответствующая применению; селективное поглощение в тканях-мишенях, микролокализация на чувствительных клеточных/субклеточных мишенях (например, митохондриях) [65].

На настоящее время фотосенсибилизатора, отвечающего всем перечисленным требованиям нет. Вместе с тем, параллельно с широким использованием производных гематопорфирина, получивших в последние годы общее название «**фотосенсибилизаторов первого поколения**», проводятся активные разработки других, оптимизированных фотосенсибилизаторов, в большей степени отвечающих перечисленным требованиям, в первую очередь, с активностью в более длинноволновых областях.

1.1.3.3. Расширение спектра используемых фотосенсибилизаторов – фотосенсибилизаторы с оптимизированными свойствами («фотосенсибилизаторы II поколения»)

Для увеличения эффективности ФДТ были предложены соединения, обладающие, лучшими фотосенсибилизирующими свойствами и обеспечивающие увеличение глубины фотодинамического воздействия за счет смещения максимумов поглощения в более длинноволновую область спектра (более 650 нм) по сравнению с препаратами первого

поколения. В ходе исследований в этом направлении были разработаны новые группы ФС, названные в целом как «**фотосенсибилизаторы II поколения**». К ним относятся фталоцианины, бензопорфирины, производные хлорофилла, обладающие длинноволновым поглощением [64, 65].

Фталоцианины - макрогетероциклические соединения, содержащие цикл тетраазатетрабензопорфина; структурно родственны порфиринам. Структурная формула данных соединений представляет собой соединённые атомами азота четыре гетероцикла, каждый из которых сопряжён с бензольными кольцами. Родоначальник ряда - собственно фталоцианин, формула которого представлена на рисунке 4.

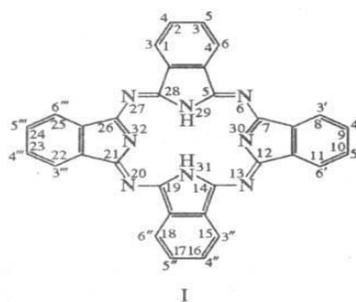


Рисунок 4. Структурная формула фталоцианина

Фталоцианины обладают рядом характеристик, необходимых для практического использования, в том числе красящими свойствами. Они поглощают свет в области 670 нм, однако плохо растворимы в воде [43]. Для повышения растворимости и биологической активности используют их комплексы с цинком, алюминием и кремнием. Компанией НИОПИК ГНЦ производится широко применяемый в клинике препарат **Фотосенс** на основе сульфозамещенного фталоцианина алюминия. Данный препарат показал высокую терапевтическую эффективность по отношению к различным видам и локализациям опухоли. Лечение им проводится в офтальмологии, при инфицировании ран, ряде кожных заболеваний [66]. Однако Фотосенс обладает существенным **недостатком** - длительной фототоксичностью, что требует тщательного соблюдения пациентами светового режима. Другим препаратом такого типа является сульфонируемый фталоцианин цинка, **Фталосенс**, максимум поглощения которого находится в области 690-695 нм. Показана его низкая кожная фототоксичность, а также возможность применения в более низких дозах.

Наиболее применяемым представителем другого типа ФС II поколения, **бензопорфиринов**, является фотосенсибилизатор Вертепорфин, используемый в ФДТ в виде моноацидного производного (BPD-MA, *benzoporphyrin derivative monoacid*), получаемого из порфирина [5]. Это производное, предложенное в конце 80-х годов А.М. Richter с соавт. в качестве нового ФС, показало ряд положительных, необходимых для ФС, свойств –

поглощение света при 693 нм, активное генерирование синглетного кислорода и химическую стабильность [67]. При этом ему свойственно значительно большее поглощение света, чем для гематопорфирина, что приводит к 10-кратному повышению цитотоксического эффекта на клеточных линиях [67]. Ценность **Вертепорфина** (чаще называемого в литературе как ВРD-МА) в качестве потенциального эффективного **ФС II поколения** была подтверждена в ряде исследований *in vitro* и *in vivo*, а также в клинических испытаниях [68, 69]. С начала 2000 г.г. ВРD-МА (инкапсулированный в липосомы¹) вошел в клиническую практику [70] и известен на фармацевтическом рынке как препарат **Visudyne** (Visudyne®, Novartis Pharma, Франция, Швейцария) [5]. Структурная формула его приведена на рисунке 5.

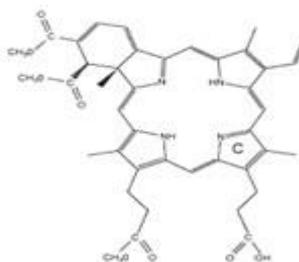


Рисунок 5. Структурная формула вертепорфина (Visudyne).

Было показано улучшение свойств ФС, в частности, снижение обесцвечивания при их приготовлении в виде комплексов с металлами, что привело к разработке ряда металлосодержащих ФС. В частности, был разработан и недавно разрешён к применению препарат **Тукад** - палладиевое производное бактериохлорина (Tookad, Израиль-ФРГ-Франция) с максимумом поглощения при 760 нм [71].

Наибольший интерес в настоящее время из **ФС II поколения** вызывают у исследователей и клиницистов ФС семейства **хлоринов**. Хлорин — это большое гетероциклическое ароматическое кольцо, ядро которого состоит из четырёх пирролов, соединённых попарно четырьмя метильными связями. В основе его химической структуры лежит тетрапиррольное ядро с одной восстановленной двойной связью в одном из пиррольных колец (рис. 6).

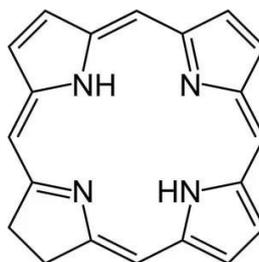


Рисунок 6. Химическая структура хлорина

¹Рассмотрение липосомальных форм фотосенсибилизаторов приведено в данном обзоре ниже, раздел 1.2.2.1.

Магний содержащие **хлорины** – хлорофиллы, - это главные светочувствительные пигменты в хлоропластах. Хлорины (или дигидропорфирины) являются производными природного хлорофилла *a*. Это гетерогенная группа препаратов, которые имеют спектр поглощения в диапазоне 640-700 нм и высокий квантовый выход синглетного кислорода (0,4–0,8) [6]. ФС группы хлоринов получают двумя путями: модификацией хлорофилла, получаемого из растительного сырья, и химическим синтезом [7, 72].

Упоминание хлорина как фотосенсибилизатора для ФДТ в научной литературе относится к 80-ым годам прошлого века. Одним из первых разрешённых препаратов на основе хлорина, был **Темопорфин** (в Европе – **Фоскан**) [73, 74]. Это мезо-тетрагидроксифенилхлорин (mTHPC) (рис. 7).

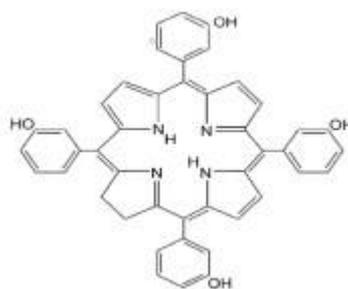


Рисунок 7. Молекулярная структура Темопорфина (Foscan)

Наиболее исследованными представителями группы хлоринов в плане применения для ФДТ являются **феофорбид *a*** и **хлорин *e6*** [6]. **Феофорбид *a*** представляет собой продукт распада природного хлорофилла *a*, обладающий большей устойчивостью, что существенно для применения в практике. Его получают при обработке хлорофилла *a* концентрированными кислотами, в результате чего происходит удаление иона Mg и отщепление этерифицирующего спирта. **Феофорбид *a*** характеризуется высокой темновой и световой стабильностью, обладает интенсивным максимумом поглощения в области 660 нм и высоким квантовым выходом синглетного кислорода [6, 75].

Хлорин *e6*

Наиболее распространённым хлорином, используемым в ФДТ, является другое производное хлорофилла – хлорин *e6*. Он образуется в результате анаэробного щелочного гидролиза феофорбида *a* или из метилфеофорбида (*a*) [76] и представляет собой производное, содержащее три карбоксильные группы.

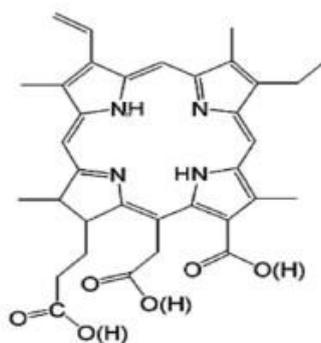


Рисунок 8. Структура хлорина е6

Хлорин е6 обладает рядом спектральных, физико-химических и энергетических характеристик, выгодно отличающих его от других ФС:

- максимум поглощения составляет 662 нм, что соответствует области оптической прозрачности для биологических тканей;
- высокая фотодинамическая активность,
- малая энергия активации (около 100 J/cm^2) при невысоких дозах введения,
- высокий квантовый выход синглетного кислорода [6, 77].

В плазме крови хлорин е6 связывается с альбумином и, в меньшей степени, с липопротеинами низкой плотности (ЛНП). Однако при небольшом сдвиге рН в кислую сторону связывание хлорина е6 с ЛНП существенно возрастает [78]. В ассоциированном с ЛНП состоянии он лучше проникает в опухолевые клетки через участие рецепторов к этим липопротеинам, повышенно экспрессирующихся на опухолевых клетках [79]. В связи с более низким рН в интерстициальной жидкости опухолевых тканей, чем в норме [78], это способствует повышенному накоплению хлорина е6 в тканях опухоли по сравнению со здоровыми тканями, что наблюдалось, как отмечено выше, и для гематопорфиринов [61]. В работе [78] это было непосредственно подтверждено на клетках HS68 по повышению клеточного проникновения и накопления хлорина е6 в лизосомах при повышении экспрессии рецепторов к ЛНП. Имеющиеся в настоящее время данные о клиническом применении производных хлорина е6 демонстрируют его высокую фотодинамическую активность при различных формах злокачественных новообразований, а также при ряде неопухолевых заболеваний [80].

На основе ФС хлоринового ряда, в основном хлорина е6, был разработан ряд лекарственных препаратов. Так, в 1998 году был разработан **Фотодитазин** - N-диметилглюкаминная соль хлорина е6, получаемого из биомассы микроводоросли Спирулины платензис [81, 82]. Он показал хорошие результаты на моделях опухолей [83] и сейчас находит активное клиническое использование [84]. В 1994-2001 годах была разработана технология

получения комплекса биологически активных хлоринов, содержащих в качестве основного компонента хлорин еб в виде водного раствора - препарат **Радахлорин** [85]. Показана высокая эффективность этих препаратов [84, 86-89], в частности, различных производных хлорина еб [82, 90-93].

1.1.3.4. Недостатки имеющихся ФС, ограничивающие их клиническое применение

В целом, хлорин еб, как и другие ФС II поколения, имеет значительные преимущества по сравнению с ранее разработанными – более длинноволновая область спектра, высокая фотодинамическая активность. Однако ему также свойственны определенные недостатки, затрудняющие широкое клиническое применение и стимулирующие дальнейшие исследования в области их оптимизации. Одной из проблем является низкая водорастворимость, как и большинства других ФС, что сопряжено, помимо практических трудностей использования, также и с тенденцией к агрегации молекул в физиологических условиях. Это несколько ослабляет активность ответа молекул на облучение, и, с другой стороны, снижает их биодоступность, негативно влияя на биораспределение [94]. В некоторой степени это преодолевается в упомянутом выше препарате Фотодитазин [81]. В то же время проблема растворимости ФС имеет и другую, обратную сторону. Водорастворимый ФС образует комплексы с белками плазмы, которые поглощаются эндотелиальными клетками в капиллярах кровеносного русла с последующим накоплением в клетках других тканей [62]. После внутривенного введения или всасывания в кровь наибольшая концентрация фотосенсибилизатора наблюдается в печени, почках, селезенке и сердце, так как эти органы характеризуются высоким уровнем кровоснабжения [60, 62]. Недостаток селективности по отношению к патологическим участкам может привести к выраженным побочным эффектам, например, к литическому некрозу или появлению на коже т. н. печеночных пятен (лентиг) [8]. В сочетании с медленным клиренсом это может вызвать впоследствии опасность ряда негативных, обусловленных фоточувствительностью, воздействий на глаза, кожу и другие нормальные ткани [95]. Отмечается также возможность длительного времени удерживания препарата в паренхиме органов и коже, которое обуславливает в течение некоторого времени повышенную чувствительность кожи к дневному свету [64].

В целом, использование ФС до последних лет ограничено из-за их плохой растворимости в воде, недостаточного нацеливания на опухолевые клетки и интернализации (проникновения в них). Активные исследования последних лет привели к новому направлению в области оптимизации ФДТ и повышения качества и эффективности ФС - это объединение в одну композицию самого ФС и других химических структур, что дает новые возможности для преодоления или смягчения недостатков, имеющихся ФС, и в то же время позволяет

использовать высокую противоопухолевую активность многих из них, в частности, хлорина еб. Это стало возможным благодаря применению различных систем доставки, большинство из которых уже применяется или активно разрабатывается для других противоопухолевых лекарств. Такие оптимизированные ФС, созданию которых уделяется много внимания в настоящее время, называют в отличие от рассмотренных выше фотосенсибилизаторами третьего поколения

1.2. Фотосенсибилизаторы, снабженные системой доставки в опухоли («ФС III поколения»)

Под препаратами третьего поколения подразумевают препараты и их модификации, представляющие собой конструкции и конъюгаты, которые имеют дополнительные свойства, улучшающие их фотодинамический терапевтический эффект (специфичность, увеличенное накопление в месте поражения, ускоренная элиминация, снижение дозо-лимитирующих побочных эффектов, эффективность при низких дозах, невысокая энергия активации). То есть, третье поколение ФС — это те же фотосенсибилизаторы II поколения, но связанные с фрагментом, способствующим доставке их к пораженной раковой опухоли клетке или улучшающим фармакокинетику. Существует два способа соединения в одну лекарственную композицию самого ФС с дополнительным оптимизирующим его компонентом — химическое присоединение (конъюгация) или включение ФС в транспортные системы, преимущественно, в наночастицы. Далее будут

кратко рассмотрены исследования по применению этих подходов по отношению к хлорину еб, как одному из наиболее используемых ФС в современной ФДТ и являющемуся объектом исследования данной работы.

1.2.1. Конъюгаты хлорина еб. Направленная («таргетная») доставка ФС в опухоли

Одним из вариантов препаратов, содержащих хлорин еб, является препарат **Фотолон** — конъюгат хлорина еб с присоединённым низкомолекулярным биосовместимым медицинским полимером поливинилпирролидоном (PVP). Фотолон избирательно накапливается в злокачественных опухолях и при локальном воздействии монохроматического света с длиной волны 666-670 нм обеспечивает фотосенсибилизирующий эффект, приводящий к повреждению опухолевой ткани. Фотолон вызывал некроз опухоли на большую глубину, чем хлорин еб и более эффективно тормозил рост опухоли, показывая при этом дозозависимую терапевтическую эффективность. Однако, при его использовании в 98% случаев после сеансов ФДТ наблюдали боли, повышение температуры и артериального давления [96, 97].

Сообщается также о получении конъюгатов хлорина еб с биосовместимыми полимерами поли(допамином) [98], плюронином [99], с хондроитин-сульфатом [100], с золотыми наночастицами [101] при сохранении или повышении продукции АФК после лазерного облучения и захвата опухолевыми клетками.

В ряде работ предлагались конъюгаты хлорина еб, как и других ФС [8], с **антителами** для придания препарату избирательной направленности на опухолевые клетки. Так, был получен конъюгат хлорина еб с моноклональными антителами **OC125** и показано его большее (в 2-3 раза) накопление в клетках мышиноного рака яичников NIH:OVCAR3 по сравнению со свободным ФС [102]. Впоследствии к такому конъюгату присоединяли полилизин и наблюдали выраженное накопление ФС в клетках, обусловленное, по мнению авторов, положительным зарядом конъюгата [103]. В то же время для другого конъюгата хлорина еб с моноклоальным антителом 17.1A и на другом виде опухолей (на модели гепатического метастаза у мышей) существенное накопление ФС в опухоли наблюдалось при присоединении сукцинированного полилизина, несущего отрицательный заряд [104, 105].

Хороший эффект – 4^x -кратное повышение по сравнению со свободным ФС давали иммуноконъюгаты производного хлорина еб с моноклональными антителами IG12, специфичными к клеткам меланомы [106]. Показана интернализация комплекса производного хлорина еб с моноклональными антителами в клетки карциномы яичников OVCAR-3 при присоединении к нему N-оксипропил-метакриламида [107]. Авторы объясняют это известным эффектом «проницаемости и удерживания» (enhanced permeability and retention, «EPR effect») – то есть, большей по сравнению с нормальными тканями проницаемостью сосудов в сочетании с меньшим лимфатическим дренажем [63]. На этом эффекте основывается конструирование систем доставки антиопухолевых лекарств, встроенных в наночастицы [63].

В работе Kim с соавторами [15] хлорин еб конъюгировали с трастузумабом (trastuzumab) – моноклональным антителом к рецептору эпидермального фактора роста (HER2), повышенно экспрессирующемуся на клетках многих опухолей. Для конъюгации использовали малеимидное производное полиэтиленгликоля. Наблюдали селективное и значительно большее присоединение ФС к опухолевым клеткам с повышенной экспрессией этого рецептора [15].

В качестве другого адресного подхода используют конъюгат хлорина еб со специфическими **аптамерами**. Так, хлорин еб конъюгировали с аптамером AIR-3A рецептора к интерлейкину-6 (IL-6R) и наблюдали связывание этого конъюгата с клетками, презентующими этот рецептор, и гибель клеток при последующем облучении светом при отсутствии эффекта на клетках без IL-6R [108]. Позже получили конъюгат хлорина еб с более специфическим аптамером AS1411, взаимодействующий с нуклеолином клеток ряда опухолей. Присоединение к хлорину еб производили через ПЭГ-аптамер [16].

1.2. 2. Включение хлорина еб в транспортные системы

Во многих работах хлорин еб, как и другие противоопухолевые агенты, включая фотосенсибилизаторы, встраивали в различные транспортные системы. В последние годы в связи с интенсивным развитием нанотехнологий для этой цели используют наночастицы из различных материалов, к которым (с некоторой степенью условности, из-за превышения, принятого для наночастиц размера, до 100 нм) часто относят и липосомы. Помимо улучшения фармакокинетики и снижения побочных эффектов, удобной в использовании плохо растворимых препаратов лекарственной формы, для противоопухолевых лекарств они обеспечивают определённый уровень адресности - преимущественного транспорта в опухолевые ткани, чем в здоровые, – за счёт упомянутой выше большей проницаемости сосудов и удерживания в ткани («EPR effect») [61]. Среди различных транспортных систем для фотосенсибилизаторов, как и других лекарств, особенно противоопухолевых, наибольшее число работ посвящено липосомам.

1.2.2.1. Хлорин еб в липосомальных системах

а) Предшественники липосомальных композиций хлорина еб. Первые композиции порфиринов

Первые исследования в этом направлении, в 1993 г., проводились не для хлорина еб, а для родственного ему другого порфиринового ФС, **Вертепорфина**, относящегося к бензопорфинам. Его моноацидное производное (BPD-MA, *benzoporphyrin derivative monoacid*) было включено в липосомы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) и яичного фосфатидилглицерина, как источника отрицательного заряда. На модели опухоли у мышей показано его большее по сравнению со свободным ФС присоединение к плазменным липопротеинам, проникновение в ткань и сосуды опухоли [109]. Впоследствии этот препарат, под названием **Визудин** (упомянутый выше, раздел 1.1.3.3) был введён в клиническую практику в офтальмологии для лечения макулодистрофии [5].

Из хлоринов первым ФС, для которого была получена липосомальная форма, является **Темпорфин** (мезо-тетрагидроксифенилхлорин, mTHPC), он же **Фоскан** [73, 74] (раздел 1.1.3.3.). В свободном виде он склонен к агрегации, снижающей его ответ на облучение светом и могущей вызвать воспаление. Этот недостаток в сочетании с его высокой противоопухолевой активностью стимулировал исследования по включению Темпорфина в липосомы различного состава [110, 111]. В первых работах для этого получали липосомы из фосфолипида димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) [11, 112]. Был показан большой захват ФС опухолевыми клетками в культуре при использовании липосомальных систем на основе DMPC,

чем в свободном виде. Впоследствии было проведено исследование влияния температуры фазового перехода используемого фосфолипида и была показана более высокая эффективность при замене DMPC на дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) [114]. В ряде работ был также показан положительный эффект при включении в липосомы дистеароилфосфатидилэтанолamina (DSPE), конъюгированного с полиэтиленгликолем (ПЭГ) - PEG-DSPE [115], и было разработано две липосомальные композиции Фоскана (Темпорфина) - Фоспег (**Fospeg**) и Фослип (**Foslip**), впоследствии активно исследуемые на ряде моделей опухолей *in vitro* и *in vivo* [116]. **Фоспег** включал DPPC, дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG) и PEG-DSPE в молярном соотношении 10:1:0.2 [117], а **Фослип** – те же компоненты, только без PEG-DSPE [118]. Проводятся их широкие доклинические испытания на животных, а для Фослипа предполагается проведение I фазы клинических испытаний [119]. Во всех проведенных исследованиях обе липосомальные композиции показали значительно бóльшую эффективность по сравнению со свободным ФС с различным соотношением степени достигаемых эффектов. Так, при инкубации Фоспега с клетками рака лёгких, A549, наблюдали накопление ФС в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи [117], а также снижение темновой токсичности (в отсутствие облучения) по сравнению со свободным ФС [120]. В экспериментах *in vivo* на крысах с инокулированной аденокарциномой молочной железы (R3230AC) было показано более раннее проникновение ФС в опухоль [121]. При введении **Фоспега** мышам с моделью кишечной карциномы человека HT29 и последующем, через 15 часов, облучении светом наблюдали существенное - более чем вдвое, - ингибирование опухолевого роста (55 дней вместо 23). Для **Фослипа** при той же схеме эксперимента, наблюдалось несколько меньшее ингибирование опухолевого роста, до 42 дней [122]. В то же время введение **Фослипа** в опухоль EMT6 у мышей с последующим облучением приводило к выраженному некрозу опухолевой ткани [113]. Показана также хорошая эффективность Фослипа на модели остеосаркомы у мышей [123] и даже способность ускорять заживление раны (также в экспериментах на мышах) [124]. В экспериментах с клетками HeLa было показано сходное фотодинамическое действие Фоспега и Фослипа на выживаемость клеток. При этом обеим композициям была свойственна более низкая темновая токсичность по сравнению со свободным Темпорфином и ускоренное выведение из организма [116].

б) Включение хлорина еб в липосомы

Работы по включению в липосомы **хлорина еб** стали проводиться позже. В работе [125] рассмотрены особенности встраивания его в липосомальные мембраны, исходя из амфифильного строения его молекулы. Он легко встраивается в структуру мембраны и, благодаря наличию трёх карбоксильных группы на одной стороне молекулы, закрепляется

ближе к границе раздела фаз: вода-липид с локализацией этих групп на поверхности липосомы [125]. В первой такой композиции хлорин еб в виде триметилового эфира включали в липосомы из дилауроилфосфатидилхолина (DLPC), диолеилфосфатидил-этанолamina (DOPE) и конъюгата PEG2000-DSPE [12, 126]. На 9 клеточных линиях рака желудка человека был показан значительно бóльший (в среднем в 53 раза) фототоксический эффект таких липосом, чем для натриевой соли хлорина еб, что авторы связывали с наблюдаемым ими по флуоресценции увеличением накопления ФС в клетках [12]. Позже было показано на культуре клеток лейкемической линии Raji, что использование липосомальных форм (с размером 100 ± 2 нм) с диметиловым и триметиловым эфирами хлорина еб значительно снижает его неспецифическую темновую цитотоксичность, сохраняя при этом высокий цитотоксический эффект фотодинамического воздействия [13].

В работе [127] хлорин еб включали в липосомы из фосфатидилхолина (ФХ) или фосфатидилглицерина с добавлением холестерина, а также в липосомы на основе 1,2-диолеил-глицеро-3-этил-фосфохолина (EDOPC) также с добавлением холестерина. Последние, рассматриваемые авторами как катионные липосомы, имели размер $142,7 \pm 9,5$ нм и показали самую высокую эффективность включения Себ. Для них наблюдалось также увеличенное поглощение опухолевыми клетками по сравнению с другими липосомами и свободным Себ и наилучшая противоопухолевая активность при облучении светом *in vitro* на клетках мышинной карциномы SCC7 [127]. Бóльшее терапевтическое действие хлорина еб, инкапсулированного в липосомы, по сравнению со свободным показано для липосом из гидрогенизированного соевого ФХ с холестерином или с PEG2000-DSPE [14]. Липосомы получали методом гидратации сухой пленки липидов и продавливали 8 раз через фильтр с диаметром пор 100 нм. В результате получали стабильные униламеллярные липосомы с хлорином, инкапсулированным в фосфолипидный бислой, с размером менее 170 нм, пригодным для транспортировки лекарств к опухоли через систему кровеносных сосудов с повышенным размером пор по сравнению с таковым в нормальных сосудах [63]. В отсутствие света они не оказывали токсического действия на клетки HCT116. Высокая активность фотоиндуцированного действия на клетки наблюдалась для хлорина еб в липосомах из дипальмитоил-ФХ с дипальмитоилфосфатидилглицерином (ФГ) [14].

В ряде работ в липосомы с ПЭГ включали хлорин еб вместе с другим противоопухолевым лекарством, получая тем самым липосомы двойного действия. Так, приготавливали липосомы на основе дистеароилглицерофосфохолина, 1,2-дистеарол-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC), DSPE-PEG2000 и холестерина, содержащие хлорин еб и доксорубицин [128]. Исследовали их цитотоксичность *in vitro* на клетках меланомы человека A375 и *in vivo* на модели опухоли у мышей C26 (опухоль толстой кишки). Показана значительно бóльшая терапевтическая

эффективность такой системы после светового облучения по сравнению с липосомами, содержащими эти средства в отдельности [128]. Аналогичный результат был получен теми же авторами при комбинации в липосомах хлорина еб с другим противоопухолевым лекарством, цисплатином [129].

Вместо ПЭГ для стабилизации липосом с хлорином еб вводили тетраэфирные липиды (TELs), полученные из термокислотофильных бактерий *Sulfolobus acidocaldarius* [130]. Суровые условия выживания этих бактерий - температура от 50-100°C и высокая кислотность, - обуславливают образование в них стабильных мембран, что обеспечивается несвойственными эукариотам и прокариотам липидами с циклопентановыми группами и четырьмя жирнокислотными остатками с высокой длиной цепей C40, создающими необычно высокую плотность упаковки мембранных липидов. G. Mahmoud с соавт. [130] добавляли эти липиды в липосомы, содержащие тринатриевую соль Себ и катионный липид 1,2-диолеил-3-триметиламмоний-пропан (DOTAP), способствующий введению Себ в липосомальный бислой. Получали липосомы с размером от 110 нм до 170 нм. На культурах клеток нейробластомы мышцы (Neuro-2a) и карциномы яичников (SK-OV-3) была показана незначительная «темновая» токсичность полученных липосом. Фотоиндуцированная токсичность включённого в них хлорина еб была более выражена у клеток Neuro-2a, чем у SK-OV-3, что может быть связано с различием свойств их мембран и поэтому несколько отличающимся взаимодействием с липосомами [130].

Встраивание хлорина еб в липосомы рядом авторов использовалось для комплексного терапевтического подхода - фотодинамической терапии совместно с фототермической. В качестве фототермического агента использовали наночастицы сульфида меди (CuS), которые, вызывая нагрев, облегчали выход Себ из липосом [131]. Готовили пэгилированные (содержащие ПЭГ) липосомы из DPPC, DSPE-PEG2000 и холестерина с добавлением конъюгата DSPE-PEG2000 с фолатом для придания адресной опухолевой направленности. Авторы сконструировали термочувствительные липосомы (thermosensitive liposomes, TSL) с включением Себ в липидный бислой и CuS во внутреннее пространство липосом (Себ-CuS-TSL). Полученные липосомы были стабильны и обладали значительным фототермическим эффектом, вызывающим высвобождение хлорина еб. Эксперименты *in vitro* показали высокое поглощение их клетками и генерацию АФК. Введение таких липосом (Себ-CuS-TSL) мышам с моделью опухоли, индуцированной подкожным введением клеток HeLa, в значительной степени ингибировало опухолевый рост, на основании чего авторы считают их перспективными для комбинации фотодинамической и фототермической терапии [131].

Сообщается также о включении в липосомы конъюгата хлорина еб с поливинилпирролидоном, называемого **Фотолоном** (см. раздел 1.2.1). Его включали в липосомы из

соевого фосфолипида, производимые технологией гидратации геля (LipoShell технология). Получали стабильные биосовместимые структуры со средним диаметром $124,7 \pm 0,6$ нм. Трансмиссионная электронная микроскопия показала распределение включаемого конъюгата хлорина еб внутри частицы, окруженной одним сферическим бислоем [132].

1.2.2.2. Различные варианты наночастиц с хлорином еб. Использование адресных фрагментов

Помимо липосом, хлорин еб включали также и в другие транспортные системы, наблюдая при этом улучшение его свойств и фотодинамической активности. Сообщается об использовании для этого наночастиц или мицелл на основе различных биосовместимых полимеров, способствующих значительно бóльшей стабильности получаемой композиции в биологических жидкостях и при хранении. Так, приготавливали наночастицы из различных вариантов поли(d,l-лактида) [133, 134], иногда в сочетании с полиэтиленгликолем [135, 136], из полиакриламида [137], хитозана [138]. С помощью специальных технологий получали наночастицы из природных белков – сывороточного альбумина [139] и лактоферрина [140]. Сообщается о приготовлении для включения хлорина еб кремниевых наночастиц [141-143], наночастиц на основе окиси железа [144, 145].

В большинстве таких исследований в наночастицы включали не сам хлорин еб, а предварительно полученные его производные, конъюгаты. Его конъюгировали с ПЭГ для включения в полимерные наночастицы [135, 136], с серином [146] или аспарагином [147]. Так, в работе [147] описаны мицеллы из детергента Тритона X-100, включающие аспарагиновое производное хлорина еб и взаимодействующие при инкубации с плазмой с липопротеинами высокой плотности. Г.В. Пономарёвым с соавт. [148] были синтезированы липофильные конъюгаты хлорина, в том числе хлорина еб, путём присоединения к нему углеводородной цепи или стероид-содержащего фрагмента. Полученные гексадецил- или холестен-оксиэтил-производные смешивали с яичным фосфатидилхолином, получая смешанные мицеллы, которые показали хорошее связывание и интернализацию в клетки карциномы молочной железы человека, MCF-7 [148].

В ряде работ к транспортирующим хлорин еб частицам, как и при получении упомянутых выше его конъюгатов (раздел 1.2.1), присоединяли какой-либо дополнительный **адресный фрагмент** для придания большей направленности к опухолевым клеткам. Наиболее доступным таким фрагментом (вектором) оказалась фолиевая кислота, которая может служить лигандом для фолатных рецепторов, повышенная экспрессия которых обнаружена в ряде опухолей [149]. Присоединение к липосомам, содержащим хлорин еб, фолата приводило к повышению цитотоксичности хлорина по отношению к опухолевым клеткам [150]. В недавней работе [151]

получали конъюгат фолиевой кислоты с ПЭГ и присоединяли его через цистамин к хлорину еб. Подобный подход с использованием фолиевой кислоты был применен и для магнитных наночастиц из окиси железа с присоединённым хлорином еб. В обеих работах наблюдалось повышение действия ФС на опухолевые клетки [152].

В работе [153] хлорин еб встраивали в виросомы - липосомальные частицы, включающие вирусный белок гемагглютинин, способствующий присоединению вируса к клеткам. К этим частицам присоединяли антитело против белка EGFR (epidermal growth factor receptor, рецептора эпидермального фактора роста), повышено экспрессирующегося на клетках карциномы OSCC. По флуоресценции наблюдали повышенную интернализацию хлорина еб в клетки, а в эксперименте *in vivo* - большее его накопление в опухоли [154].

В последние годы к хлорин-содержащим наночастицам стали применять подходы, принятые в исследованиях по биофармацевтике для разработки систем доставки – использование в качестве лигандов (векторных фрагментов) ряда специфических пептидов с аффинностью к некоторым белкам опухолевых клеток, т.е. использовался тот же принцип, что и в вышеупомянутых работах с использованием фолата [150, 151], но с большей опухолевой специфичностью рецепторов. Так, к наночастицам из биосовместимого белка фиброина присоединяли конъюгацией хлорин еб и циклический пентапептид, содержащий специфическую последовательность аминокислот **RGD** [17]. Эта последовательность - аргинин, глицин, аспарагиновая кислота (Arg-Gly-Asp) - встречается в белках межклеточного матрикса, позволяя им взаимодействовать с белками клеточных мембран – интегринами. Интегрины - гетеродимерные поверхностные рецепторы, состоящие из α - и β -цепей, и при опухолевом росте показано существенное повышение экспрессии некоторых из них, в частности $\alpha_v\beta$ -интегринов [155]. Последовательность аминокислот **RGD** обладает аффинностью к интегринам, и авторы [17] наблюдали повышенный фотодинамический эффект наночастиц с RGD и хлорином еб на клетках MGC-803 и на модели опухоли у мышей. В недавней работе [18] использовали специфический декапептид с последовательностью аминокислот **WxEAAYQrFL** (где «x» обозначает норлейцин, а “r” последующую D-аминокислоту), идентифицированный как новый распознающий маркер для клеток рака груди (возможно, и других опухолей), взаимодействующий с кератином-1 на их поверхности [154]. Этот пептид конъюгировали с хлорином еб, конъюгат присоединяли к наночастицам, представляющим собой олигомерные полиэдрические кремнево-кислородные (сил-сесквиоксановые) структуры (polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) nanoparticles). По сравнению со свободным хлорином еб наблюдали существенное повышение – фототоксичности по отношению к клеткам MDA-MB-231, в основном, через усиление клеточного апоптоза. При введении *in vivo* в таких

наночастицах хлорин еб дольше удерживался в опухолевой ткани, проявляя более выраженный ингибирующий эффект на рост опухоли [18].

Помимо хлорина еб возможности использования векторных пептидов для ФДТ исследовались для ряда других ФС. Так, группа японских авторов разработала систему, содержащую фотосенсибилизатор бензопорфирин в липосомах, содержащих также пептид Ala-Pro-Arg-Pro-Gly (**APRPG**), специфичный для ангиогенных эндотелиальных клеток. Введение его мышам с последующим локальным лазерным облучением опухоли подавляло опухолевый рост в бóльшей степени, чем введение таких же липосом без пептида [156 - 158].

В то же время относительно небольшое количество таких исследований по сравнению с широким объёмом работ последних лет в отношении транспортных систем для других лекарств, особенно противоопухолевых [159, 160], свидетельствует о недостаточно ещё использованном и исследованном потенциале этого перспективного подхода в отношении ФДТ (на что, в частности, направлена данная диссертационная работа, в отношении хлорина еб). Для более детального освещения возможностей этой актуальной области биофармацевтики целесообразно кратко рассмотреть результаты таких исследований, проводившихся в целом для противоопухолевых препаратов, поиску специфических мишеней в опухолевой ткани и соответствующих им адресных векторных пептидов для дальнейшего возможного применения этой информации для ФДТ.

1.3. Использование специфических пептидов как эффективный путь развития систем доставки лекарств в опухоли

Для придания противоопухолевым лекарствам адресности, бóльшей направленности в опухолевые клетки по сравнению со здоровыми, используется несколько подходов, включающих, в частности, антитела и аптамеры, путем их или непосредственной конъюгации с лекарством или присоединения к транспортирующим его структурам. Это применялось также и для ФДТ для улучшения доставки фотосенсибилизаторов, в частности, при получении конъюгатов хлорина еб, что рассмотрено выше (раздел 2.2.2). Несмотря на выраженную специфическую направленность конструкций, содержащих антитела и аптамеры, более перспективными и удобными для реального использования из-за относительной стабильности и меньшей стоимости получения считают, в первую очередь, специфические пептиды, обладающие аффинностью к некоторым рецепторам, с повышенной по сравнению с нормальными клетками экспрессией на клетках опухолей. Высокая экспрессия таких рецепторов свойственна также эндотелиальным **клеткам сосудов** ряда **опухолей**, вследствие активного ангиогенеза, что также способствует адресному направленному действию аффинных к ним пептидов [161]. Преимуществом пептидов является также их безопасность и низкая

иммуногенность [11]. Для оптимизации доставки лекарств в клетки используют два типа пептидов, с разными вариантами специфичности – адресные, т. е. аффинные к опухолям клеточно-таргетные (cell-targeting) и клеточно-проникающие (cell-penetrating).

1.3.1. Адресные (аффинные к опухолям) пептиды

В последние десятилетия, благодаря интенсивному развитию и совершенствованию методов, основанных на использовании комбинаторных пептидных библиотек, удалось выявить большое количество пептидов со специфической «опухолевой» аффинностью, причём для большинства из них конкретный «адрес», то есть конкретный опухолевый рецептор или маркер ещё не выяснен [162].

Среди выявленных пептидов отмечают более 10 групп, каждая из которых включает несколько вариантов пептидов с длиной цепи в основном до 15 аминокислот (реже – 20-21), включающих определенный специфический участок из 3-5 аминокислот (рис. 9) [9].

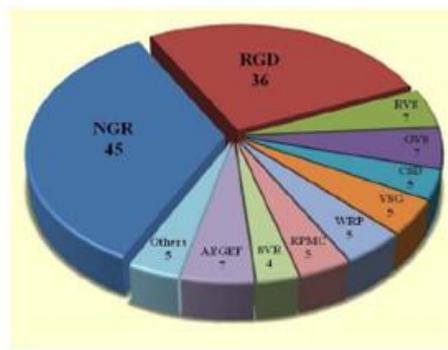


Рисунок 9. Распределение известных аффинных к опухолям пептидов по базе данных TumorHoPe [9] (указано количество различных известных пептидов с данной последовательностью аминокислот).

Наиболее распространенные среди обнаруживаемых пептидов – это гепта- и нонапептиды (более 100 разных видов), а наиболее распространенными аминокислотами в них оказались Cys, Arg, Gly, Leu и Ser [9]. В работе [163] сформулированы требования к свойствам белка-мишени (рецептора) на опухолевой клетке для возможности использования аффинного к нему пептида в качестве адресного фрагмента. Во-первых, соотношение его экспрессии на опухолевой клетке по сравнению с нормальной должно быть не меньше, чем 3:1. Во-вторых, количество таких «сверхэкспрессируемых» рецепторов должно быть достаточным для проникновения в клетку количества лекарства, необходимого для достижения терапевтического эффекта [163]. На наш взгляд, последний фактор зависит также в большой степени и от свойств лекарства и конструируемой транспортной системы.

Обычно при введении этих пептидов мышам с привитыми опухолями наблюдали их накопление в опухолях [164]. Присоединение аффинных к опухолям пептидов к наночастицам, транспортирующим противоопухолевые агенты, считают перспективным направлением современной противоопухолевой фармацевтики, сочетающим, с одной стороны, известные преимущества медицинских нанотехнологий [165], а, с другой – использование вносимой такими пептидами специфичности к клеткам или/и к сосудам опухолей [161, 166].

Известные аффинные к опухолям пептиды могут обладать сродством или к какому-либо рецептору на опухолевых клетках, или к компонентам эндотелиальных клеток сосудов, пронизывающих опухолевую ткань и сопряженных с её быстрым ростом и усиленным ангиогенезом. При этом возможные специфические различия в экспрессии рецепторных белков для разных видов опухолей и к разным клеточным линиям обуславливают и различия в аффинных к ним пептидах. Проводится множество исследований, направленных как на обнаружение мишеней для многих выявленных пептидов, так и на их терапевтическое использование для направленного транспорта лекарств или транспортных лекарственных систем в опухолевые ткани и клетки. В таблице 1 приведены наиболее часто используемые в таких исследованиях выявленные в опухолях специфические белки-мишени и аффинные к ним пептиды.

Таблица 1. Белки-мишени с повышенной экспрессией на опухолевых клетках, и аффинные к ним пептиды, используемые в системах доставки лекарств

Белок-мишень клетки (сосудов) опухоли	Виды опухолевых клеток	Адресные пептиды	Ссылки
Интегрины ($\alpha v \beta 3$),	Клетки глиобластомы, яичников и др.	RGD (Arg-Gly-Asp),	[167, 168]
Аминопептидаза N (APN, CD13)	Клетки опухолевых сосудов, клетки карциномы легких NSCLC и др.	Пептиды, содержащие последовательность NGR (Asn-Gly-Arg).	[169]
Эпидермальный фактор роста (<i>epidermal growth factor receptors</i> , EGFR)	Клетки рака легких, груди, яичников, мочевого пузыря	Гексапептид D4 . LARLLT (Leu-Ala-Arg-Leu-Leu-Thr), Пентапептид, AEYLR	[170] [171]

		(Ala-Glu-Tyr-Leu-Arg)	
Рецептор к фактору роста фибробластов (<i>fibroblast growth factor receptors</i> , FGFR).	Клетки карциномы LLC	Пептид tbFGF (KRTGQYKLC, Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu-Cys)	[172]
Бомбезиновый рецептор (относящийся к рецепторам, связанным с G-белком, GPCR*)	Клетки рака лёгких, простаты нейробластомы и др.	Бомбезин или его гомолог Pyl-QRLGNQWAV GHLM-NH2)	[11, 173]
Аминопептидаза Р	Клетки сосудов рака груди	Нонапептид PEGA CPGPEGAGC (Cys-Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Cys),	[174]

*- G-белки – семейство белков, функционирующих в качестве вторичных посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах [175].

Наибольшее количество исследований посвящено влиянию упомянутого выше (раздел 1.3.2) пептида **RGD** (Arg-Gly-Asp), проявляющего аффинность к трансмембранным клеточным рецепторам интегринам. Инвазивность опухолевых клеток коррелирует с экспрессией и составом интегринов, с возрастанием некоторых из них [155], и во многих работах последовательность RGD использовалась в качестве таргетного (векторного, направляющего) фрагмента в системах доставки [167, 168].

В последние годы существенное внимание уделяется также различным пептидам с последовательностью аминокислот **NGR** (Asn-Gly-Arg). Впервые пептиды с NGR-мотивом были выявлены с использованием метода фагового дисплея, показавшего их способность к ассоциации с опухолевыми сосудами при введении мышам с опухолью [176]. Эта последовательность обладает аффинностью к аминопептидазе N (APN, CD13), повышено экспрессирующейся на клетках сосудов опухолей и на ряде опухолевых клеток [169]. Впоследствии было показано, что мишенью для этих пептидов является аминопептидаза N (APN) (CD13) [177] – трансмембранная металлопротеаза, многофункциональный фермент, вовлечённый, в частности, в процессы, связанные с опухолегенезом [178]. Высокий уровень APN обнаруживается при различных формах рака, включая рак молочной железы, яичников, щитовидной железы, поджелудочной железы, колоректальный и немелкоклеточный рак легкого [172, 179]. Повышенная экспрессия APN на клетках ряда опухолей человека сопряжена, как

полагают, с её участием в их росте [180], а на клетках кровеносных сосудах опухоли – с сопровождающим опухолевой рост активным ангиогенезом; на поверхности нормальной сосудистой системы она не экспрессируется [172, 179].

Помимо аминопептидазы N, для NGR-содержащих пептидов выявлен и другой путь опухолевой направленности – через взаимодействие с интегринами $\alpha\nu\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$ [181] конкурирующее с RGD-содержащими пептидами, что указывает на близкую локализацию связывающих мест [182]. Оказалось, что при этом адресную роль играет уже не сам NGR, а продукт его спонтанного превращения: аминокислота аспарагин (N) через образование промежуточного сукцинимидного проиводного и его гидролиз переходит в изо-аспарагиновую кислоту с образованием изменённого пептидного фрагмента isoDGR, аффинного к интегринам [183]. Условия этого превращения, более детально исследованного на примере многофункционального белка межклеточного матрикса и плазмы фибронектина [183], чётко не определены. Отмечают некоторую возможность такого медленного перехода *in vivo*, или *in vitro* при хранении [183], чему может способствовать щелочная реакция [184]. Показано изменение функционального поведения NGR-содержащих пептидов при формировании isoDGR-фрагментов. Для коротких пептидов оно приводит к узнаванию не только аминопептидазой N, но и интегринами $\alpha\nu\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$, также повышено экспрессирующимися клетками сосудов и тканей опухолей, т.е. обуславливает двойную опухолевую направленность (*dual targeting*) NGR пептидов [184]. В последние годы различные короткоцепочечные линейные или циклические пептиды с этой последовательностью активно используются в качестве векторов путем или непосредственного присоединения к лекарственным агентам или к транспортирующим их наночастицам [184-187]. Использовались различные варианты таких пептидов, содержащие от 5 до 13 аминокислотных остатков, включая NGR [183].

Исследуется ряд других рецепторов с поиском специфичных к ним пептидных лигандов. Так, выявлено семейство рецепторов нейропептида (NPY), лигандами к которым может быть ряд нейропептидных гормонов. Экспрессия их выявлена на ряде опухолевых клеток, в частности, на клетках MCF-7 [188]. В серии работ группы французских авторов проводился поиск лигандов для универсально высоко- экспрессируемых практически на всех опухолевых клетках рецепторов к ЛНП плазмы крови [189, 190]. Ими были выявлены и затем синтезированы с различными вариациями несколько семейств линейных и циклических пептидов, обладающих различной степенью аффинности к ЛНП-рецепторам. Путем конъюгации с флуоресцентным красителем A680 детально исследовали на клеточной линии HEK 293 эндоцитоз пептидов, названных авторами как VH434 (Pr-CMPRLRGC-NH₂) и VH4127 (Pr-cMThzRLRGPen-NH₂) (где Thz и Pen две неприродные синтезированные аминокислоты тиазолидин и пенициламин, соответственно). Авторы подчеркивают будущую перспективность

подобных пептидов для направленной доставки лекарственных соединений и/или транспортирующих их наночастиц к опухолевым клеткам [189, 190].

1.3.2. Клеточно проникающие пептиды

Известен также ряд пептидов, для которых показана способность проникать через клеточную мембрану внутрь клетки. Их длина цепи в среднем 10 - 20 аминокислотных остатков, обычно с высоким содержанием остатков основных аминокислот. Точный механизм их клеточной интернализации пока не ясен [11]. По данным ряда авторов короткие клеточно-проникающие пептиды могут транслоцироваться через мембрану энергонезависимым и нерцепторным механизмом. На это указывало сохранение их способности к интернализации в присутствии ингибиторов эндоцитоза, а также при снижении температуры [168]. В то же время, имеются данные и в пользу эндоцитозного механизма, особенно для пептидов, богатых аргинином [190]. Одним из первых охарактеризованных клеточно проникающих пептидов был фрагмент белка HIV-TAT – транс-активирующего транскрипционного активатора (trans-activating transcriptional activator) – участок цепи из 11 аминокислот Tat₄₇₋₅₇ белка – YGRKKRRQRRR (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) [192, 193]. Выделен ряд других природных клеточно проникающих пептидов – сосудистый эндотелиальный кадгерин, кальцитонин и ряд других [168]. Существенное внимание в последние годы уделяется клеточно проникающим пептидам на основе аргинина (Arg, **R**), транспортирующие свойства которых связывают с влиянием содержащейся в нём гуанидиновой группы. Проводили синтез богатых аргинином белков с подобными свойствами с целью доставки в клетки различных ковалентно присоединённых к ним противоопухолевых лекарств. [168]. При сравнении интернализации аргининовых пептидов с числом звеньев от 4 до 16 (от R4 до R16) было показано, что оптимальной является цепь в среднем из 8 молекул аргинина [193]. В работе Choi с соавт. пептид из 7 остатков аргинина (гептааргинин, R7) конъюгировали с фотосенсибилизатором, трифенил-диоксихлорином. Полученный конъюгат проявлял бóльшую фототоксичность, причем она проявлялась при меньшем времени инкубации и более низких вводимых дозах [194]. Показаны также клеточно проникающие свойства для полигистидинового пептида H16 (состоящего из 16 остатков гистидина). При присоединении к липосомам, через стеароил-производное, он показал выраженную интернализацию в клетки фибросаркомы [195] Однако, широкое использование клеточно проникающих пептидов в системах доставки лекарств ограничено из-за их низкой клеточной специфичности.

1.3.3. Сочетание клеточно проникающих и адресных пептидов

В ряде работ использовали сочетание клеточно проникающих и аффинных к опухолям пептидов. При этом наблюдалось повышение доставки в клетки присоединяемого терапевтического агента по сравнению с использованием только аффинного к опухоли пептида [196, 197]. Получали, в частности, конъюгат выше- упомянутого (раздел 3) циклического нонапептида PEGA - **CPGPEGAGC** (Cys-Pro-Gly-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Cys) [174] с клеточно-проникающим пептидом кадгерином pVEC, из 18 аминокислотных остатков, выделенным из сосудистых эндотелиальных клеток мыши [196]. Было показано при введении мышам накопление этого комбинированного пептида в кровеносных сосудах опухоли рака груди. В работе [198] также наблюдалась специфическая опухолевая локализация конъюгата PEGA-pVEC при внутривенном введении мышам с опухолью MDA-MB-435. При введении же пептида pVEC, без PEGA, он обнаруживался также в лёгких, печени и в коже. Однако в клетки MDA-MB-23 такой комплексный пептид интернализуется в меньшей степени [198]. То есть, присоединение пептида PEGA оказывало двойное действие – повышение направленности к опухоли в сочетании с меньшим эндоцитозом в опухолевые клетки. Более эффективным в плане доставки в опухолевые клетки оказался другой комплексный пептид - тот же pVEC, но в комбинации с опухоль аффинным пептидом CREKA [199], который, кроме того, более удобен в плане синтеза [200]. С пептидом CREKA конъюгировали также синтетический клеточно проникающий богатый лизином (K) ундекапептид BP16 - **KKLFFKKILKKL-NH2** [201].

В ряде работ конъюгаты клеточно проникающих и аффинных к опухолям пептидов присоединяли к противоопухолевым лекарствам, наблюдая повышение эффективности на моделях у животных или в клеточных экспериментах, что детально рассмотрено в обзорах [202, 168]. Wang, с соавт. [203] применили такой подход к транспортной системе – липосомам. Предварительно полученный конъюгат клеточно проникающего пептида TAT [193] с лёгочно-специфическим пептидным лигандом T7 – **HAIVPRH** (His-Ala-Ile-Tyr-Pro-Arg-His) присоединяли к липосомам с включенным в них цитостатиком паклитакселом. Осуществляли конъюгацию к фосфолипиду липосом через спейсер ПЭГ. Был показан больший эндоцитоз лекарства опухолевыми клетками A549 для липосом с таким двойным лигандом по сравнению с эндоцитозом для липосом с каждым из этих пептидов в отдельности. В экспериментах *in vivo* на мышях с опухолью A549 также было показано при его введении большее ингибирование опухолевого роста [203]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, сопоставление литературных данных по использованию специфических пептидов в системах доставки лекарств в опухоли с данными, приведенными в предыдущих разделах, связанных с ФДТ, показывает, что в этой области, относительно

«молодой» по сравнению с другими методами противоопухолевой терапии, эти современные перспективные подходы, с включением лекарств в наночастицы и снабжением их специфическими пептидами, используются и исследованы на сегодняшний день пока ещё в недостаточной степени. На решение одной из таких задач – разработку эффективной системы транспорта в опухоли фотосенсибилизатора хлорина еб с использованием фосфолипидных наночастиц и оптимизации этой системы с использованием адресного и клеточно проникающего пептидов и направлена представленная диссертационная работа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Основные материалы. Используемые реагенты и растворители

В работе для получения и исследования лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц и хлорина е6 были использованы следующие вещества: соевый фосфолипид Lipoid S100 с содержанием фосфатидилхолина 94-96% (Lipoid GmbH, Германия); мальтозы моногидрат (Merck, Германия); DSPE-PEG(2000)-Maleimide (Avanti, США); глутатион восстановленный (Глу_{восст}) (L-glutathione, AppliChem, Darmstadt, Germany), лекарственная субстанция ди-N-метил-D-глюкаминавая соль хлорина е6, с 50% содержанием хлорина е6 (ГОУ ВПО «Ивановский химико-технологический университет», Россия). Специфический пептид с NGR-мотивом: (NH₂-)Gly-**Asn-Gly-Arg**-Gly-Cys(-COOH) был получен в ООО «Синтон-Лаб» (Санкт-Петербург, Россия) с чистотой не менее 95%, подтвержденной ВЭЖХ с МС-детектированием и ЯМР-спектроскопией (Приложение А и Б). Проникающий пептид - гептааргинин (R7) получен в ИБМХ методом твердофазного пептидного синтеза на синтезаторе 433A (Applied Biosystems, США, ЦКП «Протеом человека» ИБМХ). Пептид очищен ВЭЖХ до степени чистоты 95%, подтвержденной аналитической ВЭЖХ с МС-детектированием (Приложение В).

Использовали растворители и реагенты высокой чистоты для хроматографирования: метанол HPLC grade (Fisher Scientific UK Ltd, Великобритания); ацетонитрил – HPLC, far UV (Acros organic, США); муравьиную кислоту 98-100% (Merck KGaA, Германия); трифторуксусную кислоту, for protein sequence analysis ≥99,5 % (Fluka Chemie AG, Швейцария), воду, очищенную с помощью установки Milli-Q Biocel A10 (Millipore Corporation, США) (вода очищенная), или воду дистиллированную (аквадистиллятор GFL-2004 производства GFL). В модельных экспериментах использовали плазму крови здорового человека, полученную на Московской областной станции переливания крови. Эксперименты с кровью человека проводились в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 12 апреля 2013 г. № 331 «Об утверждении Правил обеспечения медицинских, образовательных научных и иных организаций донорской кровью и/или ее компонентами в иных целях, кроме клинического использования» (с изменениями и дополнениями).

Для инкубации клеточных культур были использованы культуральные среды RPMI-1640, DMEM, раствор Версена компании ПанЭко, Россия и эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (Gibco, США).

Другие вспомогательные материалы:

Для фильтрации растворов наноконпозиций на основе хлорина еб использовали фильтры из поливинилиден фторида с размером пор 0,22 мкм и префильтры (Merck Millipore Ltd, Ирландия). Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток - МТТ теста (Sigma, США).

2.2. Биологические объекты

2.2.1. Клеточные культуры

Культивирование клеток проводили в лаборатории биосинтеза белка ИБМХ, а также в МНИОИ им. П.А.Герцена, филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России. В работе использовали клеточные культуры, полученные из Американской коллекции типовых культур (АТСС) и поддерживаемые в коллекции клеточных культур ИБМХ:

- HepG2 – гепатоцеллюлярная карцинома человека низкой степени злокачественности;
- HT-1080 – клетки фибросаркомы человека;
- MCF-7 – клетки аденокарциномы молочной железы человека.

Использовали также культуру клеток HT-1080, полученную в ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России. Культивирование опухолевых клеток проводилось согласно рекомендациям, указанным в сертификатах культур клеток. Клетки инкубировали в культуральных средах DMEM или RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамина и 10% ЭТС (эмбриональной телячьей сыворотки) в культуральных флаконах 25 см² и 75 см² (Corning, США) при 37⁰ С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ (CO₂- инкубатор “Sanyo”, Япония). При пассировании для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена, добавляя его во флакон на 2-3 минуты. Оптимальная посевная концентрация 100 тыс. кл./мл. В работе были использованы клетки 3-18 пассажей после заморозки.

2.2.2. Животные

В работе были использованы мыши и крысы, полученные из питомника «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России.

- Крысы-самцы породы Wistar массой тела 250±20г (n=50).
- Мыши-самки гибрида BDF1 массой тела 25±3г (n=135).
- Мыши-самцы гибрида C57BL/6 массой 25±3г для перевивки опухоли (n=5).

Перед экспериментом животных выдерживали в течение 5-7 дней в стандартных условиях (12-ти часовой световой день, температура в помещении поддерживалась на уровне 20 °С). Животные получали сухой брикетированный корм для мышей и крыс (ООО «МЭСТ»). Работа с

лабораторными животными была организована в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014 от 26.01.2015) «Принципы лабораторной практики GLP»; Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 "Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)" от 29 августа 2014 г; Приказом Минздравсоцразвития России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил лабораторной практики»; Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (2012).

2.2.3. Модель опухоли

Материал для прививки опухоли был получен из МНИОИ им. П.А.Герцена, филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России. Дальнейшие работы проводились самостоятельно в лаборатории специально обученными сотрудниками ИБМХ, в совместных исследованиях.

Использовали опухоль карцинома легкого Льюиса, LLC (гематогенный путь метастазирования, локализация метастазов – легкие, частота образования метастазов – 100%). Штамм LLC поддерживали в солидной форме на мышах C57BL/6 самцах, которым внутримышечно вводили гомогенат опухоли (по 30 мг опухолевой ткани на мышшь). Карциному легкого LLC экспериментальным животным прививали, вводя по 10 мг/мышшь опухолевой ткани мышам BDF1, в объеме 0,05 мл подкожно в икроножную мышцу с внешней стороны бедра. Развитие опухоли происходило в течение 10 дней.

2.3. Методы

2.3.1. Получение композиций хлорина еб

2.3.1.1. Получение композиции хлорина еб, снабженного фосфолипидной системой транспорта (фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб) - NPh-Себ

Композицию хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы, получали в двух вариантах: лиофильно-высушенном с использованием криопротектора (для экспериментов *in vivo*), и в виде наноэмульсии без криопротектора (для экспериментов *in vitro*), при соотношении основных компонентов, Lipoid S100 : хлорин еб, равном 10:1, Исходное диспергирование Lipoid S100 проводили пленочным методом. Метод основан на получении тонкой пленки фосфолипидов при упаривании на роторном испарителе их растворов в органических растворителях, диспергировании её в водном буферном растворе с последующей обработкой полученной эмульсии ультразвуком.

Вариант 1 (лиофильно высушенная композиция)

Навеску моногидрата мальтозы (39 г) растворяли в 100 мл воды очищенной, в полученном водном растворе диспергировали 10 г Lipoid S100 с помощью бытового блендера (Braun, Германия). В 20 мл воды очищенной растворяли 2 г ди-N-метил-D-глюкаминовой соли хлорина еб, полученный раствор добавляли к фосфолипидной эмульсии. Объем полученной первичной (грубой) эмульсии доводили водой до 200 мл и нагревали до температуры $45 \pm 3^\circ\text{C}$. Подогретую грубую эмульсию заливали в приёмную емкость микрофлюидайзера Microfluidizer processor M-110EH-30 (Microfluidics, USA) и подвергали нескольким циклам (5-7) гомогенизации под высоким давлением (1000 атм) при температуре 40-45 °C. В полученной ультратонкой эмульсии измеряли pH с помощью pH-метра S20 (электрод InLab Routin Pro) (Mettler Toledo, Германия), доводили его значение до 7,0-7,5 раствором 1M NaOH. Далее проводили стерилизующую и стандартизирующую фильтрацию с помощью установки Millipore Corporation, пропуская эмульсию последовательно через префильтр из стекловолокна и мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Полученный фильтрат разливали по флаконам объемом 10 мл из темного стекла и высушивали с помощью лиофильной сушки Virtis AdVantage XL (VirTis, USA). Условия высушивания:

- 1) стадия заморозки – температура полки -65°C , продолжительность 3 ч;
- 2) стадия сублимации – температура полки $+20^\circ\text{C}$, продолжительность 12 ч;
- 3) стадия досушивания – температура полки $+40^\circ\text{C}$, продолжительность 10 ч.

Хранили при 4°C до проведения экспериментов.

Вариант 2 (для проведения экспериментов in vitro)

К 250 мг Lipoid S100 добавляли водный раствор хлорина еб (50мг ди-N-метил-D-глюкаминовой соли хлорина еб), доводили объем до 5 мл и проводили гомогенизацию на ультразвуковой установке Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия) с использованием титанового стержня KE72 в течение 6 минут при мощности 50%. После гомогенизации полученную наноэмульсию охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через фильтр 0,22 мкм.

2.3.1.2 Получение композиции хлорина еб в фосфолипидных наночастицах, снабженных адресным пептидом с NGR мотивом - NPh-Ce6-NGR

а) Синтез конъюгата DSPE-PEG(2000)-NGR

Получение конъюгата DSPE-PEG(2000)-NGR проводили согласно методике, описанной в работе [203], с небольшой модификацией. 23 мг пептида (NH₂-Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys(-COOH)) растворяли в 10 мл ФСБ (pH 7.4) (раствор А) и барботировали азотом. 100 мг DSPE-PEG(2000)-Maleimid смешивали с раствором А, барботировали азотом и инкубировали при комнатной температуре 24 часа. Полученный раствор высушивали с помощью лиофильной

сушки Virtis AdVantage XL. Высушенный лиофильный порошок хранили в условиях морозильной камеры (-16°C).

б) Анализ синтезированного конъюгата DSPE-PEG(2000)-NGR методом MALDI-TOF масс-спектрометрии

Проверку подлинности синтезированного продукта проводили в ЦКП «Протеом человека» ИБМХ с помощью времяпролетного масс-спектрометра Ultraflex II MALDI-ToF/ToF («Bruker Daltonics», Германия), снабженного Nd:YAG лазером. Навеску ~ 1–2 мг синтезированного продукта растворяли в спирте, каплю (~ 0,3 мкл) полученного раствора добавляли в каплю раствора матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота, 10 мг/мл, ацетонитрил-вода 1:1) на мишени прибора и высушивали на воздухе. Снимали масс-спектр исследуемого образца с точностью измерения моноизотопных масс не ниже 50 ppm.

в) Определение остаточного количества NGR-пептида в реакционной смеси

Для контроля полноты прохождения реакции образования конъюгата NGR-пептида и DSPE-PEG(2000)-Mal проводили количественную оценку NGR-пептида в реакционной смеси методом LC/MS на хроматографе Agilent 1200 Series с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS. Для этого отбирали аликвоты реакционной смеси до и после 24-часовой инкубации (раздел 2.3.6.1а), разводили в 10 раз дистиллированной водой и 0,5 мл полученного раствора переносили в вials для анализа. 10 мкл вносили на колонку Eclipse XDB-C18 с размером 4,6 × 150 мм и дисперсностью сорбента 5 мкм с помощью автоматического пробоотборника. Пробу элюировали в изократическом режиме смесью 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты (А) и ацетонитрила (В) в соотношении 9:1 в течение 5 мин со скоростью потока 0,5 мл/мин и температурой колонки 25°C. NGR-пептид детектировали в виде его положительно заряженного молекулярного иона [M + H]⁺ с соотношением массы к заряду (m/z) 563,2 в режиме регистрации индивидуальных ионов (SIM). Способ ионизации – электрораспыление при атмосферном давлении (API-ES). Настройки MS детектора: расход осушающего газа – 9 л/мин, температура осушающего газа – 350°C; давление на распылителе – 35 psig, напряжение на капилляре – 3000 В, напряжение на фрагментаторе – 70 В, коэффициент усиления сигнала – 1. Время удерживания NGR-пептида составляло 2,4 мин.

Калибровочная зависимость площади пика, соответствующего NGR-пептиду, от его концентрации была линейной в диапазоне от 2,3 мкг/мл до 23 мкг/мл (с коэффициентом корреляции 0,99998).

г) Получение композиции хлорина еб в фосфолипидных наночастицах с встроенным конъюгатом DSPE-PEG(2000)-NGR

В стеклянную круглодонную колбу помещали 250 мг Lipoid S100 и растворяли в 2 мл этилового спирта. 25 мг синтезированного конъюгата DSPE-PEG(2000)-NGR (раздел 2.3.1.2а) растворяли в 1 мл этилового спирта и добавляли в спиртовой раствор Lipoid S100. Проводили отгонку спирта на роторном испарителе Heidolph Laborota 4003 в вакууме (температура воды 30°C). Полученную липидную пленку регидратировали 3 мл водного раствора хлорина еб (25 мг по хлорину еб), объем грубой эмульсии доводили до 10 мл. Гомогенизацию грубой эмульсии проводили на ультразвуковой установке Bandelin Sonopuls с использованием титанового стержня KE72 в течение 6 минут при мощности 50%. После гомогенизации полученную наноэмульсию охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через фильтр 0,22 мкм.

2.3.1.3. Получение композиции хлорина еб в фосфолипидных наночастицах, снабженных клеточно-проникающим пептидом гептааргинином - NPh-Ce6-R7

Гептааргинин (R7) разводили небольшим количеством воды очищенной, к водному раствору гептааргинина постепенно, при перемешивании на шейкере IKA MS 3 basic, по каплям добавляли наноэмульсию фосфолипидной композиции хлорина еб, NPh-Ce6 (раздел 2.3.1.1). Соотношение хлорин еб:гептааргинин (Ce6:R7) составляло 1:6.

2.3.1.4. Получение композиции хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы с адресным и проникающим пептидными фрагментами - NPh-Ce6-NGR-R7

Полученную композицию хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы с пептидом, содержащим NGR-мотив (NPh-Ce6-NGR) (раздел 2.3.1.2г), добавляли постепенно по каплям к водному раствору гептааргинина, при перемешивании на шейкере IKA MS 3 basic, до окончательного соотношения хлорин еб:гептааргинин 1:6.

2.3.2. Изучение физико-химических свойств композиций хлорина еб

2.3.2.1. Определение размера частиц и дзета-потенциала

Определение размера частиц проводили с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) методом динамического рассеяния света. Источником света служил лазер с длиной волны 632,8 нм. Область измерения размера частиц коллоидных растворов: 0,6-6000 нм. Для проверки работоспособности прибора использовали стандартные образцы глобулярных белков (GCO 10447-2015, GCO 10446-2015). Аликвоту исследуемого раствора (1 мл) помещали в пластиковую кювету и запускали анализ (SOP - стандартную операционную процедуру), параметры которого задавали в соответствии с рекомендациями руководства к прибору: температура термостатируемой ячейки 25°C, время уравнивания 3 мин и др.

Интенсивность рассеянного света регистрировалась прибором при угле обратного рассеяния 173° и преобразовывалась в автокорреляционную функцию, анализ которой давал распределение частиц по размеру в исследуемом образце.

Определение дзета-потенциала (ζ -потенциала) также проводили с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS методом электрофоретического рассеяния света. В кювету наливали 1 мл исследуемого раствора, разведенного в 5 раз водой очищенной, помещали в измерительную камеру и погружали в него специальный элемент с электродами dip cell (Zen 1002). Проводили измерения, используя стандартную операционную процедуру (SOP).

2.3.2.2. Определение спектров поглощения композиций хлорина еб

Определение спектра поглощения проводили на спектрофотометре Agilent 8453E UV-visible spectroscopy system, (Agilent Technologies, USA) с использованием программы ChemStation.

Для определения спектра поглощения растворы образцов разводили в 1000 раз ФСБ и помещали в 3мл кварцевую кювету (длина оптического пути 1см). В качестве раствора сравнения использовали ФСБ.

2.3.2.3. Количественное определение содержания хлорина еб в фосфолипидных наноконпозициях методом ВЭЖХ

Определение количества хлорина еб в наноконпозициях проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series Liquid Chromatograph (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором и программным обеспечением ChemStation Rev. A.09.03 [150]. Использовали колонку Eclipse XDB-C18 с размером $4,6 \times 150$ мм и дисперсностью сорбента 5 мкм (Agilent Technologies, США). Подвижная фаза: 0,1 % водный раствор ТФУ (А)/0,1 % ацетонитрильный раствор ТФУ (В). Для анализа образец наноконпозиции 9-кратно разводили метанолом. 10 мкл пробы с помощью микрошприца через ручной инжектор вносили на колонку и элюировали в течение 10 мин подвижной фазой, состав которой менялся следующим образом, время в мин (% В): 0(60)–1(99)–10(99). Сигнал хлорина еб детектировали при длине волны 400 нм относительно 460 нм. Время удерживания хлорина еб составляло 4,350 мин.

Концентрацию хлорина еб определяли по следующему калибровочному уравнению:

$$y = 96,69 \times x,$$

где y – площадь пика сигнала, соответствующего хлорину еб; x – концентрация хлорина еб, мг/мл (коэффициент корреляции равен 0,999).

2.3.2.4. *Определение эффективности встраивания хлорина еб в наночастицы*

Для определения эффективности встраивания хлорина еб в наночастицы проводили отделением свободного хлорина еб от встроенного в наночастицы методом ультрафильтрации с помощью центрифужных фильтров Ultrafree-МС (Millipore Corporation, США), состоящие из двух элементов: вкладыша с полиэфирсульфоновой мембраной, задерживающей частицы и молекулы с массой более 10 кДа, и пробирки для сбора фильтрата. Аликвоту 150–200 мкл исследуемого раствора наливали во вкладыш, который помещали в пробирку для сбора фильтрата, закрывали крышкой и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (Eppendorf, Германия) с ротором FA-45-30-11 при скорости 10000 об/мин в течение 20 мин.

Затем определяли концентрацию лекарства в исследуемом растворе (C – суммарная концентрация хлорина еб, мг/мл) и в фильтрате ($C_{\text{ф}}$ – концентрация невстроенного в наночастицы хлорин еб, мг/мл) методом ВЭЖХ, как описано выше. Образцы разводили метанолом в 10 раз. Эффективность встраивания лекарства в наночастицы определяли по формуле:

$$(C - C_{\text{ф}}) \times 100 / C.$$

2.3.3. *Изучение окислительной способности хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы*

2.3.3.1. *Анализ жирных кислот методом ГЖХ-МС*

Раствор хлорина еб в фосфолипидных наночастицах (5 мг/мл) облучали лазером с длиной волны 650 нм (лазерная указка Shezhen, США) в течение 15 мин. После облучения раствор подвергали гидролизу соляной кислотой для переэтерификации жирных кислот по методике [205] с получением метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Водный раствор фосфолипидных наночастиц с хлорином еб (10 мкл, 5 мг/мл по хлорину) разбавляли в 56 раз 3,6 % метанольным раствором HCl и инкубировали в течение 1,5 ч при температуре 80 °С. Полученные МЭЖК экстрагировали 2,2 мл гексана с добавленным внутренним стандартом (октакозан 10 мг/мл) при комнатной температуре в течение не менее 1 ч. Экстракты анализировали с помощью газового хроматографа Agilent Technologies 6890 N (Agilent Technologies, USA), оснащенного масс-спектрометрическим детектором 5973 и автоматическим инжектором, с программным обеспечением MSD ChemStation E.02.00.493. Данное программное обеспечение включает библиотеку масс-спектров Национального института стандартов и технологий. Пробу объемом 1 мкл вводили без разделения потока при температуре испарителя 250 °С. Разделение МЭЖК осуществляли на капиллярной колонке HP-INNOWAX 19091N-133 (Agilent Technologies, США) длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной слоя

неподвижной фазы ПЭГ 0,25 мкм. Через колонку проходил газ-носитель (гелий марки А, Россия) с постоянной скоростью потока 1 мл/мин. Исходная температура термостата колонки составляла 100 °С. Начиная со второй минуты, температуру увеличивали до 240 °С со скоростью 15 °С/мин и затем выдерживали в течение 20 мин. Общее время анализа - 30,33 мин. Температура вспомогательного канала 200 °С. Детектирование осуществляли в режиме сканирования положительно заряженных ионов в диапазоне m/z 50–600. Температура источника ионов и квадруполя составляла соответственно 230 °С и 150 °С.

На полученных хроматограммах экстрактов до и после облучения определяли площади пиков, соответствующих олеиновой, линолевой и линоленовой кислотам и внутреннему стандарту октакозану. Результат выражали в виде отношения площади пика ЖК к площади пика октакозана.

2.3.3.2. Определение окислительной способности хлорина еб в системе глутатиона восстановленного методом LC/MS

Исследуемые растворы, содержащие хлорин еб (водный раствор ди-N-метил-D-глюкаминовой соли хлорина еб (Себ) и хлорин еб в фосфолипидных наночастицах (NPh-Себ), готовили в концентрации 5,5 мг/мл по хлорину еб. Раствор глутатиона восстановленного готовили в концентрации 1 мг/мл. В качестве среды использовали 0,1 М фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ, рН 7,4) или плазму крови человека (полученную в ГБУЗ МО «МОСПК»).

К 800 мкл среды (ФСБ или плазма крови) добавляли 100 мкл исследуемого раствора (Себ или NPh-Себ) и 100 мкл раствора глутатиона восстановленного. В качестве контроля вместо раствора хлорина еб добавляли воду очищенную. Смесь инкубировали в течение 15 мин в темноте. Далее образцы подвергали облучению лазером с длиной волны 650 нм и мощностью 300 мВт (лазерная указка Shezhen), расположенным вертикально на расстоянии 4 см над исследуемым образцом. Через каждые 10 мин облучения проводили отбор проб по 100 мкл. К отобранной пробе прибавляли 400 мкл метанола и перемешивали в течение 3–5 мин с помощью орбитального шейкера ИКА MS3 basic (ИКА, Германия). После этого центрифугировали для осаждения белка на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf, Германия) при 10 000 об/мин в течение 10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости разбавляли 9-кратным объемом 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты и проводили анализ содержания, восстановленного и окисленного глутатиона методом LC/MS на хроматографе Agilent Technologies 1200 с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором Quadrupole LC/MS 6130 (Agilent Technologies, США). Для этого 10 мкл исследуемого раствора вносили с помощью автоматического пробоотборника на колонку Eclipse XDB-C18 с размером 4,6 × 150 мм и

дисперсностью сорбента 5 мкм (Agilent Technologies, США). Хроматографию проводили в изократическом режиме смесью метанола (5 %) и 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты (95 %). Скорость потока подвижной фазы (0,5 мл/мин) и температуру колонки (25 °С) поддерживали постоянными на протяжении анализа продолжительностью 10 мин. Для восстановленного глутатиона регистрировали молекулярный ион с m/z 308 в режиме регистрации индивидуальных ионов (SIM). Время удерживания, восстановленного глутатиона составляло 5,3 мин. В интервале 0,1–10 мкг/мл зависимость площади сигнала от концентрации носила линейный характер (с коэффициентом корреляции 0,99998).

2.3.4. Определение влияния присоединения пептидов к наночастицам с хлорином еб на его накопление и проникновение в опухолевые клетки

2.3.4.1. Определение экспрессии аминопептидазы N (CD13) на поверхности культивируемых опухолевых клеток как белка-мишени для адресного пептида NGR

Работы проводились совместно с лабораторией клеточной биологии ИБМХ. Исследования проводили с использованием набора, включающего антитела к CD13, конъюгированные с флуорохромом, PE, позволяющие идентифицировать популяцию клеток, экспрессирующих антиген CD13. Объектом исследования выступали клеточные линии HepG2, HT-1080 и MCF-7.

Проточная цитометрия: подготовка проб и проведение анализа

Анализируемые образцы (10^5 - 10^6 клеток) ресуспендировали в 100 мкл буфера для окрашивания (ФСБ, 2% ЭТС, 0,1% азид натрия). Для иммуноцитохимического окрашивания использовали мышинные моноклональные антитела к поверхностному антигену клеток человека CD13, конъюгированным с флуорохромом фикоэритрином (PE). В качестве контроля использовали изотипические антитела (антитело того же изотипа, но не имеющее специфичности к исследуемому антигену), конъюгированные с этим же флуорохромом (BD Biosciences, США). Окрашивание суспензии клеток проводилось в течение 30 минут при температуре 4° С с периодическим перемешиванием на минишейкере (IKA, США). После окрашивания проводили двукратную отмывку клеток с применением ФСБ с 0,1% азидом натрия, центрифугирование (300g, 5 мин) и удаление супернатанта.

После отмывки клетки фиксировались в течение 15 минут с 0,5 мл буфера для фиксации, представляющим собой 4% раствор параформальдегида. Объем полученной клеточной суспензии довели до 1 мл и фильтровали в пробирки для цитометрии (BD Biosciences, США) с крышкой-фильтром с диаметром пор 35 мкм для исключения клеточных агрегатов.

Цитометрический анализ проводили с помощью цитометра FACSAria III (BD Biosciences, США) с применением программного обеспечения BD FACSDiva Software version 7. Индукцию

флуоресценции PE производили с применением желто-зеленого лазера 561нм; для детекции флуоресцентного сигнала использовали фильтр BP 582/15. При анализе полученных данных из анализируемой клеточной популяции исключали клеточный дебрис и дуплеты на основе параметров их прямого и бокового светорассеивания. Комбинированные гистограммы, отображающие интенсивность флуоресценции в контрольных и опытных образцах, получали при помощи компьютерной программы FlowJo v7.6.2.

2.3.4.2. Определение накопления в культивируемых клетках Себ, вносимого в составе композиций с фосфолипидными наночастицами

Для оценки эффективности накопления хлорина еб в клетках были использованы клеточные линии HepG2, HT-1080 и MCF-7. Клетки (10^6 клеток/лунка) высевали в 6-луночные планшеты и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Далее из лунок удаляли ростовую среду и промывали один раз ФСБ. После отмывки в лунки вносили исследуемые образцы (NPh-Себ, NPh-Себ-R7, NPh-Себ-NGR, NPh-Себ-NGR-R7) с концентрацией по хлорину еб 20 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 4 часов при температуре 37 °С (CO₂-инкубатор “Sanyo”, (Sanyo, США) и 4 °С. После инкубации растворы хлорина еб удаляли, и клетки промывали дважды раствором ФСБ.

После промывки хлорин еб из клеток экстрагировали раствором 0,1% муравьиная кислота/метанол (1мл на лунку) и перемешивали на шейкере IKA-Vibrax-VXR (IKA, Германия) в течение 5-10 минут. Метанольные экстракты переносили в пробирки eppendorf и центрифугировали при 10000 об/мин 10 мин (при 4 °С) (Eppendorf 5810R, ротор FA-45-30-11) для осаждения белка. Надосадочную жидкость переносили в виалы и анализировали содержание хлорина еб методом LC/MS, с использованием хроматографической системы для ВЭЖХ Agilent 1200 Series с колонкой Eclipse XDB-C18 и MS детектором 6130 Quadrupole LC/MS.

Пробу элюировали в течение 10 мин со скоростью потока 0,5 мл/мин смесью 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В), состав которой менялся следующим образом, время в мин (% В): 0(70)–3(90)–10(90). Температура колонки поддерживалась на уровне 20 °С. Хлорин еб детектировали в виде его положительно заряженного молекулярного иона $[M + H]^+$ с соотношением массы к заряду (m/z) 597,3 в режиме регистрации индивидуальных ионов (SIM). Способ ионизации – электрораспыление при атмосферном давлении (API-ES). Настройки масс-спектрометрического детектора: расход осушающего газа – 9 л/мин, температура осушающего газа – 350 °С; давление на распылителе – 35 psig, напряжение на капилляре – 3000 В, напряжение на фрагментаторе – 70 В, коэффициент усиления сигнала – 5.

Количественный расчёт концентрации хлорина еб в экстракте (С) производили с помощью калибровочной кривой (рис. 10) зависимости площади пика (S) от концентрации, которая в диапазоне концентраций хлорина еб 0,011–11,000 мкг/мл имела линейный характер, вида: $S = 3527669 \times C - 315219$ (коэффициент корреляции 1,00000).

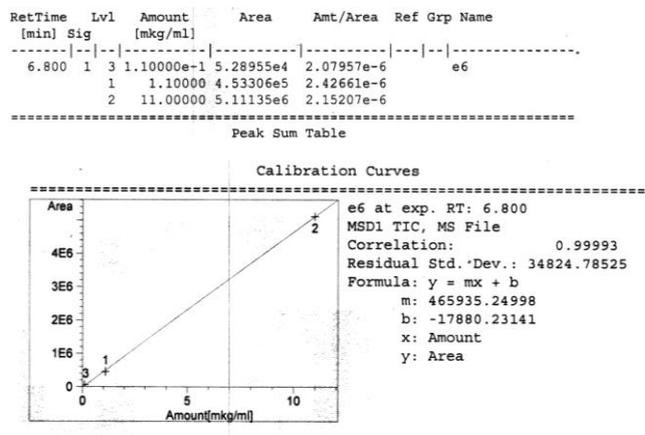


Рисунок 10. Калибровочная зависимость для хлорина еб (стандарта) с использованием программного обеспечения Agilent LC/MSD ChemStation B.03.02-SR2 жидкостного хроматографа Agilent 1200 Series, с масс-спектрометрическим детектором Quadrupole LC/MS 6130 фирмы Agilent Technologies (США).

В лунки после удаления экстрактов вносили для лизиса по 1мл 1М NaOH. Через 24 ч щелочные растворы с белком переносили в пробирки Eppendorf. Содержание белка в лизате определяли методом Лоури.

Содержание хлорина еб в клетках нормировали на уровень белка (мг). Полное проникновение Себ в клетку (интернализацию) рассчитывали по разности его содержания при 37 °С (общее накопление в клетках) и при 4 °С; ранее показано, что при 4 °С взаимодействие пептида с клеткой ограничивается его ассоциацией с наружной клеточной мембраной, и входит он в клетку только при более высоких температурах [206].

2.3.5. Определение цитотоксичности и фотоиндуцированной активности хлорина еб в фосфолипидных наночастицах *in vitro*

Работа проводилась совместно с МНИОИ им. П.А.Герцена, филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

2.3.5.1. Исследование цитотоксического действия хлорина еб (без воздействия света)

Клетки рассеивали в стерильные 96-луночные культуральные планшеты в концентрации 10^4 клеток на лунку и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ (CO₂- инкубатор Binder

(Binder, Германия)) в течение 24-26 часов. Далее в планшеты вносили сравниваемые композиции (NPh-Se6, NPh-Se6-R7, NPh-Se6-NGR, NPh-Se6-NGR-R7, Se6) в концентрациях по хлорину еб от 0,016 мкг/мл до 20 мкг/мл (разведение с шагом 5); разведения образцов осуществляли культуральной средой без сыворотки. Клетки инкубировали с образцами 24 часа при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ теста [202, 204]. Регистрировали поглощение при 550 нм (Multiscan FC, “ThermoSpectronic”, США) и нормировали на необработанный контроль (без добавления образцов Se6).

Уровень ингибирования роста клеток вычисляли по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = [(OD_k - OD_0) / OD_k] \times 100\%,$$

где: ИР - уровень ингибирования роста клеток в культуре; OD_к и OD₀ - оптическая плотность раствора формазана (фиксирующего количество живых клеток при проведении МТТ теста) в контрольных и опытных лунках, соответственно.

2.3.5.2. Определение фотоиндуцированной активности

Подготовка клеток и инкубация с исследуемыми композициями проводилась, как описано выше (2.3.4.2). Далее клетки подвергались облучению светом (источник облучения - галогеновая лампа с широкополосным фильтром КС-13 ($\lambda \geq 640$ нм (Россия)), мощностью 500 Вт). Доза света составляла 10 Дж/см². После облучения клетки оставляли при стандартных условиях (при 37 °С в атмосфере 5% CO₂) на 24-28 ч, затем проводили оценку выживаемости опухолевых клеток с использованием МТТ-теста, как описано выше (2.3.5.1). Критерием оценки специфической активности являлась величина ИК₅₀ [207].

2.3.6. Анализ накопления хлорина еб в органах животных

2.3.6.1. Определение накопления хлорина еб в ткани опухоли

В эксперименте использовали мышей с инокулированной карциномой легкого Льюис (LLC). Животным внутривенно вводили хлорин еб в свободной форме (Se6) и в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Se6) в дозе 5 мг/кг по хлорину еб. Через определенные промежутки времени осуществляли декапитацию животных и забор опухоли. Навеску ткани опухоли (100 ± 20 мг) измельчали ножницами и помещали в пластиковую пробирку. После этого добавляли трехкратный объем воды очищенной и гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия) с титановым наконечником MS-72 (45 с, мощность 45%). Из аликвоты полученного гомогената экстрагировали хлорин еб девятикратным объемом раствора 0,1% муравьиная кислота в

метаноле, перемешивали, центрифугировали (10 000 об/мин, 10 мин, 4 °С) для осаждения белка и частиц титана. Надосадочную жидкость переносили в вials и определяли в ней количество хлорина еб методом LC/MS. Для определения хлорина еб в образцах использовали хроматографическую систему Agilent 1200 Series с масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS, анализ проводили как описано выше (2.3.4.2).

Содержание хлорина еб в образцах опухолевой ткани (А, мг/г ткани) рассчитывали по следующей формуле:

$$A = (C \times 40) / P,$$

где С – экспериментально найденное значение концентрации хлорина еб в экстракте (мг/мл);

40 – множитель, учитывающий разбавление;

P – навеска опухолевой ткани (г).

2.3.6.2. Исследование фармакокинетики хлорина еб в крови при введении мышам с опухолью

Эксперимент проводили на мышах-самках с привитой карциномой LLC. Препараты на основе хлорина еб (NPh-Себ и субстанцию хлорина еб) вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг. Через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 6; 24 ч наркотизированных животных декапитировали и проводили забор крови из центрального кровотока в специальные пробирки, содержащие натриевую соль ЭДТА, при тщательном перемешивании, предотвращая появление сгустков.

Для экстракции хлорина еб из цельной крови аликвоту крови разбавляли 9-кратным объемом раствора 0,1% муравьиная кислота/метанол. Пробы экстрагировали при постоянном перемешивании в течение 5 мин. После этого проводили центрифугирование (10 000 об/мин, в течение 10 мин при t=4 °С) с использованием центрифуги Centrifuge 5810R. Отбирали 300 мкл надосадочной жидкости, переносили в вials и анализировали хлорин еб методом LC/MS, как описано выше (раздел 2.3.4.2.).

Полученные данные обрабатывали с использованием математического аппарата Microsoft Excel: построение фармакокинетических кривых осуществляли по данным, представленным как средние арифметические значения величин (M), стандартные отклонения среднего результата (SD), доверительный интервал ($\alpha=0,05$), коэффициент вариации (CV%). Фармакокинетические параметры рассчитывали на основании экспериментальных результатов (концентрация – время) с использованием программы для расчета параметров фармакокинетических кривых Borgia (интернет-версия 1.03) и математического аппарата Microsoft Excel.

2.3.6.3. Исследование динамики распределения хлорина еб по органам и тканям мыши по анализу флуоресценции

Работа проводилась совместно с МНИОИ им. П.А.Герцена, филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России.

Определение накопления хлорина еб в органах проводили методом контактной флуориметрии. Животным - мышам (18-20г) (с инокулированной опухолью, разделы 2.3.6.1 и 2.3.6.2 и здоровым) - внутривенно вводили хлорин еб, «свободный» или в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Себ), в дозе 5 мг/кг. Через 0,25; 0,5; 1; 3 и 24 ч наркотизированных животных декапитировали и проводили забор органов и тканей (кожа, мышцы, жировая ткань и селезенка). В качестве контроля выступали животные, которым вместо хлорина еб вводили физиологический раствор. Регистрацию флуоресценции хлорина еб проводили контактным способом на лазерном спектральном анализаторе для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля ФДТ «ЛЭСА-06» (ТОО «БиоСпек», Россия). Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne лазера (длина волны генерации флуоресценции 632,8 нм, спектральный диапазон измерений 640-800 нм). Из полученных показаний вычитали показания прибора для соответствующих тканей у животных контрольной группы, используемые в качестве фоновой флуоресценции.

2.3.6.4. Определение динамики накопления хлорина еб в печени и почках здоровых животных, в экспериментах на крысах методом масс-спектрометрии

В эксперименте были использованы здоровые крысы-самцы, по 3 животных на каждую временную точку. Крысам внутривенно в дозе 5 мг/кг вводили хлорин еб в фосфолипидных наночастицах (NPh-Себ), в качестве препарата сравнения выступал водный раствор ди-N-метил-D-глюкаминовой соли хлорина еб. Через определенные промежутки времени (0,25; 0,5; 1; 3; 24 ч) после введения наркотизированных животных декапитировали, извлекали печень и почки, промывали 2–3 раза водой очищенной. Пробоподготовку образцов (с экстракцией из них хлорина еб) и определение содержания хлорина еб в экстрактах проводили методом LC/MS (раздел 2.3.4.2.).

2.3.7. Статистическая обработка результатов

Достоверность различий средних значений характеристик (размер частиц, светопропускание, процент включения, дзета-потенциал, $AUC_{0-\infty}$ и C_{max}), в сравниваемых образцах оценивали по критерию Стьюдента.

Для обработки результатов исследования использовали стандартную компьютерную программу STATISTICA.

Для цифровых данных нормированной флуоресценции препаратов в крови, органах и тканях животных, флуоресцентной контрастности, объема опухоли и продолжительности жизни животных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm m$). Для оценки достоверности различий между опытной и контрольной группами в каждом исследовании применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб

3.1.1. Конпозиция хлорина еб, снабженного фосфолипидной системой транспорта - физические свойства

Для включения различных биологических соединений ранее в ИБМХ была разработана система транспорта на основе наночастиц из растительных фосфолипидов, получаемая с использованием гомогенизации (микрофлюидизации) при высоком давлении [208, 209]. Высокое включение (более 95% при соотношении лекарство / липид 1:10) было показано для ряда амфифильных лекарственных соединений, содержащих в молекуле гидрофобные и полярные фрагменты, способствующие встраиванию в поверхностный фосфолипидный слой частицы [210]. В связи с сочетанием в молекуле хлорина еб гетероциклов порфирина и полярных карбоксильных групп можно было ожидать возможности встраивания его в такие наночастицы, что и было сделано в настоящей работе. На основе данной системы и разработанной технологии нами была получена конпозиция хлорина еб (его ди-N-метил-D-глюкаминовой соли) в составе наночастиц (**NPh-Ce6**). Данная конпозиция (**NPh-Ce6**) представляет собой ультратонкую эмульсию фосфолипидных наночастиц, сохраняющую после лиофилизации и регидратации все физико-химические характеристики. При её приготовлении в качестве криопротектора, позволяющего защитить материал при замораживании и последующем размораживании в ходе высушивания [208], использовали мальтозу, в соотношении к фосфолипиду 1:4. Данное соотношение позволяет получить лиофильно высушенный порошок, при регидратации которого сохраняются его свойства (размер частиц, процент встроенной в них субстанции и др.). Это свойство существенно как для проведения экспериментов, особенно *in vivo*, а также является позитивным фактором в плане перспективности разработки стабильного при хранении лекарственного препарата.

Для получения конпозиции хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы, было использовано соотношение основных компонентов, хлорина еб и соевого фосфолипида (Lipoid S100), равное 1:10, как и ранее для других включаемых в систему лекарств [208]. Данное соотношение позволяет получить конпозицию с предельно малым размером частиц и максимальной загрузкой субстанции в них. Методом ультрафильтрации показано, что **97,4±4,1** % (до лиофилизации) взятого хлорина еб (при его исходном соотношении с фосфолипидом 1:10) оказывается в процессе обработки встроенным в фосфолипидные наночастицы (Таблица 2). При этом характеристики наночастиц сохраняются в процессе лиофилизации и последующей регидратации полученной наноэмульсии (таблица 2).

Таблица 2. Физико-химические показатели эмульсии фосфолипидной наноконпозиции хлорина еб до сушки и после регидратации

Показатель	Величина		
	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
ζ-потенциал, mV	-22,4±1,5	-24,1±4,5	-23,3±6,6

Анализ физико-химических свойств ультратонкой эмульсии, образующейся при регидратации лиофильно высушенного порошка наноконпозиции хлорина еб (**NPh-Себ**) (таблица 2), показал средний размер частиц 24±2,5 нм. Дзета-потенциал (ζ-потенциал), характеризующий поверхностный заряд частицы и существенный для противо-агрегационной стабильности коллоидной системы [211, 212], составлял -23,3±6,6 mV; отрицательный заряд поверхности обусловлен карбоксильными групп хлорина еб. На основании данных [213], показывающих склонность к флокуляции (агрегации) для частиц с ζ-потенциалом ниже |15| mV и электростатическую стабилизацию при его повышении, полученное значение для фосфолипидных наночастиц с хлорином еб может свидетельствовать об их стабильности. Таким образом, было показано, что использование лиофильного высушивания не оказывает негативного влияния на физико-химические параметры композиции хлорина еб.

В ряде экспериментов, при оценке эффективности данной композиции *in vitro*, без необходимости замораживания и хранения образцов, фосфолипидную наноконпозицию хлорина еб получали пленочным методом, без введения криопротектора. Размер полученных наночастиц эмульсии хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы, был сходным с таковым при использовании микрофлюидизации и составлял 18±1,7 нм; сходным был и процент включения лекарства в наночастицы - 94,6 ±2,17 (по сравнению с 19,3±1,2 нм и 97,4±4,1%, соответственно).

Оценка спектральных характеристик хлорина еб при включении в фосфолипидные наночастицы, существенных для ФДТ, показала отсутствие изменений в сравнении со свободной формой (Рис. 11).

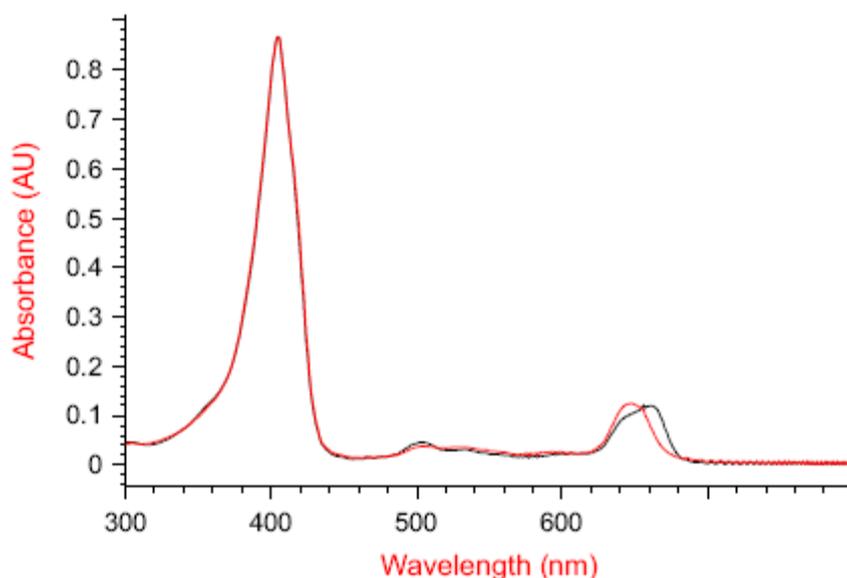


Рисунок 11. Спектры поглощения ди-N-метил-D-глюкаминовой соли хлорина е6 (красная кривая) и NPh-Се6 (черная кривая) в фосфатно-солевом буфере (рН= 7,4) (концентрация по Се6 5 мкг/мл)

Как видно из рисунка 11, поглощение в районе 400 нм (полоса Soret - самая коротковолновая область видимого излучения, характерная для порфиринов) для Се6 в составе фосфолипидных наночастиц не изменилась. В области Q-полосы ($\lambda = 650$ нм) наблюдается батохромный сдвиг – спектр поглощения немного смещен в область длинных волн. Следует отметить, что такой сдвиг спектра NPh-Се6 в красную область **способствует увеличению ответа** фотосенсибилизатора на действие более глубоко проникающего в ткани длинноволнового света, снижению поглощения пигментами крови, и, следовательно, повышению эффективности ФДТ [214, 215], что могло бы быть положительным фактором в плане перспективы создания нового лекарственного препарата на основе этой наноэмульсии.

Таким образом, включение хлорина е6 в фосфолипидные наночастицы способствует **улучшению** его спектральных характеристик как фотосенсибилизирующего агента для ФДТ: наблюдается сдвиг максимума поглощения Q-полосы в длинноволновую область спектра в сравнении со свободным Се6.

3.1.2. Фотодинамическая активность хлорина е6 в фосфолипидных наночастицах

Для выяснения результативности встраивания хлорина е6 в фосфолипидные наночастицы была определена эффективность полученной системы как ФС. Эффективность фотосенсибилизаторов определяется их способностью под действием света генерировать активные формы кислорода (reactive oxygen species – ROS (АФК), реакции I типа), в том числе синглетный кислород (реакции II типа). Баланс между двумя процессами зависит от типа ФС,

концентрации кислорода и, для реакции типа 1, от сродства субстрата и ФС [216]. Для характеристики общей выработки АФК под действием фотосенсибилизаторов используют различные критерии, например - определение активности степени дезоксигенации гемоглобина, обусловленной расходом присутствующего кислорода на фотодинамические реакции при облучении [217]. Мы сочли удобным и информативным использовать для этой цели присутствующие в наноконпозиции потенциальные субстраты окисления - ненасыщенные жирные кислоты (ЖК) фосфолипидов, а также глутатионовую редокс-систему плазмы крови, существенную для протекания окислительных процессов организма [215, 216], в том числе и индуцируемых при ФДТ. С использованием их нами была проведена оценка фотосенсибилизирующей активности хлорина еб в изменённых для него условиях функционирования (в фосфолипидных наночастицах) по двум критериям:

- 1) окисление двойных связей ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов и,
- 2) окисление восстановленного глутатиона

3.1.2.1. Окисление ненасыщенных жирных кислот ФЛ в содержащих хлорин еб наночастицах как показатель образования активных форм кислорода

Входящие в состав NPh-Seб фосфолипиды сои характеризуются высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот, двойные связи которых могут быть «ловушками» свободных радикалов. Учитывая этот факт и локальный характер действия образующихся АФК – из-за короткого времени жизни и поглощения ближайшими к ФС окисляемыми молекулами – была проведена с использованием ГЖХ/МС оценка степени окисления хлорином еб под действием света ненасыщенных ЖК фосфатидилхолина, составляющего матрицу частицы, в которую включен этот ФС. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 3. Изменение содержания ненасыщенных жирных кислот в образцах фосфолипидной наноконпозиции хлорина еб до и после облучения лазером с $\lambda = 650$ нм. (в отн. ед.)*

Жирные кислоты Образец	Олеиновая (C18:1)	Линолевая (C18:2)	Линоленовая (C18:3)
До облучения	0,395±0,032	1,719±0,125	0,113±0,009
После облучения	0,332±0,031	1,213±0,006	0,071±0,003

* за единицы принимали отношение площади пика жирной кислоты при ГЖХ разделении к таковой для внутреннего стандарта

Из результатов, представленных в таблице 3, видно, что содержание олеиновой, линолевой и линоленовой жирных кислот (моно-, ди- и триненасыщенной) в образцах

снижается, соответственно на 16%, 29% и 37%, что свидетельствует об окислении их двойных связей под действием АФК, генерируемых хлорином еб при облучении светом. Эти домены молекул ФЛ оказываются локально наиболее приближенными к включенному в фосфолипидные наночастицы Себ, и поэтому активно подвергаются окислению. То есть, хлорин еб, будучи включенным в систему, NPh-Себ, сохраняет свои фотоиндуцируемые окислительные свойства, проявляющиеся в первую очередь по способности к окислению двойных связей близко расположенных жирных кислот фосфолипидов.

3.1.2.2. Оценка окислительной способности хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы, по действию на восстановленный глутатион

Другим показателем выраженного окислительного действия облучаемого светом хлорина еб в наночастицах явилось его влияние на глутатионовую редокс-систему плазмы крови. Эта система является основной в организме, защищающей его от окислительного стресса, повреждающего макромолекулы и клеточные структуры и вызывающего тем самым нарушения в процессах нормального функционирования клетки и организма в целом [215, 216]. Активность этой системы обусловлена высоким отношением содержания восстановленной формы глутатиона (ГЛУ) к окисленной, поддерживающим антиоксидантный баланс. По сравнению с другими эндогенными антиоксидантами она обладает в два раза большей эффективностью, т.к. в окислительно-восстановительной реакции ГЛУ осуществляется перенос двух, а не одного электронов, как в других системах [218]. В работе Jones D.P [219] показано, что ГЛУ принимает прямое или опосредованное участие в наиболее ответственных процессах жизнедеятельности и повреждения клетки и, в частности, в процессах, сопровождающих апоптоз [220] и некроз [221] клеток.

Поэтому представляло существенный интерес оценить способность хлорина еб в составе фосфолипидных наночастиц в сравнении со свободным, к развитию дисбаланса этой редокс-системы, способствующего инициируемому ФДТ окислительному повреждению ткани-мишени. При этом, так как способом введения хлорина еб является внутривенный (с последующим локальным облучением опухоли), оценку проводили по состоянию системы ГЛУ в плазме крови.

Определяли изменение соотношения восстановленного и окисленного ГЛУ под действием хлорина еб в присутствии свободного Себ или его фосфолипидной наноконструкции (NPh-Себ) в ФСБ и плазме крови здорового донора. На рисунке 12 приведены результаты по определению концентрации ГЛУ восстановленного (ГЛУ_{восст}) в среде через 10 мин после облучения образцов. Важно отметить, что в образцах, не подвергнутых облучению, снижения концентрации ГЛУ_{восст} не происходило.

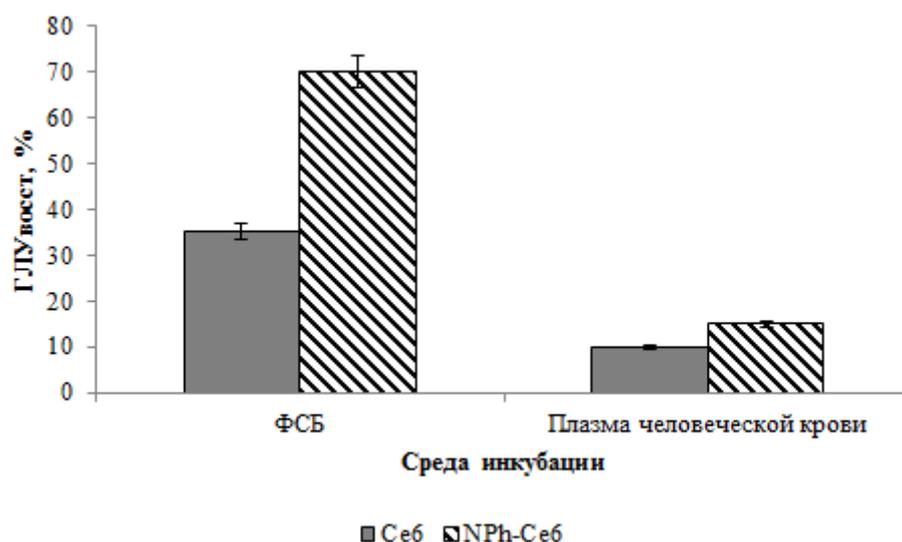


Рисунок 12. Изменение содержания ГЛУ_{восст} (в % по отношению к уровню до облучения) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и в плазме крови под действием свободной субстанции (Себ) и фосфолипидной наноконпозиции хлорина е6 (NPh-Себ) (после 10 мин. облучения лазерным светом с $\lambda = 650$ нм)

Из представленных на рисунке 12 данных видно, что в буфере доля ГЛУ_{восст} после действия NPh-Себ выше, чем после свободного Себ ($P \leq 0,05$), то есть окисление ГЛУ_{восст} происходит под действием NPh-Себ в меньшей степени. Это связано с тем, что в образцах, содержащих NPh-Себ, возникающие при облучении хлорина е6 АФК расходуются на окисление не только ГЛУ_{восст}, но также, как представлено выше (раздел 3.1.2.1, таблица 2), и на окисление ненасыщенных жирных кислот ФЛ наночастиц.

В плазме окисление ГЛУ_{восст} происходит практически одинаково в присутствии как свободного Себ, так и его фосфолипидной наноконпозиции. Этот факт можно объяснить тем, что в плазме субстратами окисления являются, помимо ГЛУ_{восст} и фосфолипидов наночастиц, также и ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов липопротеинов. Окисление ненасыщенных жирных кислот под действием АФК в результате облучения Себ в свою очередь инициирует возникновение перекисных радикалов типа ROO*, RO*, OH*. Образующиеся при этом продукты перекисного окисления липидов способны влиять на многие метаболические процессы в клетке, вызывающие, в том числе её гибель [219, 222], а также окисляют ГЛУ_{восст} [223], снижая возможность его антиоксидантного действия.

Таким образом, включение Себ в фосфолипидные наночастицы не ослабляет его способность под действием света генерировать АФК. При этом, в результате облучения источником АФК в плазме крови становится не только сам Себ, но и продукты перекисного окисления ненасыщенных ЖК фосфолипидов матрицы частиц NPh-Себ и липопротеинов плазмы, что должно способствовать увеличению фоточитотоксичности встроенного в

фосфолипидные наночастицы Себ. Подобный эффект увеличения фоточитотоксичности был показан для липосомальных форм производных Себ [13, 14, 222].

3.1.3. Влияние встраивания хлорина еб в фосфолипидные наночастицы на его действие на опухолевые клетки *in vitro* (фотоиндуцированное и неспецифическое цитотоксическое действие)

Основным параметром, характеризующим действие ФС, является оценка фотоиндуцированной активности. Кроме этого, для выяснения степени специфичности действия ФС определяют также для сравнения и «темновую» цитотоксичность, без облучения светом. Этот эксперимент был проведен для композиции хлорина еб в составе фосфолипидных наночастиц (**NPh-Себ**) в сравнении со свободной формой. Для выяснения действия фосфолипидной наноконструкции хлорина еб на клетки опухолей определяли (с помощью МТТ теста) долю погибших клеток гепатомы НерG2 в образцах культуры, проинкубированных с этой композицией или со свободным хлорином еб, как после воздействия света (фотоиндуцированное действие), так и без света (неспецифическая, «темновая» цитотоксичность). В таблице 4 приведено сравнение специфической фотоиндуцированной активности, выраженной в величинах ИК₅₀ (концентрация, вызывающая гибель 50% клеток), и неспецифической «темновой» токсичности свободного и встроенного в наночастицы хлорина еб. Для экспериментов без облучения светом, когда практически сохраняются почти все клетки, приведено содержание (% от контроля) присутствующих в среде не подвергнувшихся цитотоксическому действию живых клеток при трёх возрастающих концентрациях хлорина еб.

Таблица 4. Фотоиндуцированная активность и «темновая» токсичность хлорина еб на клетках НерG2 в составе фосфолипидных наночастиц в сравнении со свободной формой

Измеряемый параметр	Форма хлорина еб	
	Себ (свободный)	NPh-Себ (в наночастицах)
Фотоиндуцированная активность		
ИК₅₀, мкг/мл*	4,0 ±0,1	2,3±0,2
«Темновая» токсичность (цитотоксичность)		
Процент живых клеток, после инкубации (%)		
при концентрациях по Себ:		
1,25 мкг/мл	91±2,3	100±1,9
5 мкг/мл	85±3,4	100±0,7
20 мкг/мл	83±1,7	90±2,0

* - концентрация по хлорину еб.

Как видно из таблицы 4, для хлорина еб в наночастицах величина ИК₅₀ (2,3 мкг/мл), оказалась существенно ниже, чем для свободного (4 мкг/мл), что указывает на более высокую фотоиндуцированную активность, по-видимому, вследствие повышения проникновения его в клетки. В то же время свойственная этому ФС обычно небольшая цитотоксичность без облучения, сохраняющая в среднем более 90% живых клеток, остаётся практически на том же уровне, даже при высокой концентрации (20 мкг/мл), существенно превышающей приведенную выше величину ИК₅₀.

То есть, включение в фосфолипидные наночастицы значительно повышает его специфическое фотоиндуцированное действие на опухолевые клетки, не оказывая влияния на «темновую» цитотоксичность. При этом следует обратить внимание на существенно более низкую «темновую» цитотоксичность по сравнению с индуцированной светом, для обеих форм ФС, особенно при включении в наночастицы (NPh-Себ). Если при облучении для уничтожения половины живых клеток достаточно было концентраций хлорина еб в среде 2,3±0,2 мкг/мл (ИК₅₀), то без облучения значительно более высокая, почти на порядок, его концентрация (20 мкг/мл) вызывала гибель лишь 10% клеток.

3.1.4. Исследование накопления хлорина еб в тканях мышей с опухолью LLC при его внутривенном введении в составе композиции с ФЛ наночастицами (NPh-Ce6)

3.1.4.1. Накопление хлорина еб в ткани опухоли

Исследование кинетики накопления хлорина еб в опухолевой ткани после внутривенного введения свободного хлорина еб и его фосфолипидной наноконструкции проводили на мышах с привитой карциномой LLC с использованием масс-спектрометрической оценки содержания ФС в образцах взятой ткани (рис. 13).

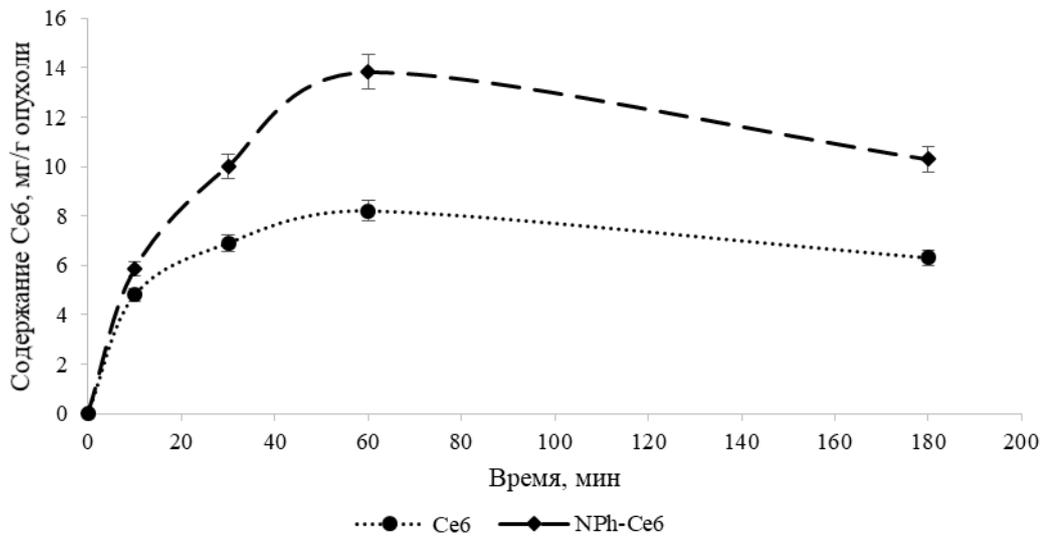


Рисунок 13. Изменение содержания хлорина еб в ткани опухоли мышей с карциномой LLC после введения свободной субстанции хлорина еб (Ce6) и фосфолипидной наноконструкции (NPh-Ce6); вводимая доза по хлорину еб 5 мг/кг

Было показано, что максимум концентрации хлорина еб в опухоли достигается для обеих систем через 60 минут после введения. Однако степень накопления была разной для свободного и встроенного в наночастицы ФС и, в частности, в этой максимальной точке она была для последнего почти вдвое выше, чем для свободного. Различия сохранялись и в последующие часы после введения. То есть, накопление в опухоли хлорина еб, введённого экспериментальным животным в составе фосфолипидных наночастиц, происходит в большей степени по сравнению со свободной субстанцией; различия были статистически достоверными ($0,01 \leq p \leq 0,05$) для всех исследованных временных интервалов.

3.1.4.2. Фармакокинетика хлорина еб в крови

В том же эксперименте проводили исследование фармакокинетических параметров композиции хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы (NPh-Ce6), в сравнении со свободной субстанцией - ди-N-метил-D-глюкаминовой солью хлорина еб (Ce6). На рисунке 14

представлено изменение содержания хлорина еб в плазме крови после его внутривенного введения в обеих названных формах.

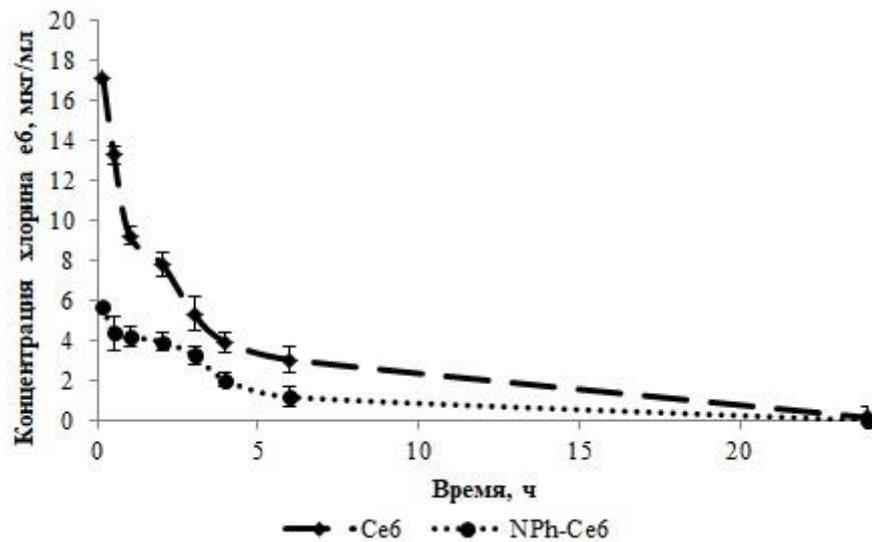


Рисунок 14. Содержание хлорина еб в плазме крови мышей с карциномой LLC после его внутривенного введения в виде ди-N-метил-D-глюкаминовой соли (Ce6) и в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Ce6) (доза по хлорину еб - 5 мг/кг)

Из представленных на рисунке 14 данных видно, что происходит постепенное снижение концентрации хлорина еб в крови в основном в течение 3 – 6 ч после введения препарата. Через 24 ч в плазме крови обнаруживаются только следовые количества исследуемого вещества в обоих случаях (фосфолипидная форма и свободная субстанция). В течение всего эксперимента концентрация хлорина еб в плазме крови при введении фосфолипидной формы была практически в 2 раза ниже по сравнению с введением свободной субстанции. Данный эффект, возможно, связан с более быстрым перераспределением хлорина еб в другие органы и ткани из кровотока.

Для оценки фармакокинетики разработанной композиции (NPh-Ce6) на основе полученных данных были рассчитаны с использованием программы Bordgia следующие параметры:

Cl (мл/мин) – клиренс - скорость очистки организма от лекарств. Соответствует тому объему крови распределения, которая очищается полностью от препарата за единицу времени;

$T_{1/2}$ (мин) – период полувыведения лекарственного вещества из организма;

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (мин×мкг/мл) - площадь под кривой (area under curve) зависимости концентрации лекарственного препарата в плазме от времени в пределах интервала времени от 0 до ∞ , т.е. до конца эксперимента (как видно из рисунка 14, до 24 часов после введения).

Значения названных фармакокинетических параметров исследуемой композиции в проведенном эксперименте по сравнению с таковыми для свободной субстанции приведены в таблице 5.

Таблица 5. Значения фармакокинетических параметров после внутривенного введения мышам с опухолью LLC хлорина еб в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Ce6) и свободного хлорина еб (Ce6) в дозе 5 мг/кг (по хлорину еб).

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

Из полученных данных (таблица 5) видно, что у хлорина еб, введенного в составе фосфолипидных наночастиц, период полувыведения ($T_{1/2}$) в 2 раза короче по сравнению с введением свободной субстанции, что свидетельствует о более быстром его распределении из «центральной камеры» (под центральной камерой понимается кровь и хорошо кровоснабжаемые органы: сердце, почки, легкие, эндокринные органы, печень, кишечник). Для хлорина еб в этой композиции был показан также больший в 2,4 раза клиренс, свидетельствующий о более высокой скорости выведения ФС из организма, по сравнению с введением свободной субстанции. Более быстрое выведение, меньшее пребывание в кровотоке проявляется в меньшем значении принятого показателя AUC (площадь под кривой «концентрация - время»). Это свидетельствует о суммарном благоприятном воздействии - меньшем (по времени и по количеству) пребывании в кровяном русле хлорина еб, вводимого в наночастицах, и, следовательно, меньшей возможности проникновения в здоровые ткани и развития индуцируемых им побочных эффектов.

3.1.4.3. Динамика содержания хлорина еб в коже мышей с опухолью LLC, определенная по его флуоресценции

Сравнение тканевого накопления хлорина еб, вводимого в двух формах, проводилось у мышей с опухолью и на здоровой ткани – ткани кожи, которая при проведении ФДТ принимает на себя некоторое его количество, вызывая побочные эффекты и повышенную чувствительность к свету [64, 95]. Оценку накопления его в коже проводили путем косвенного подхода, принятого в клинических и доклинических исследованиях - метода контактной флуориметрии [224]. Он заключается в оценке интенсивности возбуждаемой лазерным

излучением флуоресценции хлорина еб и других ФС, пропорциональной его содержанию в ткани. Этот метод используют для флуоресцентной диагностики опухолей и контроля за ФДТ. Метод не даёт количественного результата в плане содержания ФС в ткани, данные его представляют в относительных единицах флуоресценции. Но благодаря её прямой зависимости от количества флуоресцирующего агента (в данном случае ФС хлорина еб) он даёт точную сравнительную оценку его количества в разных образцах одной и той же ткани. Метод позволяет оценить максимум накопления ФС и разницу при введении тех или иных форм препаратов при терапии, а также даёт возможность проводить сравнение относительного накопления ФС в ткани при разных условиях и следить за возможной динамикой. Нами был использован этот подход для косвенной сравнительной оценки накопления хлорина еб в коже мышей с опухолью. Для этого взятые образцы кожи мышей после введения обеих форм хлорина еб подвергали лазерному облучению с последующей регистрацией индуцируемой присутствующим хлорином еб флуоресценции облучённой ткани.

На рисунке 15 представлена динамика оцениваемого таким образом накопления и последующего выведения хлорина еб из кожи мышей с карциномой LLC в течение 24 часов после внутривенного введения сравниваемых форм ФС – свободного и в фосфолипидных наночастицах (NPh-Ce6).

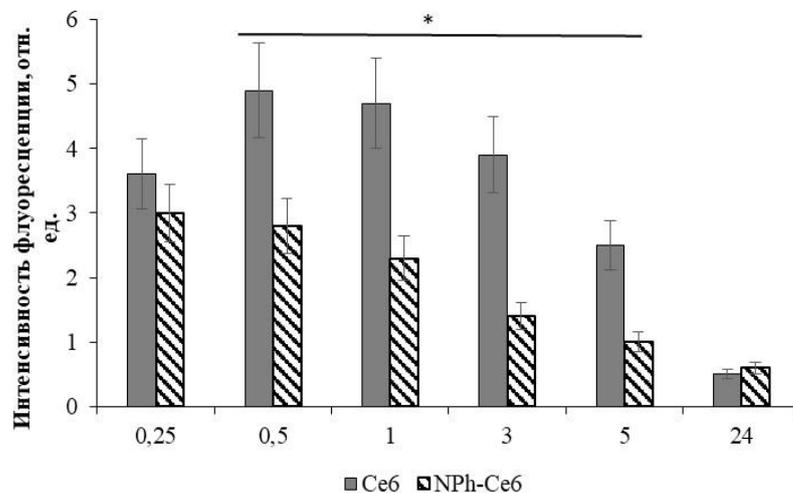


Рисунок 15. Динамика изменения флуоресценции хлорина еб в коже мышей с карциномой LLC после введения свободной субстанции хлорина еб (Ce6) и его фосфолипидной наноконпозиции (NPh-Ce6). $\lambda = 680$ нм. * $P < 0,05$ ($n = 3$)

Как видно из рисунка 15, флуоресценция хлорина еб и значит его содержание в ткани кожи животных была при всех исследуемых временных интервалах ниже для NPh-Ce6, чем для свободного Ce6, что в значительной степени является следствием продемонстрированного выше (таблица 5) изменения фармакокинетики в крови с более быстрым его клиренсом.

Элиминация (выведение) хлорина еб из ткани кожи осуществлялась для его фосфолипидной формы значительно раньше - через 3 часа после введения флуоресценция падала в 4 раза, в то время как для свободного она была еще практически равной начальному уровню. И только к 5 часам для свободного ФС наблюдалось некоторое снижение, хотя значительно меньшее (более чем вдвое), чем для остающегося ещё к этому же времени в ткани хлорина еб, введенного в наночастицах. То есть, период фототоксичности для NPh-Себ значительно короче, и степень её (обусловленная содержанием ФС в коже) ниже, чем для свободного ФС.

3.1.5. Распределение хлорина еб по органам и тканям при введении в составе ФЛ НЧ

Помимо ткани кожи, ФС при внутривенном введении проникают и в другие здоровые ткани, и для выяснения влияния включения хлорина еб в фосфолипидные наночастицы на накопление его в тканях были проведены эксперименты на здоровых животных.

3.1.5.1. Динамика содержания хлорина еб в коже, жировой ткани, селезенке и мышцах у мышей, определённая по его флуоресценции

На рисунке 16 представлены данные по изменению накопления хлорина еб в тканях мышей, также косвенно оцениваемого по интенсивности его флуоресценции.

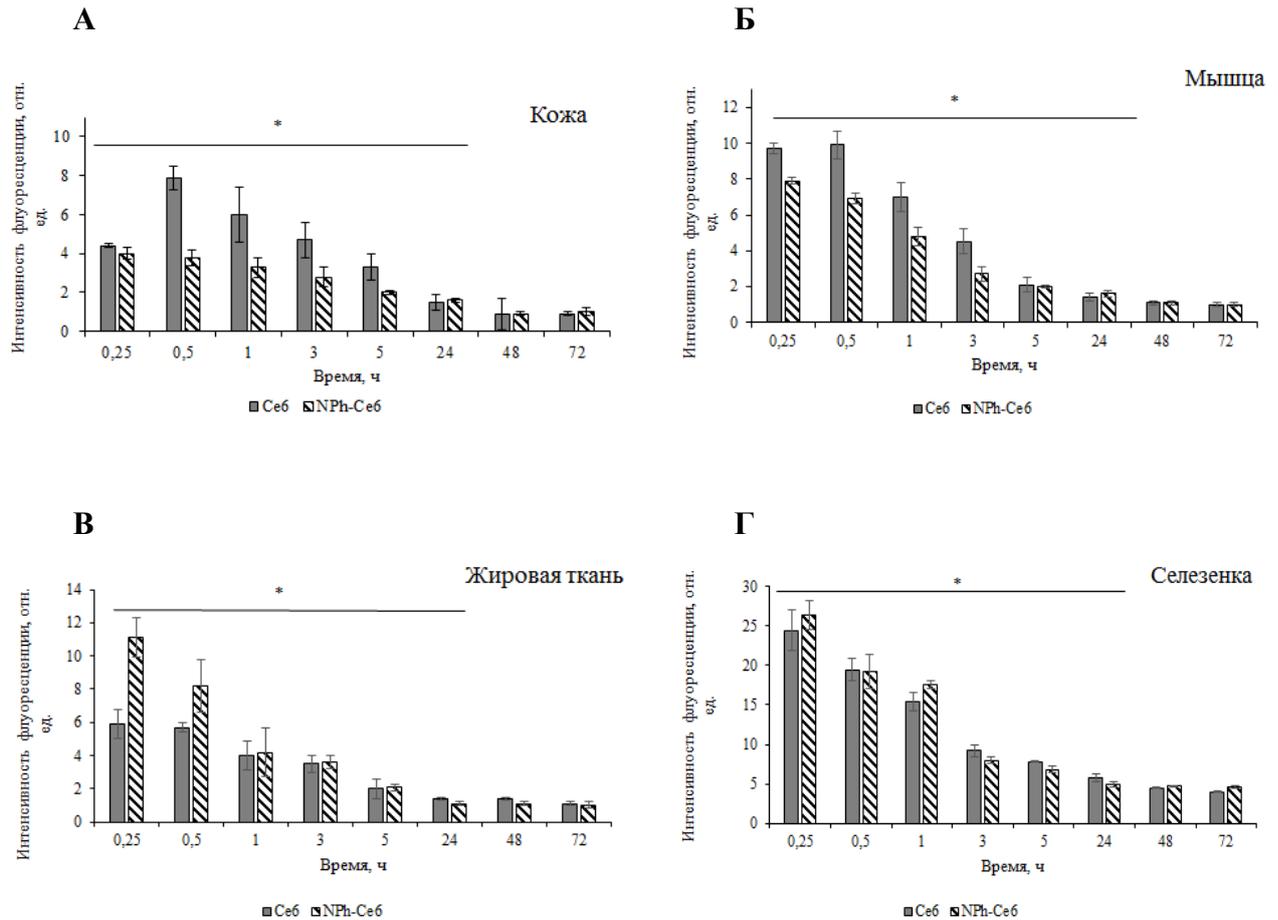


Рисунок 16. Флуоресценция хлорина еб в коже (А), мышцах (Б), жировой ткани (В) и селезенке (Г) мышей после внутривенного введения в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Сe6) и в свободной форме (Сe6). $\lambda = 680$ нм. * $P < 0,05$ ($n = 3$)

Из данных, представленных на рисунке 16А, видно, что в коже динамика изменений флуоресценции хлорина сходна с таковой, продемонстрированной выше (рисунок 15) для кожи мышей с опухолью с несколько большими величинами для обеих форм ФС (что может быть связано с некоторым ослаблением общей циркуляции при опухолевом росте и активным захватом ФС опухолевой тканью). Содержание хлорина еб при введении его в свободном виде (Сe6) также выше, чем при введении фосфолипидной формы (NPh-Сe6). Максимум достигается через 30 минут, превышая при этом вдвое его уровень для NPh-Сe6. При этом происходит постепенное выравнивание содержания хлорина еб для двух вводимых его форм и через 24 ч оно становится приблизительно одинаковым. Подобная ситуация наблюдается и при исследовании накопления в ткани мышц с более ранним (к 5 часам после введения) достижением равных концентраций для обеих форм Се6 (Рис. 16Б).

При исследовании динамики накопления хлорина еб в жировой ткани (рис. 16В) и селезенке (рис. 16Г) максимум накопления наблюдается уже через 15 минут после введения

препаратов. При этом в жировой ткани (рис. 16В) содержание хлорина еб, введенного в составе фосфолипидных наночастиц, было больше, чем при введении в свободном виде, что, вероятно, обусловлено аффинностью к этой ткани липидной поверхности наночастиц. Далее эти различия постепенно сглаживаются, выравняваясь к 1 часу после введения. В селезёнке (рис. 16Г) разницы практически не было, за исключением меньшего поступления в первые минуты после введения, также с последующим, ещё более быстрым (к 15 мин), сглаживанием этой кратковременной разницы.

3.1.5.2. Масс-спектрометрическое определение содержания хлорина еб в печени и почках у крыс

Определение абсолютного содержания хлорина еб в тканях печени и почек – основных тканях, осуществляющих элиминацию, проводили прямым, количественным масс-спектрометрическим методом в экспериментах на крысах после внутривенного его введения в двух сравниваемых формах. Для этого в определённые временные интервалы отбирали образцы тканей и в полученных после их обработки тканевых экстрактах оценивали содержание хлорина еб методом LC/MS. Результаты представлены на рисунках 17 и 18.

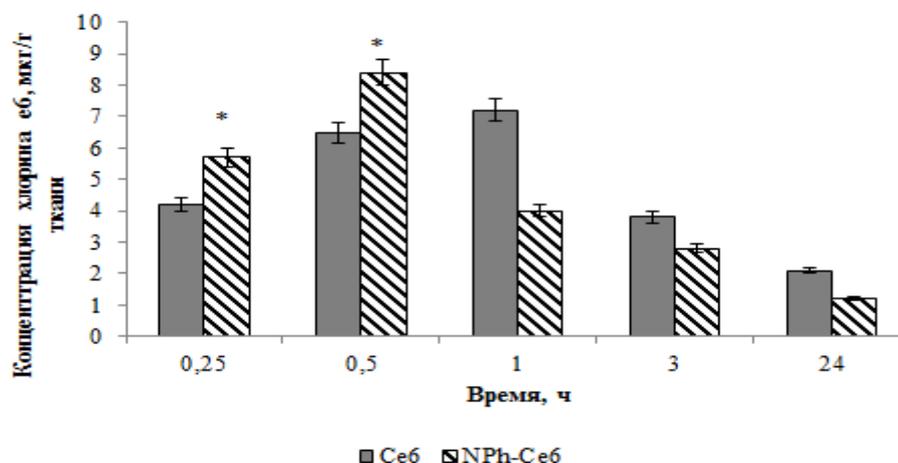


Рисунок 17. Содержание хлорина еб в печени крыс при его введении в составе наночастиц (NPh-Ce6) и в свободном виде (Ce6). Доза по хлорину еб – 5 мг/кг. Цифры под осью абсцисс – время (часы) после внутривенного введения. *P < 0,05 (n = 3)

Результаты, представленные на рисунке 17, свидетельствуют о том, что хлорин еб, введенный внутривенно крысам в составе фосфолипидных наночастиц, быстрее поступает в печень, но и раньше из неё выводится, чем при введении в свободном виде. Максимальное накопление хлорина еб, введенного в составе фосфолипидных наночастиц (NPh-Ce6), наблюдается в печени уже через 30 мин, в то время как для свободного ФС этот период был

вдвое большим. Через 24 ч после введения хлорина еб в составе фосфолипидных наночастиц происходит почти полное его выведение; по сравнению со свободной формой хлорина еб концентрация к этому времени отличалась практически в 2 раза.

На рисунке 18 представлены данные по определению хлорина еб, введенного в двух сравниваемых формах, в ткани почек.

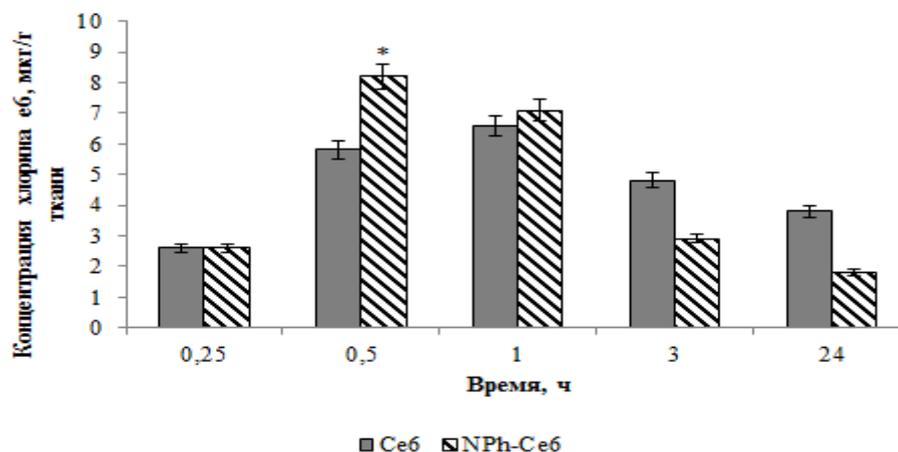


Рисунок 18. Содержание хлорина еб в почках крыс при введении хлорина еб в составе наночастиц (NPh-Se6) и свободного (Se6). Доза по хлорину еб – 5 мг/кг. Цифры под осью абсцисс – время (часы) после внутривенного введения. *P < 0,05 (n = 3)

Из представленных на рисунке 18 данных видно, что содержание хлорина еб в почках изменяется точно так же, как и печени. Максимум в накоплении хлорина еб наступает через 30 минут после введения в составе фосфолипидных наночастиц, а для свободной формы через час после введения. При этом через 24 часа происходит (как и в печени) уменьшение накопления хлорина еб, введенного в составе наночастиц, почти в 2 раза по сравнению с введением свободной субстанции, что также может свидетельствовать о более быстром выведении из организма Se6 при введении NPh-Se6.

Таким образом, сравнительная оценка накопления в тканях хлорина еб, вводимого в составе фосфолипидных наночастиц, показывает ряд преимуществ такой формы по сравнению со свободным лекарством. В первую очередь - это большее накопление в опухолевой ткани, ускоренный выход из кровотока, меньшее накопление и более быстрое выведение из здоровых тканей (кожи и мышц), более интенсивный захват и более быстрое и активное выведение печенью и почками. В то же время поступление хлорина еб в здоровые ткани, хоть и меньшее, но также имеет место. Для жировой ткани и селезенки оно было не меньшим, чем после введения свободного хлорина еб, в виде ди-N-метил-D-глюкаминовой соли. Следующим этапом работы было проведение исследований, направленных на ещё большее повышение действия хлорина еб, включенного в разработанную фосфолипидную наноконструкцию, путём её

модификации. Для этого к наночастицам с Себ присоединяли пептиды со специфическими свойствами, влияющие по различным механизмам, как показано многими авторами [9, 11, 223], на взаимодействие конъюгированных с ними структур с клетками. Разработали и исследовали несколько вариантов таких модифицированных композиций, проведена оценка их свойств и исследование особенностей их взаимодействия с тремя линиями культур опухолевых клеток, что рассмотрено ниже.

3.2. Фосфолипидная наноконпозиция хлорина еб с адресным и проникающим пептидными фрагментами для повышенной доставки к опухолевым клеткам

Основным фактором, определяющим эффективность действия ФС при проведении фотодинамической противоопухолевой терапии, является степень его накопления в опухолевой клетке с образованием при последующем световом облучении активных форм кислорода (АФК), приводящих к клеточной гибели. Интенсивность накопления ФС в опухолевой клетке может быть повышена путем придания транспортирующей его системе адресности, специфической опухолевой направленности, а также способности к большему проникновению через клеточную мембрану внутрь клетки («интернализации»). Нами было разработаны и исследованы различные варианты таких оптимизированных композиций хлорина еб в фосфолипидных наночастицах.

3.2.1. Получение и характеристика композиций

Для улучшения свойств разработанной композиции хлорина еб в фосфолипидных наночастицах, придания им преимущественной адресной направленности к опухолевым клеткам и большего связывания с ними был использован современный принятый в системах доставки лекарств подход – присоединение к их поверхности дополнительных специфических векторных компонентов [168]. В основе его лежат накопленные в литературе данные о повышении на поверхности опухолевых клеток по сравнению с нормальными экспрессии ряда белков, имеющих аффинные к ним вещества (лиганды). Эти лиганды, чаще всего специфические пептиды, используют в качестве векторов, способствующих направленному избирательному транспорту вводимых в кровяное русло лекарственных систем в опухолевые клетки и ткани [168]. На основе этого подхода создают системы доставки, снабженные таким вектором или векторным конъюгатом, то есть, адресным фрагментом, направленным на те или иные рецепторы или другие белки, повышено экспрессирующиеся на опухолевых клетках [9, 151].

Наряду с этим, для большего проникновения (интернализации) транспортирующей частицы в клетку используют также пептиды с другой специфичностью, для которых выявлена

способность активного в неё проникновения – так называемые клеточно-проникающие (cell penetrating) пептиды [11, 191]. Такие пептиды часто содержат довольно много остатков аргинина (Arg, R) [194], и для ряда олигоаргининов выявлена также обусловленная его положительным зарядом возможность адресного воздействия на опухолевые клетки, несущие отрицательный заряд [103, 193].

Нами были использованы два этих подхода с целью достижения опухоли-специфичной доставки и повышения проникновения в опухолевую клетку и, следовательно, повышения эффективности ФДТ хлорина еб, встроенного в фосфолипидные наночастицы, путем присоединения специфических пептидов к описанной в предыдущем разделе (раздел 3.1) композиции, NPh-Себ.

3.2.1.1. Выбор адресных фрагментов и их комбинаций для направленного транспорта фосфолипидных наночастиц с хлорином еб

В качестве векторного, адресного фрагмента нами был выбран специфический пептид, содержащий последовательность аминокислотных остатков **аспарагин-глицин-аргинин** (Asn-Gly-Arg, NGR), с аффинностью к аминопептидазе N (CD13), повышено экспрессирующейся на поверхности клеток и сосудов ряда опухолей [225].

Аминопептидаза N/CD13 (APN/CD13) представляет собой трансмембранный белок, выполняющий множество функций, в том числе связанных с онкогенезом [200], и в ряде работ используется в качестве мишени для адресной доставки лекарств в опухоли [184 - 187].

Нами был использован для придания направленности фосфолипидным наночастицам с включенным хлорином еб гексапептид H-Gly-**Asn-Gly-Arg**-Gly-Cys-OH (GNRGC) с NGR-мотивом (**Asn-Gly-Arg**), аффинным к этому ферменту [223, 226]. Ранее для этой цели в разных работах в системах доставки использовали различные другие NGR-содержащие пептиды [183], из которых наиболее близким к взятому нами был пентапептид CNGRC [176]. Во всех этих работах, независимо от других присутствующих аминокислот был показан обусловленный NGR выраженный адресный эффект включаемых пептидов, как *in vitro*, так и *in vivo*, на моделях опухолей у животных [183]. Согласно данным ряда исследований последовательность NGR может обладать двойной адресной направленностью (“dual targeting”) за счёт иногда наблюдаемого спонтанного её перехода в isoDGR с аффинностью к другим белкам, также повышено экспрессирующимся на ряде опухолей - $\alpha v\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$ интегринам [181].

В качестве проникающего пептида был выбран гептааргинин (R7), способный увеличивать проникновение агентов в клетки опухоли, а также индуцировать адресное воздействие на опухолевые клетки, несущие отрицательный заряд [193].

Используя эти пептиды в качестве адресного и проникающего фрагментов, нами были разработаны следующие композиции хлорина еб, включенного в фосфолипидные наночастицы с присоединенными к ним двумя пептидами в отдельности или в комбинации:

(1) Себ, встроенный в фосфолипидные наночастицы (НЧ) с добавлением проникающего пептида гептааргинаина – **NPh-Ce6-R7**;

(2) Себ, встроенный в фосфолипидные НЧ с добавлением специфического пептида с NGR-мотивом – **NPh-Ce6-NGR**, полученный с использованием ПЭГ линкера, т.е. через предварительно полученный конъюгат пептида с дистеароилфосфатидил-этанололамином (DSPE) и PEG2000;

(3) Себ, встроенный в фосфолипидные НЧ с добавлением пептида с NGR-мотивом и проникающего пептида гептааргинаина – **NPh-Ce6-NGR-R7**.

3.2.1.2. Присоединение специфических пептидов к фосфолипидным наночастицам

Присоединение положительно заряженного гептааргинаина (R7) к фосфолипидным наночастицам (композиции 1 и 3 в выше приведенном списке, 3.2.1.1) осуществлялось при простом добавлении его к предварительно приготовленной композиции фосфолипидных наночастиц с хлорином еб (детально описанной в предыдущем разделе 3.1) - благодаря его электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженными карбоксильными группами хлорина еб на поверхности наночастиц.

Для получения композиций 2 и 3, содержащих NGR-мотив (один или в сочетании с R7), была предварительно проведена работа по его присоединению к амфифильному фрагменту, который бы обеспечивал встраивание и удерживание его в фосфолипидных наночастицах. С этой целью был использован подход, применяемый в исследованиях с различными модификациями липосом – присоединение пептида к фосфолипиду DSPE с использованием его конъюгата с PEG-линкером, DSPE-PEG(2000)-Mal [227].

Был синтезирован адресный конъюгат NGR с DSPE (для последующего встраивания его в фосфолипидные НЧ). Схема синтеза представлена на рисунке 19.

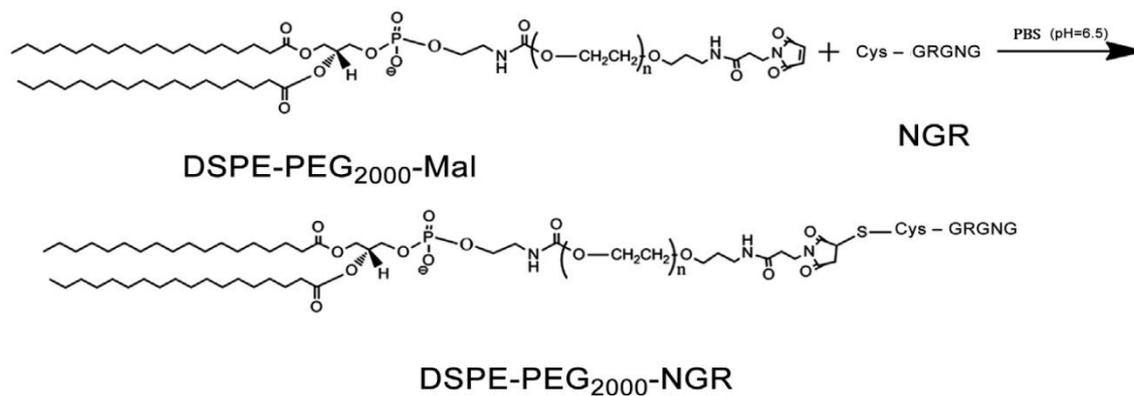
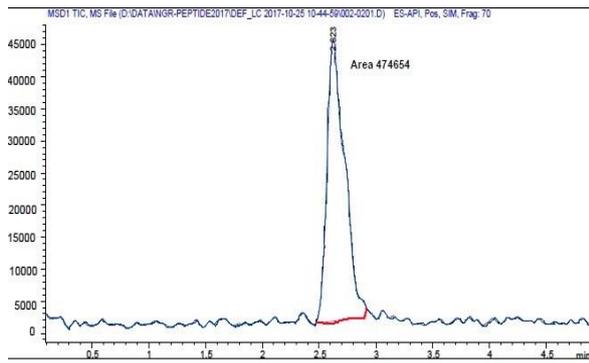


Рисунок 19. Схема синтеза адресного конъюгата DSPE-PEG(2000)-NGR

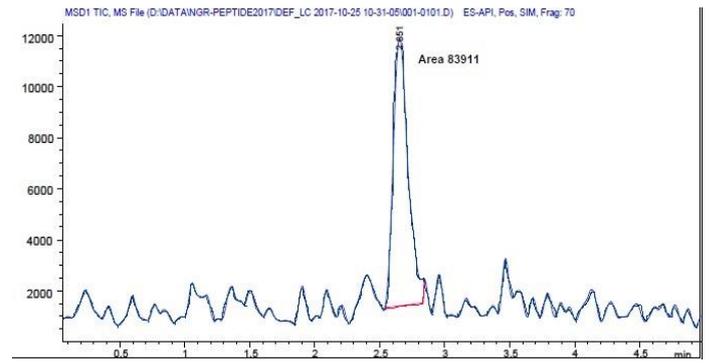
Синтез DSPE-PEG(2000)-NGR проходит за счет тиол-еновой «click»-реакции малеимидной группы с сульфгидрильной группой пептида, содержащего NGR-мотив. Основа данной реакции заключается в использовании тиольной группы остатка цистеина, присутствующего в пептидах, которую можно легко ввести в молекулу [228]. Применение малеимид-тиоловой реакции для получения конъюгатов связано с высокой реакционной способностью малеимида в мягких условиях (комнатная температура, буферные растворы с нейтральным pH) [229].

После присоединения DSPE-PEG(2000)-Mal к взятому пептиду, содержащему NGR-мотив, был получен адресный конъюгат DSPE-PEG(2000)-NGR, способный, благодаря наличию в нём фосфолипидного фрагмента, (дистеароилфосфатидилэтаноламина, DSPE), встраиваться в фосфолипидные структуры.

Масс-спектрометрически (LC/MS) было доказано, что синтез прошел успешно с образованием нужного продукта. На рисунке 20 представлены хроматограммы исходной реакционной среды, содержащей DSPE-PEG(2000)-Mal и пептид с NGR-мотивом перед синтезом и через 24 ч инкубации, во время которой осуществлялся синтез.



А



Б

Рисунок 20. Хроматограмма пептида, содержащего NGR-мотив, А) перед синтезом конъюгата DSPE-PEG(2000)-NGR; Б) через 24 ч инкубации

Хроматограмма на рисунке 20А представлена одним пиком взятого пептида, **Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys**. После инкубации интенсивность пика свободного пептида в несколько раз снижается за счёт присоединения значительной доли его к DSPE-Peg(2000)-Mal, снижения концентрации в среде свободного пептида и присоединением основной его части к линкеру. Уменьшение количества исходного свободного пептида в реакционной среде указывает на прохождение синтеза.

Для подтверждения образования конечного продукта был также проведен MALDI-TOF анализ полученного пептидного конъюгата DSPE-PEG (2000)-NGR. На рисунке 21 представлен MALDI-TOF спектр образца полученного конъюгата.

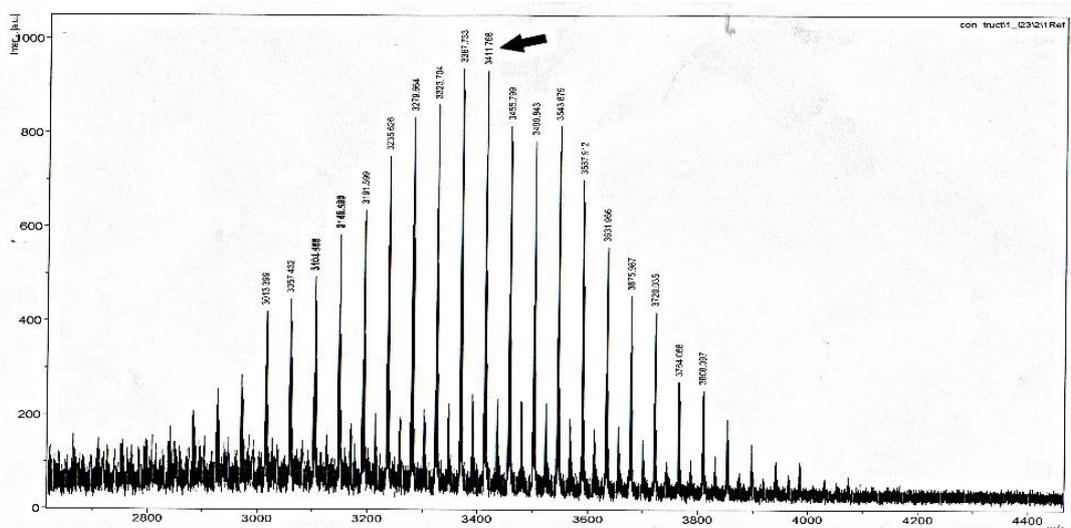


Рисунок 21. Масс-спектр MALDI-TOF конъюгата пептидного вектора DSPE-PEG2000-NGR

Из рисунка 21 видно, что на полученном масс-спектре имеется пик с массовым числом (m/z) 3411,8, соответствующий расчетному значению молекулярной массы DSPE-PEG₂₀₀₀-NGR (3412). Это подтверждает образование конъюгата. Кроме того, в области значений m/z , включающих сигнал целевого соединения ($m/z = 3411,8$), наблюдается ряд сигналов с разницей $m/z = 44$ (C_2H_5O), характерных для содержащих ПЭГ структур. Это связано с тем, что исходное соединение DSPE-PEG2000-Mal представлено множеством молекул с длиной цепи ПЭГ, близкой к целевой (2000) и отличающейся по количеству мономеров в ту или иную сторону.

Для включения, полученного конъюгата в фосфолипидные НЧ с хлорином еб его вносили в исходную смесь взятых продуктов перед обработкой, перед приготовлением наноконпозиции (детально описанным в Главе 2, раздел 2.3.1.2г). При этом его фосфолипидный фрагмент (DSPE) вместе с присутствующим в смеси основным фосфолипидом частиц (фосфатидилхолином) включается во время последующей процедуры гомогенизации в структуру формирующейся наночастицы с локализацией встроенного пептида (благодаря полярной группе и ПЭГ) на её поверхности [129].

3.2.1.3. Физико-химические характеристики фосфолипидных наночастиц с хлорином еб, снабженных пептидными фрагментами

В таблице 6 представлены физико-химические характеристики полученных композиций хлорина еб по основным параметрам: размер частиц, ζ -потенциал, процент включения хлорина еб в наночастицы (в сравнении с наночастицами без пептидов (NPh-Ce6), описанными выше, раздел 3.1).

Таблица 6. Физико-химические характеристики композиций хлорина еб

Параметры	Исследуемые композиции хлорина еб в наночастицах			
	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
Включение хлорина еб в наночастицы, %	99,9±0,2	98,9±0,7	99,9±0,14	96,5±7,3

Из представленных в таблице 6 данных видно, что процент включения хлорина еб в наночастицы в трёх системах с пептидами был таким же высоким (выше 95%), как и для NPh-

Себ. Другие же параметры изменялись по-разному, в зависимости от встраиваемых пептидов. Размер наночастиц для всех трёх композиций с пептидами оказался несколько выше, чем наночастиц с хлорином еб без пептидов, но всё же оставался в основном в пределах 30 нм, с таким же высоким (~ 90%) относительным содержанием частиц данного размера. Положительный заряд (ζ -потенциал) наночастиц двух композиций NPh-Себ-R7 и NPh-Себ-NGR-R7 обусловлен присутствием в них гептааргинина (R7). При этом включение гептаргинина в наночастицы (в обеих композициях, где он присутствовал, NPh-Себ-R7 и NPh-Себ-NGR-R7), составляло порядка 80% от исходно взятого количества (при соотношении Себ:R7 равным 1:6).

Спектры поглощения хлорина еб в составе трёх описанных композиций представлены на рисунке 22.

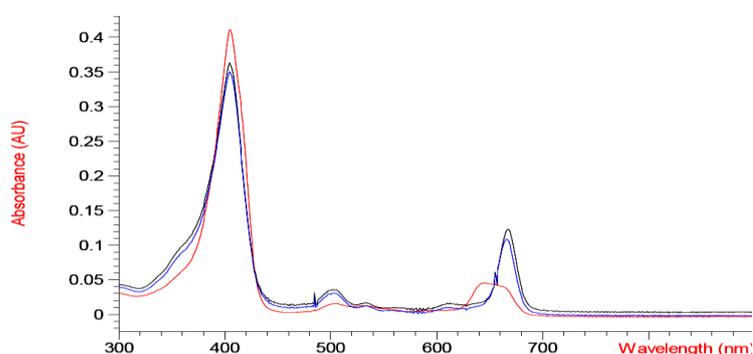


Рисунок 22. Спектры поглощения NPh-Себ-NGR (красная кривая), NPh-Себ-R7 (черная кривая) и NPh-Себ-NGR-R7 (синяя кривая) в водном растворе. Концентрация по хлорину еб 25 мкг/мл

Из рисунка 22 виден сходный характер спектров всех трёх композиций, за исключением некоторого смещения для двух композиций с проникающим пептидом (NPh-Себ-R7 и NPh-Себ-NGR-R7) наиболее длинноволнового пика - с 650 нм до 665 нм. Сравнение со спектром для наноконпозиции без пептидов, выявившим небольшой батохромный сдвиг по сравнению со свободным Себ (раздел 3.1.1, рисунок 5), показывает некоторое дальнейшее его увеличение для композиций с пептидом R7, что, как отмечалось, является позитивным фактором в плане эффективности ФДТ [214, 215]. В целом, существенных изменений в спектральных характеристиках по сравнению со свободной субстанцией не наблюдается.

Таким образом, использование выбранных специфических пептидов в качестве дополнительных компонентов не приводит к изменению спектральных свойств хлорина еб и даже может вносить некоторые улучшения за счёт небольшого сдвига в спектре поглощения в длинноволновую область. При этом за счет ожидаемого от внесения пептидов улучшения взаимодействия наночастиц с опухолевыми клетками, их введение в разработанную

фосфолипидную транспортную наносистему должно повышать эффективность включённого в неё ФС. Выяснение этого вопроса проводилось путём изучения взаимодействия полученных композиций с культурами клеток опухолей на следующем этапе работы.

3.2.2. Взаимодействие разработанных пептид-содержащих фосфолипидных наноконпозиций хлорина еб с опухолевыми клетками

3.2.2.1. Выбор клеточных линий для оценки взаимодействия с клетками векторных композиций хлорина еб на основании экспрессии аминопептидазы N/CD13

Эксперименты по исследованию адресных транспортных систем с включенным хлорином еб, содержащих специфический векторный или/и проникающий пептиды, проводились нами на трёх линиях клеток: гепатомы крысы (HepG2), аденокарциномы молочной железы (MCF-7) и фибросаркомы человека (HT-1080), различающихся по присутствию на них аминопептидазы N (CD13). Исследование экспрессии этого белка на поверхности опухолевых клеток позволяет оценить влияние пептида, содержащего аффинный к ней NGR-мотив (в двух разработанных композициях, NPh-Сe6-NGR и NPh-Сe6-NGR-R7), на накопление и проникновение в клетки хлорина еб [227].

Анализ литературы показал, что аминопептидаза N (CD13) экспрессируется на поверхности клеток HepG2 и HT-1080 [229, 230]. Данные об экспрессии данного белка на поверхности клеток MCF-7 противоречивы, даже высказывались предположения об её отсутствии [231, 232]. Использование этой клеточной культуры предполагалось нами как отрицательный контроль для адресной доставки разработанных систем, включающих пептид с NGR-мотивом. Для подтверждения данных предположений был предварительно проведен методом проточной цитометрии с использованием антитела к CD13 анализ по определению аминопептидазы N на поверхности клеток всех трёх культур, используемых в дальнейших исследованиях. Использовали специальный набор, содержащий моноклональные антитела к поверхностному антигену клеток человека CD13, конъюгированные с флуорохромом (раздел 2.3.4.1) [233]. Результаты представлены на рисунке 23.

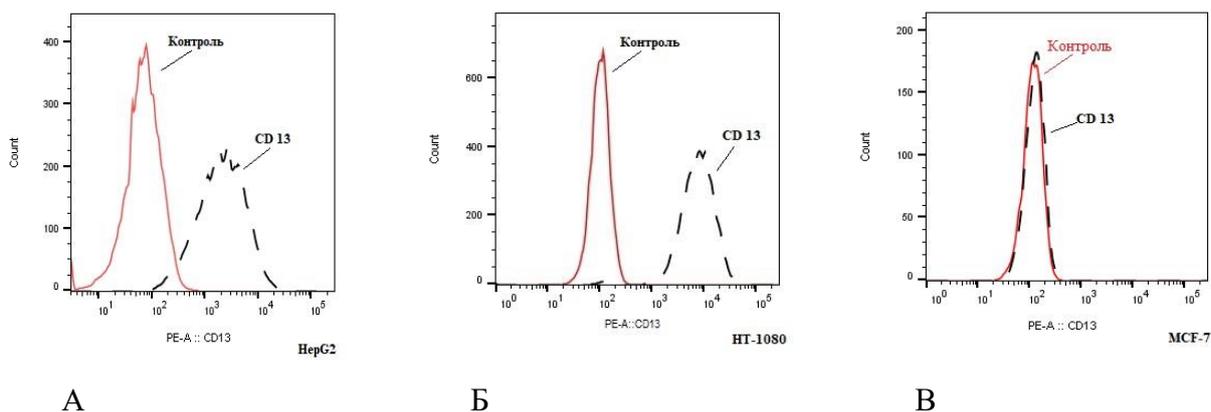


Рисунок 23. Гистограммы детектирования CD13 флуоресцентно мечеными анти-CD13 антителами методом проточной цитометрии в клетках HepG2 (А), HT-1080(Б) и MCF-7 (В). Контроль – клетки с добавлением реагента с изотипическими антителами (ось X - интенсивность флуоресценции, отн. ед., ось Y - популяция клеток в потоке, шт.)

Для всех трёх видов клеток в контроле (клетки без добавления антител, левый пик, рис. 23 – А, Б, В) наблюдалось относительно небольшое свечение за счет свойства самих клеток (аутофлуоресценция). На клеточных культурах HepG2 и HT-1080 (рис. 23А и 23Б) при добавлении реагента происходит увеличение на порядок интенсивности флуоресценции в исследуемой популяции клеток относительно контроля (с 10^3 до 10^4 отн. ед.) – за счёт флуоресценции флуорохрома, связанного с присоединившимся к клеткам антителом: появляется второй пик с бóльшей флуоресценцией. На клеточной культуре MCF-7 (рис. 23В) этот эффект отсутствует, что говорит об отсутствии при их инкубации с флуоресцентно-мечеными антителами к CD13 взаимодействия по типу антиген-антитело. Это свидетельствует об отсутствии экспрессии антигена, т. е. данного белка, на поверхности клеток нет.

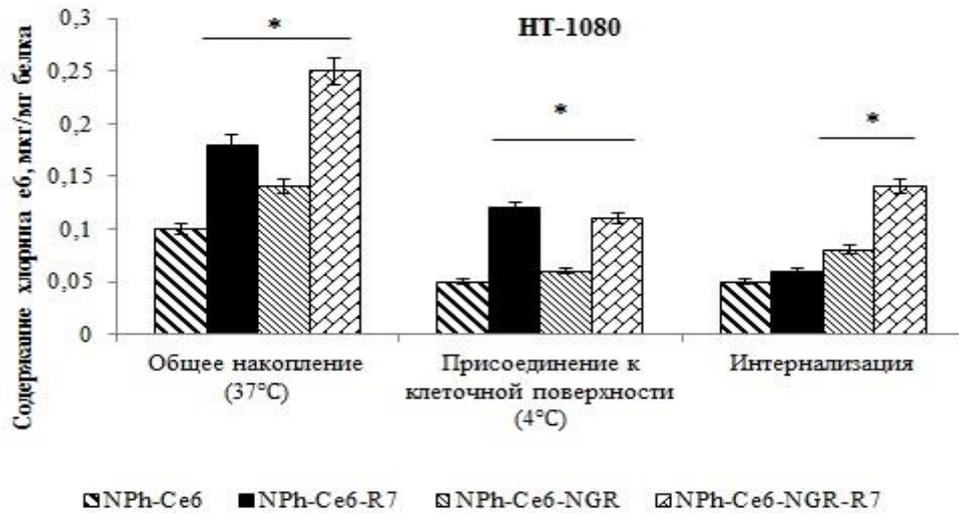
Следовательно, можно ожидать специфических различий в ответе взятых клеточных линий на присутствие аффинного к CD13 пептида NGR в сконструированных системах доставки, что должно сказаться на взаимодействии клеток со снабженными этим пептидом и содержащими хлорин еб фосфолипидными наночастицами.

Наряду с отсутствием на клетках MCF-7 белка CD13, в них, судя по данным литературы [234-236], отсутствуют также белки, обладающие некоторой афинностью к пептиду isoDGR – модифицированному пептиду, иногда спонтанно образующемуся из NGR и сопутствующему ему. Это интегрин $\alpha\upsilon\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$, повышено экспрессирующиеся в ряде опухолей [181]. То есть, клетки MCF-7 в отличие от HepG2 и HT-1080 не должны реагировать на присутствие в среде систем, содержащих последовательность NGR. Это обусловлено отсутствием на них потенциальных мишеней к этому пептиду: как основного белка-мишени аминокептидазы N, так и возможных дополнительных - интегринов $\alpha\upsilon\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$.

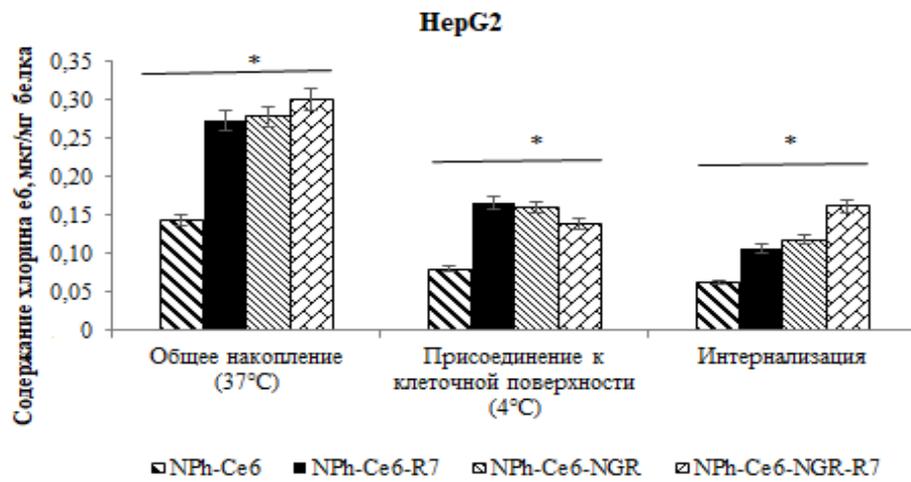
Для выяснения влияния на опухолевые клетки приготовленных композиций хлорина еб, содержащих на поверхности пептиды NGR, R7 или их сочетание (перечисленных в разделе 3.2.1.1), исследовали накопление этого ФС в культурах клеток выбранных линий, а также проявление его фотоиндуцированной активности и цитотоксичности.

3.2.2.2. Эффективность накопления хлорина еб в опухолевых клетках при его включении в фосфолипидные наночастицы с пептидными фрагментами

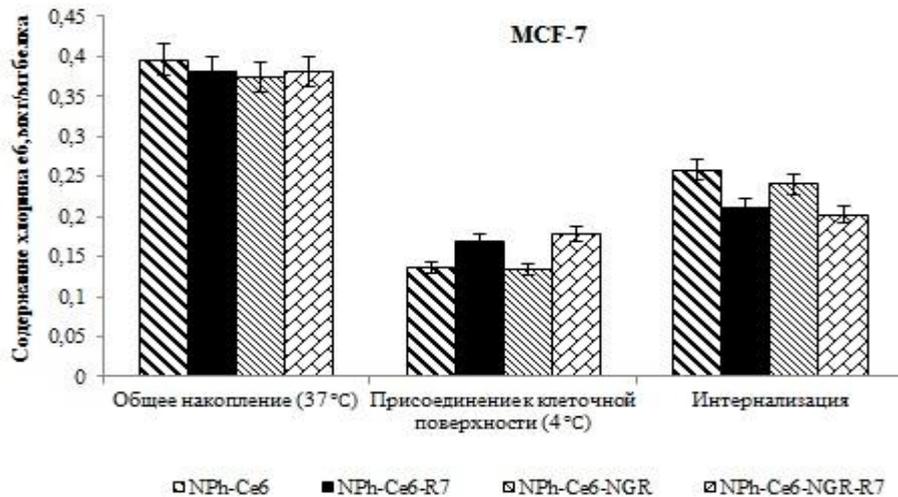
Нами была проведена оценка накопления хлорина еб в трёх линиях опухолевых клеток после их 4^х-часовой инкубации в средах, содержащих одну из разработанных композиций с пептидными фрагментами или исходную систему без пептидов. При этом, для выяснения механизма проявления их оптимизирующего действия оценивали не только общее накопление ФС в клетках, но и в отдельности присоединение к клеточной поверхности, происходящее на холоду (при 4 °С), и проникновение внутрь клетки («интернализацию») при 37 °С [207], как разность этих двух величин. Оказалось, что присутствие добавляемых к наночастицам пептидов по-разному влияет на глубину клеточного проникновения хлорина еб, что продемонстрировано на рисунке 24 для клеток HerG2, HT-1080 и MCF-7. Клетки MCF-7 (CD13-) были выбраны в качестве отрицательного контроля на влияние присоединения к наночастицам пептида с NGR-мотивом, как не экспрессирующие его белок-мишень, аминопептидазу N, и возможные дополнительные мишени интегрины $\alpha\nu\beta 3$ и $\alpha 5\beta 1$ [234, 236].



А



Б



В

Рисунок 24. Накопление хлорина е6, инкубированного в составе фосфолипидных наночастиц с добавлением проникающего (R7) и/или специфического (с NGR-мотивом) пептида, в клетках культур (А) HT-1080, (Б) HepG2 и (В) MCF-7 (после 4 ч инкубации)

* - помечены статистически достоверные отличия от NPh-Ce6 (без пептидов)

Как видно из рисунков 24А и 24Б, **общее накопление** хлорина еб в клетках НТ-1080 и НерG2 для всех композиций с пептидными фрагментами было **в 1,5-2 раза** выше по сравнению с фосфолипидной наноконпозицией без пептидов (NPh-Се6). Максимальным (более чем в 2 раза) было влияние сочетания двух пептидов (правые столбцы рис. 24А и 24Б). Степень влияния пептидов R7 и NGR в отдельности (в NPh-Се6-R7 и NPh-Се6-NGR) на общее накопление хлорина еб была несколько меньшей и разной для этих двух клеточных линий. Так, на клетках НТ-1080 (рис. 24А) значительно больше ФС накапливалось при использовании проникающего пептида R7, чем пептида с NGR-мотивом (**в среднем соответственно 0,18 и 0,13 мкг/мг белка**). Влияние пептида R7 на этих клетках может быть связано со свойственным им, как и ряду других опухолевых клеток, отрицательным зарядом на клеточной поверхности [193], способствующим электростатическому взаимодействию с молекулами аргинина в R7. На клетках же НерG2 (рис. 24Б) общее накопление было одинаковым при инкубации с обеими композициями (с R7 или NGR), **0,26-0,28 мкг/мг белка**, и лишь немного, на грани достоверности, выше при использовании обоих пептидов вместе, NPh-Се6-NGR-R7.

В этих выявленных величинах общего накопления в большинстве случаев приблизительно равный вклад приходился на количество Се6, присоединенного к клеточной поверхности, и проникшего внутрь клетки (т. е. оказавшегося способным к интернализации).

Присоединение Се6 для клеток НТ-1080 максимально и в равной степени возрастало для обеих систем с R7 (**0,13 мкг/мг по сравнению с 0,05 мкг/мг** для системы без пептидов, NPh-Се6) и не менялось от присутствия NGR. Для НерG2 все 3 системы (включая и NPh-Се6-NGR), оказали одинаковое (в среднем двукратное) стимулирующее действие.

Влияние присоединенных пептидов **на клеточную интернализацию** Се6 проявилось по-разному. На клетках НТ-1080 (рис. 24А, правая диаграмма) для системы с пептидом, содержащим NGR-мотив (**0,08 мкг/мг**), она было несколько выше, чем для исходных фосфолипидных наночастиц (**0,05 мкг/мг**), в то время как для системы с R7 практически не отличалась. В то же время сочетание обоих пептидов привело к вдвое бóльшей клеточной интернализации (**0,13 мкг/мг**), чем только для частиц с NGR пептидом. На клетках НерG2 (рис. 24Б, правая диаграмма) оба пептида в отдельности приблизительно в равной степени повышали интернализацию (до **0,11-0,12 мкг/мг по сравнению с 0,06 мкг/мг**), однако сочетание их, как и для клеток НТ-1080, оказалось в 1,5 раза эффективнее (**0,16 мкг/мг белка**). В данном случае видно суммарное проявление как клеточно-проникающего действия пептида R7, так и специфического таргетного (аффинного к CD13) влияния NGR. При этом показанное ЯМР-спектроскопией (Приложение А) отсутствие в использованном гексапептиде Н-GNDRGC-ОН возможного модификата isoDGR, аффинного к интегрину $\alpha\beta3$ и $\alpha5\beta1$ опухолей [181], является

дополнительным подтверждением роли во взаимодействии с наночастицами именно экспрессии CD13

Использование пептида R7 здесь дополняет действие фосфолипидных наночастиц с NGR-пептидом, что можно объяснить влиянием гуанидиновой группы аргинина [232], которая может, как полагают, образовывать локальные повреждения в клеточной мембране, увеличивая тем самым проникновение хлорина еб в опухолевую клетку [191, 233]. В наблюдаемом действии этих двух пептидов может играть роль узколокальный участок этих мембранных изменений, достаточный для проникновения аргинин содержащего пептида, но, возможно, слишком малый для присоединённых к нему структур, в частности, наночастиц с размером 25-30 нм. В результате проникающее действие гептааргинина сводится к проникновению только в мембрану, а сама наночастица с хлорином еб остаётся вне клетки или частично в мембране. Поэтому мы видим наибольшее влияние R7 не на интернализацию (чего можно было ожидать из его клеточно-проникающих свойств), а только на присоединение к клеточной поверхности. Сходное взаимодействие с клетками, т. е. преимущественное присоединение, наблюдалось для содержащих сходные клеточно проникающие пептиды (R4 и R8) полимерных наносфер [237] в отличие от доставки, например, генов и белков внутрь клетки путём непосредственного присоединения к ним таких пептидов [238]. Как видно из рисунка 24, наблюдаемый нами «присоединяющий» эффект пептида R7 может превышать (в клетках HT-1080) или быть равным (в HepG2) действию векторного пептида NGR (в зависимости от свойств этих клеток от степени экспрессии на них CD13).

В отличие от этих двух видов клеток, при оценке накопления хлорина еб на клеточной линии **MCF-7**, т.е. в отрицательном контроле (рис 24B), не было заметного эффекта ни для одной системы, что свидетельствует об отсутствии действия специфических пептидов. Наблюдалось лишь небольшое (на 20-30%, по сравнению с 2-3-кратным для HT-1080 и HepG2) **повышение присоединения** хлорина еб к клеточной поверхности для композиций с **R7** (одним или в сочетании с NGR), однако это никак не сказалось на его интернализации в клетки. Очевидно, это связано с какими-либо специфическими особенностями их мембран. Отсутствие влияния другого пептида, с NGR-мотивом, на этих клетках, не экспрессирующих аминопептидазу N, подтверждает направленную, «таргетную» природу обсуждаемого выше стимулирующего его влияния при взаимодействии с клетками HT-1080 и HepG2, где присутствует его белок-мишень (раздел 3.2.2.1).

Таким образом, присоединение векторного (NGR) и клеточно-проникающего (R7) пептидов и особенно их сочетания к фосфолипидным наночастицам с включённым хлорином еб повышает его накопление и интернализацию в опухолевых клетках, экспрессирующих аминопептидазу N (HT-1080 и HepG2), не оказывая при этом влияния на клетки, не

экспрессирующие этот фермент - MCF-7. Стимулирующее влияние гептааргинаина (R7) проявлялось по-разному для используемых клеточных линий: для клеток MCF-7 вызывало лишь небольшое повышение присоединения к клеточной поверхности без проникновения внутрь опухолевой клетки.

Влияние выявленных изменений свойств фосфолипидных наноконпозиций хлорина еб на проявление его фотосенсибилизирующей (фотоиндуцированной) активности исследовалось на следующем этапе работы.

3.2.2.3. Оценка фотоиндуцированной активности образцов хлорина еб в различных системах доставки *in vitro*

Результаты оценки фотоиндуцированной активности хлорина еб в различных фосфолипидных наносистемах доставки по отношению к опухолевым клеткам (культур HT-1080, HepG2 и MCF-7) представлены в таблице 7. В качестве критерия оценки фотоиндуцированной активности использовали величину ИК₅₀ (концентрация фотосенсибилизатора в среде, после воздействия которой наблюдается гибель 50% клеток), в том числе и для характеристики описанной выше исходной фосфолипидной наносистемы, NPh-Ce6 (раздел 3.1.3). Чем ниже значение величины ИК₅₀, тем большую специфическую активность проявляет соединение относительно опухолевых клеток в культуре [207].

Таблица 7. Фотоиндуцированная активность композиций хлорина еб в фосфолипидных наночастицах с добавлением специфического адресного (NGR) или/и проникающего (R7) пептидов.

Композиция хлорина еб	Величина ИК ₅₀ (мкг/мл) для культур клеток:		
	HT-1080	HepG2	MCF-7
NPh-Ce6	2,5±0,2	2,3±0,2	3,0±0,9
NPh-Ce6 -R7	0,8±0,1	0,8±0,2	1,4±0,4
NPh-Ce6 -NGR	2,6±0,1	1,9±0,3	3,8±0,2
NPh-Ce6 -NGR-R7	0,7±0,1	0,8±0,2	1,3±0,3

Как видно из данных, представленных в табл. 7, при использовании исходных наночастиц с хлорином еб без добавления пептидов (описанных выше, в разделе 3.1) величины ИК₅₀ были для всех трёх клеточных линий сопоставимы и составили в среднем 2,6 мкг/мл. Для систем с пептидами почти во всех случаях ИК₅₀ существенно снижалась, указывая на более высокую активность данных композиций. Наиболее выраженная фотоиндуцированная активность ФС относительно всех исследуемых опухолевых клеток с одинаковыми минимальными значениями

ИК₅₀, отмечена для двух систем, включающих проникающий пептид (R7) - один или в сочетании с NGR. Для клеток HT-1080 и HerG2 наблюдалось наиболее выраженное снижение ИК₅₀: в 3 раза (до 0,7-0,8 мкг/мл). В несколько меньшей степени эффект проявлялся на клетках MCF-7, однако, по сравнению с системой без пептидов (ИК₅₀ в среднем 2.5 – 3 мкг/мл) он также был более чем в 2 раза выше (ИК₅₀ 1,3-1,4 мкг/мл).

При этом добавление NGR к системе с R7 не повышало эффективности включённого хлорина еб ни на одной из трёх клеточных культур независимо от наличия (HerG2, HT-1080) или отсутствия (MCF-7) на их поверхности белка-мишени к этому пептиду, аминопептидазы N (CD13) [230]. Не было обнаружено также ожидаемого активирующего влияния векторного пептида NGR для системы с использованием только его одного, без R7. На всех культурах клеток ИК₅₀ хлорина еб для композиции с пептидом NGR (NPh-Сe6-NGR) была сопоставима с фосфолипидной наноконструкцией хлорина еб (NPh-Сe6).

Сравнение этих результатов с вышеприведенными данными по клеточному накоплению (раздел 3.2.2.2, рис. 24), где именно сочетание R7 и NGR (NPh-Сe6 -NGR-R7) в транспортирующих ФС наночастицах давало наибольшую его интернализацию в опухолевые клетки HT-1080 и HerG2 (экспрессирующие CD13), свидетельствует о том, что интернализация в клетки в данном случае не сыграла ожидаемой решающей роли для проявления фотоиндуцированной активности хлорина еб. Также из этого сравнения можно видеть некоторый параллелизм клеточно-повреждающего действия хлорина еб (таблица 7) с его количеством, присоединённым к клеточной поверхности (рис. 24). Результаты показывают достаточность для проявления активности хлорина еб на этих клетках в условиях *in vitro* просто присоединения ФС к клеточной поверхности. По-видимому, это обусловлено проникновением внутрь клетки не самого хлорина еб, а уже продуктов его фотоиндуцированной реакции, активных форм кислорода (АФК), инициирующих процессы клеточной гибели. Это подтверждается данными [125], что синглетный кислород, продуцируемый хлорином еб, может быстро диффундировать из мембран и достигать водной среды. Повреждающее действие на клетку может осуществляться также за счёт окисления образующимися АФК ненасыщенных связей в ЖК фосфолипидов мембран, а также самих фосфолипидных наночастиц, показанного выше для системы NPh-Сe6 методом ГЖХ/МС (раздел 3.1.2.1).

Отсутствие в проведенных экспериментах *in vitro* влияния адресного пептида с NGR-мотивом на клетках культур HT-1080 и HerG2 не исключает проявления его избирательного действия в условиях *in vivo*, путём возможного снижения поступления в здоровые клетки, не экспрессирующие аффинный к нему фермент APN. В пользу этого предположения свидетельствует существенно меньшая активность (более высокая ИК₅₀) хлорина еб в этой

системе на клетках MCF-7 ($3,8 \pm 0,2$ мкг/мл), которым, как и клеткам здоровых тканей, не свойственна экспрессия этого белка (раздел 3.2.2.1).

Таким образом, добавление специфических пептидов к фосфолипидным наночастицам с включённым хлорином еб повышает фотоиндуцированную активность этого ФС, что было показано для системы с гептааргином на опухолевых клетках трёх видов. В отношении пептида, содержащего NGR-мотив, более детальное выяснение его влияния в условиях *in vivo* может быть выявлено в дальнейших экспериментах на моделях опухолей у животных.

3.2.2.4. Оценка цитотоксического действия фосфолипидных композиций хлорина еб без воздействия света

Исследование неспецифического цитотоксического действия лекарственных композиций позволяет оценить возможное их дальнейшее использование. В условиях «темноты» (без облучения светом, инициирующим фотодинамическое терапевтическое действие ФС на опухолевые клетки) была проведена оценка с помощью МТТ теста цитотоксичности композиций хлорина еб в фосфолипидных наночастицах с пептидными фрагментами и без них. На рисунке 25 представлены результаты исследования такой «темновой» цитотоксичности композиций хлорина еб на культурах клеток HepG2, HT-1080 и MCF-7. Эксперименты проводились при трёх концентрациях хлорина еб в среде - **1,25; 5,0 и 20 мкг/мл**. На рисунке приведены данные для концентрации 5 мкг/мл, превышающей в среднем вдвое указанные выше (раздел 3.2.2.3, таблица 7) величины ИК₅₀ (вызывающие 50%-ную гибель клеток).

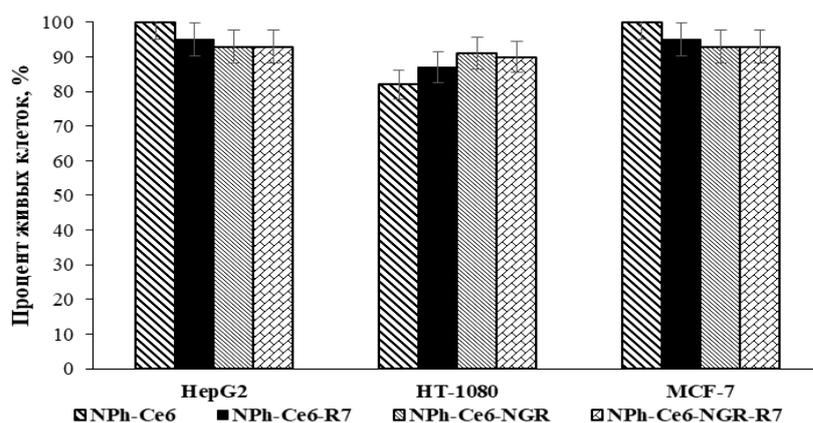


Рисунок 25. Цитотоксичность (без воздействия света) хлорина еб при концентрации 5 мкг/мл в различных системах доставки на клеточных линиях HepG2, HT-1080 и MCF-7

Исследования цитотоксического действия исследуемых композиций хлорина еб на всех видах клеток показали, что в отсутствии светового воздействия не происходит их существенной гибели. Ингибирование пролиферации не превышало 16-17%, а в большинстве случаев 10% для

всех композиций независимо от присутствия пептидных фрагментов на фосфолипидных наночастицах. Это существенно ниже 50%-ного фотоиндуцированного действия ФС при вдвое больших концентрациях (таблица 8), т.е. в целом цитостатическое действие фосфолипидных композиций в среднем в 4-10 раз ниже их специфического повреждающего противоопухолевого эффекта. При меньшей концентрации хлорина (1,25 мкг/мл) результаты были аналогичные (данные не приведены). Следует подчеркнуть, что даже и при значительно более высокой концентрации хлорина еб в среде, 20 мкг/мл, превышающей в среднем более чем в 5 раз величины ИК₅₀ для фотоиндуцированного воздействия (от 0,8 до 3,8 мкг/мл) для разных систем и клеточных линий (Таблица 8), цитостатическое действие без облучения светом на всех трёх видах клеток для всех композиций не увеличивалось.

Таблица 8. Цитотоксическое действие образцов хлорина еб в различных системах доставки без воздействия света при концентрации 20 мкг/мл (доля живых клеток после инкубации *in vitro*)

	Количество живых клеток в среде после инкубации, в % для клеточных культур:		
	НepG2	HT-1080	MCF-7
NPh-Ce6	92±1,6	81±1,4	94±2,4
NPh-Ce6-R7	93±1,4	78±1,9	81±1,0
NPh-Ce6- NGR	85±1,0	88±1,6	95±2,0
NPh-Ce6- NGR-R7	86±1,6	80±2,5	88±1,0

* - приведены проценты от количества живых клеток в контроле (без добавления композиций с Ce6)

То есть, снабжение транспортирующих хлорин еб фосфолипидных наночастиц используемыми пептидами - R7 и NGR, - не увеличивает его «темновую» токсичность, как и само включение этого ФС в исходные частицы (раздел 3.1.3). Во всех случаях она остаётся существенно ниже специфической противоопухолевой фотодинамической активности (ИК₅₀ составляла в среднем от 0,8 до 3,8 для разных типов клеток и разных композиций Ce6, раздел 3.2.2.3).

Это даёт основания предполагать также лишь минимальное, слабовыраженное побочное действие разработанных систем на здоровые клетки и ткани. Для ряда порфириновых ФС продемонстрирована сравнительно более низкая «темновая» токсичность по отношению к нормальным клеткам, чем к опухолевым [23]. Различие клеточных ответов, преимущественное воздействие именно на опухоли, должно усиливаться для разработанных нами фосфолипидных нанокомпозиций хлорина еб за счёт повышенной благодаря присутствию специфических пептидов направленной адресной доставки в опухолевые клетки и ткани и, как можно полагать,

меньшего поступления в здоровые ткани. Кроме того, обеспечиваемое включением этих пептидов большее накопление хлорина е6 и повышенная активность этих систем доставки, особенно с проникающим пептидом (R7) (разделы 3.2.2.2 и 3.2.2.3.), позволит вводить для достижения тех же лечебных эффектов меньшие дозы ФС, что снизит проявления его побочной неспецифической цитотоксичности. В целом, это должно дать повышенную терапевтическую эффективность таких систем по сравнению с применяемыми в настоящее время препаратами свободного хлорина е6 [90-93] и даже по сравнению с его оптимизированной формой в фосфолипидных наночастицах, а также описанными в ряде работ липосомальными формами этого эффективного фотосенсибилизатора [13, 127, 239].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе показано, что некоторые ограничения, существующие для применения в противоопухолевой фотодинамической терапии фотосенсибилизатора хлорина еб, заключающиеся в недостаточности его селективности и накопления в опухолях и относительно низкой фотоиндуцированной активности, могут быть преодолены путём включения его в ультрамалые наночастицы из соевого фосфолипида, в основном фосфатидилхолина, с диаметром менее 30 нм с возможностями дальнейших оптимизирующих модификаций. Исходная транспортная фосфолипидная система, сохраняющая фотодинамические свойства хлорина еб, была получена нами на основе ранее разработанной в лаборатории и применённой для ряда других лекарств технологии гомогенизации при высоком давлении с использованием микрофлюидизера. После инкубации *in vitro* с опухолевыми клетками она показала более высокую фотоиндуцированную активность, а в экспериментах *in vivo* при введении мышам с опухолью LLC - бóльшее его накопление в опухолевой ткани и более быстрый клиренс ФС по сравнению с его свободной формой. Показано также его меньшее поступление и ускоренное выведение из здоровых тканей.

Присоединение к таким фосфолипидным наночастицам специфических пептидов способствовало направленному транспорту и большему накоплению хлорина еб в опухолевых клетках. Использовали пептид с NGR-мотивом (Asn-Gly-Arg), выполняющий за счёт аффинности к экспрессируемому на ряде опухолей белку CD13 векторную роль для доставки к этим клеткам. Резервным, «запасным» путём адресности этого пептида может служить аффинность спонтанно образующегося его модификата isoDGR, аффинного к другим высокоэкспрессируемым опухолевым белкам интегринам $\alpha v \beta 3$ и $\alpha 5 \beta 1$. Однако для наших экспериментов такое взаимодействие было исключено, так как используемый гексапептид H-GNGRGC-OH по данным ЯМР-спектроскопии его не содержал, и поэтому направленность осуществлялась только за счёт CD13. Для включения гексапептида в наночастицы был предварительно синтезирован его фосфолипид содержащий конъюгат с использованием комплекса дистеароил-фосфатидилэтанолламин-полиэтиленгликоль (DSPE-PEG2000). Включение другого пептида, гептааргинина (R7), обладающего клеточно-проникающим действием, осуществлялось при его добавлении в систему, по всей вероятности, за счёт электростатического взаимодействия аргининовых остатков с карбоксильными группами хлорина еб на поверхности частицы. На трёх линиях опухолевых клеток показано стимулирующее влияние присоединения этих пептидов (в отдельности и в сочетании) на накопление хлорина еб в клетках и его действие. При этом характер влияния – присоединение к клеточной поверхности, проникновение внутрь клетки (интернализация) и степень активации

фотоиндуцируемого эффекта, – зависел от включённого пептида и отличался для разных культур клеток. Так, присутствие NGR повышало накопление и интернализацию только для клеток с экспрессией CD13 (HT-1080 и HerG2), не влияя на клетки MCF-7, не экспрессирующие ни его, ни опухоль специфичные интегрины. Основным же эффектом гептааргинаина (R7) для всех трёх видов клеток оказалось повышение присоединения хлорина еб к клеточной поверхности, сопряженное и с наибольшей стимуляцией его фотоиндуцируемого действия. Вклад в него неспецифической цитотоксичности, без воздействия света был небольшим и одинаковым для всех разработанных композиций.

Проведение соответствующих экспериментов на различных моделях опухолей *in vivo* позволит выявить наиболее эффективную из разработанных систем. Дополнительным преимуществом препаратов является их стабильность при длительном хранении, удобство использования и транспортировки в форме дозированного сухого лиофилизированного порошка с полным восстановлением свойств при его регидратации до прозрачной эмульсии. 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 показано по снижению величины ИК₅₀.

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 он раньше поглощается печенью и почками и быстрее выводится, а также меньше проникает 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, и 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 ИК₅₀, по сравнению с фосфолипидной наноконпозицией 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.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Государственный контракт № 16.N08.11.0001 от 23.05.2012г. «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства на основе хлорина Е6, снабженного эффективной системой доставки» с Министерством образования и науки Российской Федерации (2012 – 2014 гг.).

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность научному руководителю – ведущему научному сотруднику лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем, д.б.н. Торховской Татьяне Ивановне за помощь в написании работы и всестороннюю поддержку. Особую благодарность автор выражает ушедшему от нас главному научному сотруднику лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем ИБМХ, д.б.н. Прозоровскому Владимиру Николаевичу за руководство в течение длительного времени и помощь в работе, передачу важного опыта в организации и проведении исследовательской работы и поддержку в написании диссертационной работы. Благодарность выражается главному научному сотруднику лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем ИБМХ, д.б.н. Ипатовой Ольге Михайловне за помощь в работе, ценные идеи и поддержку во всех начинаниях. Автор также выражает благодарность заведующей лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем, к.х.н. Тихоновой Елене Георгиевне, за помощь в работе и постоянную поддержку.

Особую благодарность выражаю д.х.н., профессору, главному научному сотруднику лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ Пономареву Гелию Васильевичу, стоявшему у истоков применения в отечественной медицине методологии фотодинамической терапии, разработчику фотосенсибилизатора «Фотодитазин» за научные идеи, проявленный интерес к работе, рекомендации и замечания.

Отдельно выражаю благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории биосинтеза белка ИБМХ, к.б.н. Морозевич Галине Евгеньевне, за помощь в проведении клеточных экспериментов; ведущему научному сотруднику лаборатории клеточной биологии, к.б.н. Лупатову Алексею Юрьевичу за помощь в определении аминопептидазы с помощью проточной цитометрии. Автор также выражает благодарность сотрудникам лаборатории пептидной инженерии, д.б.н. Колесановой Екатерине Федоровне за помощь в работе и ценные

рекомендации, а также Мельниковой Марине Валерьевне и Колесниченко Алёне Васильевне за синтез проникающего пептида (гептааргинина).

Также автор выражает благодарность всем сотрудникам лаборатории фосфолипидных нанолекарств и транспортных систем за поддержку и помощь в проведении исследовательской работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moghissi K., Dixon K., Thorpe J.A., Stringer M., Moore P.J. The role of Photodynamic Therapy (PDT) in inoperable oesophageal cancer // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2000. – V.17. – № 2. – P. 95-100.
2. Cramer S.W., Chen C.C. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma // *Front. Surg.* – 2020. – V. 6. – № 81. – P. eCollection 2019.
3. Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S., Isakoff S.J., Chen S.T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 2019. – V. 35. – № 5. – P. 295-303.
4. Huang Z. A Review of progress in clinical photodynamic therapy // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2005. – V.4. – № 3. – P. 283-293.
5. Houle J.M, Strong A. Clinical pharmacokinetics of verteporfin // *J. Clin. Pharmacol.* – 2002. – V. 42. – № 5. – P. 547-557.
6. Шляхтин С.В., Трухачева Т.В. Возможности и перспективы использования производных Хлорофилла для создания эффективных и безопасных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // *Вестник фармации.* – 2010. – Т. 2. – № 48. – С. 1-20.
7. Патент РФ №2416614, МПК А61К31/409, МПК А61Р35/00, МПК С07D487/22. Фотосенсибилизатор и способ его получения / Пономарев Г.В., Каплан М.А., Поспелов В.И., Круглов И.Ю., Ахлебинин М.Ю.; заявитель и патентообладатель - Пономарев Г.В., Каплан М.А., Поспелов В.И., Круглов И.Ю., Ахлебинин М.Ю. - № 2007144740; заявл. 05.12.2007, опубл. 20.04.2011, Бюл. №11
8. Kim J., Jo Y.U., Na K. Photodynamic therapy with smart nanomedicine // *Arch. Pharm. Res.* – 2020. – V. 43. – № 1. – P. 22-31.
9. Kapoor P. et al. A database of tumor homing peptides // *PLoS. One.* – 2012. – V. 7. – № 4. – P. e35187.
10. Otsuki T. et al. Aminopeptidase N/CD13 as a potential therapeutic target in malignant pleural mesothelioma // *Eur. Respir. J.* – 2018. – V. 51. – № 5. – P. 1701610.
11. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A. G. Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies // *Front. Chem.* – 2020. – V. 8. – № 571. – P. eCollection.
12. Namiki Y. et al. Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome // *Pharmacol. Res.* – 2004. – V. 50. – № 1. – P. 65–76.
13. Зорина Т.Е. и др. Оценка фото- и цитотоксичности этерифицированных производных хлорина е6 и их липосомальных форм // *Биофизика.* – 2015. – Т. 60. – № 5. – С. 922-930.

14. Szurko A. et al. Photodynamic performance of amphiphilic chlorin e6 derivatives with appropriate properties: A comparison between different-type liposomes as delivery systems // *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* – 2020. – V. 30. – P. 101799
15. Kim K.S., Kim J., Kim D.H., Hwang H.S., Na K. Multifunctional trastuzumab–chlorin e6 conjugate for the treatment of HER2-positive human breast cancer // *Biomater. Sci.* – 2018. – V. 6. – № 5. – P. 1217-1226.
16. Kim J. et al. Tumor-specific aptamer-conjugated polymeric photosensitizer for effective endo-laparoscopic photodynamic therapy // *Adv. Funct. Mater.* – 2019. – V. 29. – № 23. – P. 1900084.
17. Mao B. et al. Cyclic cRGDfk peptide and Chlorin e6 functionalized silk fibroin nanoparticles for targeted drug delivery and photodynamic therapy // *Biomaterials.* – 2018. – V. 161. – P.306-320.
18. Kim Y.J., Lee H.I., Kim J.K., Kim C.H., Kim Y.J. Peptide 18-4/chlorin e6-conjugated polyhedral oligomeric silsesquioxane nanoparticles for targeted photodynamic therapy of breast cancer // *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* – 2020. – V. 189. – P. 110829.
19. Арчаков А.И. Нанобиотехнологии в медицине: нанодиагностика и нанопрепараты // *Биомедицинская химия.* – 2010. – Т. 56. – № 1. – С. 7-25.
20. Ипатова О.М., Медведева Н.В., Арчаков А.И., Григорьев А.И. Трансляционная медицина – путь от фундаментальной биомедицинской науки в здравоохранение // *Вестник Российской академии медицинских наук.* – 2012. – Т.6. – С. 57-65.
21. Zhu T.C., Finlay J.C., Hahn S.M. Determination of the distribution of light, optical properties, drug concentration, and tissue oxygenation in-vivo in human prostate during motexafin lutetium-mediated photodynamic therapy // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2005. – V. 79. – № 3. – P. 231-241
22. O'Connor A.E. et al. Mechanism of cell death mediated by a BF₂-chelated tetraaryl-azadipyrrro-methene photodynamic therapeutic: dissection of the apoptotic pathway in vitro and in vivo // *Int. J. Cancer.* – 2012. – V. 130. – № 3. – P. 705-715.
23. Мищенко Т.А. и др. Сравнительный анализ действия фотосенсибилизаторов фотосенс, фотодитазин и гиперидин на клетки глиомы и первичные нейрональные культуры in vitro // *Современные технологии в медицине.* – 2019. – Т. 11. – № 4. – С. 52-63.
24. Злокачественные новообразования в России в 2010 году / Под ред. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. - М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. – 260 с.
25. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – V. 68. – № 6. – P. 394-424.

26. Wainwrigth M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) // *J. Antimicrob. Chemther.* – 1998. – V. 42. – № 1. – P. 13-28.
27. Alves E. et al. Bioluminescence and its application in the monitoring of antimicrobial photodynamic therapy // *Appl. Microbiol. Biothechnol.* – 2011. – V. 92. – № 6. – P. 1115-1128.
28. Nguyen M., Sandhu S.S., Sivamani RK. Clinical utility of daylight photodynamic therapy in the treatment of actinic keratosis - a review of the literature // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* – 2019. – V. 12. – P. 427-435.
29. Diamond, I. et al. Photodynamic Therapy of Malignant Tumors // *Lancet.* – 1972. – V. 300. – № 7788. – P. 1175-1177.
30. Dougherty T. J. et al. Photoradiation Therapy// *J. Natl. Cancer. Inst.* – 1998. – V. 90. – № 12. – P. 889-905.
31. Dougherty, T. J. Activated Dyes as Anti-Tumor Agents // *J. Nati. Cancer Inst.* – 1974. – V. 52. – № 4. – P. 1333-1336.
32. Dougherty T.J., Grindey G.B., Fiel R., Weishaupt K.R., Boyle D.G. Photoradiation Therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light // *J. Nati. Cancer Inst.* – 1975. – V. 55. – № 1. – P. 115-121.
33. Порфирины: структура, свойства, синтез / Под ред. Ениколопян Н.С. – М.: Наука, 1985. – 333 с.
34. Weishaupt K.R., Gomer C.J., Dougherty T.J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor // *Cancer Res.* – 1976. – V. 36. – № 7-1. – P. 2326-2329.
35. Dergacheva O. lu, Kolosov M.S., Uzdenskiï A.B. Photosensibilization of isolated mechanoreceptor neuron of *Astacus leptodactilus* and satellite glial cells with endogenous riboflavin // *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* – 2005. – Vol. 41. – № 3. – P. 259-265.
36. Luby B.M., Walsh C.D., Zheng G. Advanced Photosensitizer Activation Strategies for Smarter Photodynamic Therapy Beacons // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2019. – V. 58. – № 9. – P. 2558-2569.
37. Chiba M. et al. Activatable Photosensitizer for Targeted Ablation of lacZ-Positive Cells with Single-Cell Resolution // *ACS Cent. Sci.* – 2019. – V. 5. – № 10. – P. 1676-1681
38. Kwiatkowski S. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – V. 106. – P. 1098-1107.
39. Страховская М.Г. Фотодинамическая инактивация микроорганизмов: фундаментальные и прикладные аспекты: диссертация доктора биологических наук: 03.01.02 / Страховская Марина Глебовна – М., 2010. – 285 с.

40. Agostinis P. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA Cancer J. Clin.* – 2011. – V. 61. – № 4. – P. 250-281.
41. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // *J. Photochem. Photobiol.* – 1997. – V. 39. – № 1. – P. 1-18.
42. Swetha S., Singh M.K., Minchitha K.U., Balakrishna R.G. Elucidation of cell killing mechanism by comparative analysis of photoreactions on different types of bacteria // *Photochem. Photobiol.* – 2012. – V.88. – № 2. – P. 414-422.
43. Wilson B.C., Patterson M.S. and Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: A new paradigm // *Lasers Med. Sci.* – 1997. – V. 12. – № 3. – P. 182-199.
44. Patterson M.S., Wilson B.C. and Graff R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – V. 51. – № 3. – P. 343-349.
45. Sakamoto F.H. et al. Intracutaneous ALA photodynamic therapy: dose-dependent targeting of skin structures // *Lasers Surg. Med.* – 2011. – V. 43. – № 7. – P. 621-631.
46. Berki T., Nemeth P. Photo-immunotargeting with haematoporphyrin conjugates activated by a low-power He-Ne laser // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1992. – V. 35. – № 1. – P. 69-74.
47. Hudson R., Boyle R.W. Strategies for selective delivery of photodynamic sensitizers to biological targets // *J. Porphyrins Phthalocyanines.* – 2004. – V. 8. – № 7. – P. 954-975.
48. Allison R.R., Moghissi K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms // *Clin. Endosc.* – 2013. – V. 46. – № 1. – P. 24-29.
49. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2004. – V.1. – № 4. – P. 279-293.
50. Lan M. et al. Photosensitizers for Photodynamic Therapy // *Adv. Healthc. Mater.* – 2019. – V. 8. – № 13. – P. e1900132.
51. Lipson R.L., Baldes E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative // *Archives of Dermatology.* – 1960. – V. 82. – № 4. – P. 508-516.
52. Zheng H. A Review of progress in clinical photodynamic therapy // *Technol. Cancer Res. Treat.* – 2005. – V.4. – № 3. – P. 283-293.
53. Bellnier D.A., Dougherty T.J. A preliminary pharmacokinetic study of intravenous Photofrin in patients // *J. Clin. Laser. Med. Surg.* – 1996. – V.14. – № 5. – P. 311-314.
54. Allison R.R. et al. Photosensitizers in clinical PDT // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2004. – V. 1. – № 1. – P. 27-42.

55. Гельфонд М.Л. Фотодинамическая терапия в онкологии // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – № 4. – С. 204-210.
56. Dougherty T.J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors // *Cancer Res.* – 1978. – V. 38. – № 8. – P.2628-2635.
57. Haidekker M. et al. Dyes with segmental mobility: molecular rotors // In: *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I.* – 2010. – V. 8. – P. 267-308.
58. Morton C.A., McKenna K.E., Rhodes L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update // *Br. J. Dermatol.* – 2008. – V. 159. – № 6. – P. 1245-1266.
59. Allison R.R. Photodynamic therapy: oncologic horizons // *Future Oncol.* – 2014. – V. 10. – № 1. – P. 123-124
60. Khurana M. et al. Biodistribution and pharmacokinetic studies of a porphyrin dimer photosensitizer by fluorescence imaging and spectroscopy in mice bearing xenograft tumors // *Photochem. Photobiol.* – 2012. – V. 88. – № 6. – P. 1531-1538.
61. Kessel D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization// *Cancer Lett.* – 1986. – V. 33. – № 2. – P. 183-188.
62. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction // *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* – 2005. – V. 2. – № 2. – P. 91-106.
63. Yuan, F. et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – № 17. – P. 375-3756.
64. Лукьянец Е.А. Поиск новых фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика.* – 2013. – Т. 2. – № 3. – С. 3-16.
65. Demidova T.N., Hamblin M.R. Photodynamic therapy targeted to pathogens // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* – 2004. – V. 17. – № 3. – P. 245-254.
66. Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2004. – V. 3. – № 5. – P. 436-450.
67. Richter A.M. et al. Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1987. – V. 79. – №6. – P. 1327-1332.
68. Houle J.M., Strong H.A. Duration of skin photosensitivity and incidence of photosensitivity reactions after administration of verteporfin // *Retina.* – 2002. – V. 22. – №6. – P. 691-697.
69. Chan, W.M., Lim T.H., Peco A., Silva R., Yoshimura N. Verteporfin PDT for non-standard indications – a review of current literature // *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2010. – V. 248. – № 5. – P. 613-626.

70. Chowdhary, R.K., Shariff I., Dolphin D. Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivative // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2003. – V. 6. – № 1. – P. 13-19.
71. McFarland S.A., Mandel A., Dumoulin-White R., Gasser G. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 2020. – V. 56. – P. 23-27.
72. Странадко Е.Ф. Основные этапы развития фотодинамической терапии в России // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика.* – 2015. – Т.4. – № 1. – С.3-10.
73. Mohammad A., Ballullaya S.V., Thumu J., Maroli S., Shankarappa P. Effect of ultrasonic activation of photosensitizer dye temoporfin (Foscan) on antimicrobial photodynamic therapy: An ex vivo study // *J. Conserv. Dent.* – 2017. – V. 20. – № 6. – P. 419-423.
74. Senge M.O., Brandt J.C. Temoporfin (Foscan®, 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)-a second-generation photosensitizer // *Photochem. Photobiol.* – 2011. – V. 87. – № 6. – P. 1240-1296.
75. Krasnovsky A.A. Jr., Neverov K.V., Egorov S.Yu., Roeder B., Levald T. Photophysical studies of pheophorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1990. – V. 5. – № 2. – P. 245-254.
76. Патент РФ № 2490273С1, МПК C07D 487/22. Способ получения метилфеофорбида (А) / Койфман О.И., Пономарёв Г.В.; заявитель и патентообладатель - Койфман О.И., Пономарёв Г.В. - № 2012107000/15А; заявл. 27.02.2012, опубл. 20.08.2013, Бюл. № 23
77. Zenkevich E. et al. Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and chlorin photosensitizers for PDT // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 1996. – V. 33. – № 2. – P. 171-180.
78. Mojzisova H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – V. 1768. – № 2. – P. 366-374.
79. Vitols S., Gunven P., Gruber A., Larsson O. Expression of the low-density lipoprotein receptor, HMG-CoA reductase, and multidrug resistance (Mdr1) genes in colorectal carcinomas // *Biochemical. Pharmacology.* – 1996. – V. 52. – № 1. – P. 127-131.
80. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis // *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* – 2009. – V. 6. – № 2. – P. 94-96.
81. Патент РФ № 2144538, МПК C07D487/22, МПК А61К31/40, МПК А61Р35/00. Способ получения водорастворимых хлоринов / Пономарев Г.В., Решетников А.В., Гусева-Донская Т.Н., Швец В.И., Баум Р.Ф., Ашмаров В.В.; заявитель и патентообладатель – Закрытое акционерное общество «Вета» - № 96100545/04; заявл. 22.01.1998, опубл. 20.01.2000.

82. Патент РФ №2568597, МПК А61К31/409, МПК А61К47/36, МПК А61Р35/00. Фотосенсибилизатор и способ его получения / Батомункуев А.В., Ашмаров В.В., Дауэ С.С.; заявитель и патентообладатель – Общество с ограниченной ответственностью «РЕВИКСАН» (ООО «РЕВИКСАН») - № 2014147699/15; заявл. 27.11.2014, опубл. 20.11.2015, Бюл. №32

83. Каплан М.Г., Пономарев Г.В., Баум Р.Ф., Романко Ю.С., Мардынская В.П., Малагина А.И. Изучение специфической фотодинамической активности фотодитазина при фотодинамической терапии у экспериментальных животных-опухоленосителей // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2. – № 4. – С. 23-30.

84. Пономарев Г.В. Современные тенденции создания фотосенсибилизаторов для ФДТ и ФД // Biomedical Photonics. – 2015. – Т. 4. – № 5. – С. 68-69.

85. Патент РФ № 2183956, МПК А61К31/409, МПК А61Р35/00, Фотосенсибилизатор и способ его получения / Решетников А.В., Залевский И.Д., Кемов Ю.В., Иванов А.В., Карменян А.В., Гладюшко А.Т., Лаптев В.П., Неугодова Н.П., Абакумова О.Ю., Привалов В.А., Лаппа А.В., Романов В.А.; заявитель и патентообладатель - Общество с ограниченной ответственностью «РАДА-ФАРМА» - № 2001108397/14; заяв. 30.03.2001, опубл. 27.06.2002, Бюл. №18

86. Бурмистрова Н.В. и др. Экспериментальные аспекты фотодинамической терапии // под общ. Ред. А.Ф. Цыба и М.А. Каплан. - Калуга: Изд-во Н.Ф. Бочкаревой, 2010. – Гл. 1. – С.9-33.

87. Кочнева Е.В. Результаты II фазы клинического исследования фотосенсибилизатора Радохлорин у больных базально-клеточным раком кожи, проведенного в Челябинской городской больнице №1 // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4. – №4. – С. 92-95.

88. Вакуловская Е.Г., Решетников А.В., Залевский И.Д., Кемов Ю.В. Фотодинамическая терапия и флюоресцентная диагностика с фотосенсибилизатором Радахлорин у больных раком кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т.3. – №1. – С. 77-82.

89. Kim S.M., Rhee Y.H., Kim J.S. The Anticancer Effects of Radachlorin-mediated Photodynamic Therapy in the Human Endometrial Adenocarcinoma Cell Line HEC-1-A // Anticancer Res. – 2017. – V. 37. – № 11. – P. 6251-6258.

90. Savitskii V.P., Zorin V.P., Potapnev M.P., Potapenko A.Ya. Comparative analysis of accumulation of chlorine e6 and hematoporphyrin derivatives in subpopulations of peripheral blood lymphocytes // Bull. Exp. Biol. Med. – 2004. – V. 138. – № 2. – P. 158-162.

91. Pegaz B. et al. Preclinical evaluation of a novel water-soluble chlorin E6 derivative (BLC 1010) as photosensitizer for the closure of the neovessels // *Photochem. Photobiol.* – 2005. – V. 81. – № 6. – P. 1505-1510.
92. Li P. et al. Photodynamic therapy with hyperbranched poly(ether-ester) chlorin(e6) nanoparticles on human tongue carcinoma CAL-27 cells // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2012. – V. 9. – № 1. – P. 76-82.
93. Алексеев Ю.В., Лихачёва Е.В., Терёшкин Д.В., Пономарёв Г.В., Мазур Е.В. Подбор эффективных фотосенсибилизаторов для лечения заболеваний лор-органов на основе изучения их накопления в патологически изменённых тканях // *Биомед. Хим.* – 2012. – Т. 58. – № 1. – С.112-120.
94. Li X., Kwon N., Guo T., Liu Z., Yoon J. Innovative strategies for hypoxic-tumor photodynamic therapy // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2018. – V. 57. – № 36. – P. 11522-11531
95. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – V. 3. – № 5. – P 380-387.
96. Istoin Y.P., Laptsevich T.P., Bizyuk S.A., Alexandrova E.N. Photodynamic efficacy of topical application of chlorin e6--polyvinyl pyrrolidone complex in tumor-bearing rats // *Exp. Oncol.* – 2006. – V. 28. – № 4. – P. 299-302.
97. Ali-Seyed M., Bhuvanewari R., Soo K.C., Olivo M. Photolon™ --photosensitization induces apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes // *Int. J. Oncol.* – 2011. – V. 39. – № 4. – P. 821-831.
98. Zhang D. et al. Chlorin e6 conjugated Poly(dopamine) nanospheres as PDT/PTT dual-modal therapeutic agents for enhanced cancer therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2015. – V. 7. – № 15. – P. 8176-8187.
99. Park H., Na K. Conjugation of the photosensitizer Chlorin e6 to pluronic F127 for enhanced cellular internalization for photodynamic therapy // *Biomaterials.* – 2013. – V. 34. – № 28. – P. 6992-7000.
100. Li F., Na K. Self-assembled chlorin e6 conjugated chondroitin sulfate nanodrug for photodynamic therapy // *Biomacromolecules.* – 2011. – V. 12. – №5. – P. 1724-1730.
101. Huang X., Tian X.J., Yang W.L., Ehrenberg B., Chen J.Y. The conjugates of gold nanorods and chlorin e6 for enhancing the fluorescence detection and photodynamic therapy of cancers // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2013. – V. 15. – № 38. – P. 15727-15733.
102. Goff B.A. et al. Photoimmunotherapy and biodistribution with an OC₁₂₅-chlorin immunoconjugate in an in vivo murine ovarian cancer model // *Br. J. Cancer.* – 1994. – V. 70. – № 3. – P. 474-480.

103. Hamblin M.R., Miller J.L., Hasan T. Effect of charge on the interaction of site-specific photoimmunoconjugates with human ovarian cancer cells // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – № 22. – P. 5205-5210.
104. Hamblin M.R., Governatore M.Del, Rizvi I., Hasan T. Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoconjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer // *Br. J. Cancer.* – 2000. – V. 83. – № 11. – P. 1544-1551.
105. Governatore M. Del et al. Experimental photodynamic therapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1A chlorin(e6) immunoconjugate // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 15. – P. 4200-4205.
106. Hu L.K., Hasan T., Gragoudas E.S., Young L.H. Photodynamic therapy of human uveal melanoma cells // *Exp. Eye. Res.* – 1995. – V. 61. – № 4. – P. 385-91.
107. Omelyanenko V., Gentry C., Kopecková P., Kopecek J. HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro // *Int. J. Cancer.* – 1998. – V. 75. – № 4. – P. 600-608.
108. Kruspe S., Meyer C., Hahn U. Chlorin e6 Conjugated Interleukin-6 Receptor Aptamers Selectively Kill Target Cells Upon Irradiation // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* – 2014. – V. 3. – № 1. – P. e143.
109. Richter A.M. et al. Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model // *Photochem. Photobiol.* – 1993. – V. 57. – № 6. – P. 1000-1006.
110. Skupin-Mrugalska P. et al. Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers // *Drug. Discov. Today.* – 2013. – V. 18. – № 15-16. – P. 776-784.
111. Vetta M. D., González L., Nogueira J.J. Hydrogen bonding regulates the rigidity of liposome-encapsulated chlorin photosensitizers // *ChemistryOpen.* – 2018. – V. 7. – № 6. – P. 475-483.
112. Bombelli C. et al. Inclusion of a photosensitizer in liposomes formed by DMPC/gemini surfactant: correlation between physicochemical and biological features of the complexes // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48. – № 15. – P. 4882-4891.
113. Molinari A. et al. Cationic liposomes, loaded with m-THPC, in photodynamic therapy for malignant glioma // *Toxicol. In. Vitro.* – 2007. – V. 21. – № 2. – P. 230-234.
114. Kuntsche J., Freisleben I., Steiniger F., Fahr A. Temoporfin-loaded liposomes: physicochemical characterization // *Eur. J. Pharm.* – 2010. – V. 40. – № 4. – P.305-315.
115. Zeng N. et al. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded DSPE-PEG-liquid crystalline nanoparticles (LCNPs) for improved bioavailability // *Int. J. Pharm.* – 2012. – V. 424. – № 1-2. – P. 58-66.

116. Gaio E., Scheglmann D., Reddi E., Moret F. Uptake and photo-toxicity of Foscan®, Foslip® and Fospeg® in multicellular tumor spheroids // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 2016. – V. 161. – P. 244-252.
117. Kuntsche J., Freisleben I., Steiniger F., Fahr A. Temoporfin-loaded liposomes: physicochemical characterization // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2010. – V. 40. – № 4. – P. 305-315
118. D'Hallewin M.A. et al. Photodynamic therapy with intratumoral administration of Lipid-Based mTHPC in a model of breast cancer recurrence // *Lasers Surg. Med.* – 2008. – V. 40. – № 8. – P. 543-549.
119. Jablonka L et al. Predicting human pharmacokinetics of liposomal temoporfin using a hybrid in silico model // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2020. – V. 149. – P. 121-134.
120. Compagnin C. et al. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-loaded liposomes sterically stabilised with poly(ethylene glycol) of different length and density: characterisation, in vitro cellular uptake and phototoxicity // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2011. – V. 10. – № 11. –P. 1751-1759.
121. de Visscher S.A.H.J. et al. Fluorescence localization and kinetics of mTHPC and liposomal formulations of mTHPC in the window-chamber tumor model // *Lasers Surg. Med.* – 2011. – V. 43. – № 6. – P. 528-536.
122. Reshetov V. et al. Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo // *Int. J. Nanomedicine.* – 2013. – V. 8. – P. 3817-3831.
123. Meier D. et al. Foscan and foslip based photodynamic therapy in osteosarcoma in vitro and in intratibial mouse models // *Int. J. Cancer.* – 2017. – V. 140. – № 7. – P. 1680-1692.
124. Garrier J. et al. Foslip®-based photodynamic therapy as a means to improve wound healing // *Photodiagnosis. Photodyn. Ther.* – 2011. – V. 8. – № 4. – P. 321-327.
125. Mojzisova H., Bonneau S., Maillard P., Berg K. and Brault D. Photosensitizing properties of chlorins in solution and in membrane-mimicking systems // *Photochem Photobiol Sci.* – 2009. – V. 8. – № 6. – P. 778-787.
126. Иен Ч.Т.Х., Раменская Г.В., Оборотова Н.А Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в ФДТ опухолей // *Российский биотерапевтический журнал.* – 2009. – Т. 8. – № 4. – С. 99-104.
127. Shim G., Lee S., Kim Y.B., Kim C.W. and Oh Y.K. Enhanced tumor localization and retention of chlorin e6 in cationic nanolipoplexes potentiate the tumor ablation effects of photodynamic therapy // *Nanotechnology.* – 2011. – V. 22. – № 36. – P. 365101.
128. Peng P.C. et al. Dual-effect liposomes encapsulated with doxorubicin and chlorin e6 augment the therapeutic effect of tumor treatment // *Lasers Surg. Med.* – 2015. – V. 47. – № 1. – P. 77-87.

129. Peng P.C., Hong R.L., Tsai T. and Chen C.T. Co-Encapsulation of chlorin e6 and chemotherapeutic drugs in a PEGylated liposome enhance the efficacy of tumor treatment: pharmacokinetics and therapeutic efficacy // *Pharmaceutics*. – 2019. – V. 11. – № 11. – P. 617.
130. Mahmoud G., Jedelská J., Strehlow B. and Bakowsky U. Bipolar tetraether lipids derived from thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* for membrane stabilization of chlorin e6 based liposomes for photodynamic therapy // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2015. – V. 95(A). – P. 88-98.
131. Tan X. et al. An efficient dual-loaded multifunctional nanocarrier for combined photothermal and photodynamic therapy based on copper sulfide and chlorin e6 // *Int. J. Pharm.* – 2016. – V. 503. – № 1-2. – P. 220-228.
132. Kałas W. et al. Photoactive liposomal formulation of PVP-conjugated chlorin e6 for photodynamic reduction of atherosclerotic plaque // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20. – № 16. – P. 3852.
133. Kumari P., Jain S., Ghosh B., Zorin V. and Biswas S. Polylactide-Based Block Copolymeric Micelles Loaded with Chlorin e6 for Photodynamic Therapy: In Vitro Evaluation in Monolayer and 3D Spheroid Models // *Mol. Pharm.* – 2017. – V. 14. – № 11. – P. 3789-3800.
134. Lee D.J. et al. Multifunctional poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for luminescence/magnetic resonance imaging and photodynamic therapy // *Int. J. Pharm.* – 2012. – V. 434. – № 1-2. – P. 257-263.
135. Kumari P., Rompicharla S.V.K., Bhatt H., Ghosh B. and Biswas S. Development of chlorin e6-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(d,l-lactide) nanoparticles for photodynamic therapy // *Nanomedicine (Lond)*. – 2019. – V. 14. – № 7. – P. 819-834.
136. Kumari P. et al. Chlorin e6 Conjugated Methoxy-Poly(Ethylene Glycol)-Poly(D,L-Lactide) Glutathione Sensitive Micelles for Photodynamic Therapy // *Pharm. Res.* – 2020. – V. 37. – № 2. – P. 18.
137. Hopkins T., Ukani R. and Kopelman R. Intracellular Photodynamic Activity of Chlorin e6 Containing Nanoparticles // *Int. J. Nanomed. Nanosurg.* – 2016. – V. 2. – № 4. – P. 119.
138. Ding Y.F. et al. Highly Biocompatible Chlorin e6-Loaded Chitosan Nanoparticles for Improved Photodynamic Cancer Therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. – 2018. – V. 10. – № 12. – P. 9980-9987.
139. Shton I.O., Sarnatskaya V.V., Prokopenko I.V. and Gamaleia N.F. Chlorin e6 combined with albumin nanoparticles as a potential composite photosensitizer for photodynamic therapy of tumors // *Exp. Oncol.* – 2015. – V. 37. – № 4. – P.250-254.

140. Adimoolam M.G., A V., Nalam M.R. and Sunkara M.V. Chlorin e6 loaded lactoferrin nanoparticles for enhanced photodynamic therapy // *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – V.5. – № 46. – P. 9189-9196.
141. Bharathiraja S., Moorthy M.S., Manivasagan P., Seo H., Lee K.D. and Oh J. Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2017. – V.19. – P. 212-220.
142. Kamkaew A. et al. Cerenkov Radiation Induced Photodynamic Therapy Using Chlorin e6-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2016. – V. 8. – № 40. – P. 26630-26637.
143. Jain B., Uppal A., Gupta P.K. and Das K. Spectroscopic investigations on the binding of the photosensitizer Chlorin p6 with amine-modified silica nanoparticles in aqueous media // *Photochem. Photobiol.* – 2009. – V. 85. – № 4. – P. 927-933.
144. Zhang P. et al. Iron oxide nanoparticles as nanocarriers to improve chlorin e6-based sonosensitivity in sonodynamic therapy // *Drug Des. Devel. Ther.* – 2018. – V. 12. – P. 4207-4216.
145. Zhao L. et al. Efficient delivery of chlorin e6 into ovarian cancer cells with octalysine conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for effective photodynamic therapy // *J. Mater. Chem. B.* – 2016. – V. 4. – № 47. – P. 7741-7748.
146. Gjuroski I. et al. Evaluation of polyvinylpyrrolidone and block copolymer micelle encapsulation of serine chlorin e6 and chlorin e4 on their reactivity towards albumin and transferrin and their cell uptake // *J. Control. Release.* – 2019. – V. 316. – P. 150-167.
147. Kessel D. Interactions between N-aspartyl chlorin e6, detergent micelles and plasma lipoproteins // *Photochem. Photobiol.* – 1995. – V. 61. – № 6. – P. 646-649.
148. Ponomarev G.V. et al. Lipophilic derivatives of natural chlorins: Synthesis, mixed micelles with phospholipids, and uptake by cultured cells // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – V. 21. – № 17. – P. 5420-5427.
149. Narmani A. et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems // *Drug Dev. Res.* – 2019. – V. 80. – №4. – P. 404-424.
150. Moret F., Scheglmann D. and Reddi E. Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – V. 12. – № 5. – P. 823-834.
151. Kook M.S., Lee C.M., Jeong Y.I. and Kim B.H. Nanophotosensitizers for Folate Receptor-Targeted and Redox-Sensitive Delivery of Chlorin E6 against Cancer Cells. // *Materials (Basel).* – 2020. – V. 13. – № 12. – P. 2810.
152. Choi K.H., Nam K.C., Cho G., Jung J.S. and Park B.J. Enhanced Photodynamic Anticancer Activities of Multifunctional Magnetic Nanoparticles (Fe₃O₄) Conjugated with Chlorin e6

and Folic Acid in Prostate and Breast Cancer Cells // *Nanomaterials (Basel)*. – 2018. – V. 8. – № 9. – P. 722.

153. Low K.P., Bhuvaneshwari R., Thong P.S., Bunte R.M. and Soo K.C. Novel delivery of chlorin e6 using anti-egfr antibody tagged virosomes for fluorescence diagnosis of oral cancer in a hamster cheek pouch model // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2016. – V. 83. – P. 143-154.

154. Soudy R., Etayash H., Bahadorani K., Lavasanifar A. and Kaur K. Breast cancer targeting peptide binds keratin 1: a new molecular marker for targeted drug delivery to breast cancer // *Mol. Pharm.* – 2017. – V. 14. – № 3. – P. 593-604.

155. Li Z.H., Zhou Y., Ding Y.X., Guo Q.L., Zhao L. Roles of integrin in tumor development and the target inhibitors // *Chin. J. Nat. Med.* – 2019. – V. 17. – № 4. – P.241-251.

156. Ichikawa K. et al. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – V. 1669. – № 1. – P. 69-74.

157. Oku N. and Ishii T. Antiangiogenic photodynamic therapy with targeted liposomes // *Methods Enzymol.* – 2009. – V. 465. – P. 313-330.

158. Xiao L. et al. Development of a novel drug targeting delivery system for cervical cancer therapy // *Nanotechnology.* – 2019. – V. 30. – № 7. – P. 075604.

159. Sun Y. et al. RGD Peptide-Based Target Drug Delivery of Doxorubicin Nanomedicine // *Drug. Dev. Res.* – 2017. – V. 78. – № 6. – P. 283-291.

160. Kebebe D. et al. Dimeric c(RGD) peptide conjugated nanostructured lipid carriers for efficient delivery of Gambogic acid to breast cancer // *Int. J. Nanomedicine.* – 2019. – V. 14. – P. 6179-6195.

161. Gautam A. et al. Tumor homing peptides as molecular probes for cancer therapeutics, diagnostics and theranostics // *Curr. Med. Chem.* – 2014. – V. 21. – № 21. – P. 2367-2391.

162. Reubi J.C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy // *Endocr. Rev.* – 2003. – V. 24. – № 4. – P. 389-427.

163. Vrettos E.I., Mező G. and Tzakos A.G. On the design principles of peptide-drug conjugates for targeted drug delivery to the malignant tumor site // *Beilstein. J. Org. Chem.* – 2018. – V. 14. – P. 930-954.

164. Ellerby H. M. et al. Anticancer activity of targeted pro-apoptotic peptides // *Nat. Med.* – 1999. – V. 5. – № 9. – P. 1032-1038.

165. van der Meel R., Vehmeijer L.J., Kok R.J. Storm G. and van Gaal E.V.B. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: Current status // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – V. 65. – № 10. – P. 1284-1298.

166. Liu R., Li X., Xiao W. and Lam K.S. Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2017. – V. 110-111. – P. 13-37.
167. Ruoslahti E. The RGD story: a personal account // *Matrix Biol.* – 2003. – V. 22. – № 6. – P. 459-465.
168. Dissanayake S., Denny W.A., Gamage S. and Sarojini V. Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides // *J. Control. Rel.* – 2017. – V. 250. – P. 62-76.
169. Chen H. et al. A bestatin-based fluorescent probe for aminopeptidase N cell imaging // *Chin. Chem. Lett.* – 2015. – V. 26. – № 5. – P. 513-516.
170. Song S. et al. Novel peptide ligand directs liposomes toward EGF-R high-expressing cancer cells in vitro and in vivo // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – № 5. – P. 1396-1404.
171. Han C.Y. et al. A novel small peptide as an epidermal growth factor receptor targeting ligand for nanodelivery in vitro // *Int. J. Nanomed.* – 2013. – V. 8. – P. 1541-1549.
172. Togami K. et al. Efficient delivery to human lung fibroblasts (WI-38) of pirfenidone incorporated into liposomes modified with truncated basic fibroblast growth factor and its inhibitory pulmonary fibrosis // *Biol. Pharm. Bull.* – 2015. – V. 38. – № 2. – P. 270-276.
173. Akhtar M.J., Ahamed M., Alhadlaq H.A. and Kumar S. Targeted anticancer therapy: Overexpressed receptors and nanotechnology // *Clin. Chim. Acta.* – 2014. – V. 436. – P. 78-92.
174. Essler M. and Ruoslahti E. Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – № 4. – P. 2252-2257.
175. Leu F.P. and Nandi M. GPCR somatostatin receptor extracellular loop 2 is a key ectodomain for making subtype-selective antibodies with agonist-like activities in the pancreatic neuroendocrine tumor BON cell line // *Pancreas.* – 2010. – V. 39. – № 8. – P. 1155-1566.
176. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model // *Science.* – 1998. – V. 279. – P. 377-380.
177. Pasqualini R. et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 3. – P. 722-727.
178. Yepeng L., Wenfang X. The structure and main functions of aminopeptidase N // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – V. 14. – № 6. – P. 639-647.
179. Liu C., Liu T., Yu X. and Gua Y. A preliminary study on the interaction between Asn-Gly-Arg (NGR)-modified multifunctional nanoparticles and vascular epithelial cells // *Acta Pharm. Sin. B.* – 2017. – V. 7. – № 3. – P. 361-372

180. Piedfer M., Dauzonne D., Tang R., N'Guyen J., Billard C., Bauvois B. Aminopeptidase-N/CD13 is a potential proapoptotic target in human myeloid tumor cells // *FASEB J.* – 2011. – V. 25. – № 8. – P. 2831-2842.
181. Curnis F, Longhi R, Crippa L, et al. Spontaneous formation of L-isoaspartate and gain of function in fibronectin // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 36466-36476.
182. Spitaleri A., Mari S., Curnis F., et al. Structural basis for the interaction of isoDGR with the RGD-binding site of avbeta 3 integrin // *J. Biol. Chem.* – 2008. – V. 283. – № 28. – P. 19757-19768.
183. Corti A., Curnis F., Arap W., Pasqualini R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye // *BLOOD.* – 2008. – V. 112. – № 7. – P. 2628-2635.
184. Enyedi K.N., Toth S., Szakacs G., Mező G. NGR-peptide–drug conjugates with dual targeting properties // *PLoS ONE.* – 2017. – V. 12. – № 6. – P. e0178632.
185. Wang R.E., Niu Y., Wu H., Hu Y., Cai J. Development of NGR-based anti-cancer agents for targeted therapeutics and imaging // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2012. – V. 12. – № 1. – P. 76-86.
186. Valiyari S., Salimi M., Bouzari S. Novel fusion protein NGR-sIL-24 for targetedly suppressing cancer cell growth via apoptosis // *Cell Biol. Toxicol.* – 2020. – V. 36. – № 2. – P. 179-193.
187. Li X., et. al. Multimodality labeling of NGR-functionalized hyaluronan for tumor targeting and radiotherapy // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2021. – V. 25. – P.105775.
188. Hofmann S., Maschauer S., Kuwert T., Beck-Sickinger A.G. and Prante O. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of an (18)F-labeled neuropeptide Y analogue for imaging of breast cancer by PET // *Mol. Pharm.* – 2015. – V. 12. – № 4. – P. 1121-1130.
189. Varini K. et al. Target engagement and intracellular delivery of mono- and bivalent LDL receptor-binding peptide-cargo conjugates: implications for the rational design of new targeted drug therapies // *J. Control. Release.* – 2019. – V. 314. – P.141-161.
190. Molino, Y. et al. Use of LDL receptor-targeting peptide vectors for in vitro and in vivo cargo transport across the blood-brain barrier // *FASEB J.* – 2017. – V. 31(5). – P. 1807-1827.
191. Futaki S., Nakase I., Tadokoro A., Takeuchi T. and Jones A. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms // *Biochem. Soc. Trans.* – 2007. – V. 35 (Pt 4). – P. 784-787.
192. Ruben S. et al. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein // *J. Virol.* – 1989. – V. 63. – № 1. – P. 1-8.
193. Futaki S. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms // *Biopolymers (Peptide Science).* – 2006. – V. 84. – № 3. – P. 241-249.

194. Choi Y., McCarthy J.R., Weissleder R. and Tung C.H. Conjugation of a Photosensitizer to an Oligoarginine-Based Cell-Penetrating Peptide Increases the Efficacy of Photodynamic Therapy // *Chem. Med.Chem.* – 2006. – V. 1. – № 4. – P. 458-463.
195. Hayashi T., Shinagawa M., Kawano T. and Iwasaki T. Drug delivery using polyhistidine peptide-modified liposomes that target endogenous lysosome // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – V. 501. – № 3. – P. 648-653.
196. Myrberg H., Zhang L., Mäe M. and Langel Ü. Design of a tumor-homing cell-penetrating peptide // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – V. 19. – № 1. – P. 70-75.
197. Regberg J., Srimanee A. and Langel Ü. Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies // *Pharmaceuticals.* – 2012. – V. 5. – № 9. – P. 991-1007.
198. Kersemans V. and Cornelissen B. Targeting the tumour: Cell penetrating peptides for molecular imaging and radiotherapy // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2010. – V. 3. – № 3. – P. 600-620.
199. Zanuy D., Curco D., Nussinov R. and Aleman C. Influence of the dye presence on the conformational preferences of CREKA, a tumor homing linear pentapeptide // *Biopolymers.* – 2009. – V. 92. – № 2. – P. 83-93.
200. Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1816. – № 2. – P. 232-246.
201. Soler M. et al. Enzyme-triggered delivery of chlorambucil from conjugates based on the cell-penetrating peptide BP16 // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – V. 13. – № 5. – P. 1470-1480.
202. Böhme D. and Beck-Sickinger A.G. Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy // *J. Pept.Sci.* – 2015. – V. 21. – №3. – P. 186-200.
203. Wang R.H. et al. Efficacy of dual-functional liposomes containing paclitaxel for treatment of lung cancer // *Oncol. Rep.* – 2017. – V. 38. – № 5. – P. 3285.
204. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – V. 65. – № 1-2. – P. 55-63.
205. Laurens L.M., Quinn M., Van Wychen S., Templeton D.W. and Wolfrum E.J. Accurate and reliable quantification of total microalgal fuel potential as fatty acid methyl esters by in situ transesterification // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 403. – № 1. – P. 167-178.
206. Sheldon K., Liu D., Ferguson J. and Gariépy J. Lologomers: design of de novo peptide-based intracellular vehicles// *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1995. – V. 92. – № 6. – P. 2056-2060.
207. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. // Под ред. А.Н. Миронова и др. - М.: Из-во Гриф и К., 2012. – С. 657-671.
208. Патент РФ №2391966 С1, МПК А61К9/127, В82В1/00. Наносистема на основе растительных фосфолипидов для включения биологически активных соединений и способ ее получения / Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева

Н.В., Лисица А.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широнин А.В.; заявитель и патентообладатель ООО “ЭкоБиоФарм” – №2009104784/15; заявл. 13.02.2009; опубл. 20.06.2010, Бюл. №17.

209. Арчаков А.И. Нанобиотехнологии в медицине: нанодиагностика и нанолечения // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56. – № 1. – С. 7-25.

210. Медведева Н.В. и др. Лекарственные препараты и транспортные наносистемы на основе растительных фосфолипидов // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61. – № 2. – С. 219-230.

211. Crommelin D.J. Influence of lipid composition and ionic strength on the physical stability of liposomes // J. Pharmacol. Sci. – 1984. – V. 73. – № 11. – P. 1559-1563.

212. Laouini A., Jaafar-Maalej C., Sfar S., Charcosset C. and Fessi H. Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor-application to spironolactone encapsulation // Int. J. Pharm. – 2011. – V. 415. – № 1-2. – P. 53-61.

213. Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.-E., Benoit J.-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles // Biomaterials. – 2003. – V. 24 (23). – P. 4283-4300.

214. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy // Clin Dermatol. – 2006. – V. 24. – № 1. – P. 16–25.

215. Mallidi S. et al. Beyond the barriers of light penetration: strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy // Theranostics. – 2016. – V. 6. – № 13. – P.2458-2487.

216. Calixto G.M.F., Bernegossi J., de Freitas L.M., Fontana C.R. and Chorilli M. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review // Molecules. – 2016. – V. 21. – № 3. – P. 342.

217. Woodhams J.H., MacRobert A.J., Bown S.G. The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry // Photochem. Photobiol. Sci. – 2007. – V. 6. – № 12. – P. 1246-1256.

218. Rebrin I. and Sohal R.S. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2008. – V. 60. – № 13-14. – P. 1545-1552.

219. Sies H., Berndt C. and Jones D.P. Oxidative stress // Annu. Rev. Biochem. – 2017. – V. 86. – P. 715-748.

220. Franco R. and Cidlowski J.A. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant // Cell Death Differ. – 2009. – V. 16. – № 10. – P. 1303-1314.

221. Han D., Hanawa N., Saberi B. and Kaplowitz N. Mechanism of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury // Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. – 2006. – V. 291. – № 1. – P. G1-G7.

222. Matt U., Sharif O., Martins R. and Knapp S. Accumulating evidence for a role of oxidized phospholipids in infectious diseases // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2015. – V. 72. – № 6. – P. 1059-1071.
223. 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.
224. Шляхтин. С. В., Трухачева, Т. В., Исаков, Г. А., Истомин, Ю. П. Применение метода прижизненного детектирования флуоресценции биологических тканей *in vivo* для исследования фармакокинетики фотосенсибилизаторов хлоринового ряда // *Биомедицинская химия.* – 2009. – Т. 55. – № 6. – С. 766-778.
225. Wickstrom M., Larsson R., Nygren P. and Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy // *Cancer Sci.* – 2011. – V. 102. – № 3. – P. 501-508.
226. Schreiber C.L. and Smith B.D. Molecular Imaging of Aminopeptidase N in Cancer and Angiogenesis // *Contrast. Media. Mol. Imaging.* – 2018. – V. 2018. – P. 5315172.
227. Yang Y. et al. PEGylated liposomes with NGR ligand and heat-activable cellpenetrating peptide-doxorubicin conjugate for tumor-specific therapy // *Biomaterials.* – 2014. – V. 35. – № 14. – P. 4368-4381.
228. Martínez-Jothar L. et al. Insights into maleimide-thiol conjugation chemistry: Conditions for efficient surface functionalization of nanoparticles for receptor targeting // *Journal of Controlled Release.* – 2018. – V. 282. – P. 101-109.
229. Fontaine S.D., Reid R., Robinson L., Ashley G.W. and Santi Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates // *Bioconjug. Chem.* – 2015. – V. 26. – № 1. – P. 145-152.
230. Pasqualini R. et al. Aminopeptidase is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – №. 3. – P. 722-727.
231. Dixon J. et al. Expression of aminopeptidase-N (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin // *J. Clin. Pathol.* – 1994. – V. 47. – № 1. – P. 43-47.
232. Hou L. et al. Antitumor activity of antimicrobial peptides containing CisoDGRC in CD13 negative breast cancer cells // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 1. – P. e53491.
233. Stelzer G.T. et al. US-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures // *Cytometry.* – 1997. – V. 30. – № 5. – P. 214-230.
234. Selecic M. et al. Nanostructured Amphiphilic Star-Hyperbranched Block Copolymers for Drug Delivery // *Langmuir.* – 2015. – V. 31. – № 15. – P.4542-4551.

235. Zako T. et al. Cyclic RGD peptide-labeled upconversion nanophosphors for tumor cell-targeted imaging // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V. 381. – № 1. – P. 54-58.
236. Nista A., Leonetti C., Bernardini G., Mattioni M., Santoni A. Functional role of alpha4beta1 and alpha5beta1 integrin fibronectin receptors expressed on adriamycin-resistant MCF-7 human mammary carcinoma cells // *Int. J. Cancer.* – 1997. – V. 72. – № 1. – P. 133-141.
237. Mumcuoglu D., Sardan M., Tekinay T., Guler M.O., Tekinay A.B. Oligonucleotide delivery with cell surface binding and cell penetrating Peptide amphiphile nanospheres // *Mol. Pharm.* – 2015. – V. 12. – № 5. – P.1584-1591.
238. Ramakrishna S. et al. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA // *Genome Res.* – 2014. – V. 24. – № 6. – P.1020-1027.
239. Chen B., Pogue B.W. and Hasan T. Liposomal delivery of photosensitising agents // *Expert. Opin. Drug. Deliv.* – 2005. – V. 2. – № 3. – P. 477-487.

ЯМР–спектр пептида (NH₂-)Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys(-COOH)

SL104180:

¹H NMR (700 MHz, D₂O) δ:

4.78 (dd, *J* = 7.5, 5.5 Hz, 1H), 4.60 (dd, *J* = 6.6, 4.6 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J* = 8.8, 5.6 Hz, 1H) – α-CH;

4.02 – 3.91 (m, 4H) – glycine α-CH₂;

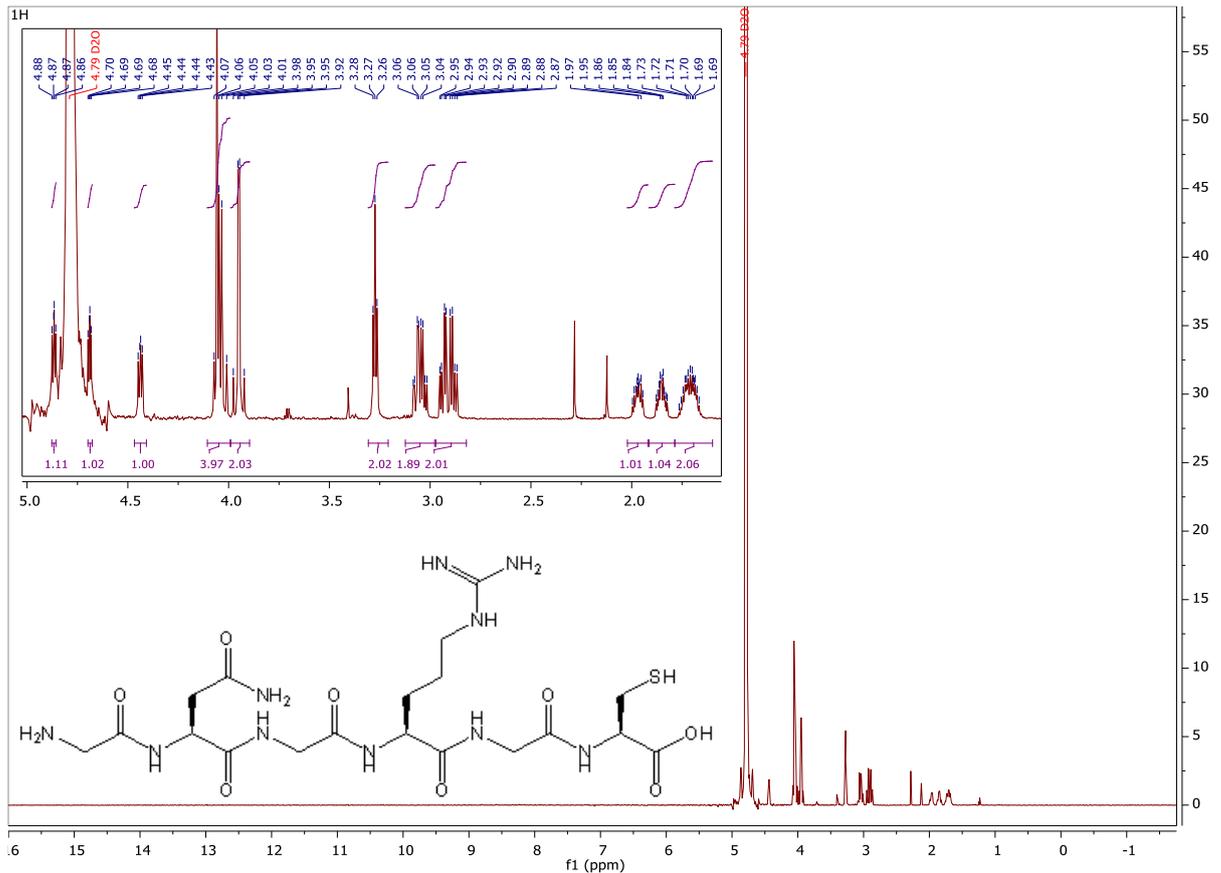
3.90 – 3.81 (m, 2H) – N-terminal glycine α-CH₂;

3.19 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) – CH₂CH₂CH₂NH (Arg);

2.96 (qd, *J* = 14.2, 5.6 Hz, 2H), 2.89 – 2.73 (m, 2H) – α-CHCH₂;

1.88 (ddd, *J* = 13.9, 10.9, 5.8 Hz, 1H), 1.76 (dtd, *J* = 13.7, 10.0, 4.9 Hz, 1H) – CH₂CH₂CH₂NH (Arg);

1.63 (dddd, *J* = 24.0, 17.0, 13.7, 6.9 Hz, 2H) – CH₂CH₂CH₂NH (Arg).



Сертификат анализа пептида (NH₂)-Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys(-COOH)

СИНТОН-ЛАБ
Тонкий органический синтез и химические исследования

ООО «Синтон-Лаб», 190020, Россия,
Санкт-Петербург, Бумажная ул., д. 17, офис 400
Тел: +7 (812) 495-9051; Факс: +7 (812) 495-9052
E-mail: sl@sinton-lab.com; www.sinton-lab.com
DUNS number: 682261960

ТОЛЬКО ДЛЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ЦЕЛЕЙ

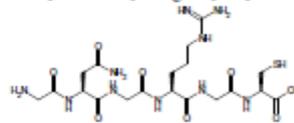
СЕРТИФИКАТ АНАЛИЗА

Название продукта (IUPAC):

(2R,8S,14S)-17-амино-14-(2-амино-2-оксоэтил)-8-(3-гуанидинопропил)-2-(меркаптометил)-4,7,10,13,16-пентаоксо-3,6,9,12,15-пентаазагептадекан-1-овая кислота
H-Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys-OH; H-GNGRGC-OH

Другие названия продукта:

Структурная формула:



Брутто-формула:

C₁₉H₃₄N₁₀O₈S

Молекулярная масса:

562.61

Солевая / Сольватационная часть:

CF₃COOH

Полная молекулярная масса:

676.62

Каталожный номер:

SL104180

CAS номер:

NA

Партия:

Партия №1

Условия хранения:

хранить при +4°C в инертной атмосфере (окисляется кислородом)

Страна-производитель:

РОССИЯ

Параметр	Метод (дата анализа)	Спецификация	Результат
Химическая структура	MALDI TOF (09 октября 2017)	–	подтверждено
Внешний вид / цвет	визуально (06 октября 2017)	–	порошок / белый
T плавления, °C	–	–	–
Мин. чистота, %масс	¹ H ЯМР (–)	–	–
Мин. чистота, %пл	ВЭЖХ (06 октября 2017)	95	95
Известные примеси, %масс	MALDI TOF (09 октября 2017)	–	GNGRGC disulfide, 3 %

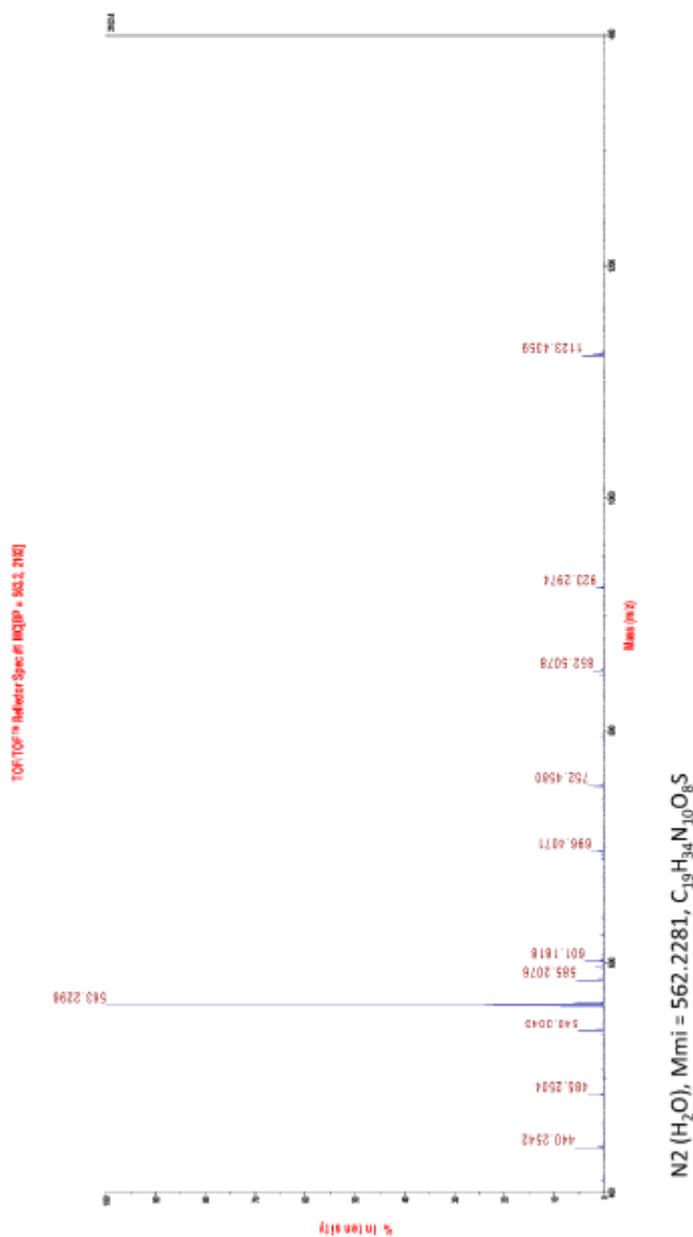
к.х.н. А. В. Трухин,
Заведующий лабораторией контроля качества,
ООО «Синтон-Лаб»

13 октября 2017



СИНТОН-ЛАБ
Точный органический синтез и химические исследования

ООО «Синтон-Лаб», 190020, Россия,
Санкт-Петербург, Бумажная ул., д. 17, офис 400
Тел: +7 (812) 495-9051; Факс: +7 (812) 495-9052
E-mail: sl@synthon-lab.com; www.synthon-lab.com
DUNS number: 682261960





СИНТОН-ЛАБ
Точный органический синтез и химические исследования

ООО «Синтон-Лаб», 190020, Россия,
Санкт-Петербург, Бумажная ул., д. 17, офис 400
Тел: +7 (812) 495-9051; Факс: +7 (812) 495-9052
E-mail: sk@sinton-lab.com; www.sinton-lab.com
DUNS number: 682261960

06.10.2017 17:43:12 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

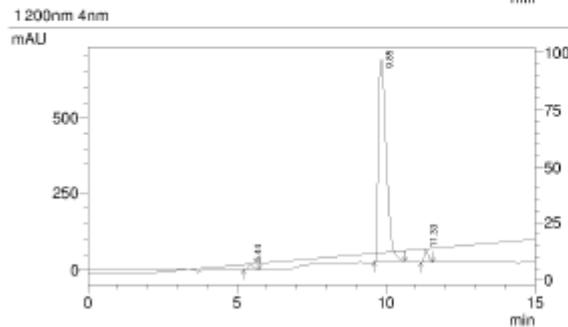
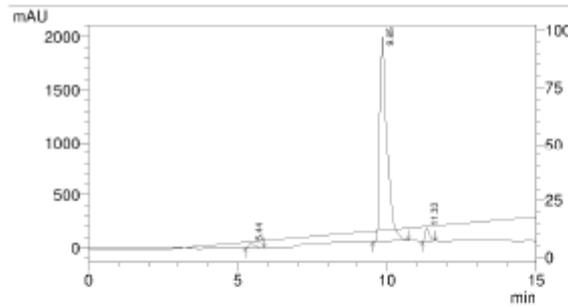
Sample Name: iio 0,056g

C:\LabSolutions\Data\Sinton-Lab\Hes\iio 0,056g.kd
Acquired by : Adria
Injection Volume : 5 uL
Data File Name : iio 0,056g.kd
Method File Name : 3-20-3B_25min_1.0ml.Lsm
Data Acquired : 06.10.2017 13:19:03
Data Processed : 06.10.2017 16:48:38
Sample Comments : dissolved in water

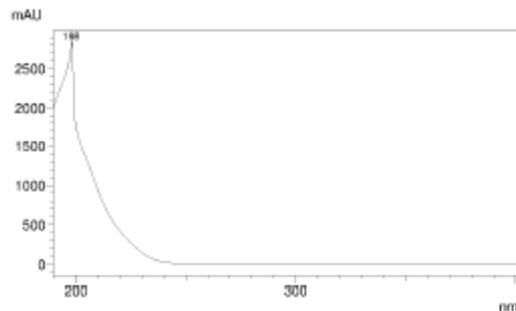
Column: YMC-Triart C18 5u 4.6 x 250 mm
Manufacturer: YMC
Column description:
Mobile Phase A:
Mobile Phase B:
Mobile Phase C:
Mobile Phase D:
Pump Total Flow: 1.0000 mL/min
Oven Temperature: 25 C

<dc Program>
Время Блок Каналы Экспозиция Коэф
0.01 Насосы В.Сонс 3
0.01 Насосы Т.Флоу 1
2.00 Насосы В.Сонс 3
17.00 Насосы В.Сонс 20
18.00 Насосы В.Сонс 3
25.00 Насосы В.Сонс 3
25.00 Контроллер Сигн

COMMENTS

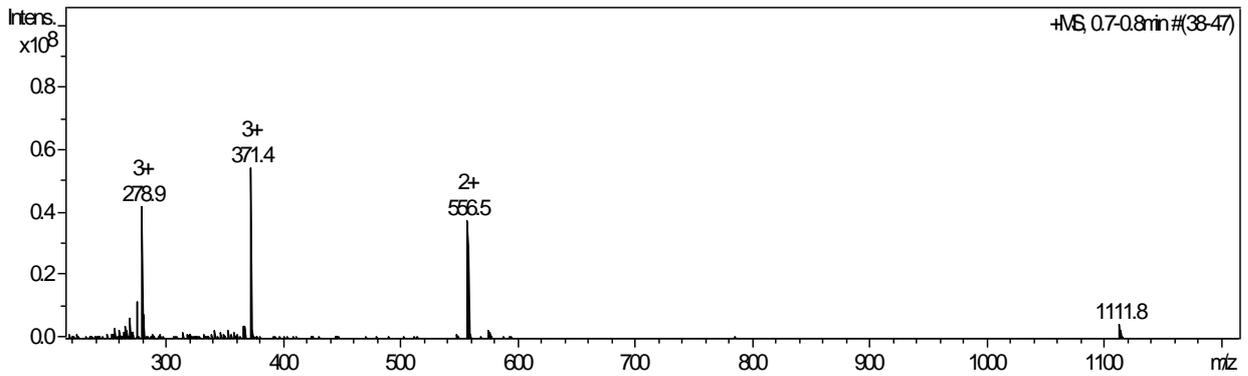
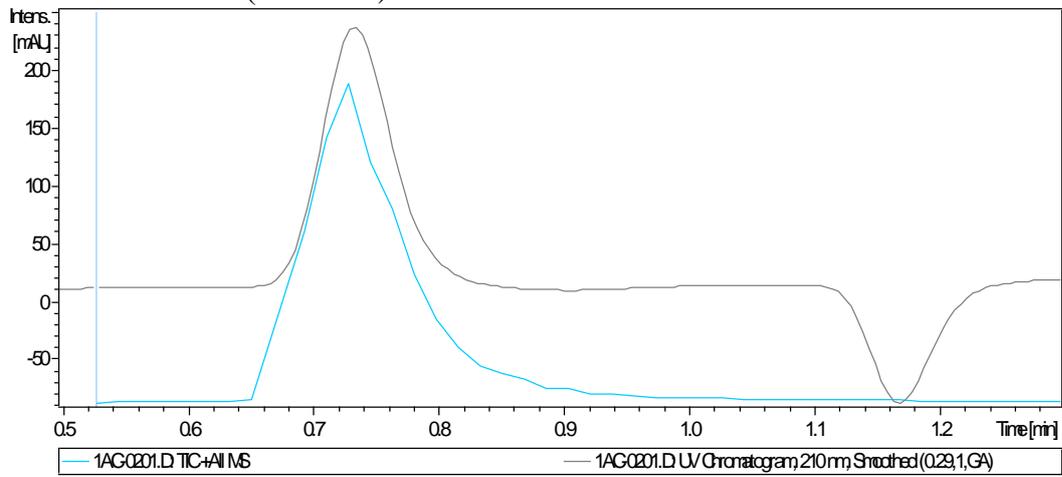


UV spectrum Peak# : 2
Retention time : 9.849



Примечание: неинтегрированные пики соответствуют примесям в элементе и/или обусловлены растворителем, использованным для приготовления аналитической пробы.

Хроматограмма и масс-спектр гептааргинаина (R7), полученные методом LC-MS/MS

R7 после чистки* (Mr=1110)

*чистота по данным LC-MS/MS не ниже 95%