

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

**Государственный научный центр Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)**

На правах рукописи

Фролова Анастасия Юрьевна

**Мультифункциональные гибридные структуры
для тераностики раковых заболеваний**

Специальность – 1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Мартынов Владимир Иванович

Москва 2024

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	10
2.1. Гипоксия опухоли	10
2.2. Энергообеспечение клеток в нормальных условиях и при гипоксии	14
2.3. Кислотность у поверхности раковых клеток.....	16
2.4. Лечение, направленное на опухолевый ацидоз.....	17
2.4.1. Вмешательство в системы регулирования рН.	17
2.4.2. Воздействие на внеклеточную кислотность опухоли.	19
2.4.3. рН-чувствительные системы доставки лекарств для нацеливания на опухоль.....	19
2.5. рНЛIP–технология.....	20
2.5.1. Пептиды семейства рНЛIP и их механизм действия.....	20
2.5.2. Варианты рНЛIP	22
2.5.3. рНЛIP как инструмент для диагностики и визуализации микроокружения опухоли	23
2.5.4. рНЛIP как переносчик низкомолекулярных токсинов и лекарств в опухолевые клетки.	25
2.5.5. Доставка генетического материала (пептидно-нуклеиновых кислот) при рНЛIP	27
2.5.6. Адресная доставка наноматериалов при помощи рНЛIP.....	29
2.5.7. Доставка к опухоли пептидных и белковых нагрузок при помощи рНЛIP	37
2.5.8. Терапевтические агенты на основе слияния белков и рНЛIP.....	39
2.5.9. Ограничения рНЛIP-технологии	41
2.5.10. Неопухолевые применения технологии рНЛIP.....	42
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
3.1. Реактивы и материалы.....	43
3.2. Методы.....	44
3.2.1. Приготовление компетентных клеток	44
3.2.2. Трансформация плазмидной ДНК.....	45
3.2.3. Выделение плазмидной ДНК.....	45
3.2.4. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле	45
3.2.5. Амплификация ДНК методом ПЦР	45
3.2.6. Очистка амплифицированных фрагментов ДНК из реакционной смеси.....	46
3.2.7. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции	46
3.2.8. Лигирование молекул ДНК.....	46

3.2.9. Нарботка биомассы для выделения белков	46
3.2.10. Выделение белков	46
2.3.11. Денатурирующий электрофорез в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).....	47
3.2.12. Гель-фильтрация белков	47
3.2.13. УФ-видимая спектрофотометрия	47
3.2.14. Культивирование клеточных линий.....	47
3.2.15. Конфокальная микроскопия	48
3.2.16. Проточная цитофлуориметрия.....	48
3.2.17. Анализ жизнеспособности клеток.....	49
3.2.18. Ингибирование эндоцитоза.....	49
3.2.19. Оценка фототоксичности	50
3.2.20. Определение фототоксичности при помощи окрашивания клеток трипановым синим.....	51
3.2.21. Генерация АФК в кювете	51
3.2.22. Генерация АФК в живых клетках	52
3.2.23. Гель-фильтрационный анализ белков для определения олигомерного состояния ..	52
3.2.24. Анализ распределения гибридной конструкции на модели <i>in vivo</i>	52
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
4.1. Гибридные конструкции флуоресцентного белка EGFP с пептидами pHLP	55
4.1.1. Дизайн и получение генетически кодируемых конструкций EGFP/pHLP	55
4.1.2. Подбор оптимальных условий тестирования конструкций EGFP/pHLP	57
4.1.3. pH-зависимое связывание гибридных конструкций с клеточной мембраной по данным флуоресцентной микроскопии	59
4.1.4. pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLP с клетками HeLa по результатам анализа методом проточной цитометрии	61
4.1.5. Изучение интернализации EGFP-pHLPwt клетками HeLa.....	63
4.2. Гибридная конструкция на основе белка miniSOG и пептида pHLP	66
4.2.1. Разработка белково-пептидной фотосенсибилизирующей системы	66
4.2.2 pH-зависимое связывание miniSOG-pHLPwt с клетками HeLa	67
4.2.3. Изучение фототоксичности miniSOG-pHLPwt на клеточной модели HeLa.....	70
4.3. Влияние линкерных последовательностей на свойства конструкций EGFP/pHLP	73
4.3.1. Эффективность созревания хромофора флуоресцентного белка в конструкциях EGFP/pHLP.....	74
4.3.2. pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLP с клетками HeLa согласно данным проточной цитофлуориметрии.....	75

4.3.3. pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa по данным флуоресцентной микроскопии.....	77
4.4. Влияние линкерных последовательностей на свойства конструкций mCherry/pHLIP	79
4.4.1. Дизайн конструкций на основе mCherry и пептидов pHLIP	79
4.4.2. Эффективность созревания хромофора флуоресцентного белка гибридных конструкций.....	80
4.4.3. Изучение эффективности pH-зависимого связывания гибридных конструкций.	81
4.4.4. Изучение олигомерного состояния гибридных конструкций.	83
4.4.5. Изучение распределения конструкции mCherry-15-ATRAM в организме модельного животного.	83
4.5. Влияние природы нагрузки на pH-специфичность пептида ATRAM.	85
4.6. Новый подход к получению оптимальных конструкций белков с пептидами pHLIP	88
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
6. ВЫВОДЫ.....	95
7. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	96
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	98
9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
10. ПРИЛОЖЕНИЕ	120

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Онкологическая ситуация в мире остается крайне неблагоприятной. В частности, плохая экология и увеличение стрессового воздействия приводят к возрастающему количеству случаев возникновения рака. Рак является второй по распространенности причиной смерти. Уровень заболеваемости продолжает расти, что создает огромные физические, эмоциональные и финансовые проблемы для отдельных людей, целых семей, общин и систем здравоохранения. В настоящее время востребованы высокоточные и высокоэффективные методы борьбы с раком. Проблема воздействия на раковые клетки с минимальными повреждениями здоровых является основной в терапии рака. Ранее была разработана таргетная терапия на основе антител к ряду онкомаркеров. Ввиду частой гиперэкспрессии таких онкомаркеров на поверхности раковых клеток и высокой аффинности таргетного агента для данного подхода возникает терапевтическое окно, что приводит к существенному увеличению терапевтического индекса по сравнению с традиционными методами лечения рака. Несмотря на эффективность этих препаратов, адаптивные механизмы опухоли могут привести к ее множественной лекарственной устойчивости, что часто приводит к рецидиву заболевания и низкому качеству жизни пациентов. Также для многих типов опухолей может не наблюдаться гиперэкспрессии онкомаркеров, что является существенным ограничением данного вида терапии.

Известно, что в подгруппе человеческих опухолей существует метаболическая гетерогенность: некоторые клетки преимущественно используют гликолиз, в то время как механизмом энергообеспечения других является окислительное фосфорилирование. Высокопролиферативные раковые клетки, опухолевая строма и активированные иммунные клетки в пределах опухолевого микроокружения имеют тенденцию к использованию гликолиза в ответ на высокие энергетические потребности в условиях гипоксии (эффект Пастера) или в достаточном присутствии кислорода (эффект Варбурга), значительно снижая рН во внеклеточном пространстве. Независимо от молекулярного профиля раковых клеток, способность к закислению межклеточного пространства является их общим свойством. Ввиду этого в последние годы активно развивающимся направлением в терапии рака является нацеливание на кислотное микроокружение опухоли.

Нацеливание на области тканей с пониженным рН можно осуществить при помощи пептидов семейства рНLIP (pH low insertion peptide), которые при физиологических значениях рН растворимы в воде и имеют неупорядоченную структуру, а при подкислении способны к приобретению альфа-спиральной структуры, сопровождающейся встраиванием в клеточную мембрану. В течение последнего десятилетия был разработан ряд пептидов семейства рНLIP,

обладающих улучшенными pH-зависимыми свойствами. pHLLIP-технология уже применялась при доставке к злокачественным новообразованиям различных низкомолекулярных агентов, пептидно-нуклеиновых кислот, липосом и наночастиц, инкапсулированных терапевтическими препаратами. В настоящее время агенты на основе pHLLIP и индоцианина зеленого (ICG, NCT05130801), а также pHLLIP и экзатекана (CBX-12, NCT0490287) проходят клинические испытания на людях.

В 2015 г появилось первое сообщение о получении противоопухолевого агента, представленного конструкцией слияния белкового компонента и пептида pHLLIP. Непосредственно белки в качестве терапевтических препаратов весьма успешно используются в практике и, в настоящее время, их потенциал получил беспрецедентное признание. Получение конструкций на основе пептидов pHLLIP и белков является перспективным направлением, однако на настоящий момент в литературе представлено лишь незначительное количество работ по данной тематике.

Цель исследования и задачи

Целью настоящей работы стало изучение возможностей применения pHLLIP-технологии в виде белков слияния и оценка ее потенциала по доставке высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам для получения новых агентов для тераностики рака. Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. При помощи методов генной инженерии получить гибридные конструкции на основе вариантов пептидов pHLLIP и различных флуоресцентных белков (ФБ), в том числе, обладающих фототоксичными свойствами.
2. Разработать методики тестирования гибридных конструкций на клеточных линиях при пониженных значениях pH.
3. Изучить pH-чувствительные свойства пептидно-белковых конструкций на моделях раковых клеток, определить степень токсичности.
4. На моделях *in vivo* изучить распределение гибридной конструкции ФБ-pHLLIP, демонстрирующей наиболее эффективное связывание *in vitro* при пониженных значениях pH.
5. Изучить влияние природы нескольких синтетических флуоресцентных меток на pH-селективность их конъюгатов с пептидом pHLLIP или с гибридной конструкцией ФБ-pHLLIP.

Научная новизна

Получение конструкций на основе пептидов pHLLIP и белков является перспективным направлением в онкотераностике. Во-первых, белковые молекулы могут выполнять огромное количество функций, действуя как токсины, катализаторы, сигнальные молекулы, молекулярные

и ионные переносчики, каркасы для поддержания целостности клеток и тканей, рецепторы и прочее. Во-вторых, ввиду возможности генетического кодирования последовательностей пептидов рНLIP получение таких белково-пептидных конструкций возможно без задействования этапов химического синтеза, а при помощи сочетания стандартных протоколов генной инженерии и бактериальной наработки рекомбинантных белков. Однако, несмотря на очевидную привлекательность данного направления, на момент начала настоящей работы было известно об успешном получении всего лишь двух конструкций такого рода. Параллельно с ходом текущей работы и выходом публикаций, посвященных ее результатам, в литературе появились новые публикации научных конкурентов по данной тематике, что свидетельствует о ее актуальности и своевременности. Настоящая работа отличается от других работ в данной инновационной области 1) комплексностью: были получены, изучены и проанализированы десятки конструкций на основе белков и пептидов семейства рНLIP; и 2) систематичностью: впервые были выявлены закономерности, влияющие на эффективность рН-зависимого связывания гибридных конструкций с мембранами клеток, и с учетом этого предложены новые подходы для получения высокоактивных мультидоменных структур в условиях пониженных рН.

Теоретическая и практическая значимость

В результате выполнения данной работы было установлено, что получение multifункциональных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНLIP с сохранением их исходных функций является нетривиальной задачей. В результате получения конструкций на основе флуоресцентных белков и нескольких пептидов рНLIP в разных комбинациях был обнаружен ряд моментов, негативно сказывающихся либо на белковый компонент в составе гибридных конструкций (нарушение фолдирования ФБ), либо на рН-чувствительный (низкая эффективность рН-зависимого связывания пептида рНLIP). Установлено, что на эффективность рН-зависимого связывания таких конструкций может влиять тип линкера, используемого при соединении молекулы белка с пептидом рНLIP. Продемонстрировано, что снижение эффективности рН-зависимого связывания у исследуемых конструкций обусловлено межмолекулярными взаимодействиями пептида рНLIP с другими функциональными компонентами этих конструкций. На основе вышеперечисленных результатов были предложены стратегии для получения гибридных конструкций на основе белков и пептидов семейства рНLIP, что, вероятно, поможет в дальнейшем избежать проблем, связанных с получением целевых конструкций с низкой рН-чувствительностью. Также было установлено, что некоторые варианты пептида рНLIP не эффективны при доставке белковой высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам пониженных рН. Продемонстрировано влияние на рН-зависимые свойства гибридной конструкции на основе ФБ и рНLIP дополнительной нагрузки в виде

гидрофобной низкомолекулярной метки, химически конъюгированной вблизи последовательности пептида рНЛIP. Было показано, что гибридные рН-чувствительные конструкции способны к быстрому внутриклеточному проникновению за счет механизмов эндоцитоза. Данный факт стоит принимать во внимание для разработки правильной стратегии терапии препаратами вида белок-рНЛIP. Все вышеперечисленные факты, о которых сообщается впервые, могут помочь в определении оптимального дизайна конструкций при сочетании белков с пептидами семейства рНЛIP с целью получения эффективных противоопухолевых агентов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Получение мультифункциональных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP с сохранением их первоначальных свойств является нетривиальной задачей, поскольку 1) включение последовательности пептида семейства рНЛIP в состав гибридной белковой конструкции часто влияет на фолдирование белкового компонента; 2) некоторые варианты пептида рНЛIP не эффективны при доставке белковой высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам при понижении рН; 3) на эффективность рН-зависимого связывания гибридных конструкций большое влияние оказывает тип линкера, используемого между молекулой белка и пептидом рНЛIP.
- Предложены подходы для получения конструкций на основе белков и пептидов семейства рНЛIP, способных к эффективному связыванию при понижении рН.
- Конъюгация гибридной конструкции на основе флуоресцентного белка и рНЛIP с гидрофобной низкомолекулярной меткой влияет на рН-зависимые свойства этой конструкции.
- Продемонстрирован потенциал применения пептидов рНЛIP в сочетании с белковыми молекулами на примерах флуоресцентных белков, обладающих, в том числе, и фототоксичными свойствами, на моделях *in vivo* и *in vitro*.

Личный вклад автора

Личный вклад Фроловой А.Ю. заключается в анализе литературных данных по теме диссертации, планировании и выполнении всей экспериментальной части работы, а также обработке и анализе полученных данных. Основные результаты исследований опубликованы в трех статьях, в которых Фролова А.Ю. является первым автором в соответствии с её ведущей ролью при выполнении диссертационной работы.

Апробация результатов исследования

Материалы диссертации были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных школах и конференциях: XXVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2020, устный доклад; XXXIII зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2021, стендовый доклад; XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2021, устный доклад; XXXIV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, стендовый доклад.

Структура и объём работы

Диссертационная работа изложена на 123 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 244 источника, и приложения. Работа содержит 38 рисунков и 5 таблиц.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В данном обзоре систематизированы сведения, направленные на понимание причин и механизмов закисления опухоли ее межклеточного пространства. Основной акцент сделан на известные методы, приводящие к уменьшению опухолевого ацидоза, и подходы для нацеливания на кислотное микроокружение опухоли.

2.1. Гипоксия опухоли

Приблизительно 50 – 60 % опухолей человека содержат области гипоксии, которые являются неоднородными в пространственном и временном отношении [1]. Известно, что опухолевая гипоксия запускает адаптивные процессы на клеточном уровне, что в конечном итоге приводит к повышению агрессивности опухоли, ее резистентности к кислородозависимым методам лечения (например, стандартной лучевой терапии, некоторым формам химиотерапии, иммунной, гормональной и фотодинамической терапиям), что в совокупности приводит к негативным клиническим прогнозам [1].

Внутри опухолевой ткани различают два типа гипоксии [2, 3, 4]. Первым типом является хроническая гипоксия, возникновение которой обусловлено ограниченной диффузией кислорода через ткань при развитии опухоли (рис. 1). Интенсивное деление раковых клеток приводит к разрастанию опухолевой ткани. Данный процесс сопровождается ангиогенезом, т. е. образованием новых кровеносных сосудов, однако из-за быстрой пролиферации опухолевых клеток плотность сосудистой сети крови является недостаточной для поддержания перфузии всей опухоли. Как следствие, некоторые опухолевые клетки расположены далеко от существующих кровеносных сосудов и не получают достаточного количества кислорода (рис. 1, 2).

Впервые этот феномен был описан Р.Г. Томлинсоном и Д.Г. Греем в 1955 году, при их изучении операционных образцов карциномы бронхов. Из этих новообразований были отобраны образцы гистологических срезов, обладающих определенным типом строения [5]. Клетки многослойного плоского эпителия, как нормального, так и опухолевого, обычно находятся в контакте друг с другом. Сосудистая строма, от которой зависит их питание, находится в контакте с эпителием, но капилляры не проникают между отдельными клетками. Опухоли, состоящие из этих клеток, часто растут сплошными стержнями, которые на гистологических срезах, вырезанных в плоскости под прямым углом к их оси, выглядят как круглые участки, окруженные стромой. В своей работе Р.Г. Томлинсон и Д.Г. Грей сообщили, что в опухолях такого рода центры больших участков некротизированы и окружены неповрежденными опухолевыми

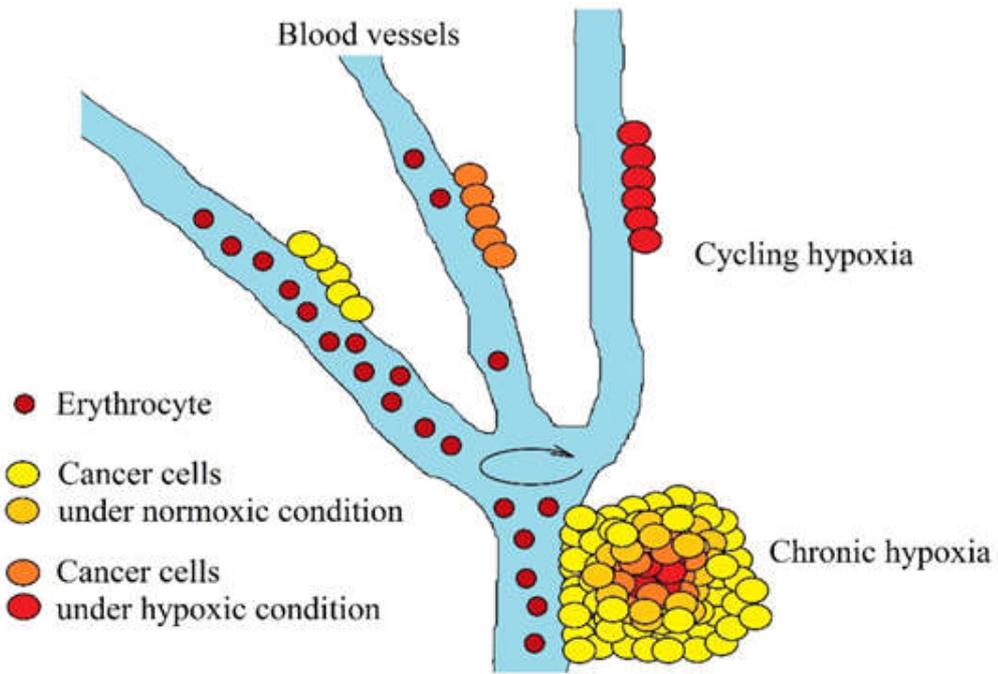


Рисунок 1. Два типа гипоксии в опухоли [3]. Хроническая гипоксия связана с большим расстоянием между клетками и кровеносными сосудами, снабжающими их кислородом. Циклическая гипоксия обусловлена периодической дестабилизацией кровотока по данному сосуду.

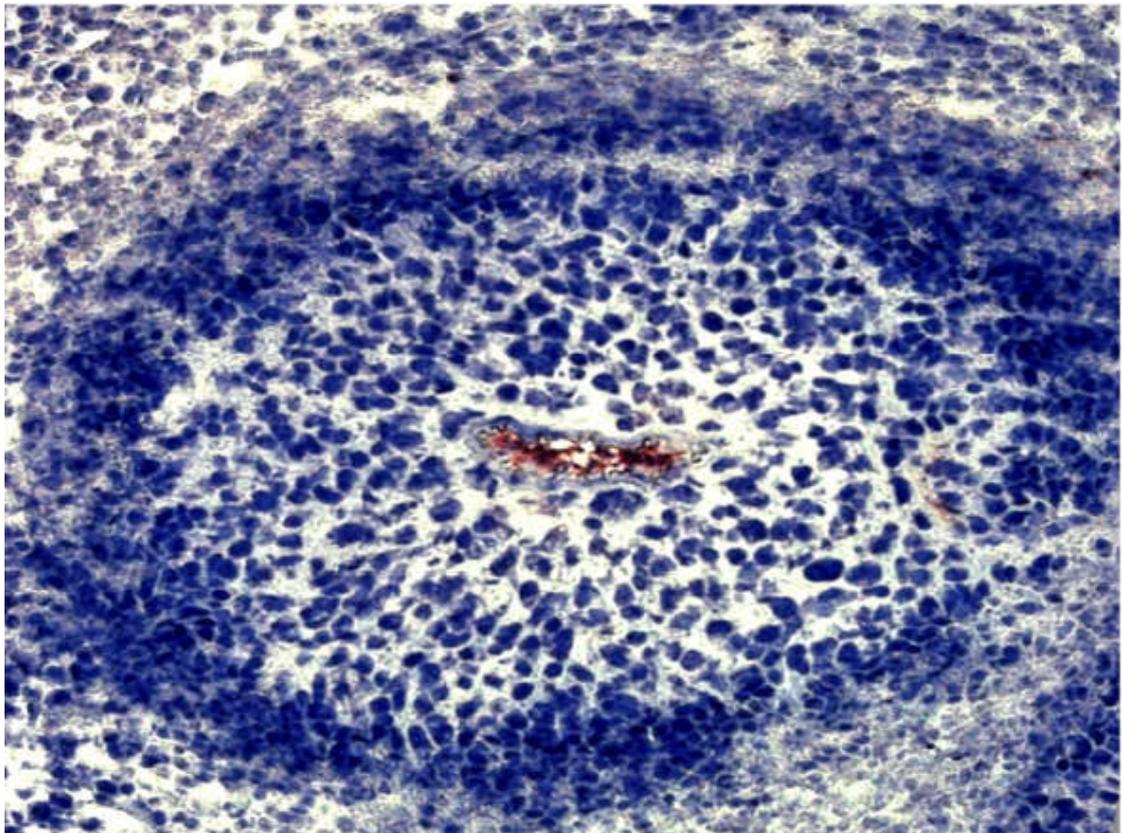


Рисунок 2. Островок раковых клеток, обнаруженный в срезе опухоли мышцы. Контрастно окрашенные синие ядра демонстрируют, что раковые клетки нежизнеспособны на некотором расстоянии (150–200 мкм) от кровеносного сосуда (красно-коричневый) [4].

клетками, которые выглядят как кольца. Авторы предположили, что между периферией и центром каждого опухолевого тяжа должен существовать падающий градиент концентрации кислорода, и при помощи расчетов показали, что степень аноксии клеток, расположенных более центрально, была очень значительной. Величина кислородного градиента зависит от потребления кислорода всей клеточной массой и не является точно определенной. Для своих расчетов ученые использовали дыхательный коэффициент по всей массе опухоли, определенный О. Варбургом при исследовании тринадцати срезов тканей опухолей человека. В результате было установлено, что в центре любой опухоли, радиусом более 150 мкм, наблюдается полная аноксия [5].

Хорошо известно, что при обработке клеток дозой рентгеновского или γ -излучения, как правило, гораздо меньше повреждаются те, которые во время облучения испытывают недостаток кислорода [6]. Р.Г. Томлинсон и Д.Г. Грей были первыми, кто связал радиорезистентность раковых клеток и гипоксию [5].

Для адаптации к гипоксии опухоли развивают собственную сеть кровеносных сосудов за счет регуляции факторов ангиогенеза, главным образом за счет активации факторов транскрипции HIF (факторов, индуцируемых гипоксией), [3, 7, 8]. Однако эта новая сосудистая сеть опухоли остается структурно и функционально аномальной. Незрелость сети кровеносных сосудов опухоли приводит к неэффективной перфузии опухоли и низкой доступности кислорода по сравнению со здоровыми тканями. Выделяют семь основных факторов, обуславливающих недостаток транспорта кислорода сосудистой сетью [7]:

1) Ограниченное кровоснабжение артериол, в результате чего снижается количество насыщенной кислородом крови и возможно образование продольных градиентов – зон с очень низкими концентрациями кислорода в микрососудах опухоли, которые удалены от артериолярного источника [9, 10, 11]. Продольные градиенты также существуют в нормальных тканях, но из-за избыточного кровоснабжения в большинстве случаев они не приводят к гипоксии [7, 12].

2) Неэффективная ориентация кровеносных сосудов опухоли, которая приводит к переизбытку сосудистой сети в одних регионах и недостаточной плотности в других [13].

3) Низкая сосудистая плотность [8].

4) Неравномерное распределение потока эритроцитов (количества эритроцитов, которые проходят через сосуд в единицу времени) в микрососуды. В некоторых микрососудах опухоли наблюдается очень низкое содержание эритроцитов или их полное отсутствие [14].

5) Гипоксические эритроциты сжимаются и становятся более жесткими, по сравнению с эритроцитами, насыщенными кислородом [15]. Это увеличивает вязкость крови, замедляет кровоток и влияет на распределение эритроцитов.

б) Наличие шунтирующих сосудов (сосудов большого диаметра, которые напрямую соединяют артериолы и дренирующие вены, обходя в определенных областях капилляры), которые отводят кровь от опухолевой массы [16].

7) Дисбаланс между доставкой кислорода и его потреблением (недостаток кислорода при его высокой потребности) [7].

Эти взаимосвязанные особенности способствуют плохой доступности кислорода в опухолевой ткани и могут приводить к возникновению временно нестабильной перфузии кровеносных сосудов опухоли. В результате это приводит к другому типу гипоксии, названному циклической [17]. В 1979 году Браун впервые смог экспериментально индуцировать эту форму гипоксии, первоначально обозначенную как «острая» гипоксия, и предположил, что она возникает в результате изменений перфузии опухолевой ткани [8]. Для определения этого типа гипоксии использовались и другие термины, а именно: «прерывистая», «преходящая», «ограниченная перфузией». Однако М.У. Дьюхерст предложил использовать термин «циклическая гипоксия», поскольку они лучше подчеркивают динамику последовательных периодов гипоксии и реоксигенации, которые характерны для многих типов опухолей [18]. Также М.У. Дьюхерст предположил, что колебания парциального давления кислорода в опухолях могут происходить в соответствии с двумя перекрывающимися временными шкалами: в течение нескольких дней в результате ангиогенеза и ремоделирования сосудов и в течение нескольких часов (от 1 до 3 колебаний в час) в результате колебаний потока эритроцитов в нефункциональной сети крови опухоли [19].

Для адаптации к гипоксии и компенсации дефицита кислорода раковые клетки используют различные метаболические пути, в частности происходит активация факторов HIF, которые являются важными регуляторами кислородного гомеостаза [8, 20]. К настоящему времени идентифицированы сотни генов, регулируемых HIF-1, белковые продукты которых играют основную роль в ангиогенезе и сосудистом ремоделировании, пролиферации клеток и их выживании, энергетическом метаболизме, гомеостазе железа, эритропоэзе. В частности, под влиянием HIF-1 повышается экспрессия VEGF, являющегося одним из самых мощных эндотелиальных митогенов и участвующего непосредственно в ангиогенезе [21, 22]. HIF-1 является основным регулятором гликолиза. Он повышает экспрессию многих ферментов гликолиза и транспортеров глюкозы GLUT, особенно GLUT1 и GLUT3, а также играет важную роль в качестве активатора аэробного гликолиза и образованию лактата [23]. Механизмы последних процессов обсуждаются ниже.

2.2. Энергообеспечение клеток в нормальных условиях и при гипоксии

Основная часть энергии, необходимая клеткам для поддержания жизнеспособности, вырабатывается в митохондриях посредством кислородзависимого процесса, называемого окислительным фосфорилированием. В результате данного процесса происходит синтез аденозинтрифосфорой кислоты (АТФ), являющейся универсальным источником энергии для всех биохимических процессов, протекающих в живых системах [24]. При отсутствии необходимого количества АТФ в клетках перестают протекать жизненно важные реакции, что может впоследствии привести к их гибели.

При окислительном фосфорилировании происходит перенос электронов от соединений-доноров к соединениям-акцепторам в ходе ряда окислительно-восстановительных реакций [25]. В эукариотических клетках эти окислительно-восстановительные реакции осуществляются рядом белковых комплексов, составляющих электрон-транспортную цепь (ЭТЦ). Она локализована во внутренней митохондриальной мембране (рис. 3), в непосредственной близости от митохондриального матрикса, в котором локализован цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). НАДН и ФАДН₂, генерируемые ЦТК, являются донорами электронов и передают их на ЭТЦ (рис. 3). Данный процесс включает множество этапов с участием различных белковых комплексов, но заключительный происходит с участием кислорода, являющегося конечным акцептором электронов, который впоследствии восстанавливается до воды. В результате движения электронов по ЭТЦ происходит перемещение протонов из митохондриального матрикса через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство. Это движение создает протондвижущую силу, которая обусловлена разностью электрохимических потенциалов ионов водорода по разные стороны внутренней мембраны в сочетании с градиентом рН (ввиду повышения концентрации протонов). Перемещение протонов по градиентам электрического поля и рН приводит в действие особый белковый комплекс — АТФ-синтазу, которая синтезирует АТФ из АДФ и фосфата [25, 26].

Клетки также могут производить АТФ посредством процесса гликолиза, который происходит в цитозоле и не требует кислорода. В процессе гликолиза одна молекула глюкозы расщепляется на две молекулы пирувата, в результате чего образуется АТФ. В этом процессе расходуется НАД⁺, который может быть регенерирован за счет превращения пирувата в лактат (рис. 3) [25, 26].

Окислительное фосфорилирование более эффективно генерирует АТФ, чем гликолиз: в первом случае окисление одной молекулы глюкозы приводит к образованию 30 молекул АТФ и только 2 молекулы АТФ во втором случае. Поэтому при достаточном количестве кислорода в клетках используется первый механизм синтеза АТФ. Однако в конце 19 века Пастером было

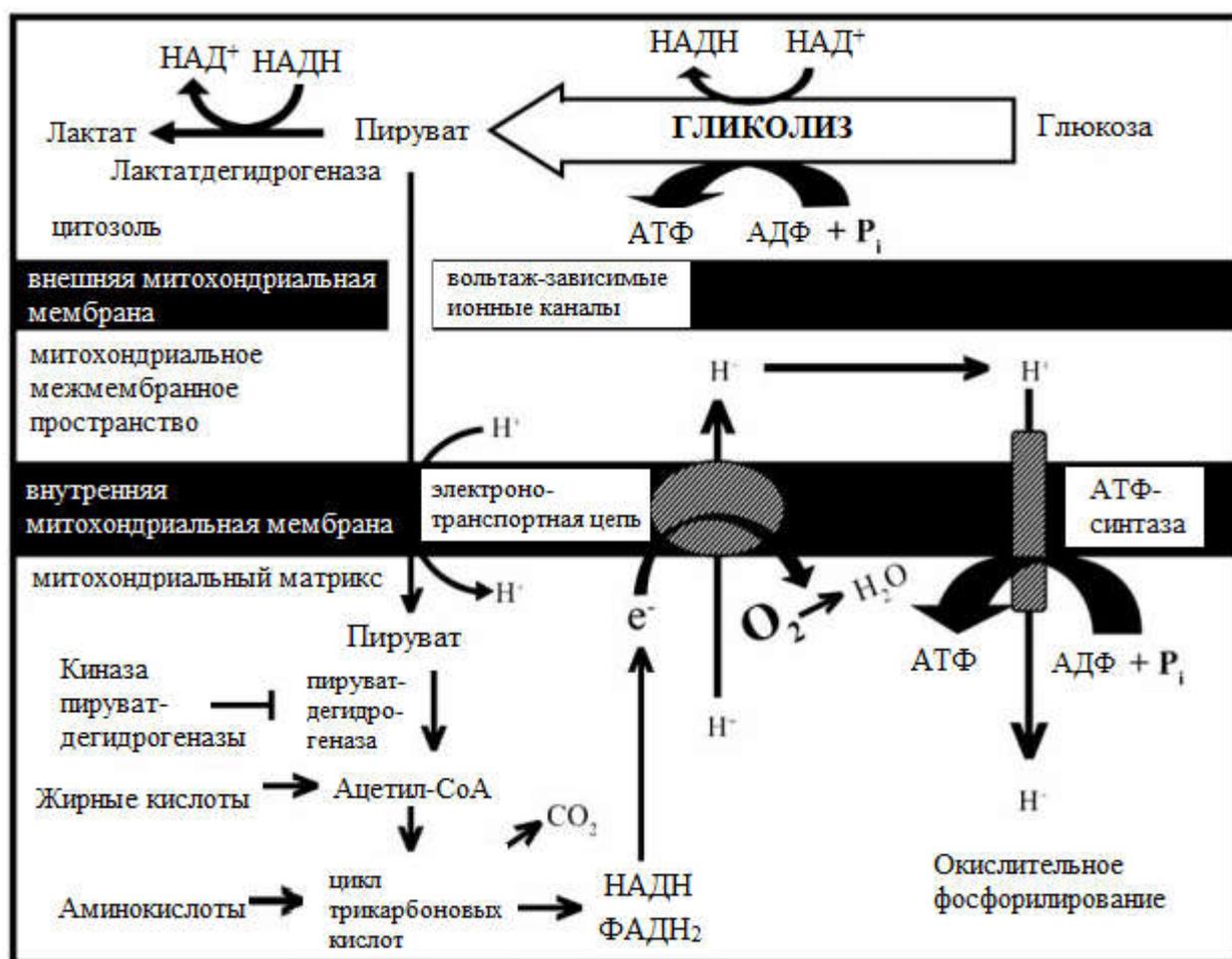


Рисунок 3. Упрощенная схема процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования

замечено, что при снижении уровня кислорода механизм образования АТФ замещается с окислительного фосфорилирования на гликолиз (эффект Пастера) [25, 26, 27].

При гипоксии HIF1 увеличивает экспрессию изофермента фосфоинозитол-зависимой протеинкиназы-1 (PDK1), который ингибирует митохондриальный фермент – пируватдегидрогеназу (PDG) за счет фосфорилирования, что препятствует превращению пирувата в ацетил-КоА и ограничивает его доступность для ЦТК. Это приводит к подавлению потребления кислорода митохондриями, и в результате пируват расходуется на процесс гликолиза [28, 29]. Этот переход от окислительного метаболизма к гликолитическому значительно уменьшает потребность клетки в кислороде, необходимом для синтеза АТФ. Более того, снижение потребления кислорода митохондриями приводит к снижению выработки митохондриями активных форм кислорода (АФК), тем самым защищая клетку от повреждения [30].

В первой половине 20-го века О. Варбург впервые заметил, что раковые клетки имеют повышенную скорость гликолиза, несмотря на наличие достаточных уровней кислорода [31]. Это

явление, называемое аэробным гликолизом или эффектом Варбурга, неоднократно наблюдалось в раковых клетках [32, 33, 34]. Для объяснения факта использования опухолевыми клетками в условиях нормоксии гликолиза, неэффективного метаболического пути, были предложены три возможных варианта [35, 36]. Во-первых, по сравнению с окислительным фосфорилированием скорость синтеза АТФ посредством гликолиза намного выше [37]. Во-вторых, высокая скорость гликолиза приводит к образованию достаточного количества промежуточных гликолитических продуктов для удовлетворения потребностей биосинтеза быстро пролиферирующих клеток [38, 39]. Наконец, НАДФН, полученный в результате усиленного пентозофосфатного пути из-за накопления гликолитических промежуточных продуктов, позволяет раковым клеткам поддерживать необходимые уровни восстановленных форм глутатиона для устойчивости к химиотерапевтическим агентам.

2.3. Кислотность у поверхности раковых клеток

Как упоминалось выше, раковые клетки используют анаэробный путь энергообеспечения чаще, чем нормальные клетки. Как правило, клеточный метаболизм происходит при низкой скорости гликолиза с последующим окислением пирувата в митохондриях, тогда как анаэробный метаболизм связан с высокой скоростью гликолиза и, в конечном итоге, образованием избытка лактата и протонов [40]. Для поддержания гомеостаза клетка должна контролировать свой внутриклеточный рН на физиологическом уровне, около рН 7,2-7,4. Если рН внутри клетки падает, происходит перекачивание избыточной кислотности во внеклеточное пространство.

Известно, что раковые клетки сверхэкспрессируют поверхностные карбоангидразы (CAIX и CA XII), которые катализируют превращение углекислого газа и воды в углекислоту (бикарбонат и протоны), что также способствует закислению внеклеточного пространства [41, 42, 43, 44]. Таким образом, раковые ткани способны к накоплению избыточного количества кислоты и протонов во внеклеточном пространстве, особенно в плохо перфузируемых опухолевых областях, что приводит к снижению рН внеклеточного пространства и подкислению опухоли [44, 45].

Кислотность не только является признаком развития опухоли, но также способствует ее росту [46]. Подкисление здоровой ткани, окружающей опухоль, приводит к ее ремоделированию и локальному внедрению опухоли [46]. В исследованиях, в которых проводилось измерение значения рН у поверхности опухолей, было показано, что области наибольшей инвазии опухоли соответствовали областям наибольшей кислотности. Поэтому нацеливание на наиболее кислые области опухолей является важной задачей, поскольку они являются наиболее агрессивными [47].

В недавних исследованиях при помощи флуорофора с рН-зависимым спектром эмиссии было показано, что значение рН вблизи плазматической мембраны раковых клеток примерно на 0,3–0,7 единиц ниже, чем значение рН межклеточного пространства (объемный внеклеточный рН) [47]. В экспериментах *in vitro*, где рН раствора, в котором росли раковые клетки (объемный рН), поддерживался на уровне рН 7,4, было показано, что рН клеточной поверхности для сильно метастатических клеток составлял ~ 6,7. На 3D-моделях опухолей, опухолевой ткани мышей *ex vivo* и живых животных было показано, что рН поверхности раковых клеток составляет всего лишь рН 6,0.

Таким образом, раковые клетки имеют «корону кислотности» вблизи своих клеточных поверхностей. рН становится менее кислым по мере удаления от поверхности клетки, и, следовательно, объемный внеклеточный рН может быть относительно высоким, особенно в хорошо перфузируемых областях. Однако рН клеточной поверхности всегда остается низким (т. е. кислым). Объемный внеклеточный рН коррелирует с перфузией, в то время как рН клеточной поверхности в меньшей степени зависит от перфузии опухолевой ткани и является прогностическим маркером развития и прогрессирования опухоли, поскольку более агрессивные опухолевые клетки имеют более кислую среду [48].

2.4. Лечение, направленное на опухолевый ацидоз

2.4.1. Вмешательство в системы регулирования рН.

В последнее десятилетие был разработан ряд агентов, нацеленных на регуляторы рН в опухолевых клетках, и к настоящему моменту они находятся на различных стадиях клинической разработки [49].

Ингибиторы протонной помпы (ИПП), например, омепразол и эзомепразол, находятся на самой продвинутой стадии клинических испытаний. Эти препараты, используемые во всем мире в качестве антацидов, хорошо переносятся и безопасны, даже при длительном применении в высоких дозах [50]. ИПП представляют собой пролекарства, которые активируются протон-катализируемым процессом с образованием сульфенамида. Последний в кислой желудочной среде ковалентно взаимодействует с сульфогидрильными группами остатков цистеина во внеклеточном домене H^+/K^+ -АТФазы, тем самым ингибируя ее активность. Таким образом, основными мишенями для ИПП, используемыми в качестве антацидов, являются P-АТФазы (то есть АТФазы, регулирующие транспорт ионов), но не V-АТФазы (то есть АТФазы, регулирующие рН в везикулах, включая лизосомы). Однако вполне вероятно, что цистеины V-АТФаз или других лизосомальных белков (и даже из белков на клеточной поверхности раковых клеток, подверженных ацидозу) могут взаимодействовать с ИПП [51]. В самом деле, способность

ИПП снижать кислотность успешно использовалась для подавления роста опухоли на мышинной модели, а также преодоления кислотной хеморезистентности. В отличие от ИПП, бафиломицин А1 является высокоспецифичным ингибитором V-АТФазы и хорошо известен как средство, используемое для нарушения аутофагии за счет ингибирования закисления лизосом и связанного с этим слияния аутофагосомы и лизосомы, тем самым способствуя гибели раковых клеток, выживание которых зависит от аутофагии [49].

Карбоангидразы (CA), в частности внеклеточные CAIX и CA XII, являются другой привлекательной терапевтической мишенью. В то время как CA XII присутствует в различных клетках нормальных тканей и сверхэкспрессируется на некоторых типах опухолей, CA IX присутствует в основном на клетках опухолей и практически отсутствует на здоровых [52]. Интересно, что при совместной экспрессии данных карбоангидраз на одной и той же опухоли, на краю опухоли экспрессия CA IX выше, чем экспрессия CA XII, для которой характерна высокая экспрессия в опухолевом центре [49]. Основываясь на этих наблюдениях, были разработаны CA IX- и CA XII-специфические химические ингибиторы (например, производные сульфонида и кумарина), для которых доклинические оценки выявили сильные ингибирующие эффекты роста на образование первичных опухолей и метастаз у нескольких моделей мышей [52].

Транспортеры монокарбоксилата (MCT), в частности MCT1 и MCT4, регулируют приток и отток лактата и, таким образом, представляют собой привлекательные мишени для борьбы с лактозависимым метаболическим симбиозом, возникающим в опухолях [49]. AZD3965, ингибитор MCT1 и MCT2, продемонстрировал сильные противоопухолевые эффекты на мышинной модели и в настоящее время проходит клиническую оценку [49]. Известно, что противовоспалительный препарат диклофенак ингибирует отток лактата в различных раковых клетках независимо от ингибирования циклооксигеназы [53].

Натрий-водородный антипортер 1 (NHE1) представляет собой одну из наиболее очевидных целей для влияния на внутриклеточный pH. Хотя уже давно известно, что NHE1 участвует в выкачивании протонов из цитозоля, что особенно необходимо раковым клеткам, клинического прорыва пока не было достигнуто [54]. Генетическое нарушение NHE1 уменьшало рост опухоли у множества мышинных моделей рака. Аналогичные противоопухолевые эффекты *in vitro* и *in vivo* наблюдались при использовании селективных ингибиторов NHE1, таких как амилорид и карипорид [54]. Тем не менее, клиническое применение карипорида было остановлено из-за плохого ответа и побочных эффектов на III фазе клинических исследований для лечения инфаркта миокарда. Токсические эффекты карипорида могли быть связаны с экспрессией NHE1 в здоровых тканях и его фундаментальной ролью в значимых физиологических процессах [54]. В недавних исследованиях сообщалось о важности NHE1 в

миграции и метастазировании опухолевых клеток, что свидетельствует о необходимости его ингибирования для противораковой терапии [54].

Несмотря на убедительные доказательства действия вышеупомянутых лекарств, влияние этих соединений на прогрессирование опухоли обычно неоднозначно. Вероятно, это связано с тем, что согласованное действие отдельных белков, регулирующих рН, может способствовать компенсаторным механизмам, ведущим к адаптивной устойчивости.

2.4.2. Воздействие на внеклеточную кислотность опухоли.

Нейтрализация опухолевой кислоты буферными системами (например, бикарбонатом натрия, имидазолами и лизином) была предложена несколько лет назад в качестве терапевтического подхода для снижения агрессивности опухоли. Пероральное введение таких буферов препятствовало развитию метастаз на экспериментальных животных моделях, не оказывая заметного влияния на рост первичной опухоли. Также было показано, что буферная терапия повышала внеклеточный рН опухоли, в то время как значение рН крови и здоровых тканей существенно не изменялось [55]. Также сообщалось, что в результате буферной терапии при помощи бикарбоната натрия происходило повышение внеклеточного рН опухоли, что приводило к повышению эффективности противоопухолевой иммунотерапии. Эти данные подтвердили предыдущие результаты, полученные при изучении ИПП эзомепразола, который также может бороться с кислотностью раковых клеток, что приводило к общему увеличению эффективности иммунотерапии [55]. Тем не менее, основной вопрос, связанный с потенциалом приема внутрь бикарбоната для нейтрализации кислого рН опухоли, заключается в соотношении пользы и риска, учитывая неизбежное развитие серьезных побочных эффектов, включая гипокалиемию (снижение концентрации калия в сыворотке крови) и удлинение интервала QT (нарушения электрической реполяризации сердца).

2.4.3. рН-чувствительные системы доставки лекарств для нацеливания на опухоль.

Вместо прямого воздействия на опухолевый ацидоз были разработаны рН-чувствительные системы доставки лекарств для нацеливания терапевтических агентов на кислотное микроокружение опухоли [48]. Эти чувствительные к рН наносистемы оставались стабильными при физиологическом рН, но дестабилизировались в кислой среде. Доставка ими лекарственных агентов осуществлялась либо при помощи их химической конъюгации, либо за счет инкапсулирования [56].

Полимерсомы на основе поли-2-(метакрилоилокси)этилфосфорилхолина (PMPC) поли-2-(диизопропиламино)этилметакрилата (PDPA) недавно стали перспективными рН-

чувствительными системами доставки лекарств [49]. Эти структуры образуются путем самосборки амфифильных блок-сополимеров в воде с образованием наноразмерных бислойных везикул. Полимерсомы могут инкапсулировать нерастворимые в воде соединения в гидрофобной мембране и водорастворимые соединения во внутреннем пространстве везикул, что делает их особенно подходящими для комбинированной доставки лекарств [49]. Сообщалось, что pH-чувствительные полимерсомы PMPC-PDPA обеспечивали эффективную внутриклеточную доставку паклитаксела *in vitro* и *in vivo*, специфическое прикрепление к раковым участкам брюшины и повышали терапевтическую активность паклитаксела при очень низких дозах [57]. Также было описано, что эти наноносители обеспечивали эффективную цитоплазматическую доставку доксорубина и его терапевтическое воздействие на клетки меланомы [58], и благодаря такой доставке препараты действовали значительно быстрее, чем при их самостоятельном введении [59].

Для облегчения внутриклеточной доставки лекарств были разработаны синтетические pH-чувствительные пептиды такие как GALA и pHILIP [56, 60]. GALA был первым пептидом, предназначенным для взаимодействия преимущественно с липидными бислоями при кислотном pH [60]. GALA-наноносители были дополнительно оптимизированы при помощи модификации ПЭГ для улучшения доставки, а также с помощью использования новых версий пептида (например, KALA и shGALA) [57]. Такие системы использовались для внутриклеточной доставки *in vivo* малых интерферирующих РНК (миРНК) [61], белковых и ДНК-вакцин [62, 63].

Пептиды семейства pHILIP представляют собой водорастворимые мембранные пептиды, которые подвергаются pH-зависимому фолдингу, способствующему встраиванию пептида в клеточную мембрану [48, 64]. pHILIP может перемещать прикрепленные к нему молекулы (к его С-концу) через клеточные мембраны. Системное введение pHILIP использовалось для доставки различных молекул, включая химиотерапевтические агенты. Эффективным было использование pHILIP для доставки лекарств на основе липосом и наночастиц золота. Они ингибировали пролиферацию раковых клеток и снижали рост опухоли *in vivo* [48, 65, 66]. Более подробное рассмотрение свойств и применения пептидов данного класса представлено ниже.

2.5. pHILIP–технология

2.5.1. Пептиды семейства pHILIP и их механизм действия

Первый pH-чувствительный пептид семейства pHILIP был открыт в 1997 году в ходе фундаментальных исследований, направленных на изучение сворачивания мембранных белков на модели белка бактериородопсина (BR) [64]. Было обнаружено, что 36-аминокислотный полипептид, имеющий последовательность С-спирали BR (пептид BRC), способен к

встраиванию в липидный бислой при понижении pH [56]. Это явление нашло практическое применение, но только 10 лет спустя [67, 68, 69, 70, 71]. В то время пептид BRC был переименован в pHLP (конкретно, pHLPwt от Wild Type), и были реализованы первые биомедицинские применения pHLP-технологии [72, 73, 74, 75, 76].

Позднее последовательность исходного pHLPwt претерпевала изменения, и было разработано и изучено целое семейство пептидов pHLP [77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85]. Механизм действия всех пептидов pHLP хорошо изучен (рис. 4): мембраносвязывающий фолдинг запускается протонированием и увеличением гидрофобности пептида при воздействии кислого окружения [68, 70, 86, 87]. При физиологическом pH пептиды pHLP в основном существуют в равновесии между двумя состояниями: сольватированным, в котором pHLP принимает конформацию небольшой вторичной структуры, и состоянием, в котором pHLP остается неупорядоченным и адсорбируется на поверхности клеточной мембраны [60]. При низком pH происходит протонирование отрицательно заряженных остатков в ключевых местах пептида, что увеличивает его общую гидрофобность и приводит к фолдингу с образованием спирали, которая внедряется в липидный бислой в виде трансмембранной спирали. N-конец встроенного пептида находится во внеклеточном пространстве, тогда как C-конец транслоцируется через мембрану в цитоплазму. Механизм индуцируемого при помощи pH мембранно-связанного фолдинга pHLP был детально изучен с использованием вариантов pHLP с одним а.к.о. триптофана, что позволило проследить погружение различных частей пептидов в липидный бислой мембраны и проникновение через него, и наблюдать за процессом, связанным с переходом пептида из неупорядоченного состояния в упорядоченное, с образованием аспирали [86, 88]. Было показано, что равновесие смещается от неупорядоченных к спиральным структурам по мере того, как пептид глубже проникает в гидрофобную область. Активационный барьер встраивания пептида в мембрану увеличивался (на порядки) по мере увеличения числа протонируемых групп в последовательности пептида и благодаря наличию полярных или заряженных полезных нагрузок на C-концах пептидов, транслоцирующихся через мембрану [86, 89].

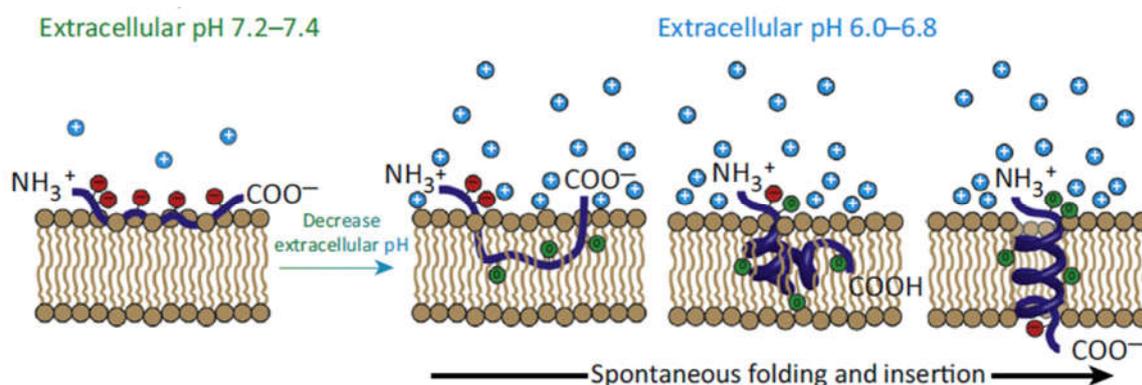


Рисунок 4. Механизм встраивания пептида pHLP в клеточную мембрану [48].

Также было показано, что состав мембранных липидов и присутствие ионов могут влиять на встраивание пептидов pHLP, облегчая или затрудняя данный процесс [87, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95].

2.5.2. Варианты pHLP

Ряд вариантов последовательностей pHLP был разработан с целью улучшения внутриклеточной доставки, а также специфичности в отношении внеклеточной кислотности. Замена одной или двух аминокислот в трансмембранной области pHLP может изменить pH_{50} (рН, при котором 50% pHLP находятся во встроеном состоянии). pHLP-D25E-C (Asp25 заменен на Glu) и pHLP-P20G (Pro20 заменен на Gly) имеют более высокий pH_{50} , тогда как pHLP-R11Q-C (Arg11 заменен на Gln) имеют более низкий pH_{50} [96].

Изменения в последовательности pHLP дикого типа (pHLPwt) привели к появлению новых пептидов pHLP со значительно улучшенными свойствами нацеливания на опухоль, таких как вариант 3 (pHLPvar3) – слегка укороченного варианта, содержащего остатки Asp, и варианта 7 (pHLPvar7), который также укорочен и содержит остатки Glu [80]. Недавно также были разработаны варианты pHLP с использованием неканонических аминокислот: γ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla), содержащей две карбоксильные группы, и α -аминоадипиновой кислоты (Aad), менее полярной версии глутаминовой кислоты [82]. Спейсеры из полиэтиленгликоля (ПЭГ) использовались для соединения 2 или 4 последовательностей pHLPwt вместе, в так называемые «связки pHLP» [91].

Пептид ATRAM (**a**cid-**t**riggered **r**ational **m**embrane) также был разработан на основе свойств pHLP при помощи рационального дизайна [81]. Для основной части последовательности ATRAM аминокислотные остатки (а.к.о.) были выбраны так, чтобы обеспечить общую гидрофобность, аналогичную гидрофобности pHLP, путем балансирования более гидрофобного лейцина с менее гидрофобными аланином и глицином. Последний был предпочтительнее аланина, поскольку его конформационная склонность сильно зависит от окружающей среды: если в растворе глицин дестабилизирует вторичную структуру, то в мембранах он способствует образованию спиралей. Была проведена замена присутствующих в pHLP аспартатов на глутаматы, поскольку последние имеют более высокие значения pK_a и лучше подходят для нацеливания на подкисленные ткани [81]. Также в пептид ATRAM был введен единственный остаток триптофана для проведения оценки свойств пептида методами спектроскопии и флуориметрии.

Во всех вариантах полученных пептидных последовательностей pHLP присутствуют общие особенности: в середине пептида чередуются комбинации гидрофобных остатков и остатков, которые заряжены отрицательно при физиологическом рН, но становятся нейтрально

заряженными при низком рН, и гидрофильных концевых областей на транслоцирующемся в мембрану С-конце (в большинстве последовательностей), содержащем несколько дополнительных протонируемых остатков.

Относительная эффективность внутриклеточной доставки и опухолевая специфичность этих вариантов рНЛIP различаются в зависимости от полярности и размера. Укороченные варианты имеют пониженное сродство к мембране при нейтральном рН из-за потери гидрофобных остатков, что позволяет потенциально повысить специфичность доставки на основе рН [80]. Кроме того, усечение пептида рНЛIP на С-конце, где происходит вставка в мембрану, обеспечивает более быструю вставку в мембрану [80]. рКа мембранного встраивания пептидов рНЛIP выше в вариантах, содержащих остатки Glu, по сравнению с остатками Asp [80]. В исследованиях *in vivo* было продемонстрировано, что рНЛIPvar3 имеет высокое накопление в опухолях и хорошую специфичность в сравнении с накоплением в мышцах, почках и печени [80]. В свою очередь рНЛIPvar7 демонстрирует быстрое нацеливание на опухоль и высокую скорость клиренса, что может сделать его подходящим для целей визуализации [80]. Менее полярные варианты рНЛIP демонстрируют большее воздействие на нормальные ткани и повышенный печеночный клиренс [91]. Следовательно, благодаря наличию различных вариантов рНЛIP появилась возможность выбирать наиболее предпочтительные в зависимости от предполагаемого применения.

2.5.3. рНЛIP как инструмент для диагностики и визуализации микроокружения опухоли

Множество различных флуоресцентных красителей [46, 73, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103] и агентов для визуализации при помощи позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) [76, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110] были конъюгированы с различными пептидами рНЛIP для таргетирования опухоли. Пути введения включали внутрибрюшинные, внутривенные, ретро-орбитальные и подкожные инъекции. Поглощение рНЛIP наблюдалось на более чем на 20 различных моделях опухолей животных, включая модели трансгенных мышей [46, 97, 98, 99, 111]. Различные результаты подтверждают идею о том, что нацеливание *in vivo* основано на кислотности опухоли. Было показано, что нацеливание положительно коррелирует с внеклеточным рН опухоли [46, 76, 105], и оно усиливается за счет подкисления с использованием совместной инъекции глюкозы [97] или сверхэкспрессии CAIX [46]. И наоборот, было показано, что нацеливание на опухоль снижается за счет подщелачивания опухолей у мышей, которых кормили бикарбонатной питьевой водой [112]. Было продемонстрировано распределение пептидов рНЛIP в опухолях и их корреляция с различными маркерами агрессивности и инвазивности опухоли, включая CAIX,

лактатдегидрогеназу (LDH), ядерный белок Ki67 и матриксные металлопротеиназы 7 (MMP7) [98, 112]. Кислые области, на которые нацелен рНЛIP, не ограничивались областями гипоксии. Высокопролиферативные области на границе опухоли-stroma очень хорошо маркировались пептидами рНЛIP [112, 113]. Помимо раковых клеток внутри опухолевого микроокружения рНЛIP оказывал воздействие на опухоль-ассоциированные фибробласты, опухоль-ассоциированные макрофаги, миелоидные супрессорные клетки [103, 113, 114]. Также было продемонстрировано, что в дополнение к первичным опухолям, сателлиты вблизи первичной опухоли и микрометастазы в отдаленных органах хорошо поддавались воздействию пептидов рНЛIP [75, 97, 99, 101, 112, 115].

Новым агентом для визуализации опухоли является конъюгат рНЛIP и индоцианина зеленого (ICG) – флуоресцентного красителя ближнего инфракрасного диапазона, широко используемого для визуализации кровотока [116]. Флуоресценция рНЛIP-ICG усиливается примерно в 20 раз при его связывании с клеточной мембраной по сравнению с эмиссией рНЛIP-ICG в водном растворе [116, 117, 118]. рНЛIP-ICG использовался для визуализации опухолей на различных моделях опухолей мышей [103, 113, 116] и *ex vivo* в образцов мочевого пузыря и верхних мочевых путей человека. Двадцать восемь образцов мочевого пузыря *ex vivo* от пациентов, перенесших роботизированную лапароскопическую радикальную цистэктомию ввиду рака мочевого пузыря, были обработаны рНЛIP, конъюгированным ICG или флуоресцентными красителями ближнего инфракрасного диапазона IR-800. При цистоскопии образцов в белом свете был выявлен 81% злокачественных поражений различных подтипов. Аналогичная оценка в ближнем ИК-диапазоне имела более высокую чувствительность - 98% [119]. Чувствительность визуализации рНЛIP-ICG составила 100% по сравнению с 79% при исследовании образцов верхних мочевых путей человека в белом свете [120]. В настоящее время агент рНЛIP-ICG проходит клинические испытания в хирургии под флуоресцентным контролем на пациентах с раком молочной железы в сочетании с устройством визуализации Stryker SPI-PHY (NCT05130801).

Были изучены конъюгаты радиоактивных меток ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{64}Cu , $^{18}\text{F}]\text{AlF}$ и $^{68/67}\text{Ga}$ с пептидами рНЛIP на различных моделях опухолей [76, 104, 105, 106, 107, 119, 121]. При изучении агента для ПЭТ-визуализации, рНЛIP- ^{18}F не наблюдалось никаких побочных эффектов, и было эффективно реализовано нацеливание на опухоль. Однако даже через 4 ч после инъекции значительная часть сигнала являлась фоновой (сигнал в крови и основных органах). Для улучшения контрастности ПЭТ был получен конъюгат рНЛIP с ^{89}Zr – более долгоживущим радионуклидом с периодом полураспада 3,3 дня [122]. Период полувыведения из крови составил $16,0 \pm 0,4$ ч, а из организма – 415 ± 10 ч. Оптимальное поглощение опухолью наблюдалось через 48 ч. Агент присутствовал во всей опухолевой массе, а области наибольшей инвазии находились

на границе со стромой опухоли. Ожидается, что pHLLIP-Zr станет первым в своем классе агентом ПЭТ для визуализации кислотности опухоли.

2.5.4. pHLLIP как переносчик низкомолекулярных токсинов и лекарств в опухолевые клетки.

Низкомолекулярные полярные агенты плохо поглощаются клетками в отличие от гидрофобных из-за их неспособности перемещаться через липидный бислой, как описано в пяти правилах Липинского [123]. Хотя проницаемость клеточной мембраны для полярных лекарств и токсинов может быть улучшена путем преобразования их в неполярные гидрофобные аналоги, такое большое изменение химической структуры привести к потере активности. С другой стороны, гидрофобные терапевтические вещества могут поглощаться любыми клетками, а значит, токсичны для здоровых клеток [44, 124, 125, 126, 127]. Конъюгация С-конца pHLLIP, транслоцирующегося через мембрану, при помощи дисульфидной связи или другого линкера с небольшими полярными или неполярными веществами является эффективным методом доставки целевых агентов к клеткам в гипоксичной и кислой среде. Несмотря на то, что для конъюгации молекул с pHLLIP требуются незначительные модификации, эти дополнительные этапы синтеза компенсируются эффективной доставкой непосредственно в цитоплазму, повышая терапевтическую эффективность.

Фаллоидин и α -аманитин были первыми функциональными нагрузками, доставляемыми внутриклеточно при помощи пептидов pHLLIP. Они представляют собой циклические токсины, которые могут действовать как ингибиторы клеточной пролиферации и противораковые агенты. Однако ввиду их полярности и непроницаемости для клеточной мембраны, их самостоятельное применение в качестве терапевтических средств было невозможным [125, 126]. Конъюгация этих токсинов с pHLLIPwt обеспечивала их эффективную доставку к различным раковым клеткам в зависимости от pH, что приводило к ингибированию пролиферации клеток. В случае с фаллоидином этот подход устранял этапы сложных модификаций токсина для превращения его в неполярный аналог [60]. Однако, чтобы данные токсины могли действовать как терапевтические агенты, требовалось их отщепление от pHLLIP, поэтому их конъюгация осуществлялась при помощи дисульфидной связи, для разрушения которой, как правило, достаточно восстановительной среды цитозоля. Для доставки аманитина проводили его конъюгацию с С-концом pHLLIPwt при помощи нерасщепляемого и расщепляемого SS-линкера [62]. Была продемонстрирована значительная токсичность данной конструкции на клеточных моделях при пониженном pH, чего не наблюдалось в случае использования конструкции с нерасщепляемым линкером или при конъюгации аманитин на N-конец pHLLIP, не встраивающийся в клеточную мембрану [126]. Несмотря на многообещающие результаты,

полученные на клеточных моделях, системное введение pHLP-аманитина было токсичным для печени. Авторы связали данное явление со способностью гепатоцитов к захвату небольших циклических молекул, таких как исследуемые токсины [128]. Однако недавно было показано, что усиление цитотоксичности pHLP-аманитина в 3–4 раза наблюдается для уротелиальных клеток, утративших хромосому 17p, после 2 ч обработки при pH 6 [119]. Хотя системное применение данного препарата маловероятно, в дальнейшем возможно его использование при раке мочевого пузыря путем местного введения.

При помощи pHLP была осуществлена доставка ингибиторов тубулина к опухолевым клеткам таких, как монометилауристатин E и F (ММАЕ и ММАФ) и майтанзиноид равтанзин (DM4) [96, 129]. pHLP в сочетании с ММАЕ или ММАФ был протестирован на предмет ингибирования пролиферации раковых клеток и лечения солидных опухолей у мышей. pHLP-DM4 и pHLP-ММАЕ, получивших в дальнейшем названия СВХ-13 и СВХ-15, соответственно, находятся на стадии перехода к клиническим испытаниям компанией Cybrexa Therapeutics. Ингибиторы DM4 и ММАЕ связаны с мембрано-встраиваемым концом pHLP через расщепляемые саморазрушающиеся линкеры [65]. Многообещающие данные по результатам тестирования pHLP-ММАЕ (СВХ-15) были представлены на 35-м симпозиуме AACR-NCI-EORTC в 2023 году. В представленном исследовании оценивалась противоопухолевая эффективность СВХ-15 и индуцированная им иммунная память на животных моделях опухоли молочной железы. СВХ-15 эффективно воздействовал на опухоли, что приводило к полному излечению животных. Также было изучено развитие противоопухолевой иммунологической памяти на вылеченных при помощи СВХ-15 животных путем повторного введения *in vivo/ex vivo* живых опухолевых клеток. СВХ-15 вызвал повышенную устойчивость к повторному заражению живой опухолью. После 50 дней с момента введения СВХ-15 наблюдалось удвоение в костном мозге резидентных CD4 Т-клеток [130].

Конъюгат pHLPwt с лекарственным средством экзатеканом – мощным агентом, повреждающим ДНК, который действует как ингибитор топоизомеразы [131] – находится в стадии клинической разработки под названием СВХ-12 (NCT04902872). В экспериментах на ксенографтных онкомоделях при помощи pHLPwt была осуществлена доставка экзатекана в опухоли, вызывая их уничтожение с минимальной токсичностью для костного мозга или желудочно-кишечного тракта, что было свойственно для свободного экзатекана [132].

Другими цитотоксическими препаратами, доставленными с помощью pHLPwt, являлись доксорубин (DOX) и этомоксир. Конъюгат pHLP-DOX, несущий дендримерный линкер между ключевыми компонентами, оказался эффективен как в отношении чувствительных, так и устойчивых к лекарствам клеток, что может позволить решить проблему множественной лекарственной устойчивости [127]. Как и в предыдущих работах, DOX конъюгировали к

дендримерному линкеру посредством дисульфидных связей. При их разрушении сильной восстановительной средой клеточного цитозоля происходило высвобождение DOX, в результате значительно увеличивалась цитотоксичность DOX по сравнению со свободным веществом [133]. рНЛIP-этомоксир, где этомоксир является ингибитором карнитинпальмитоилтрансферазы 1, эффективно замедлял рост различных видов рака [83].

В недавнем исследовании сообщалось об изучении конъюгата рНЛIP с калихемицином - мощным, не зависящим от клеточного цикла антибиотиком, который связывает и расщепляет ДНК [134]. Ввиду высокой токсичности калихемицин используется в виде конъюгата с антителами для лечения жидкостных опухолей [135, 136]. Препарат рНЛIP-калихемицин проявлял цитотоксическую активность как в отношении высокопролиферативных раковых клеток, так и в отношении непролиферативных иммунных клеток, таких как поляризованные макрофаги M2. Препарат эффективно подавлял рост опухоли у мышей без признаков побочной токсичности. Лечение опухолей приводило к истощению CD206+ M2-опухоль-ассоциированных макрофагов в очаге опухоли [134]. рНЛIP-калихемицин может быть использован в качестве эффективного терапевтического средства для лечения солидных опухолей, а также найти применение в комбинированных терапевтических стратегиях.

2.5.5. Доставка генетического материала (пептидно-нуклеиновых кислот) при рНЛIP

Другими классами полярных, непроницаемых для клеток терапевтических средств, являются малые интерферирующие РНК (миРНК) и пептидно-нуклеиновые кислоты (ПНК). ПНК менее полярны по сравнению с миРНК, поскольку они представляют собой искусственные олигонуклеотидные миметики с пептидным остовом, в котором отсутствуют высокополярные фосфаты обычной нуклеиновой кислоты [137, 138]. ПНК образует более стабильные дуплексы с ДНК или РНК, чем любой из гомодуплексов ДНК или РНК, и может использоваться в качестве антисмыслового, регулирующего гены или иммуномодулирующего агента [139]. ПНК, будучи мембранонепроницаемой молекулой, необходимо доставлять внутриклеточно. Ранее была продемонстрирована рН-зависимая внутриклеточная доставка антисмысловой ПНК, меченной флуоресцентным красителем TAMRA, с помощью пептида рНЛIPwt [72]. Позже, в систематическом исследовании применения рНЛIPwt для доставки TAMRA-ПНК различной длины (размера), включая 12-мер (4,1 кДа), 16-мер (5,2 кДа), 20-мер (6,3 кДа) и 25-мер (7,7 кДа). кДа) была показана эффективная рН-зависимая внутриклеточная транслокация ПНК, размером до 7 кДа [140].

Кроме того, с помощью рНЛIP была протестирована доставка модифицированной ПНК с (R)-диэтиленгликолем в положении γ (γ ПНК) [141]. рНЛIP доставлял антисмысловую γ ПНК,

нацеленную на белок KU80 – фактор репарации двухцепочечных разрывов ДНК – в раковые клетки. В результате происходило подавление экспрессии KU80 рН-зависимым образом. Лечение мышей рНЛIP-γПНК приводило к нокдауну экспрессии KU80 в опухолях [141].

При помощи рНЛIP была успешно реализована доставка определенных последовательностей ПНК для нацеливания на микроРНК (миР), которые играют важную регуляторную роль во многих патологических процессах. В частности, было продемонстрировано нацеливание на миР-155 на моделях раковых клеток и опухоли животных [111]. рНЛIP изменял биораспределение ПНК, предотвращая его накопление в печени и способствуя почечному клиренсу, не влияя на функцию почек и гистологию. Применение рНЛIP-ПНК на мышинной модели лимфомы приводило к ингибированию миР-155 и подавлению метастазирования.

ПНК в сочетании с рНЛIP использовали для нацеливания на миР-21 в опухоль-ассоциированных макрофагах [114]. миР-21 регулирует различные эффекторы и связана с патогенезом опухолей на всех стадиях канцерогенеза [142]. В результате тестирования рНЛIP-анти-миР-21-ПНК наблюдалось замедление роста опухоли.

Белком-мишенью для миР-29а является молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 6 (CEACAM6) – гликопротеин, который опосредует межклеточные взаимодействия и участвует в клеточной адгезии, пролиферации, миграции, инвазии и метастазировании [143, 144] и сверхэкспрессируется в самых разных карциномах [145, 146]. рНЛIP-анти-миР-29а-ПНК был эффективен в снижении жизнеспособности клеток и ингибировал рост опухоли на мышинной модели в виде монотерапии или в сочетании с цисплатином, что уменьшало объем опухоли на 40% [147].

Также рНЛIP использовали для целевой внутриклеточной доставки ПНК, конъюгированной с проникающим в клетку пептидом (CPP) RRRQRRKKR. ПНК была разработана для воздействия на бессмысловую РНК длинного некодирующего транскрипта НОХ (НОТАIR), которая часто сверхэкспрессируется в солидных опухолях и коррелирует с химиорезистентностью и плохим прогнозом для пациентов [148, 149]. В результате лечения мышей с ксенотрансплантатами опухоли яичников, устойчивых к платине, конструкцией рНЛIP-CPP-ПНК происходило подавление активности НОТАIR, что приводило к уменьшению опухолей и улучшало выживаемость [150].

При помощи рНЛIP также была обеспечена успешная внутриклеточная доставка миРНК, которые подавляют гены, кодирующие белки CEACAM6 и CDCA1 (белок 1, связанный с циклом деления клеток), сверхэкспрессируемые в самых разных карциномах [151, 152]. Обработка рНЛIP-миРНК-CEACAM6 приводила к ингибированию роста опухоли до 36%, а в сочетании с цисплатином — до 47% [152]. В другом примере было изучено воздействие рНЛIP-миРНК на

белок CDCA1, который высоко экспрессируется в клетках рака предстательной железы человека. Была продемонстрирована зависимость от pH внутриклеточная доставка CDCA1-миРНК с помощью pHLP, а также ингибирование роста опухоли, наблюдаемое после лечения pHLP-миРНК [152].

Несмотря на то, что регуляторные пути и роль малых молекул РНК сложны и взаимозависимы, было показано, что данное направление является многообещающим для возможных будущих терапевтических разработок, и целевая доставка ПНК или миРНК, нацеленных с помощью pHLP на определенные мишени, может быть вполне успешной.

2.5.6. Адресная доставка наноматериалов при помощи pHLP

Нанотехнологии играют важную роль в медицине и, в частности, в визуализации и лечении рака [153, 154]. Системы доставки лекарств на основе наноматериалов популярны в терапии рака из-за легкости пассивного нацеливания на пораженные ткани вследствие эффекта усиленного проникновения и удержания, а также их способности инкапсулировать терапевтические полезные нагрузки и высвободить их в очаге заболевания. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что использование лекарств, инкапсулированных в наноносители, является более безопасной и эффективной альтернативой, чем доставка лекарства в свободной форме [153, 154]. Однако в некоторых видах опухолей эффект усиленного проникновения и удержания мал или отсутствует, что приводит к неэффективной целевой доставке. Также такие наносистемы могут привести к множественной лекарственной устойчивости из-за случайной диффузии полезных нагрузок в опухолевых клетках, а их захват внутри эндосом может привести к необходимости использования более высоких дозировок. Решением этих проблем может быть активное нацеливание, которое, как следует из множества сообщений, может значительно улучшить доставку наносистем в опухоли [155]. При помощи pHLP к опухоли были доставлены различные наноносители, инкапсулированные полезной нагрузкой.

2.5.6.1. Липосомы и ниосомы

В одной из первых работ в данном направлении сообщалось о получении фьюзогенных (т.е. имеющих тенденцию к слиянию) липосом с использованием фосфолипидов DOPE (1, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин) и нефьюзогенных на основе DOPC (1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), покрытых pHLP-ПЭГ. pHLP способствовал клеточному поглощению как фьюзогенных, так и нефьюзогенных липосом при значениях pH, ниже физиологического. Было продемонстрировано, что около 50% клеточного поглощения pHLP-ПЭГ-липосом при

пониженном pH было связано с их непосредственным слиянием с плазматической мембраной и около 50% проникновения в клетки происходило за счет эндоцитоза. Полезные нагрузки, заключенные в липосомы распределялись в различные клеточные компартменты, включая митохондриальную, ядерную и плазматическую мембраны. В частности, инкапсулированный в липосомы полярный груз – йодистый пропилий – доставлялся к ядерной ДНК при низком pH. Было показано, что липосомы, покрытые pHЛIP-ПЭГ, содержащие С6-керамид, вызывали гибель клеток гораздо эффективнее (~90% ингибирования), чем ПЭГ-липосомы, не содержащие pHЛIP (~40% ингибирования) при низком pH [156].

В другой работе сообщалось о получении фьюзогенных липосом на основе липидов DOPC, покрытых pHЛIP. В бислое липосом были включены грамицидиновые каналы. Слияние такой pH-чувствительной наносистемы с клеткой вводило грамицидиновые каналы в бислое клеточной мембраны. Это приводило к нарушению клеточного ионного баланса и градиента pH, а также к деполяризации митохондриальной мембраны, что в конечном итоге вызывало апоптоз раковых клеток HeLa, A549 и M4A4 pH-зависимым образом [157].

Были получены pH-чувствительные липосомы на основе фосфолипида DOPE, холестерина, витамина E, фосфолипида DSPE (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфорилэтаноламин), связанного с ПЭГ или pHЛIP (ПЭГ-DSPE или pHЛIP-DSPE), где вариант с ПЭГ являлся контролем для сравнения липосом, покрытых pHЛIP [158]. Компоненты ПЭГ или pHЛIP были конъюгированы через расщепляемые дисульфидные связи с DM1, мощным майтанзиноидным цитотоксином, ингибирующим сборку микротрубочек. Липосомы, покрытые pHЛIP или ПЭГ были изучены на клеточных моделях и на животных. При использовании липосом с pHЛIP, содержащих несколько процентов флуоресцентно меченых липидов, флуоресцентный сигнал обнаруживался в эндоплазматическом ретикулуме или митохондриях, в отличие от липосом того же состава, но с заменой pHЛIP на ПЭГ, которые обнаруживались в основном в эндосомах. Липосомы с pHЛIP были более эффективны в ингибировании клеточной пролиферации и роста опухолей у мышей [158].

Сообщалось о получении pH-чувствительных ниосом с использованием pHЛIP. Ниосомы представляют собой нановезикулы, образованные неионными поверхностно-активными веществами. Они похожи на липосомы с точки зрения физических свойств, однако демонстрируют более длительную физико-химическую стабильность (даже в комнатных условиях), меньшую токсичность ввиду своей неионной природы, являются биоразлагаемыми и неиммуногенными [159, 160]. Чувствительные к pH ниосомы (диаметром 80-90 нм) были получены при помощи сочетания неионных поверхностно-активных веществ Span20 и Tween20, холестерина и пептида pHЛIP, конъюгированного с липидами DSPE или гидрофобным флуоресцентным красителем пиреном, который встраивается в мембраны ниосом [161, 162].

Флуоресцентно меченые pHLP-носомы продемонстрировали таргетирование опухолей с последующим однородным распределением в опухоли и минимальным накоплением в основных органах. pHLP-носомы продемонстрировали в 2-3 раза более высокое поглощение опухоли по сравнению с контрольными носомами, в которых pHLP был замещен на ПЭГ. Возможно, это направление заслуживает дальнейшего изучения в качестве средства доставки.

2.5.6.2. Золотые наноматериалы

Наночастицы золота (НЧЗ) разных размеров и форм находят разнообразные биомедицинские применения [163]. НЧЗ полезны для усиления терапевтических эффектов облучения, например, они способны поглощать ближнее инфракрасное излучение для создания локального нагрева. В результате мягкого рентгеновского облучения они способны генерировать электроны Оже и выступать в качестве радиосенсибилизаторов. Было проведено несколько различных исследований доставки НЧЗ с помощью pHLP, с многообещающими результатами.

В первом примере использования НЧЗ, покрытых pHLP, была решена проблема маркировки тромбоцитов, которые обычно не восприимчивы к трансфекции или микроинъекции [164]. pHLP способствовал интернализации НЧЗ, содержащих люминесцентные комплексы европия, в тромбоциты в течение нескольких минут при пониженном значении pH.

Нацеливание на опухоль НЧЗ, несущих pHLP, повысило эффективность мягкого рентгеновского излучения, снижая выживаемость раковых клеток и размер опухоли у мышей за счет генерации электронов Оже [165, 166, 167]. Также сообщалось, что НЧЗ, имеющие диаметр металлического ядра 7 нм и покрытые 10% pHLP и 90% ПЭГ, обладают лучшей стабильностью и нацеливанием на опухоль [168].

Золотые нанозвезды (ЗНЗ), покрытые pHLP (ЗНЗ-pHLP), исследовались вместе с нетаргетирующими ЗНЗ-ПЭГ в качестве контроля [169]. ЗНЗ-pHLP продемонстрировали более высокую клеточную интернализацию при пониженном pH по сравнению с ЗНЗ-ПЭГ и в 3 раза более высокую направленность на опухоль молочной железы у мышей. Также в ходе тестирования ЗНЗ-pHLP при помощи методов КТ и фотоакустической визуализации наблюдались более сильные сигналы по сравнению с ЗНЗ-ПЭГ. Эффективность фототермической терапии опухолей, обработанных ЗНЗ-pHLP, наблюдалась с минимальными побочными эффектами для нормальных тканей.

В другой работе фотосенсибилизатор хлорин е6 (Хе6) и pHLP были абсорбированы на поверхности полых золотых наносфер (ПЗНС) в разных комбинациях для получения ПЗНС-Хе6, ПЗНС-pHLP и ПЗНС-pHLP-Хе6 [170]. ПЗНС (размером около 40 нм) продемонстрировали высокую емкость загрузки Хе6 и pHLP, образуя оболочку толщиной 4 нм. Превосходную цитотоксичность, нацеливание на опухоль и фототермический эффект демонстрировала

конструкция ПЗНС-rHLIP-Хеб после облучения лазером с длиной волны 670 нм или 808 нм, что привело к ингибированию роста опухоли [171].

На основе золотых наностержней, покрытых мезопористым кремнием и хитозаном и конъюгированных с rHLIP для мультиспектральной оптоакустической томографии Был получен противоопухолевый агент для мультиспектральной оптоакустической томографии (МСОТ) [172]. Обработка раковых клеток наностержнями с rHLIP, содержащими гемцитабин, привела к значительно большей цитотоксичности по сравнению с цитотоксичностью одного гемцитабина. Наностержни с rHLIP были нацелены на опухоли, и их сигнал МСОТ в опухолях был значительно выше по сравнению с нецелевыми НЧ.

Другой подход, реализованный при помощи rHLIP, заключался в запуске локального высвобождения лекарств из наночастиц. НЧЗ были конъюгированы с термочувствительным полимером, покрыты rHLIP и загружены доксорубицином (DOX) [173]. Облучение ближним ИК светом инициировало усадку термочувствительного полимера, что приводило к открытию пор НЧЗ и быстрому высвобождению DOX. Свободный DOX и DOX, загруженный в НЧЗ с покрытием rHLIP и без него, были изучены на человеческих клетках рака молочной железы MCF-7 и адриамицин-резистентных (ADM) MCF-7/ADM, на клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и HepG2/ADM, а также на опухолях MCF-7/ADM у мышей. Покрытие rHLIP значительно усиливало клеточное поглощение НЧЗ, а лазерное облучение запускало высвобождение DOX. Благодаря покрытию НЧЗ пептидом rHLIP, наблюдалось их более эффективное ориентирование на опухоль, а также однородное распределение высвобожденного DOX в опухолевой массе. Данные указывают на синергический противоопухолевый эффект и возможность преодоления множественной лекарственной устойчивости.

2.5.6.3. Магнитные наноматериалы

Активно развивающимся является подход доставки атомов, обладающих сильными магнитными свойствами, к опухоли, поскольку он может использоваться для визуализации опухолей при помощи магнитной резонансной томографии (МРТ). Известно о нескольких инновационных применениях этого подхода в сочетании с rHLIP.

В раннем исследовании парамагнитные rHLIP-НЧ были разработаны с использованием дендримера G5-РАМАМ, конъюгированного примерно с 44 атомами гадолия, хелатированными при помощи DOTA (додекантетрауксусная кислота), и было обнаружено внутриклеточное поглощение этого агента [174]. Другие НЧ на основе Gd (AGuIX), конъюгированные с rHLIP, были введены для T1 МРТ и лучевой терапии [175]. AGuIX представляли собой 3 нм НЧ, состоящие из полисилоксановой сети, окруженной примерно 10

хелатами Gd. НЧ pHLP-AGuIX были изучены в культивируемых раковых клетках, а МРТ была зарегистрирована у мышей с опухолями. Использование этих частиц позволило визуализировать опухоль и установить концентрацию агента в опухоли и здоровой ткани с помощью МРТ, которую затем можно использовать для расчета дозы облучения для лечения. Усиление лучевой терапии происходит за счет генерации каскада Оже-электронов внутри наночастиц.

В другой работе впервые был предложен двухмодальный зонд ПЭТ/МРТ T1 на основе магнитных наночастиц оксида железа (Fe_3O_4) в сочетании с pHLP в качестве нацеливающего модуля. Эти НЧ были стабилизированы цитратом и модифицированы ПЭГ-pHLP и ПЭГ-DOТА или только ПЭГ-DOТА. Для ПЭТ-визуализации был включен Ga^{68} в качестве хелата с DOТА [176]. В случае тестирования pHLP-ПЭГ-НЧ на опухолях мышей 4T1 наблюдались более сильные сигналы как при МРТ, так и ПЭТ в сравнении с неадресными ПЭГ-НЧ.

Ион марганца (Mn^{2+}) является другим контрастным агентом МРТ T1, может быть осажден при нейтральном pH триоксидом мышьяка с образованием комплекса арсенита марганца (MnAs). Триоксид мышьяка является одобренным FDA препаратом для лечения острого промиелоцитарного лейкоза [177]. MnAs диссоциирует в слабокислой среде, высвобождая ионы Mn^{2+} , которые усиливают сигнал T1, и арсенит, который убивает опухоль [178]. Для реализации данной концепции в работе [179] были приготовлены НЧ (30 нм в гидродинамическом диаметре), в которые MnAs был встроен в кремниевые оболочки, и покрыты флуоресцентным pHLP-ПЭГ8. Были получены стабильные частицы размером 90 нм. Были продемонстрированы pH-зависимое высвобождение Mn^{2+} , усиление сигнала T1, клеточное поглощение, более эффективное нацеливание на опухоль наночастиц, покрытых pHLP, по сравнению с нецелевыми наночастицами, а также значительное подавление роста опухоли и выживаемости мышей.

В другом исследовании суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (SPION) разных размеров (64, 82, 103 и 121 нм) были покрыты pHLP. Нанокластеры SPION-pHLP размером 64 нм продемонстрировали наиболее эффективное удержание в клетках в зависимости от pH и сильный магнитно-резонансный сигнал, зарегистрированный в нескольких моделях опухолей животных [180]. В другой работе были исследованы магнитные наночастицы Fe_3O_4 , полученные методом со-осаждения, модифицированные 3-аминопропилсиланом (APS) и покрытые pHLP [181]. При помощи МРТ *in vivo* и последующего определения содержания железа в образцах опухолей с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии, было обнаружено, что накопление pHLP-НЧ зависит от объема опухоли, а распределение кровеносных сосудов в опухоли является ключевым фактором, определяющим успех накопления НЧ. Была выявлена высокая нацеленность на опухоли малого и среднего размера (80–400 cm^3) и меньшее накопление в более крупных опухолях [182]. Позднее были введены аналогичные типы НЧ, покрытых либо ПЭГ, либо ПЭГ-pHLP [183]. С помощью МРТ на моделях мышей BALB/c, с ортотопической

опухолью рака молочной железы 4T1 и ксенотрансплантантной MDA-MB231, было продемонстрировано более высокое накопление pHILIP-НЧ в очаге заболевания по сравнению с ПЭГ-НЧ. Никаких патологических изменений в органах или крови мышей после введения НЧ не наблюдалось. Количество Fe, определенного в пределах опухолевого микроокружения, напрямую коррелировало с pH, измеренным с помощью нанозондового pH-датчика. Области более высокого накопления Fe имели более низкий pH [184].

Интересный подход для визуализации опухоли при помощи МРТ был реализован в работе [185], в которой были получены агенты на основе магнитосом, несущих на своей поверхности ориентирующие на опухоль пептиды, в том числе и pHILIP. Магнитосомы – это внутриклеточные структуры, синтезируемые магнитотактическими бактериями, которые представляют собой нанокристаллы магнетита, окруженные липидной двухслойной мембраной. Они привлекли большое внимание для биотехнологических приложений и могут служить превосходными контрастными агентами для МРТ T2 [186]. Было установлено, что магнитосомы, покрытые pHILIP, сохраняют свои магнитные свойства, продемонстрированы их pH-зависимые свойства в экспериментах *in vitro*. При *in vivo* визуализации с помощью МРТ наблюдалось лучшее накопление магнитосом, покрытых pHILIP, в опухолях модельных животных в сравнении с ненацеленными магнитосомами дикого типа.

2.5.6.4. Другие металлические наночастицы

Ряд металлов без выраженных магнитных свойств имеют потенциал для визуализации или различных терапевтических подходов. При помощи люминесцентных наночастиц на основе галлата цинка $ZnGa_2O_4$ (ZGO), покрытых pHILIP, на мышинных моделях был продемонстрирован подход по визуализации опухоли молочной железы 4T1 [187]. Максимальное накопление наночастиц ZGO-pHILIP в опухоли наблюдалось через 6 ч. При этом эффектов их цитотоксичности не наблюдалось. Логическим продолжением этой работы стало сообщение о нагрузке подобных НЧ ZGO-pHILIP, загруженных большим количеством бора (B^{10}), для получения агента для бор-нейтрон захватной терапии [188]. Данный подход основан на поглощении нейтрона бором-10, что приводит к образованию возбужденного ядра бора-11, которое распадается на ядро лития-7 и альфа-частицу, разлетающиеся с большой энергией. Эта ядерная реакция с большим выделением энергии в клетке приводит к ее гибели. Одной из проблем данного подхода являлась доставка достаточного количества бора в опухоль. В результате тестирования ZGO- B^{10} -pHILIP на животных моделях с опухолью меланомы и фибросаркомы, наблюдалось уменьшение объема опухоли (75%–80%) по сравнению с контрольной опухолью после нейтронного облучения.

Цистеамин меди (Cu-Cu) – перспективный фотосенсибилизирующий агент для фотодинамической терапии (ФДТ), который может активироваться рентгеновскими лучами с выделением синглетного кислорода, что может быть эффективно для лечения глубокого залегающих опухолей – использовался в работе для получения НЧ, размером ~200 нм, которые были конъюгированы с pHLP [189]. При тестировании Cu-Cu-НЧ, покрытых pHLP, наблюдалось уменьшение размера опухоли у мышей при активации рентгеновскими лучами. В другом исследовании были изучены подобные НЧ разных размеров и их эффективность при различных дозах облучения [190]. Крупные Cu-Cu-pHLP-НЧ (~300 нм) демонстрировали наиболее интенсивную фотолюминесценцию, в то время как НЧ среднего размера (~100 нм) производили большее количество АФК при рентгеновском облучении, а при использовании самых маленьких НЧ (~40 нм) был получен наилучший результат при лечении опухолей у мышей при облучении 90 кВп [190].

Интересный подход был реализован в работе [191] при помощи получения противоопухолевого агента для фототермической терапии с контролируемым высвобождением действующего вещества. Были синтезированы полые НЧ из сульфида меди (CuS), модифицированные с помощью ПЭГ-pHLP, и загружены ингибитором стрессовых гранул (ISRIB) и лауриновой кислотой. Последний компонент чувствителен к свету ближнего ИК диапазона и инициировал высвобождение ISRIB из НЧ при облучении. Известно, что применение фототермической терапии в отношении онкозаболеваний может быть не столь эффективно, что обусловлено устойчивостью раковых клеток к теплу, возникающей из-за сверхэкспрессии белков теплового шока (БТШ). БТШ дополнительно запускают образование стрессовых гранул, которые регулируют экспрессию других белков и жизнеспособность клеток в различных стрессовых условиях [192]. Ингибирование образования стрессовых гранул приводило к увеличению противоопухолевого эффекта и вызывало мощную иммуногенную гибель клеток. Также происходило значительное торможение роста опухоли и развития метастазов в легких, наблюдалось перепрограммирование M2-макрофагов в фенотип M1.

2.5.6.5. Полимерные и кремниевые наночастицы

Наночастицы на основе полимерных или кремниевых материалов в сочетании с pHLP, были разработаны для обнаружения, визуализации и терапии опухолей.

Была получена гибкая конструкция для обнаружения и визуализации опухоли на основе мультимодального наносенсора PRISM (датчика визуализации злокачественных новообразований, реагирующего на протеазу) и пептида pHLPvar3 [193]. PRISM представлял полимерный каркас из ПЭГ с восемью плечами (40 кДа), который был функционализирован при помощи pHLPvar3 и последовательности PLGVRGK, узнаваемой и расщепляемой матриксной

металлопротеиназой 9 (MMP-9). Помимо этого, pHLPvar3 был дополнительно модифицирован с помощью металл-хелатного комплекса ^{64}Cu -NOTA для визуализации при помощи ПЭТ, а последовательность PLGVRGK была модифицирована с помощью метки флуоресцеин амидит-биотин, которая могла быть обнаружена в моче в случае взаимодействия с MMP-9 (сверхэкспрессируемой в некоторых видах рака) и служить детектором опухоли. Метастазы в легких, которые часто сложно визуализировать, были хорошо различимы и визуализированы у мышей с использованием ^{64}Cu -pHLP-PRISM. Этот сигнал был в 4 раза более интенсивным в сравнении с PRISM, без pHLPvar3. На животных моделях с опухолью человеческого колоректального рака было продемонстрировано 8,6-кратное поглощение pHLP-PRISM по сравнению с окружающими нормальными мышцами.

Другой тип НЧ был разработан с использованием ПЭГ и сополимерного ядра нитрогенированной глюконовой кислоты. НЧ были покрыты pHLP и загружены DOX, боронатом-DOX (BDOX), а также препаратом β -лапахон [194]. β -лапахон — это новый препарат, который индуцирует выработку высокого уровня активных форм кислорода [195]. При помощи pHLP НЧ были нацелены на опухоль и активированы высокоинтенсивным сфокусированным ультразвуком. Было отмечено значительное уменьшение опухоли мышей без признаков токсичности, оцененных по биохимическим параметрам.

Мезопористые кремниевые наночастицы диаметром около 140 нм и с порами около 3 нм были покрыты pHLP и загружены DOX [196]. Было проведено изучение их клеточного поглощения, кинетики высвобождения DOX, а также была определена цитотоксичность при пониженном pH.

В другом исследовании мезопористые кремниевые наночастицы размером 26, 45 и 73 нм, которые можно использовать для доставки лекарственных препаратов и агентов визуализации, были функционализированы с помощью pHLP [197]. Превосходное нацеливание на опухоли поджелудочной железы у мышей наблюдалось для pHLP-НЧ по сравнению с нецелевыми наночастицами, а самым высоким поглощением обладали pHLP-НЧ размером 26 нм.

Наноллисты ковалентного органического каркаса (COF), конъюгированные с золотыми НЧ (COF-Au) и покрытые pHLP (pHLP-COF-Au), были загружены DOX и протестированы *in vitro* и *in vivo* [198]. Было изучено влияние НЧ, как покрытых pHLP, так и нецелевых, на пролиферацию и выживаемость клеток, нацеливание на опухоли и терапевтическая эффективность на мышинных моделях были исследованы при облучении светом с длиной волны 635 нм или без него. Наилучшие результаты были достигнуты в клеточных и животных моделях при использовании НЧ, покрытых pHLP, загруженных DOX и облученных светом.

2.5.7. Доставка к опухоли пептидных и белковых нагрузок при помощи pHLP

Пептиды pHLP использовались для доставки пептидов, конъюгированных через расщепляемые или нерасщепляемые связи SS, с целью запуска путей клеточной регуляции и подавления опухоли.

Пептид P1AP (KKSRLF), который имитирует третью внутриклеточную петлю i3 рецептора, активируемого протеазой (PAR1), был конъюгирован с С-концом различных pHLP через нелабильный хлорацетилхлоридный линкер [199], расщепляемый SS-линкер [200] или был синтезирован как отдельный полипептид [201]. PAR1 является членом семейства рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), и нацеливание на его внутриклеточную часть модулирует взаимодействие GPCR с G-белками [202]. Пептид P1AP, доставляемый внутриклеточно с помощью pHLP, был закреплен на цитозольной поверхности плазматической мембраны для стабилизации PAR1 в его неактивной конформации и эффективного подавления его сигнального каскада. В результате была обнаружена цитотоксичность на раковых клетках, а нацеливание на опухоль было подтверждено с помощью ОФЭКТ-визуализации с использованием I¹²⁵-pHLP-P1AP [201].

Другой путь, который, как было показано, играет важную роль в регуляции аутофагии и гибели клеток, основан на взаимодействии трансмембранного белка TM219 с протеином-3, связывающим инсулиноподобный фактор роста (IGFBP3), который индуцирует апоптоз, зависимый от каспазы 8 [203]. Пептид CFHPRRESHWSRTRL цитоплазматического домена TM219 был конъюгирован через связь SS с С-концевой частью pHLP [204]. Такая конструкция ингибировала сигнализацию TM219-IGFBP3 при доставке в цитоплазму и блокировала аутофагию в 3D-культуре клеток.

Пептид pHLP использовался для доставки антимикробных катионных пептидов, которые образуют амфипатические α -спирали при связывании с отрицательно заряженными липидными мембранами. Последовательность (KLAKLAK)₂ и ее шесть пептидных производных были конъюгированы с С-концом pHLP через дисульфидную связь [205]. Антипролиферативный эффект pHLP-KLAKLAK, полученный в раковых клетках, по-видимому, был обусловлен pH-селективной транслокацией пептида через плазматическую мембрану, восстановлением дисульфида и связыванием KLAKLAK с митохондриальной мембраной для ее дестабилизации. Однако эти данные следует интерпретировать с осторожностью, так как положительно заряженные пептиды имеют высокое сродство к отрицательно заряженным клеточным мембранам и легко поглощаются эндоцитозом, поэтому вполне возможно, что могло быть задействовано несколько путей поглощения целевой конструкции.

При помощи pHLP было выполнено нацеливание на раковые клетки иммуногенных эпитопов для стимулирования иммунных реакций или цитотоксической активности для терапии опухолей. В работе [206] пептид из вируса гриппа HA (YRYDVDPYA) был выбран в качестве высокоиммуногенного экзогенного эпитопа. Пептид HA был присоединен к N-концевой последовательности pHLP либо напрямую, либо при помощи ПЭГ. Для повышения общей аффинности связывания HA-pHLP с антителами против HA были получены двухмодульные агенты HA-pHLP, где два эпитопа HA были связаны с одним пептидом pHLP при помощи ПЭГ12. Последовательность pHLP была дополнительно модифицирована, чтобы компенсировать добавление полярных пептидов HA и полимеров ПЭГ для обеспечения надлежащих рК в диапазоне рН 5–6. Эпитоп HA был нацелен на раковые клетки с помощью pHLP в мышинной модели опухоли, и оставался доступным в течение 24 часов. Лечение иммунизированных мышей двухмодульным HA-pHLP привело к снижению роста опухоли на 55%.

В другом исследовании pHLP был конъюгирован с лигандом формилпептидного рецептора (FPRL), который взаимодействует с N-формилпептидным рецептором (FPR), экспрессируемом в основном в фагоцитарных лейкоцитах (нейтрофилах, моноцитах, дендритных клетках и натуральных киллерах) [207]. Было показано, что FPRL-pHLP активирует FPR и усиливает привлечение иммунных клеток и их прикрепление к раковым, что может привести к иммунному ответу.

Другим примером являются конструкции, для получения которых Fc-фрагменты или терапевтические моноклональные антитела были конъюгированы с N-концом пептида pHLP [208]. Терапевтическая эффективность была продемонстрирована как на первичных солидных опухолях, так и на метастазах. Используемые иммуно-компоненты эффективно активировали NK-клетки, инициируя антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, что приводило к гибели раковых клеток. Эти модифицированные Fc-фрагменты и антитела обладают большим потенциалом для преодоления ограничений, связанных с гетерогенностью опухолевых антигенов, расширяя возможности применения иммунотерапии NK-клеток при лечении солидных опухолей.

Ингибирование рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [209] за счет воздействия на его цитоплазматический юкстамембранный (JM) домен, который необходим для димеризации рецептора и его функционирования в роли киназы – еще один перспективный подход к лечению рака. Вариант для таргетной терапии был разработан следующим образом: C-конец пептида pHLP был слит с пептидом JMA (TLRRLQ, остатки 645–663 JM) [210]. JMA образует короткую α -спираль, которая антипараллельно взаимодействует с JM, стабилизируя асимметричный димер. pHLP-JMA ингибировал фосфорилирование EGFR, что приводило к

появлению цитотоксичности. Стоит отметить, что конструкция рНЛIP-ЖМА была при помощи получения необходимого гена и его экспрессии в отличие от предыдущих конструкций, которые были получены при помощи химической конъюгации.

2.5.8. Терапевтические агенты на основе слияния белков и рНЛIP

Благодаря возможности генетического кодирования последовательности пептида рНЛIP логичной вариацией его применения является слияние рНЛIP на уровне генов с белковыми компонентами, определяющими функциональные свойства целевого гибридного агента. Терапевтические препараты на основе белков весьма успешно применяются в клинике и в настоящее время пользуются беспрецедентным признанием своего потенциала. Белки представляют собой наиболее универсальный класс биомолекул, действующих как токсины, катализаторы, сигнальные молекулы, молекулярные и ионные переносчики, каркасы для поддержания целостности клеток и тканей, рецепторы и выполняющих многие другие функции [211, 212]. Помимо того, что использование белковых молекул в качестве лекарств помогает решить широкий диапазон проблем медицины, такие препараты обладают несколькими преимуществами по сравнению с низкомолекулярными препаратами. При вмешательстве в нормальные биологические процессы белки с меньшей вероятностью вызывают побочные эффекты, что обусловлено их эволюцией для выполнения высокоспецифичных задач. Как правило, белковые терапевтические средства демонстрируют высокую эффективность, а также могут выполнять более сложные функции благодаря своим сложным трехмерным структурам [211].

Первым примером использования рНЛIP в составе конструкции слияния является гибридный белок tTF-рНЛIP, в котором N-концевой участок рНЛIP был слит с C-концом белка усеченного тканевого фактора, индуцирующего коагуляцию (tTF) [213]. Предполагалось, что рНЛIP будет направлять конструкцию к клеткам опухоли и закреплять tTF на поверхности мембраны, что вызывало бы запуск каскада коагуляционных реакций. На моделях мышей с опухолью меланомы B16-F10 и ксенотрансплантационной опухолью молочной железы человека MDA-MB-231 было продемонстрировано, что системное введение tTF-рНЛIP вызывало тромботическую закупорку опухолевых сосудов. Это приводило к снижению перфузии опухоли и способствовало ее регрессии. Тромбозы или другие нарушения в нормальных органах мышей не наблюдались.

Затем появилось сообщение о получении конструкции слияния, состоящей из тиоредоксиновой метки (Trx), рНЛIP и консервативного мотива беклин-1, состоящего из 20 аминокислот (Trx-рНЛIP-беклин1) [214]. Беклин-1 является основным компонентом комплекса фосфатидилинозитол-3-киназы класса III (PI3K класса III или Vps34), который индуцирует

образование аутофагосом [215]. Являясь геном-супрессором опухолей, Беклин-1 моноаллельно удален в раке яичников (до 75%), раке молочной железы (~50%) и раке простаты (около 40%) [216, 217, 218]. Повышение уровня Беклин-1 в определенных опухолевых клетках может открыть новые возможности для терапии рака. Гибридный белок Trx-pHLIP-беклин1 был получен путем соединения N-конца консервативного мотива beclin1 с C-концом pHLIP и связывания N-конца pHLIP с высокогидрофильным и термостабильным белком Trx, используемым для увеличения водорастворимости целевой гибридной конструкции и препятствию ее агрегации в тельца включения при бактериальной экспрессии интересующих генов [219]. Гибридный белок Trx-pHLIP-беклин1 ингибировал пролиферацию клеток рака молочной железы MCF-7 и яичников SKOV3 в слабокислых условиях (pH 6,5) и индуцировал аутофагию. Противоопухолевая эффективность была также подтверждена на мышинной модели с ксенотрансплантантной опухолью SKOV3 [214].

Другим примером является более сложный белок слияния, состоящий из 3 компонентов: 1) домена CD19 для нацеливания на анти-CD19 химерный антигенный рецептор (CAR) Т-клеток (CAR-T, одобренная FDA терапия); 2) внеклеточного домена молекулы адгезии JAM, которая играет ключевую роль в организации плотных клеточных контактов и контроле межклеточной адгезии; и 3) пептида pHLIP [220]. При тестировании CD19-JAM-pHLIP на моделях клеток плоскоклеточной карциномы языка CAL27 и карциномы легких A549 наблюдалось снижение пролиферации ввиду встраивания гибридной белковой конструкции в мембраны раковых клеток и образованию дополнительных JAM-опосредованных контактов. Благодаря домену CD19 раковые клетки, обработанные гибридной конструкцией, распознавались анти-CD19 CAR-T-клетками. Авторы сообщили, что в случае аналогичных тестирований CD19-JAM-pHLIP на модели нераковой клеточной линии HUVEC не наблюдалось никакого ее воздействия и связали это с противораковой специфичностью пептида pHLIP. Однако использование авторами контроля такого типа вызывает сомнения в достоверности результатов, поскольку нацеливании пептида pHLIP на опухоль обусловлено его встраиванием в закисленные участки тканей, наличие которых характерно не только для опухоли. Известно, что pHLIP-технология применима не только для визуализации и лечения опухолей, но и при нацеливании и лечении воспаленных и фиброзных тканей [103, 115, 221], атеросклероза [222], ишемического инсульта [223] и ишемического миокарда [224, 225]. Перечисленные патологии также связаны с повышенным уровнем кислотности, развивающейся в пораженных тканях. Эксперименты по изучению pH-зависимого связывания конструкции CD19-JAM-pHLIP с раковыми клетками в данной работе не выполнялись.

Большая полярная белковая нагрузка, такая как гликопротеин гелонин (30 кДа), была успешно доставлена при помощи pHLIP в цитоплазму [226]. Гелонин — фитотоксин, который

ингибирует синтез белка путем расщепления аденина 4324 рибосомальной РНК 28S, что приводит к гибели клетки [227]. Гелонин слишком токсичен для использования в ненацеленной форме. Гибридный белок Trx-pHLIP-гелонин был протестирован *in vitro* и *in vivo*. Лечение Trx-pHLIP-гелонином солидных опухолей яичников SKOV3 у мышей было очень эффективным при незначительной токсичности.

При помощи рHLIP была осуществлена направленная доставка хемокина CCL21 к раковым клеткам при пониженном pH [228]. CCL21 относится к лимфоидным хемокинам и является лигандом к рецептору, связанному с G-белком типа 7 (CCR7), который экспрессируется в основном на клетках, отвечающих за адаптивный иммунитет [229]. За счет направления дендритных и Т-клеток к раковым CCL21 может оказывать противоопухолевый иммунитет. Слияние CCL21 с рHLIP было выполнено как с меткой тиоредоксина (Trx), так и без нее для получения конструкций Trx-CCL21-pHLIP и CCL21-pHLIP. Оба гибридных белка в экспериментах *in vitro* были доставлены к поверхности клеток рака молочной железы мыши 4T1 при пониженном значении pH и успешно ориентировали CCR7-положительные клетки [228].

Недавно была получена конструкция слияния на основе интерлейкина 2 (IL-2) и рHLIP (IL2-pHLIP), которая продемонстрировала опухолевое нацеливание. Ее применение привело к эффективному уменьшению опухолей молочной железы и меланомы модельных животных [230].

Стоит отметить, что несмотря на удобство сочетания рHLIP с белковыми компонентами, обуславливающими широкий диапазон свойств и применения целевого агента, при помощи стандартных методик генной инженерии, в литературе по этой теме на момент начала данной диссертационной работы имелось всего два сообщения [213, 214]. В свою очередь было множество сообщений об использовании пептидов рHLIP для нацеливания на опухоль низкомолекулярных или нано-агентов, как упоминалось выше, и их количество превышало несколько десятков. В этой связи появилось желание детального и подробного изучения конструкций вида белок-рHLIP для оценки перспективности сочетания белковых компонентов с pH-чувствительными пептидами. Поэтому наряду с перечисленными работами по данной тематике появлялись новые, полученные в нашей лаборатории, обсуждение которых приводится далее.

2.5.9. Ограничения рHLIP-технологии

Основное ограничение технологии рHLIP при использовании конструкций вида рHLIP-SS-нагрузка связано с нюансами ее синтеза. Несмотря на то, что синтез является простым, выход целевого продукта (рHLIP-SS-нагрузка) существенно снижен за счет образования побочных гомодимеров (рHLIP-SS-рHLIP или нагрузка-SS-нагрузка). Это снижает экономическую эффективность технологии и требует дальнейшей оптимизации [107, 140].

Простая конъюгация pHLP облегчает транслокацию большинства непроницаемых для клетки нагрузок. Однако ограничения на их доставку возникают из-за полярности и размеров. Для эффективной доставки в цитоплазму некоторых синтетических полярных молекул требуется их модификация или модификация С-конца pHLP [124, 125]. Кроме того, в случае больших полярных молекул, таких как ПНК, размер нагрузки сильно влияет на встраивание [140]. Таким образом, эффективная доставка с заданным рН зависит не только от pHLP, но и от нагрузки, поэтому pHLP не может быть эффективным средством для всех типов доставляемых молекул.

Другим ограничением использования pHLP для визуализации рака и диагностики *in vivo* является его накопление в почках и при патологических состояниях, таких как воспаление [66].

2.5.10. Неопухолевые применения технологии pHLP

В дополнение к визуализации и терапии рака, технология pHLP имеет потенциал для использования при патологических состояниях, связанных с нарушением регуляции рН ткани, особенно при воспалении и ишемии. В ходе *in vivo* визуализации флуоресцентного красителя, конъюгированного с pHLP, были локализованы места воспаления на крысиной модели артрита, вызванного инъекцией метилированного BSA и адьюванта Фрейда в коленный сустав [73]. В воспаленных суставах уровень флуоресцентного сигнала был примерно в 5 раз выше, чем в контрольных суставах.

Образование кислоты при ишемии сердца — хорошо описанный феномен [231]. Пептиды pHLP и липосомы, покрытые pHLP, накапливались в двух мышечных моделях сердечной ишемии [224]. Важно отметить, что pHLP можно использовать для выявления областей ишемии до начала обширного повреждения тканей и необратимых изменений миокарда.

Также pHLP может иметь значение для доставки соединений с относительной селективностью в почки. На мышечной модели повреждения почек, вызванного введением фолиновой кислоты, при помощи pHLP была реализована доставка в почки ПНК, нацеленной на миРНК-33, которая играет ключевую роль в воспалении [221]. Это позволило уменьшить развитие почечного фиброза и свидетельствовало о пользе применения pHLP при лечении патологий почек.

Таким образом, несмотря на очевидное главенство онкологического направления конструкций на основе pHLP, область их применения значительно шире — повышенная кислотность характеризует многие патогенные состояния.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Реактивы и материалы

В работе были использованы штаммы *Escherichia coli* Top-10, BL21 (DE3) (Promega, США).

В работе были использованы следующие реактивы: агар, бактотриптон, дрожжевой экстракт (Difco); натриевая соль ампицилина (Синтез); параформальдегид, $MgCl_2$, $B(OH)_3$ (Sigma); $NaCl$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, (Merck); $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Amresco), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Panreac); имидазол, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), $NaOH$ (Serva); агароза, бромистый этидий, β -меркаптоэтанол, глицерин, глицин, диметилсульфоксид, Кумасси синий R-250, персульфат аммония, додецилсульфат натрия (SDS), мочевины, трисгидроксиметиламинометан Tris, CH_3COONa , $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (Helicon); $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (Ferak); трипановый синий 0,4% (Biorad, США); этанол (Флора Кавказа), 10 kb DNA Ladder (Евроген); рестриктазы: NdeI, BamHI, EcoRI, NcoI, NotI, HindIII, XhoI (Fermentas); T4 DNA ligase (Fermentas); набор для выделения ДНК из геля Cleanup Standard, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген, Россия);

Клетки *E. coli* выращивали в питательных средах Лоури-Бертани (LB). Для приготовления компетентных клеток и трансформации использовали питательную среду LB (10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л $NaCl$). Для выделения плазмидной ДНК биомассу клеток выращивали в питательной среде LB.

Твердые среды получали добавлением 1,5% (вес/объем) агара; при селективном выращивании в среды добавляли ампициллин до конечной концентрации 100 мкг/мл.

Для очистки белков использовали колонки, заполненные металл-хелатным сорбентом никель-нитрилотриацетатагарозой (Ni-NTA-AG) (Qiagen, Германия).

В работе использовались следующие растворы:

1) Буферные растворы для приготовления компетентных клеток:

Буфер RF1: 100 мМ KCl , 50 мМ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 мМ ацетат калия, 10 мМ $CaCl_2$, 15% глицерин, pH 5.8.

Буфер RF2: 10 мМ MOPS, 10 мМ KCl , 75 мМ $CaCl_2$, 15% глицерин, pH 6.8.

2) Буферные растворы для очистки белка на колонке Ni-NTA-AG:

Буфер А: 50 мМ Трис, 300 мМ $NaCl$, 20 мМ имидазол, 1 мМ NaN_3 , pH 8.0

Буфер В: 50 мМ Трис, 300 мМ $NaCl$, 250 мМ имидазол, 1 мМ NaN_3 , pH 8.0

3) Буферный раствор для исследований методом УФ-видимой спектрофотометрии:

Буфер ST1: 20 мМ Трис, 100 мМ $NaCl$, pH 8.0

4) Буферный раствор для электрофоретического анализа образцов ДНК

Буфер TBE: 89 мМ Трис, 89 мМ В(ОН)₃, 2 мМ ЭДТА, рН 8.3

5) Фосфатный буферный раствор (PBS)

Буфер PBS: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, and 2 мМ KH₂PO₄

Для приготовления буферных растворов использовали высокоочищенную воду, полученную на установке Milli-Q (Millipore, Франция).

6) Буферы для электрофореза в денатурирующих условиях

Двухкратный буфер нанесения образцов: 1% 2-меркаптоэтанола, 4% SDS, 0.25 М Трис–HCl, рН 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, рН 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего.

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, SDS 5 г/л, Трис–HCl 6.5 г/л, рН 8.3.

Концентрирующий гель для электрофореза по Леммли: 5% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% SDS, 0.125 М Трис –HCl, рН 6.8.

Разделяющий гель для электрофореза по Леммли: 12% смесь акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис–HCl, рН 8.9. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.1%.

6) Компоненты для культивирования эукариотических клеток

Среда DMEM с глюкозой 4,5 г/л с глутамином (ПанЭко, Россия) Fetal Bovine Serum (HyClone, США); Glutamax (Gibco, США), раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США); PBS (ПанЭко, Россия).

3.2. Методы

3.2.1. Приготовление компетентных клеток

Свежевыращенную на чашке колонию *E.coli* штамма Top-10 или BL21 (DE3) пересевали в 2 мл среды LB и растили в течение ночи. В случае колонии штамма Top-10 к среде был добавлен антибиотик стрептомицин (25 мкг/мл). После пересевали ночную культуру в 100 мл LB и инкубировали клетки до достижения культурой ранней логарифмической фазы роста (OD₅₉₅~0,6) при 37°C и интенсивной аэрации (250 об/мин). Клеточную культуру переносили в пробирки и охлаждали во льду в течение 15 мин, осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин при 4°C и удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 1/3 объема от исходного буфера RF1. Инкубировали 15 мин во льду и осаждали при тех же условиях. Далее клетки ресуспендировали в 1/12 от объема исходного буфера RF2 и инкубировали во льду 15 мин. Полученные компетентные клетки разливали по 50 мкл и хранили при -80°C в течение нескольких месяцев.

3.2.2. Трансформация плазмидной ДНК

К 50 мкл компетентных клеток добавляли 5-50 нг плазмидной ДНК, ресуспендировали и выдерживали во льду в течение 30 мин. Затем клетки подвергали тепловому шоку в течение 90 с при 42°C и инкубировали во льду в течение 4-5 мин. К клеточной суспензии добавляли 150 мкл среды LB и растили в течение 40-60 мин при 37°C и 250 об/мин. Осаждали клетки при помощи центрифугирования при 700 g в течение 3 мин, отбирали 150 мкл жидкости, ресуспендировали клетки и высевали в объеме 50 мкл на чашки с твердой средой LB, содержащей необходимый антибиотик в заданной концентрации (ампициллин 100 мкг/мл, канамицин 30 мкг/мл) и выращивали в течение ночи при 37 °C.

3.2.3. Выделение плазмидной ДНК

Ночную культуру клеток *E. coli* в объеме 4,5 мл осаждали центрифугированием в течение 3 мин при 16000 g, удаляли супернатант. Выделение плазмидной ДНК из полученного клеточного осадка проводили с использованием набора реактивов системы очистки ДНК-Wizard-Miniprep (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

3.2.4. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле

Анализ плазмидной ДНК проводили при помощи электрофореза в 1.0% агарозном геле, содержащим бромистый этидий в конечной концентрации 0.5 мкг/мл. Процедуру проводили при напряженности электрического поля 3-6 В/см. В качестве электродного буфера использовали трис-боратный буфер. После завершения электрофореза пластину просматривали в трансиллюминаторе АТМ (BioTecMed, Швеция).

3.2.5. Амплификация ДНК методом ПЦР

ПЦР проводили, используя полимеразы Tersus или Taq (Евроген, Россия). В состав реакционной смеси входили: 10x Tersus/ Taq буфер, смесь dNTP (конечная концентрация 0.25 мМ), праймеры (0.5 пмоль/мкл), матричная ДНК (для плазмиды 0.01-1нг на 25 мкл реакционной смеси), термостабильная ДНК-полимераза (0.5 ед. на 25 мкл реакционной смеси), вода mQ. Реакцию проводили в амплификаторе в режиме с нагреванием крышки. Количество циклов зависело от начального количества матрицы и требуемого количества продукта реакции (от 14 до 24 циклов), Температуру на стадии отжига рассчитывали, основываясь на длине и GC-составе праймеров. При расчете длительности стадии элонгации учитывали длину амплифицируемого фрагмента ДНК и процессивность полимераз.

3.2.6. Очистка амплифицированных фрагментов ДНК из реакционной смеси

Очистку фрагментов ДНК из реакционной смеси производили набором Cleanup Standard. К реакционной смеси добавляли 4 объема «Связывающего раствора» и перемешивали. Пробу переносили в спин-колонку, помещенную в собирательную пробирку, и центрифугировали на при 10000 об/мин в течение 30 с. Затем удаляли фильтрат из собирательной пробирки и вносили в колонку наливали 700 мкл «Промывочного раствора», повторяли центрифугирование. Фильтрат сливали и центрифугировали колонку при 10000 об/мин в течение 60 с для полного удаления промывочного раствора. Элюировали ДНК с колонки 50 мкл воды mQ.

3.2.7. Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции

Реакционная смесь состояла из 10x буфера для эндонуклеаз рестрикции, ДНК, воды mQ и ферментов. Рестрикцию продуктов ПЦР и плазмидной ДНК проводили в течение 2-4 ч при 37°C.

3.2.8. Лигирование молекул ДНК

После рестрикции продуктов ПЦР и плазмидного вектора проводили их лигирование ДНК-лигазой бактериофага T4. В состав реакционной смеси входили фермент, лигируемые фрагменты, 5x буфер и вода mQ. Молярное соотношение вектор:вставка составляло 1:5–1:10. Лигирование проводили в объеме 10 мкл в течение 1 ч при комнатной температуре.

3.2.9. Нарabотка биомассы для выделения белков

Экспрессию генов осуществляли в штамме *E. coli* BL21 (DE3). Клетки трансформировали экспрессионной плазмидой pET-24, содержащей интересующие гены. Пересевали клетки на жидкую питательную среду LB с добавлением канамицина (25 мкг/мл). Клеточную культуру выращивали при 37°C и хорошей аэрации (250 об/мин) до достижения ими оптической плотности 0,8-1 при 600 нм. После этого добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,4 мМ и продолжали инкубацию при 37°C в течение 4 часов, после и продолжали инкубацию при 20°C и хорошей аэрации еще в течение 22-24 ч. Затем суспензию клеток осаждали центрифугированием при 3000g в течение 15 мин при 4°C. Полученный осадок хранили при -20 °C.

3.2.10. Выделение белков

Для получения целевых белково-пептидных конструкций наработанную биомассу ресуспендировали в промывочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 8,0), а затем разрушали ультразвуком с использованием ультразвукового дезинтегратора Bandeline (6 импульсов по 10 с, каждый с 10-секундными интервалами, пробирки выдерживали

во льду). Затем клеточный лизат осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 30 мин при 4°C. После этого супернатант наносили на колонку с Ni²⁺-NTA-агарозой (Qiagen, Нидерланды), предварительно уравновешенную промывочным буфером. После нанесения колонку промывали 5-кратным объемом промывочного буфера и белок элюировали буфером, содержащим 50 мМ Трис-НСl, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, pH 8,0.

2.3.11. Денатурирующий электрофорез в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ)

Чистоту и целостность гибридных конструкций подтверждали при помощи SDS-электрофореза в 12%-ном ПААГ, выполненного по стандартному протоколу. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис –НСl, pH 6.8; разделяющий гель – 12% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.375 М Трис–НСl, pH 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации 0.1%, а затем персульфат аммония до 0.03%. Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения, содержащим меркаптоэтанол в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C. Проводили электрофорез при напряжении 90В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 20 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля. По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250.

3.2.12. Гель-фильтрация белков

Выделенные белковые конструкции переводили в PBS с использованием гель-фильтрационных колонок Micro Bio-Spin™ 6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США), заполненных Bio-Gel P-6 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

3.2.13. УФ-видимая спектрофотометрия

Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Cary 50 Bio (Varian, США) в буфере ST1 при комнатной температуре. Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции, рассчитанного на основе аминокислотной последовательности белка.

3.2.14. Культивирование клеточных линий

Клетки карциномы шейки матки человека HeLa и карциномы молочной железы EMT6 культивировали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, Inc.), с добавлением 10% фетальной

бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Scientific, Inc.), 100 единиц/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Клетки культивировали во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C, среду обновляли каждые 2-3 дня.

3.2.15. Конфокальная микроскопия

Клетки HeLa выращивали в 96-луночной планшете до тех пор, пока слияние не достигало ~ 60 % (10⁴ клеток/луночку). Затем среду удаляли и добавляли 100 мкл 50 мМ фосфатного буфера с заданным pH (буферы с pH в диапазоне 6,0–7,4 с добавлением 100 мМ NaCl и 10% FBS), содержащего белково-пептидный гибрид (1 мкМ) был добавлен. Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 15 мин. Клетки дважды промывали PBS и фиксировали 4% формальдегидом в PBS в течение 10 минут, затем клетки снова промывали PBS и перед микроскопическими экспериментами добавляли Hoechst до концентрации 20 нМ. Визуализацию проводили с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Германия), оснащенного Confocal Microscopy Upgrade (Thorlabs, США). Лазер возбуждения 405 нм и эмиссионный фильтр 440/40 нм использовали для обнаружения Hoechst 33258, а лазер возбуждения 488 нм и эмиссионный фильтр 525/45 нм использовали для EGFP. Для сравнения полученных изображений друг с другом использовались идентичные условия получения и обработки. Для экспериментов по эндоцитозу и некоторых других использовали Zeiss LSM 980 с Airyscan 2 (ZEISS Microscopy, Германия).

3.2.16. Проточная цитофлуориметрия

Клетки HeLa выращивали в культуральном пластике T-25 до конfluenceности ~ 90% (2 миллиона клеток на флакон). Затем среду удаляли, добавляли 1 мл раствора Versene и клетки инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Через 10 мин инкубации клетки ресуспендировали для получения гомогенной суспензии и центрифугировали 3 мин при 125 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 600 мкл PBS с добавлением 10% FBS. Образцы для цитофлуориметрии готовили путем смешивания 3 мкл полученной клеточной суспензии с 97 мкл буферного раствора заданного pH, содержащего 50 мМ фосфата, 100 мМ NaCl, 10% FBS и гибридный белок-пептидный слияние в заданной концентрации. Полученную смесь инкубировали 15 минут при 37 °C, затем клетки осаждали центрифугированием в течение 30 секунд при 500 g, удаляли супернатант, добавляли 100 мкл PBS и анализировали клетки методом проточной цитофлуориметрии. Данные проточной цитофлуориметрии были получены на приборе Novocyte 3000 VYB (ACEA Biosciences, США) и проанализированы с использованием программного обеспечения NovoExpress 1.3 для не менее 20 000 событий на образец. События были сначала отобраны для клеток (точечный график FSC-A/SSC-A), затем для отдельных клеток

(точечный график FSC-A/FSC-H), затем были получены гистограммы интенсивности флуоресценции клеток. Канал BL1 (возбуждающий лазер 488 нм, эмиссионный фильтр 530/30 нм) использовали для регистрации флуоресценции. Значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) использовали для оценки эффективности связывания гибридных белково-пептидных конструкций с клетками. Для каждой белково-пептидной конструкции анализ проводили в трех повторах. Полученные зависимости MFI от pH аппроксимировали с помощью программы Origin 8.1 (OriginLab, США) функцией $MFI = (F_a - F_b \cdot 10^{m(pH-pK_a)}) / (1 - 10^{m(pH-pK_a)})$, где F_a - кислотная основа, F_b - базовая линия, m — наклон перехода, а pK_a — середина кривой [232].

3.2.17. Анализ жизнеспособности клеток

Тест МТТ (метилтиазолилдифенилтетразолия бромид) использовали для определения цитотоксичности EGFP-pHLIPwt при pH 7,4 или при pH 6,2 в различных концентрациях (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 и 10 мкМ) против клеток HeLa. Клетки высевали на 96-луночные планшеты, содержащие DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) с плотностью 104 клеток на каждую лунку, и инкубировали при 37°C в течение ночи. После этого среду удаляли и заменяли свежей средой, содержащей различные концентрации EGFP-wt pHLIP при pH 7,4 или при pH 6,2, и клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Затем среду удаляли, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) в бессывороточной культуральной среде и далее инкубировали планшет при 37°C в течение 3 ч. Затем супернатант удаляли и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Считыватель микропланшетов Infinite 1000 Pro (Tecan, Австрия) использовали для измерения оптической плотности при 570 и 640 нм. Уровень жизнеспособных клеток оценивали в $3 \cdot 10^4$ клеток. Все образцы были протестированы в трех независимых экспериментах.

3.2.18. Ингибирование эндоцитоза

Клетки HeLa высевали в 96-луночный планшет (10^4 клеток/лунку) в среде DMEM и выращивали в течение ночи. Затем в среду для культивирования клеток добавляли ингибиторы эндоцитоза хлорпромазин, нистатин и винбластин до конечной концентрации 30 мкМ, 50 мкМ и 3 мкМ соответственно и инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 30 мин. Доза каждого ингибитора была выбрана в соответствии с предыдущими исследованиями [233, 234, 235, 236]. Затем культуральную среду удаляли, добавляли раствор EGFP-pHLIP с концентрацией 2 мкМ (pH 6,2), содержащий соответствующий ингибитор в вышеуказанной концентрации, и клетки инкубировали в течение 5 мин или 15 мин при 37°C. Затем раствор белка удаляли, клетки промывали PBS, добавляли культуральную среду с соответствующей концентрацией ингибитора

и инкубировали еще 0, 15, 30 и 60 мин. По окончании инкубации клетки промывали PBS, фиксировали и окрашивали ядра в соответствии с описанным выше протоколом.

3.2.19. Оценка фототоксичности

Клетки HeLa, культивируемые в питательной среде DMEM, содержащей фетальную бычью сыворотку (FBS) до 10%, 1% смесь пенициллин/стрептомицина и 2 мМ L-глутамин, засеивали в 96-луночные планшеты в количестве 10^4 клеток на лунку и растили в течение ночи. Далее проводили инкубацию исследуемых конструкций с клетками HeLa при концентрациях заданных концентрациях (0,08, 0,2, 0,512, 1,28, 3,2, 8, 20 мкМ) в течение 15 мин при 37°C в буферных растворах с заданным значением pH 6,2 и содержащих 50мМ фосфата, 100мМ NaCl с добавлением FBS до 10%. По окончании инкубации удаляли белковые растворы из лунок планшета, вносили 100 мкл PBS и облучали диодной матрицей в течение 30 мин. После этого клетки переводили в среду DMEM с 10% FBS и инкубировали в течение суток в CO₂-инкубаторе. Для облучения клеток, обработанных белком, использовали панель светодиодов, полностью покрывающих площадь 96-ти луночного планшета. Максимум эмиссии света равнялся 460 нм (для возбуждения miniSOG). Мощность диодов и время экспозиции подбирались так, чтобы клетки не теряли жизнеспособность в отсутствие фототоксичного белка. Для оценки фототоксичности использовали МТТ-тест.

Для экспериментов по фотообесцвечиванию и фототоксичности белок miniSOG возбуждался светодиодами (460 нм, рис. 5). Использовалась панель светодиодов, полностью покрывающая площадь 96-луночного планшета. Мощность диода (10 мВт/см^2) и время экспозиции были выбраны таким образом, чтобы клетки не теряли жизнеспособность в отсутствие фототоксичного белка и белок miniSOG был полностью фотообесцвечен. Темновая токсичность и фототоксичность miniSOG-pHLIPwt определяли с помощью теста МТТ (метилтиазолилдифенил-тетразолий бромид). Клетки засеивали в 96-луночные планшеты в количестве 10^4 клеток на лунку и выращивали в течение ночи. Дальнейшая инкубация клеток HeLa с miniSOG-pHLIPwt в концентрациях 0,08, 0,2, 0,512, 1,28, 3,2, 8 и 20 мкМ проводилась в течение 15 мин при 37 °C в буферных растворах со значением pH 6,2 (50 мМ фосфата, 100 мМ NaCl с добавлением 10% FBS). Все образцы тестировались в трех повторностях. По окончании инкубации растворы miniSOG-pHLIPwt удалялись, а планшет дважды промывался PBS. Затем для оценки темновой токсичности добавлялось 100 мкл полной среды, и клетки инкубировались в течение ночи при 37°C в присутствии 5% CO₂. Для исследований фототоксичности в каждую лунку добавлялось 100 мкл PBS, и планшет подвергался воздействию светового облучения в течение 30 мин. После воздействия света PBS удаляли, добавляли 100 мкл полной среды, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в присутствии 5% CO₂. Затем в каждую лунку добавляли

5 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) в PBS, и планшет инкубировали при 37 °С в присутствии 5% CO₂ в течение 3 ч. Затем супернатант сливали и добавляли 100 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Для измерения разницы поглощения при 570 и 640 нм был использован микропланшетный ридер Infinite 1000 Pro (Tecan, Австрия). Далее были построены кривые выживаемости клеток и определена концентрация полувывиваемости IC₅₀. Для определения фототоксичности miniSOG-pHLIPwt при различных значениях pH был проведен эксперимент, аналогичный описанному выше, с той разницей, что инкубацию клеток с miniSOG-pHLIPwt проводили в концентрации 5 мкМ в диапазоне pH от 6,0 до 7,4. Была получена кривая выживаемости и определено значение pH полувывиваемости.

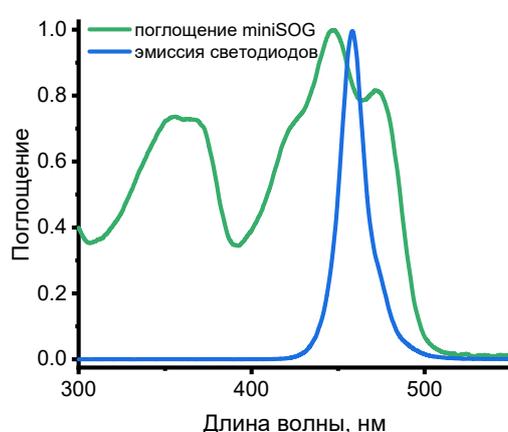


Рисунок 5. Нормированный спектр поглощения miniSOG и нормированный спектр излучения светодиодов, использованных для экспериментов по фотообесцвечиванию и фототоксичности.

3.2.20. Определение фототоксичности при помощи окрашивания клеток трипановым синим

Для определения фототоксичности miniSOG-pHLIPwt с помощью трипанового синего использовали протоколы, описанные выше (раздел 3.2.18), за исключением того, что клетки инкубировали в 5 мкМ растворах miniSOG-pHLIPwt при pH 6,2 и 7,4. После облучения клетки инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 4 часов, а не в течение ночи. Затем культуральную среду удаляли, добавляли 100 мкл 0,01% раствора трипанового синего в PBS и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Визуализацию проводили с помощью микроскопа Leica DMI6000 (Leica Microsystems, Германия) в режиме яркого поля без вымывания красителя.

3.2.21. Генерация АФК в кювете

Для обнаружения генерации АФК под действием miniSOG-pHLIPwt использовали АФК-чувствительный краситель 1,3-дифенилизобензофуран (DPBF, Carbosinth, Великобритания). Конечные концентрации miniSOG-pHLIPwt и DPBF в реакционной смеси составляли 10 и 30

мкМ, соответственно. Аналогичным образом был приготовлен контрольный образец DPBF без miniSOG-pHLIPwt. Регистрировали спектры поглощения полученных образцов, затем проводили их облучение светодиодной панелью с длиной волны 460 нм в течение 5 мин и снова регистрировали спектры поглощения. Для предотвращения фотодеградации DPBF использовали низкую интенсивность света (20 мкВт/см²).

3.2.22. Генерация АФК в живых клетках

Для обнаружения генерации АФК под действием miniSOG-pHLIPwt в живых клетках использовали флуорогенный краситель 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (6-carboxy-H₂DCFDA, Lumiprobe, Россия). Клетки HeLa высевали в 96-луночный планшет (10⁴ клетки на лунку) и выращивали в течение ночи. Клетки дважды промывали PBS, добавляли свежую бессывороточную среду, содержащую 6-карбокси-H₂DCFDA в конечной концентрации 10 мкМ, и инкубировали в течение 15 мин при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки дважды промывали PBS, добавляли раствор, содержащий 1 мкМ miniSOG-pHLIPwt при pH 6,2 и 10 мкМ карбокси-H₂DCFDA, и инкубировали 15 мин при 37°C и 5% CO₂. Контрольные клетки обрабатывали растворами 6-карбокси-H₂DCFDA (10 мкМ) в течение 30 мин или раствором miniSOG-pHLIPwt (1 мкМ, pH 6.2) в течение 15 мин при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки дважды промывали PBS и облучали светодиодной панелью с длиной волны 460 нм (10 мВт/см²) в течение 15 мин. Визуализацию проводили с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 980 (ZEISS Microscopy, Германия).

3.2.23. Гель-фильтрационный анализ белков для определения олигомерного состояния

Образцы исследуемых белков концентрацией 1,5 мг/мкл наносили на гель-фильтрационную колонку (300×10 мм) с сорбентом Superdex 200 (Bio-Sciences, Швеция), уравновешенную буфером ST1. Гель-фильтрационный анализ проводили при помощи оборудования АСТА FPLC со скоростью потока 0,5 мл/мин. Детекцию белковых фракций осуществляли при 280 нм.

3.2.24. Анализ распределения гибридной конструкции на модели in vivo

Эксперимент на животных одобрен Комиссией по контролю за содержанием и использованием животных Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (протокол 368/2022 от 19.12.2022). Самки мышей линии Balb/c (в возрасте 8-ми недель) были куплены в лицензированном питомнике Пущино, поставляющем

свободных от патогенной флоры животных. Животных содержали в условиях с неограниченным доступом к пище и воде.

Для получения подкожной модели опухоли суспензию клеток ЕМТ6 (2×10^6 клеток) в 100 мкл бесывороточной питательной среды инокулировали в правый бок. Изучение биораспределения в организме животного начинали при достижении опухолью объема 300 мм^3 . Примерно через 2 недели после прививки опухоли животным в ретроорбитальный синус вводили 100 мкл 60 мкМ гибридной конструкции. Ее распределение в организме животного оценивали *ex vivo* с помощью прибора биовизуализации LumoTrace FLUO (Абисенс, Россия).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время активно разрабатываются подходы для осуществления адресной доставки противоопухолевых агентов. Особый интерес вызывает нацеливание на кислотное микроокружение опухоли, поскольку пониженное значение внеклеточного рН можно рассматривать как универсальное свойство раковых клеток. Многообещающим и активно развивающимся методом для реализации данного типа нацеливания является доставка различных агентов при помощи пептидов рНЛIP.

К настоящему времени получен массив данных по применению пептидов семейства рНЛIP при доставке к злокачественным новообразованиям ряда низкомолекулярных визуализирующих и терапевтических агентов. Как было описано выше, имеется значительное количество сообщений по применению пептидов рНЛIP в сочетании с пептидно-нуклеиновыми кислотами, наночастицами, липосомами для получения противораковых агентов.

Привлекательным является направление по доставке белковых терапевтических молекул к опухоли при помощи рНЛIP, поскольку, с одной стороны, терапевтические средства на основе белков пользуются большим успехом в клинике и их лечебный потенциал общепризнан [211, 212, 237], с другой стороны, конструкции данного типа являются полностью генетически кодируемыми, что облегчает их получение за счет сочетания стандартных протоколов генной инженерии и бактериальной наработки рекомбинантных белков. Однако до недавних пор данный подход слабо реализован. Только в последние пару лет стали чаще появляться сообщения такого рода, и к настоящему времени известно о получении шести конструкций на основе сочетания белков и рНЛIP [213, 214, 220, 226, 228, 230]. Все они содержали последовательность исходного пептида рНЛIPwt. Однако ранее сообщалось о получении различных мутантных вариантов рНЛIP, обладающих улучшенными рН-чувствительными свойствами в сравнении с исходным пептидом, что было продемонстрировано как на клеточных, так и на животных моделях. Таким образом, целью данной работы являлось более подробное изучение совместимости рНЛIP-технологии с высокомолекулярными белковыми компонентами для определения перспективности ее применения. Как известно, основным фактором, определяющим активность белковой молекулы, является приобретение ею определенной вторичной и третичной структуры. В случае флуоресцентных белков (ФБ) правильное фолдирование обеспечивает автокаталитический биосинтез хромофора. В данном исследовании в качестве белкового модельного груза, доставляемого при помощи пептидов рНЛIP, были выбраны именно ФБ, поскольку по эффективности синтеза хромофора можно было бы судить о степени влияния пептидов рНЛIP на первоначальные свойства белковой нагрузки. В настоящей работе был получен и детально изучен ряд гибридных рН-чувствительных конструкций на основе различных вариантов рНЛIP в сочетании с несколькими белковыми компонентами, представленными

флуоресцентными белками, в том числе и фототоксичными. В ходе выполненного исследования разработаны методики для тестирования данного типа конструкций на клеточных моделях, установлены принципиально важные условия для получения белковых рН-чувствительных структур, продемонстрированы их свойства. При помощи результатов, полученных в ходе выполнения работы в рамках данной кандидатской диссертации, можно обосновать отсутствие должного количества сообщений, которых действительно заслуживает направление по получению гибридных белковых конструкций с использованием пептидов рНЛIP.

4.1. Гибридные конструкции флуоресцентного белка EGFP с пептидами рНЛIP

Для подробного изучения перспективности использования рНЛIP-технологии по доставке различных белковых макромолекул к опухоли сначала были получены и изучены гибридные конструкции на основе нескольких вариантов пептидов рНЛIP в сочетании с белковым компонентом. Последний был представлен зеленым флуоресцентным белком EGFP, выполняющим роль как модельного груза, переносимого при помощи рНЛIP, так и флуоресцентной метки, обладающей высокой яркостью. На данном этапе работы в качестве рН-чувствительной составляющей были выбраны два варианта пептида: исходный рНЛIPwt и его укороченный мутантный вариант рНЛIPvar3 [46, 80], который, как сообщалось ранее, обладал улучшенными по сравнению с рНЛIPwt показателями накопления в опухолях при доставке низкомолекулярных красителей.

4.1.1. Дизайн и получение генетически кодируемых конструкций EGFP/рНЛIP

При разработке дизайна целевых гибридных конструкций были учтены особенности взаимодействия рН-чувствительных пептидов с клеточными мембранами. Известно, что в результате встраивания пептидов рНЛIP в липидный бислой происходит транслокация их С-концевого фрагмента в цитоплазматическое пространство клетки [94]. В связи с этим конструкции были представлены ФБ EGFP, несущем на N-конце гексагистидиновую (6-His) метку и на С-конце последовательности рНЛIPwt или рНЛIPvar3 (рис. 6а, б). Стоит отметить, что в данном исследовании последовательность белка EGFP была укорочена (см. приложение, рис. П1). Был исключен неупорядоченный С-концевой фрагмент EGFP, представленный семью аминокислотами (а.к.). Вместо него был использован короткий пептидный линкер –GS–, соединяющий белковую часть в виде EGFP с пептидом рНЛIP.

Поскольку данные конструкции являются полностью генетически кодируемыми, то для их дальнейшей наработки сначала были получены гены, кодирующие последовательности укороченного ФБ EGFP, GS–линкера и рН-чувствительных пептидов в одних и тех же рамках считывания. Затем целевые гены были клонированы в модифицированный бактериальный вектор

pET-24a, несущем ген 6-His-метки перед сайтом множественного клонирования. Проводили трансформацию бактериальных клеток *E. Coli* штамма BL21 (DE3) полученными плазмидами, наработку и выделение белково-пептидных конструкций в соответствии с описанными протоколами (см. раздел 3.2). Целостность гибридных конструкций подтверждали с помощью гель-электрофореза в SDS-полиакриламидном геле (см. приложение, рис. П2а).

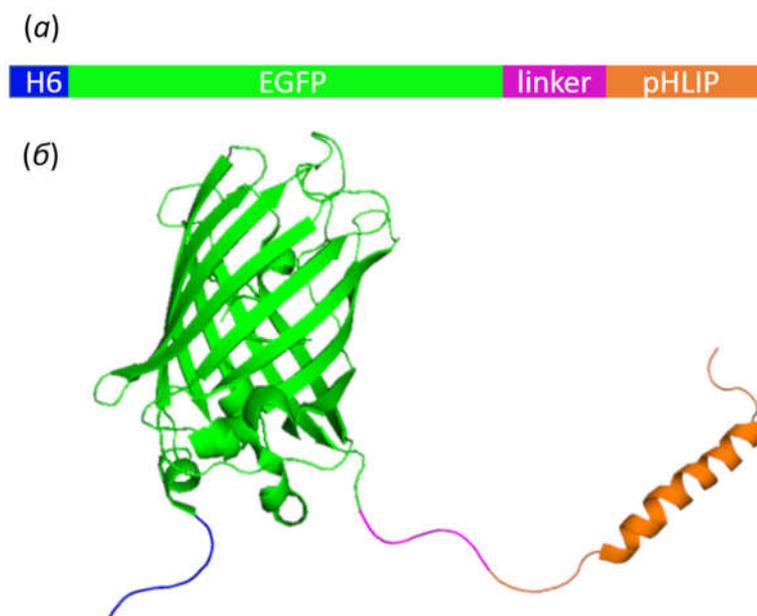


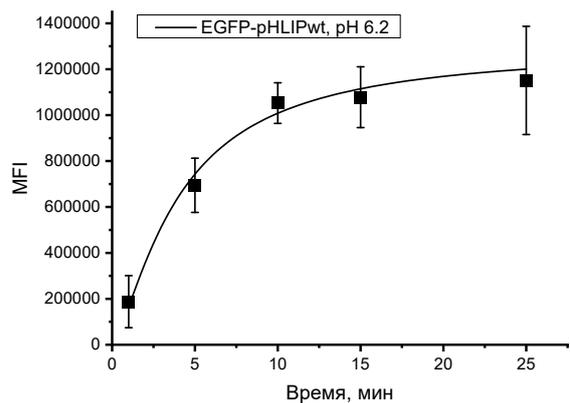
Рисунок 6. Упрощенная схема (а) и пространственная модель (б) гибридных конструкций. Гексагистициновая метка обозначена синим цветом, флуоресцентный белок – зеленым, линкер (linker) – лиловым, pHLLP – оранжевым.

4.1.2. Подбор оптимальных условий тестирования конструкций EGFP/pHLIP

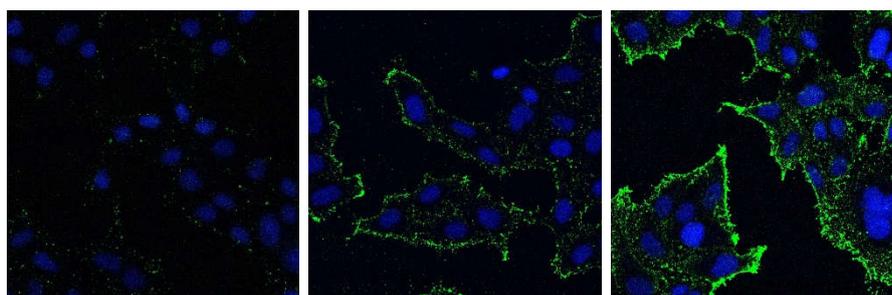
Ввиду отсутствия достаточного количества литературных данных, связанных с тематикой данной работы, важной задачей являлась отработка условий для тестирования белково-пептидных конструкций на клеточных моделях, которые не вредили бы клеткам в ходе экспериментов и обеспечивали воспроизводимость результатов. Был определен состав буферов для получения пониженных значений pH. В зависимости от необходимого значения pH использовалось различное соотношение солей фосфатов (NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4), но всегда в финальной концентрации 50 мМ, с добавлением NaCl до 100 мМ и FBS до 10%. Отсутствие последнего компонента вызывало преждевременную гибель многих клеточных линий, особенно при значениях $\text{pH} < 6.4$. При инкубации клеток линий клеток SKBR3 и HeLa в буферах данного состава от значений pH 6,0 до 7,4 при 37°C морфология клеток оставалась прежней, по крайней мере в течение 30 мин, и незначительно менялась при использовании буферов с $\text{pH} < 6.0$.

Чтобы изучить способность вариантов EGFP/pHLIP связываться с клеточной мембраной, при помощи метода проточной цитофлуориметрии был осуществлен подбор оптимального времени инкубации исследуемых конструкций с клетками HeLa. В ходе культивирования клеточной линии HeLa было замечено, что при закислении клетками среды до значения pH 6,2 их морфология остается неизменной, а по возвращении стандартных условий культивирования скорость их роста не нарушается. Исходя из этого, эксперимент по подбору оптимального времени инкубации разработанных конструкций проводили при значении pH 6,2. Также был проведен предварительный эксперимент по связыванию полученных конструкций EGFP/pHLIP при pH 6,2 и 7,4 с использованием метода флуоресцентной микроскопии, в ходе которого было установлено, что все конструкции не активны при нейтральном значении pH. Однако при пониженном значении pH все тестируемые конструкции демонстрировали связывание с клеточными мембранами, и лучшей оказалась конструкция EGFP-GS-pHLIPwt. Таким образом, дальнейшие эксперименты по подбору оптимальных условий тестирования проводили с использованием последней конструкции.

Подбор оптимального времени инкубации осуществляли методом проточной цитофлуориметрии. В течение первых 10 минут эксперимента наблюдался значительный рост флуоресцентного сигнала в зеленом канале, свидетельствующий о связывании конструкции EGFP-GS-pHLIPwt с клетками (рис. 7а). Дальнейшая инкубация привела к незначительному увеличению связавшейся конструкции. Полученные результаты были подтверждены методом конфокальной флуоресцентной микроскопии (рис. 7б). Таким образом, было принято решение проводить инкубацию исследуемых конструкций с клетками HeLa в течение 15 мин для последующих экспериментов.



а)

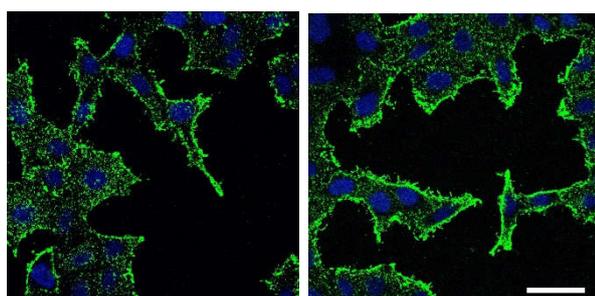


Время, мин

1

5

10



б) Время, мин

15

25

Рисунок 7. Связывание EGFP-GS-pHLIPwt с клетками HeLa при pH 6,2 в зависимости от времени, изученное с помощью проточной цитофлуориметрии (а) и конфокальной микроскопии (б). Масштабный отрезок 50 мкм.

4.1.3. pH-зависимое связывание гибридных конструкций с клеточной мембраной по данным флуоресцентной микроскопии

Для анализа связывания полученных гибридных конструкций с раковыми клетками при понижении pH был использован метод конфокальной флуоресцентной микроскопии. Инкубацию исследуемых конструкций с клетками HeLa проводили при концентрации 2 мкМ. Переход от нейтрального pH к кислому осуществляли с шагом в 0.2 единицы. Таким образом, был охвачен диапазон значений pH от 7,4 до 6,0.

При нейтральных значениях pH клетки, обработанные EGFP-GS-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPvar3, обладали низким значением флуоресцентного сигнала, сопоставимым с контрольными клетками, обработанными EGFP (см. приложение, рис. П3). Однако при $\text{pH} < 6.8$ наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с $\text{pK}_a \sim 6.4$, при этом связывание конструкции, содержащей pHLIPwt, было в несколько раз эффективнее (рис. 8а, б).

Согласно литературным данным, встраивание пептида pHLIPwt в мембраны клеток происходит с переносом его С-конца в цитоплазматическое пространство [48, 65, 66]. Ранее сообщалось, что максимальная нагрузка, конъюгированная на С-конец пептида pHLIPwt и не препятствующая эффективному связыванию такой конструкции, составляла 7 кДа [140]. Для подтверждения механизма встраивания пептидов pHLIP и определения его максимально допустимой С-концевой нагрузки нами была получена новая конструкция, несущая флуоресцентный белок на С-конце пептида pHLIP. Поскольку ранее было обнаружено, что наиболее эффективной оказалась конструкция EGFP-GS-pHLIPwt, было принято решение получить обратную конструкцию только с использованием pHLIPwt. Новая конструкция pHLIPwt-EGFP была протестирована аналогичным образом. В этом случае значительный уровень зеленого флуоресцентного сигнала наблюдался (рис. 9) только при $\text{pH} < 6.4$. В ходе данного эксперимента наблюдалось pH-зависимое связывание инвертированной конструкции, усиливающееся при понижении pH, однако оно было менее эффективным в сравнении с EGFP-GS-pHLIPwt.

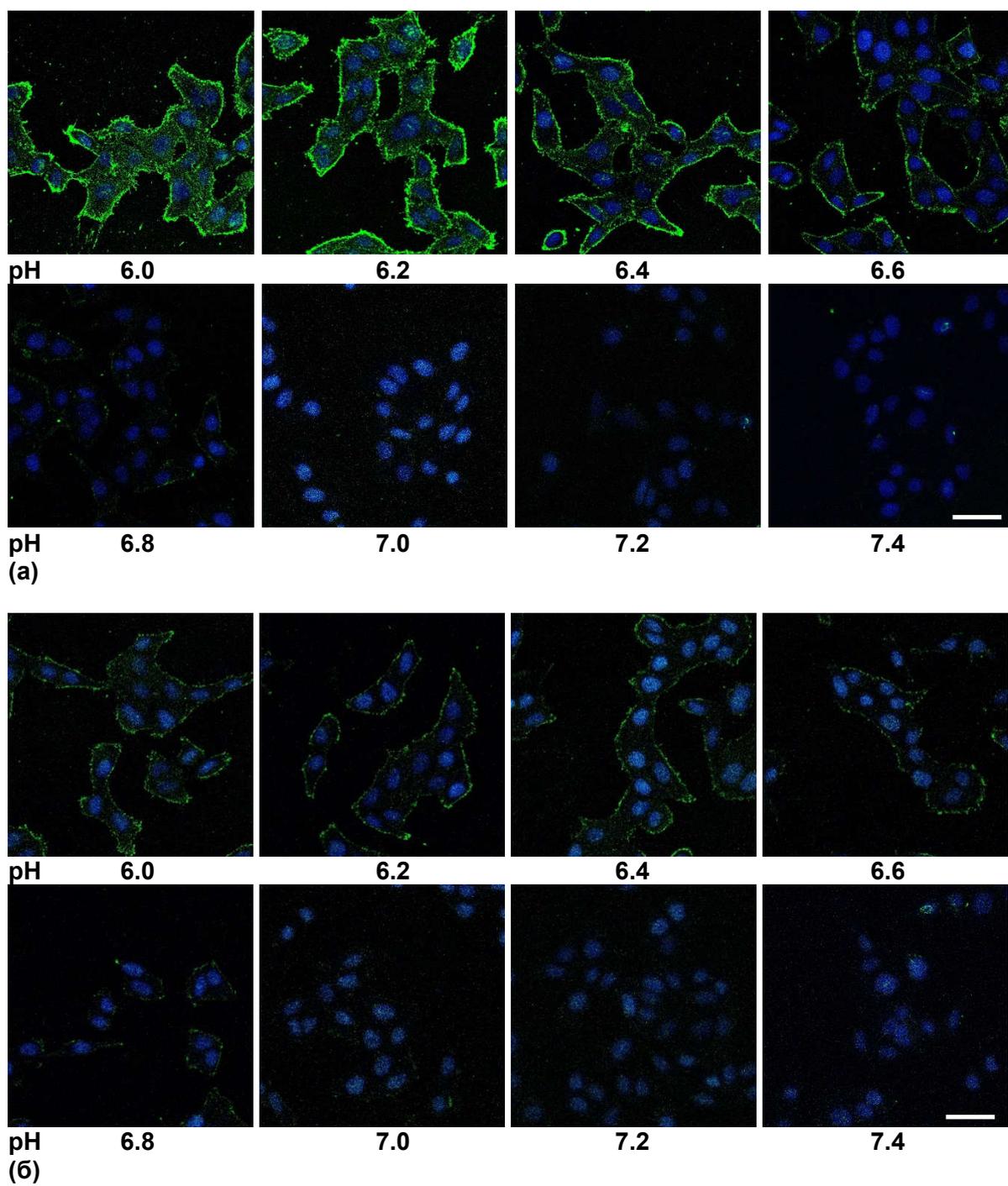


Рисунок 8. pH-зависимое связывание конструкций EGFP-GS-pHLIPwt (a) и EGFP-GS-pHLIPvar3 (б) с клетками HeLa. Масштабный отрезок 50 мкм.

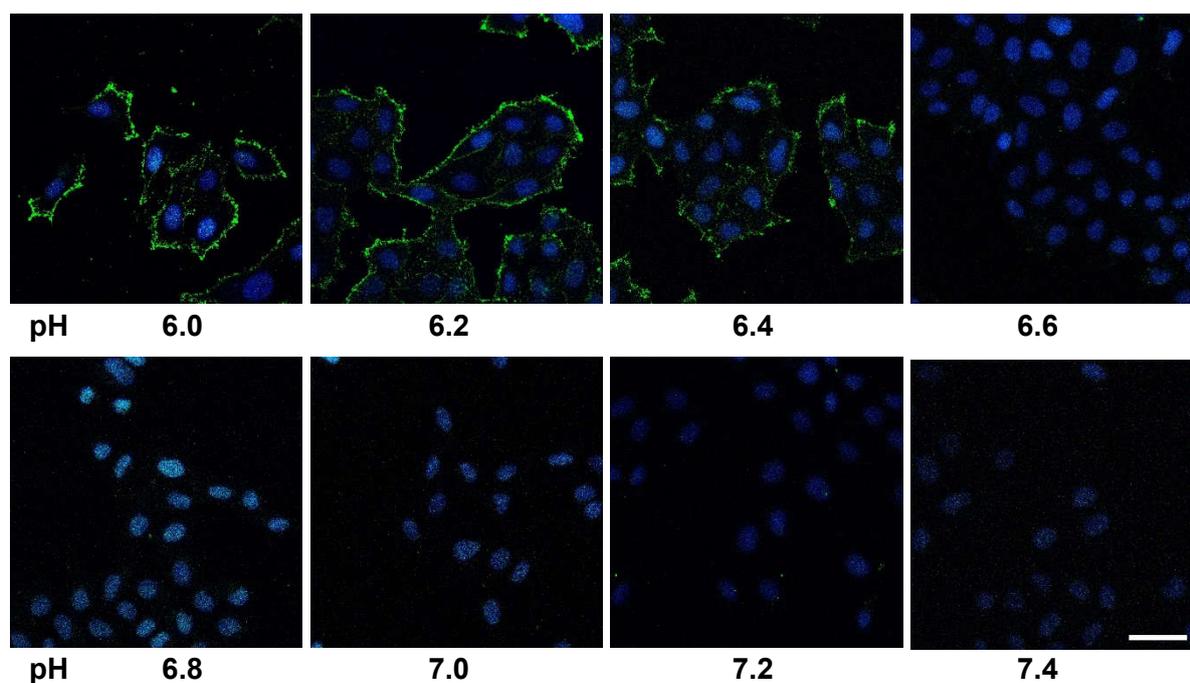


Рисунок 9. pH-зависимое связывание конструкций pHLIPwt-EGFP с клетками HeLa. Масштабный отрезок 50 мкм.

4.1.4. pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIP с клетками HeLa по результатам анализа методом проточной цитометрии

Для получения более подробной информации о динамике связывания конструкций EGFP/pHLIP с клетками HeLa при понижении pH было проведено их исследование при помощи метода проточной цитофлуориметрии. В данном эксперименте мы использовали более широкий диапазон значений pH, сдвинутый в кислую область – от 5,6 до 7,4 с шагом 0,2 единицы. На основе результатов исследования при помощи флуоресцентной микроскопии сперва была протестирована конструкция, демонстрирующая лучшее связывание – EGFP-GS-pHLIPwt. Ее изучение проводили при трех различных концентрациях (0,5, 1 и 2 мкМ). Было показано, что концентрация не влияет на значение константы кислотно-основного процесса, которая составила примерно 6,4 (рис. 10а). Конструкции EGFP-GS-pHLIPvar3 и pHLIPwt-EGFP тестировали уже только при одной концентрации – 1 мкМ.

При нейтральных значениях pH клетки, обработанные EGFP-GS-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPvar3 (1,0 мкМ), продемонстрировали очень низкий уровень флуоресцентного сигнала из-за их ограниченного связывания с мембраной, сопоставимым с контрольным EGFP. Однако при pH ниже 6,8 наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с pKa около 6,4 (рис. 10а). Конструкция pHLIPwt-EGFP также связывалась с клетками при понижении pH, однако значение pKa данного процесса было смещено в кислую область по сравнению с предыдущими конструкциями и составило 5,9. Также, как и в экспериментах с микроскопией,

EGFP-GS-pHLIPvar3 и pHLIPwt-EGFP показали более низкий сигнал флуоресценции при пониженных значениях pH по сравнению с EGFP-GS-pHLIPwt (рис. 10б и 10в).

По данным проточной цитофлуориметрии, EGFP-GS-pHLIPwt связывается в 6-8 и 10 раз эффективнее, чем инвертированная конструкция pHLIPwt-EGFP и EGFP-GS-pHLIPvar3, соответственно. Чтобы исключить возможный вклад неспецифических взаимодействий конструкций при низких значениях pH, мы проверили способность свободного EGFP связываться с клетками HeLa. В этом случае регистрировался очень низкий уровень фоновой флуоресценции клеток во всем диапазоне исследуемых значений pH (рис. 10б).

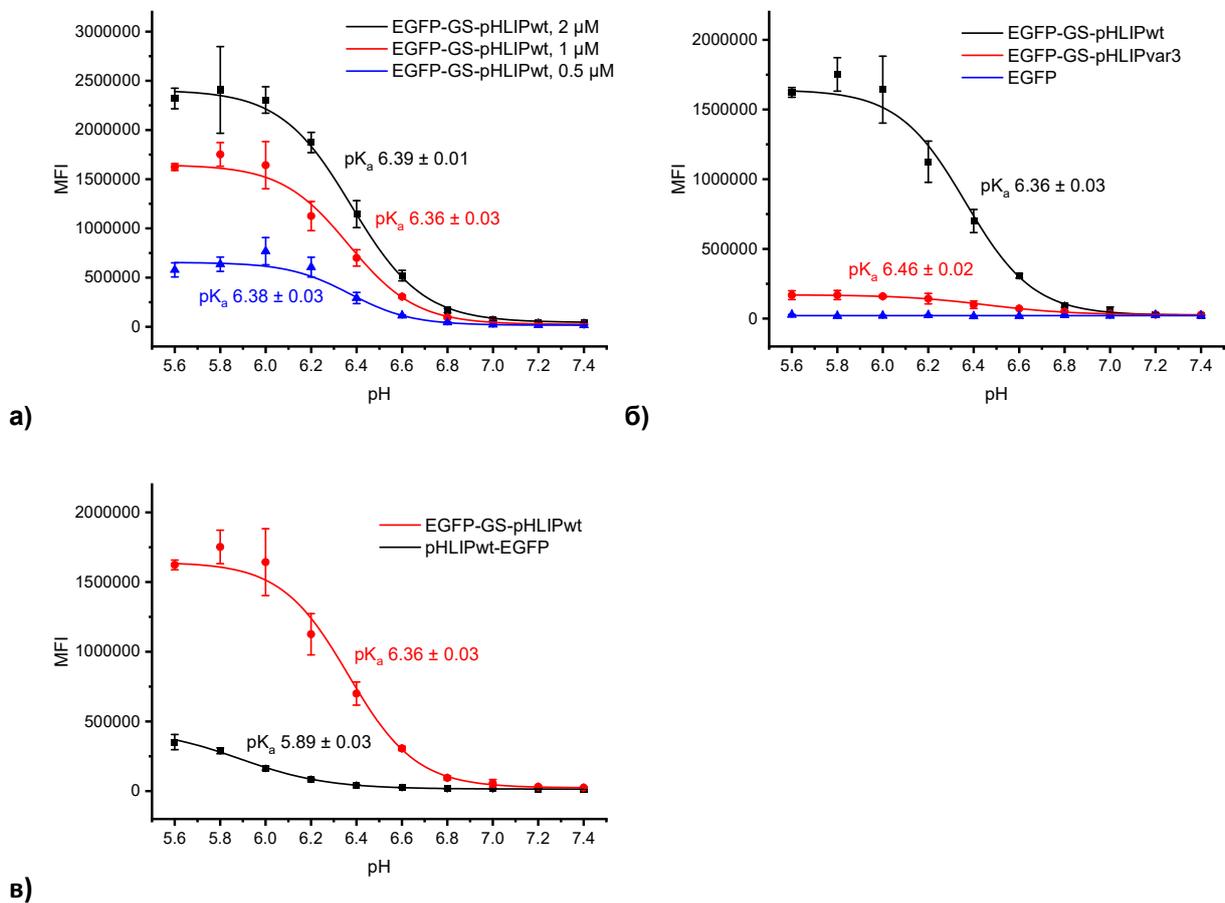
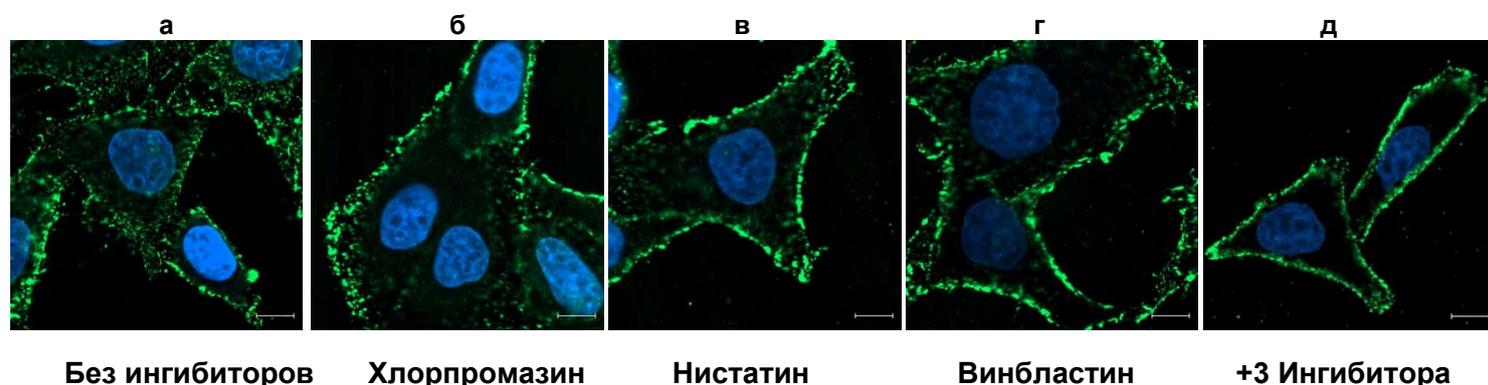


Рисунок 10. Проточная цитофлуориметрия при различных концентрациях EGFP-GS-pHLIPwt (а), в присутствии 1 мкМ EGFP-GS-pHLIPwt, EGFP-GS-pHLIPvar3 или EGFP (б) и в присутствии 1 мкМ EGFP-GS-pHLIPwt или инвертированной конструкции pHLIPwt-EGFP (в).

4.1.5. Изучение интернализации EGFP-pHLIPwt клетками HeLa

Ранее было показано, что pHLIP транслоцирует низкомолекулярные грузы, прикрепленные к его С-концу, через клеточную мембрану в цитоплазматическое пространство, минуя эндоцитарное поглощение [124, 125]. Однако на полученных конфокальных изображениях помимо мембранного связывания наблюдались и внутриклеточные флуоресцентные сигналы, локализованные по всей цитоплазме, что указывает на некоторые другие механизмы интернализации EGFP-GS-pHLIPwt. Поэтому была выдвинута гипотеза, что конструкции, в которых высокомолекулярные грузы связаны с N-концом pHLIP, могут быть интернализированы путем клеточного эндоцитоза.

Для выяснения механизмов внутриклеточного проникновения была выполнена серия экспериментов со специфическими ингибиторами эндоцитоза. В качестве ингибиторов клатрин- и кавеолин-зависимого эндоцитоза были использованы хлорпромазин и нистатин, соответственно, а в качестве ингибитора микропиноцитоза – винбластин [233, 234, 235, 236]. Клетки были предварительно проинкубированы в среде DMEM, содержащей все три ингибитора одновременно или каждый ингибитор в отдельности. Затем проводили инкубацию клеток в 2 мкМ растворе EGFP-GS-pHLIPwt при pH 6,2, содержащем специфический ингибитор или набор ингибиторов. Также клетки, предварительно не обработанные ингибиторами, были проинкубированы в растворе аналогичного состава. Инкубация была выполнена при 37°C в течение 15 мин, затем проводилась двукратная промывка клеток при помощи PBS, их фиксация 4% раствором формалина и анализ методом конфокальной микроскопии. В результате на полученных снимках почти не наблюдалось различий в локализации флуоресцентных сигналов клеток, обработанных одним ингибитором и без каких-либо ингибиторов (рис. 11а-д).



Без ингибиторов

Хлорпромазин

Нистатин

Винбластин

+3 Ингибитора

Рисунок. 11. Распределение сигнала флуоресценции в клетках, не обработанных ингибиторами (а), обработанных одним ингибитором (б, в, г) и после инкубации с полным набором из трех ингибиторов (д). Масштабная линейка 10 мкм

В этих случаях сигнал был неравномерно локализован как на периферии клеток, так и внутри клетки. Однако при одновременном использовании всех трех ингибиторов преимущественно наблюдался равномерный сигнал по периметру клеток. Таким образом, эти данные подтверждают гипотезу об интернализации EGFP-GS-pHLIPwt за счет эндоцитоза разных типов.

Далее была изучена динамика интернализации EGFP-GS-pHLIPwt. Для этого клетки были проинкубированы в растворе EGFP-GS-pHLIPwt (pH 6,2) в течение 15 мин, после удаления раствора белка был добавлен DMEM с последующей инкубацией 0, 15, 30 и 60 мин (рис. 12). По окончании инкубации клетки были промыты раствором PBS и зафиксированы 4% раствором формалина. В отдельном эксперименте клетки были предварительно проинкубированы с полным набором ингибиторов, а затем обработаны аналогичным образом, описанным выше. В результате на клетках, не подвергавшихся ингибированию эндоцитоза, с течением времени наблюдалось снижение флуоресцентного сигнала и его перемещение с клеточной поверхности в цитоплазматическое пространство. В случае добавления ингибиторов к клеткам сигнал был локализован в основном на клеточной мембране на протяжении всего эксперимента (рис. 11).

Ввиду поглощения конструкции EGFP-GS-pHLIPwt клетками HeLa посредством эндоцитоза, было выдвинуто предположение, что в дальнейшем она может терять свою флуоресценцию за счет последующей протеолитической деградации в лизосомах [238]. Поэтому были получены клетки, обработанные меньшим количеством EGFP-GS-pHLIPwt. Для этого были воспроизведены условия предыдущего эксперимента, за исключением того, что время инкубации с EGFP-GS-pHLIPwt (pH 6,2) было сокращено до 5 мин. При этом практически полное исчезновение флуоресцентного сигнала было обнаружено через 60 мин инкубации в отсутствие ингибиторов (рис. 13), тогда как флуоресценция EGFP-GS-pHLIPwt, локализованная на поверхности клеток после воздействия всех трех ингибиторов, практически не изменилась. Таким образом, можно предположить, что снижение флуоресценции EGFP-GS-pHLIPwt со временем обусловлено в основном эндоцитозом и последующей протеолитической деградацией, а не вымыванием конструкций EGFP-GS-pHLIPwt из клеточной мембраны. Чтобы убедиться, что pH-зависимое поглощение клетками не связано с внутренней токсичностью конструкции EGFP-GS-pHLIPwt и что условия низкого pH не влияют на целостность клеточной мембраны, использовали анализ жизнеспособности клеток HeLa, определенной количественно при помощи метилтиазолилтетразолия (MTT). При обработке клеток в течение ночи различными концентрациями EGFP-GS-pHLIPwt при pH 7,4 и при pH 6,2 (см. раздел 3.2.17), конструкция продемонстрировала превосходную биосовместимость (относительная жизнеспособность клеток >95 %) при концентрациях до 10 мкМ (рис. 14).

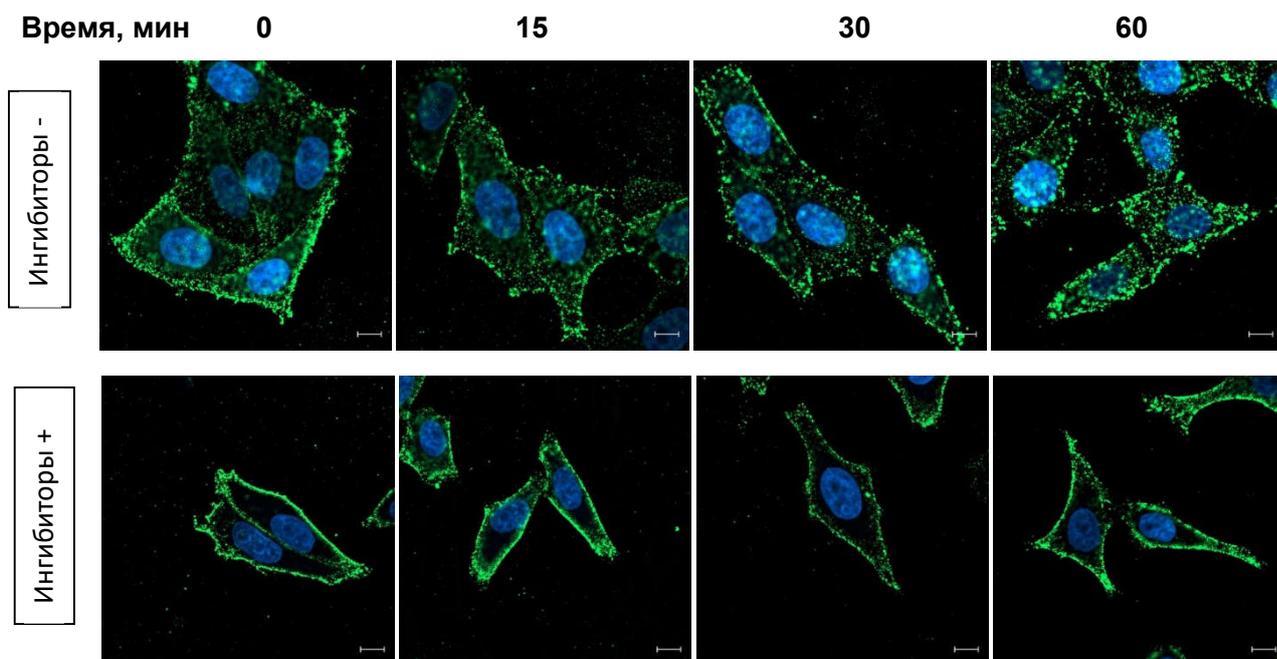


Рисунок 12. Изменение локализации сигналов флуоресценции во времени. Клетки предварительно инкубировали в растворе EGFP-GS-pHLIPwt (pH 6,2) в течение 15 мин с последующей инкубацией в течение 0, 15, 30 и 60 мин в среде DMEM в отсутствие (верхний ряд) или в присутствии ингибиторов эндоцитоза (нижний ряд). Шкала 20 мкм.

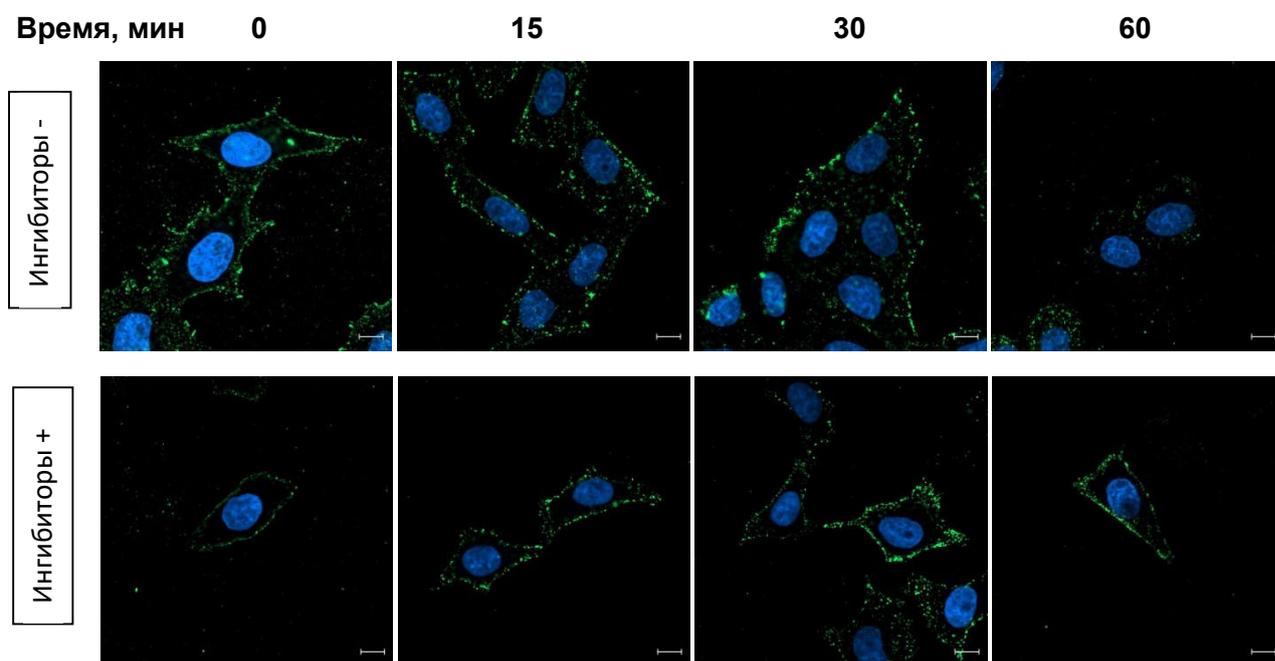


Рисунок 13. Изменение флуоресценции клеток во времени. Клетки предварительно инкубировали в растворе EGFP-GS-pHLIPwt (pH 6,2) в течение 5 мин с последующей инкубацией в течение 0, 15, 30 и 60 мин в среде DMEM в отсутствие (верхний ряд) или в присутствии ингибиторов эндоцитоза (нижний ряд). Масштабный отрезок 10 мкм.

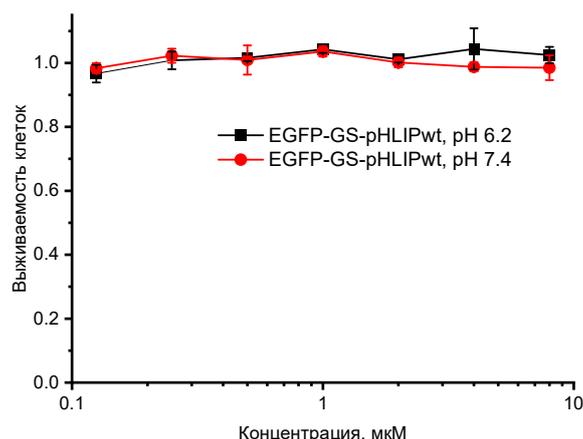


Рисунок 14. Исследование жизнеспособности клеток (анализ МТТ). Жизнеспособность клеток HeLa оценивали при различных концентрациях EGFP-GS-pHLIPwt при pH 7,4 и 6,2.

4.2. Гибридная конструкция на основе белка miniSOG и пептида pHLIP

После подробного изучения свойств конструкций EGFP/pHLIP было принято решение на основе более удачной (EGFP-GS-pHLIPwt) получить новую, содержащую другой белковый груз, для оценки ее pH-зависимого связывания с клетками в сочетании с иным белковым модулем. К тому же, чтобы дополнительно оценить эффективность pHLIP при доставке белковых терапевтических агентов, в качестве новой белковой матрицы был выбран белок miniSOG – флавин-связывающий белок, который является генетически-кодируемым фотосенсибилизатором, способный к генерации синглетного кислорода в результате воздействия света [239]. Был использован улучшенный мутантный вариант miniSOG, с заменами W81L/H85N/M89I/Y98A/L103V (SOPP3), который демонстрирует более высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода ($\Phi \approx 0,60$) [240].

4.2.1. Разработка белково-пептидной фотосенсибилизирующей системы

Для получения pH-чувствительной белково-пептидной фотосенсибилизирующей системы гены, кодирующие последовательности miniSOG, линкера -GNSGS- и pHLIPwt, были собраны в единую рамку считывания (рис. 15) и клонированы в модифицированный бактериальный вектор pET-24a, в результате целевая конструкция несла 6-His-метку на N-конце (см. приложение, рис. П4). Нарботка и выделение белково-пептидной конструкции была выполнена в соответствии с вышеописанными протоколами (см. раздел 3.2). Благодаря наличию гидрофильного белкового компонента, конструкция miniSOG-pHLIPwt обладала отличной растворимостью в воде (до 100 мкМ) в отличие от чрезвычайно гидрофобного характера многих синтетических фотосенсибилизаторов и свободного pHLIPwt, который агрегирует при концентрациях выше 7-8

мкМ [67, 241]. Целостность конструкции подтверждали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза (см. приложение, рис. П26).

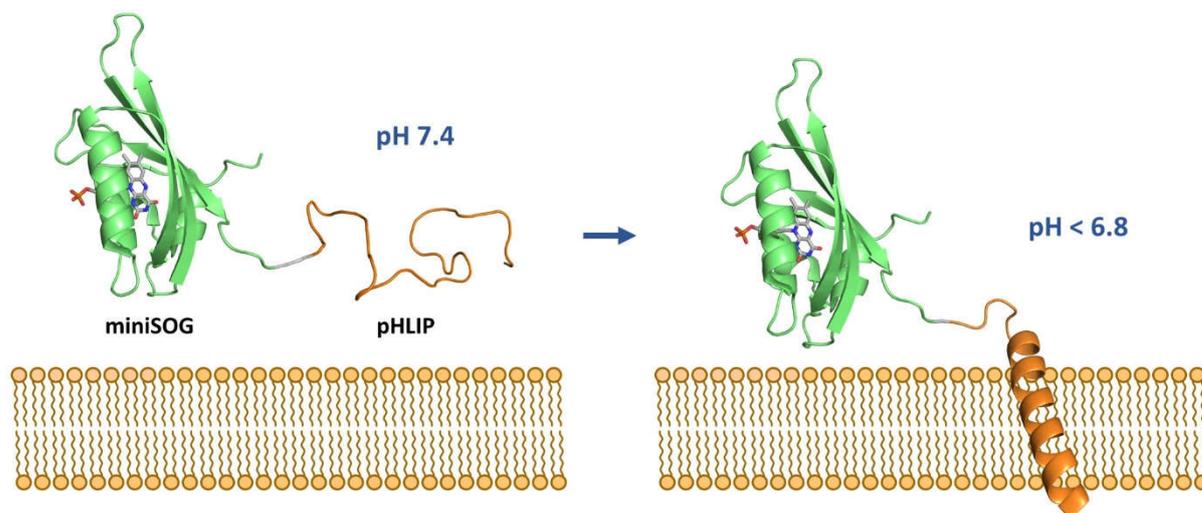


Рисунок 15. Структура гибридной конструкции miniSOG-pHLIPwt и ее pH-зависимое связывание с клеточной мембраной

4.2.2 pH-зависимое связывание miniSOG-pHLIPwt с клетками HeLa

Эксперименты по изучению pH-зависимого связывания проводились по ранее используемым протоколам с использованием двух независимых методов - конфокальной флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии на клетках HeLa. В этих экспериментах связывание miniSOG-pHLIPwt с клетками HeLa не наблюдалось в диапазоне pH 7,4-7,0. Однако при дальнейшем снижении pH клетки, обработанные miniSOG-pHLIPwt, демонстрировали более высокую интенсивность флуоресцентного сигнала, что свидетельствовало о связывании конструкции с клеточной мембраной (рис. 16). Значение pKa данного процесса составило 6,4. В аналогичном эксперименте с белком miniSOG pH-зависимого связывания не наблюдалось.

Для изучения pH-зависимого связывания miniSOG-pHLIPwt с помощью микроскопии конструкция была дополнительно помечена N-гидроксисукцинимидным производным флуоресцентного красителя AlexaFluor488 (~1 молекула красителя была связана с молекулой белка). Дополнительное флуоресцентное мечение было обусловлено тем, что конфокальные изображения, полученные в результате предварительных экспериментов данной конструкции, становились очень тусклыми из-за быстрого фотообесцвечивания miniSOG. Результаты четко показали, что связывание miniSOG-pHLIPwt с клетками HeLa значительно увеличивалось при переходе от диапазона значений pH 7,4 - 6,8 к 6,4 - 6,0, что соотносилось с результатами проточной цитофлуориметрии (рис. 17).

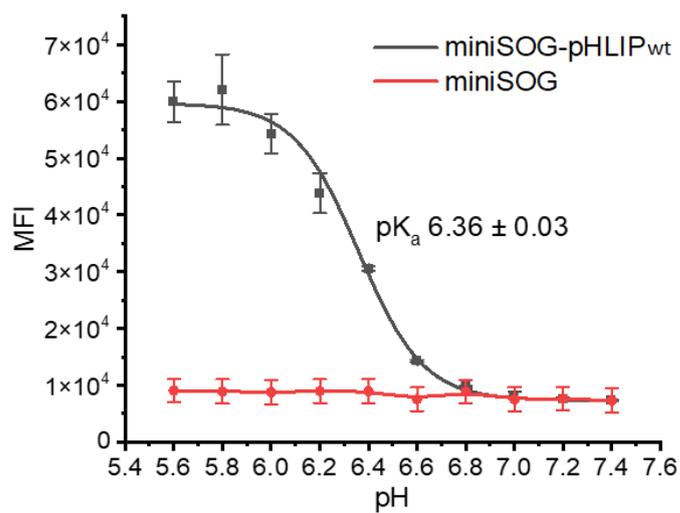
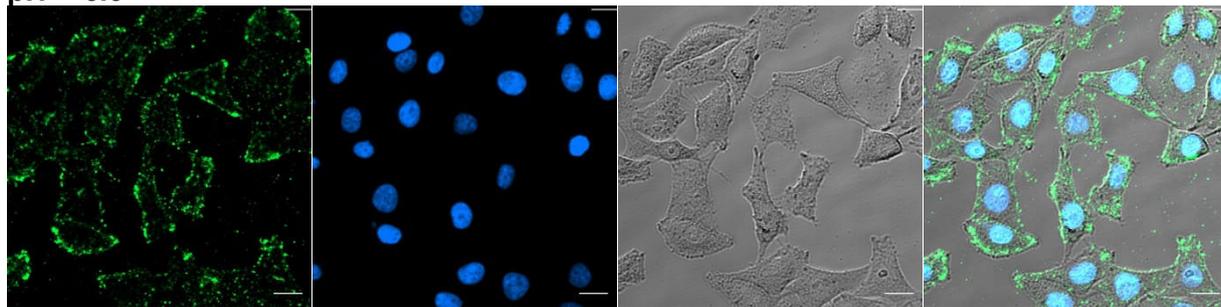
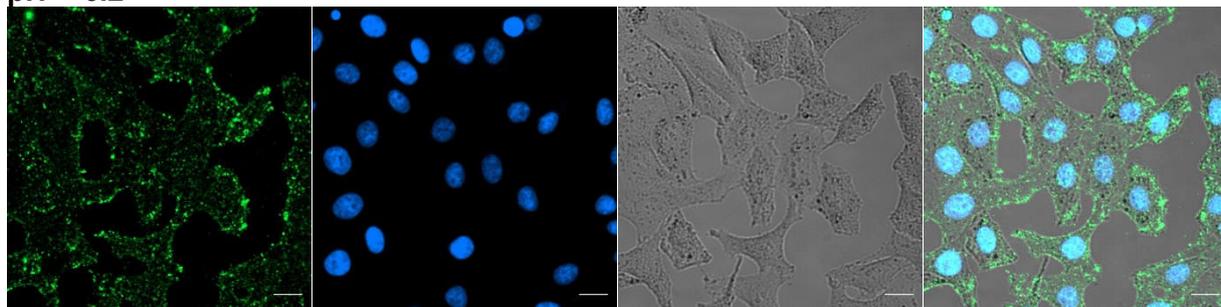


Рисунок 16. Кривые связывания miniSOG-pHLIPwt (черная) и свободного miniSOG (красная) с клетками при различных pH (при концентрации белков 1 мкМ), полученные при помощи метода проточной цитометрии.

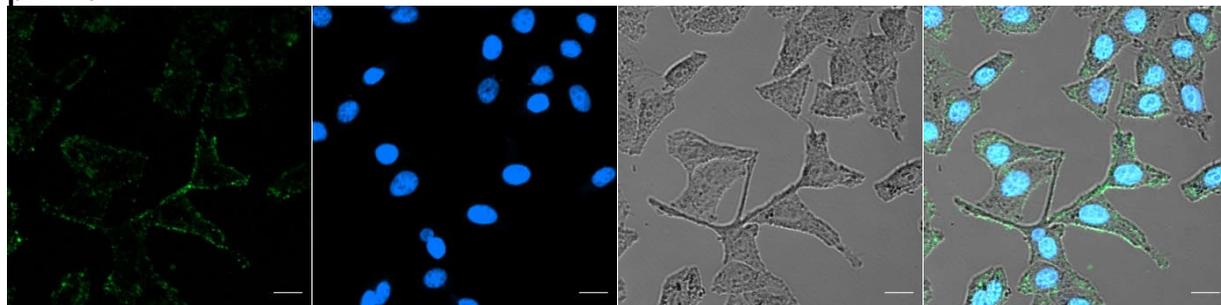
pH 6.0



pH 6.2



pH 6.4



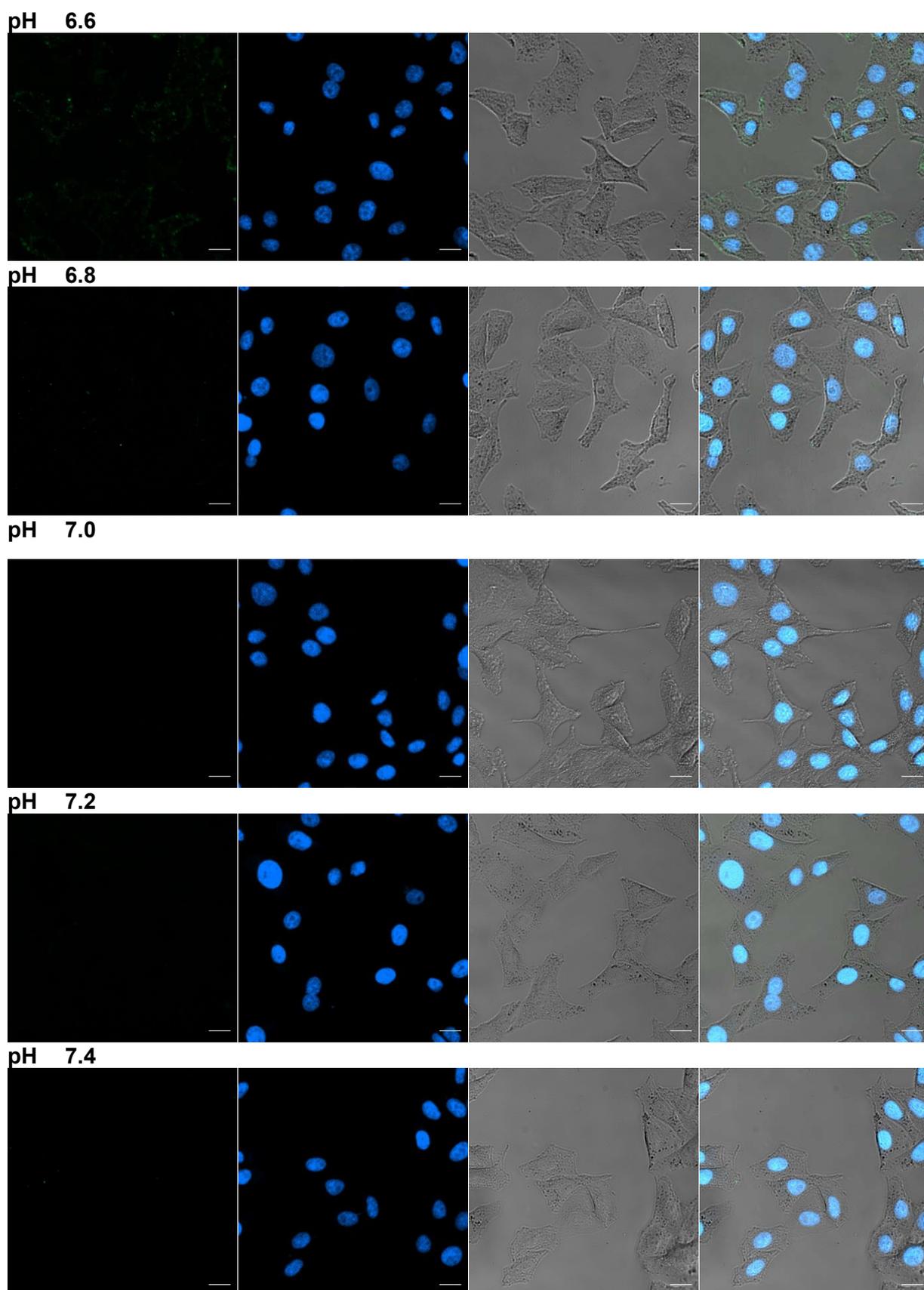


Рисунок 17. pH-зависимое связывание miniSOG-pHLIPwt с клетками HeLa, определенное с помощью конфокальной микроскопии. Слева направо: изображения в зеленом (miniSOG/AlexaFluor488, возбуждение 488 нм, эмиссия 500-550 нм) и синем (Hoechst 33258, возбуждение 405 нм, эмиссия 420-470 нм) каналах флуоресценции, проходящем свете и их наложение. Масштабный отрезок 20 мкм.

4.2.3. Изучение фотоцитотоксичности miniSOG-pHLIPwt на клеточной модели HeLa

Оценка фотоцитотоксического действия miniSOG-pHLIPwt была выполнена при помощи МТТ-теста, основанном на зависимости выживаемости клеток от концентрации белка (рис. 18а-в). Клетки HeLa были обработаны растворами miniSOG-pHLIPwt или miniSOG в качестве контроля при рН 6,2, промыты от несвязанного фототоксина. После к клеткам был добавлен буфер PBS, и проводилось их облучение при заранее выбранных условиях (см. материалы и методы). Затем буфер заменяли культуральной средой и после одного дня инкубации оценивали выживаемость клеток (рис. 18б). Анализ выживаемости клеток был выполнен через сутки после облучения. Согласно полученным данным, конструкция miniSOG-pHLIPwt проявляла фототоксичность со значением $IC_{50} \sim 3,4$ мкМ, тогда как обработка контрольным белком miniSOG не вызывала гибели клеток в тех же условиях (рис. 18б). Эффективность фототоксичности данной конструкции является сопоставимой в сравнении с похожими конструкциями на основе фототоксичных белков и опухоль-ориентирующих пептидов [242]. Фотоцитотоксичность miniSOG-pHLIPwt была также подтверждена окрашиванием клеток трипановым синим в параллельных экспериментах при тех же условиях (рис. 19а-в). Трипановый синий окрашивал мертвые клетки с поврежденными мембранами в синий цвет, которые наблюдались только в случае их обработки miniSOG-pHLIPwt при рН 6,2 (рис 19б), в то время как живые клетки с неповрежденными мембранами оставались неокрашенными. Без воздействия света miniSOG-pHLIPwt не проявлял токсичности при концентрациях до 20 мкМ как при физиологическом, так и при пониженном рН (рис. 18г).

Для оценки рН-зависимой фототоксичности miniSOG-pHLIPwt была выполнена обработка данной конструкцией клеток HeLa в буферах с различными значениями рН. В данном случае концентрация miniSOG-pHLIPwt в конечных растворах с заданным значением рН была постоянной и составила 5 мкМ. Данное значение обусловлено тем, что оно превышает значение IC_{50} (3,4 мкМ), и, предполагалось, являлось достаточным для значительной клеточной гибели. Дальнейшие этапы эксперимента были аналогичны этапам предыдущего. На основе полученных результатов было установлено, что miniSOG-pHLIPwt не проявляет фототоксичности при рН 7,4, тогда как при подкислении она значительно увеличивалась (рис. 18в). Значение рН, при котором наблюдалась гибель 50% клеток ввиду фототоксичности miniSOG-pHLIPwt, составило 6,5 и является достаточно близким к значению pK_a процесса рН-зависимого связывания miniSOG-pHLIPwt с клетками, как было установлено с помощью проточной цитофлуориметрии. В отличие от этого, свободный белок miniSOG не проявлял фототоксичности во всем исследуемом диапазоне значений рН (рис. 18в).

Генерация АФК конструкцией miniSOG-pHLIPwt была подтверждена с помощью сенсоров на основе красителей DPBF и 6-карбокси-H₂DCFDA в кювете и на живых клетках, соответственно. DPBF теряет свою абсорбцию в области 400 нм в присутствии АФК, хорошо растворяется в органических растворителях, в то время как в водных растворах он агрегирует. Была проверена растворимость DPBF в смеси PBS:ДМСО и обнаружено, что она является достаточной при соотношении 1:1. MiniSOG-pHLIPwt оставался стабильным в этих условиях (рис. 20а). Были приготовлены образцы DPBF с miniSOG-pHLIPwt и без. Наблюдалось значительное уменьшение поглощения DPBF в случае облучения образца с miniSOG-pHLIPwt (рис.20в), чего не было в контрольном образце (рис. 20б). На клетках, обработанных 6-карбокси-H₂DCFDA и miniSOG-pHLIPwt при pH 6,2, а затем облученных, наблюдался сигнал от сенсора, также свидетельствующий об образовании АФК.

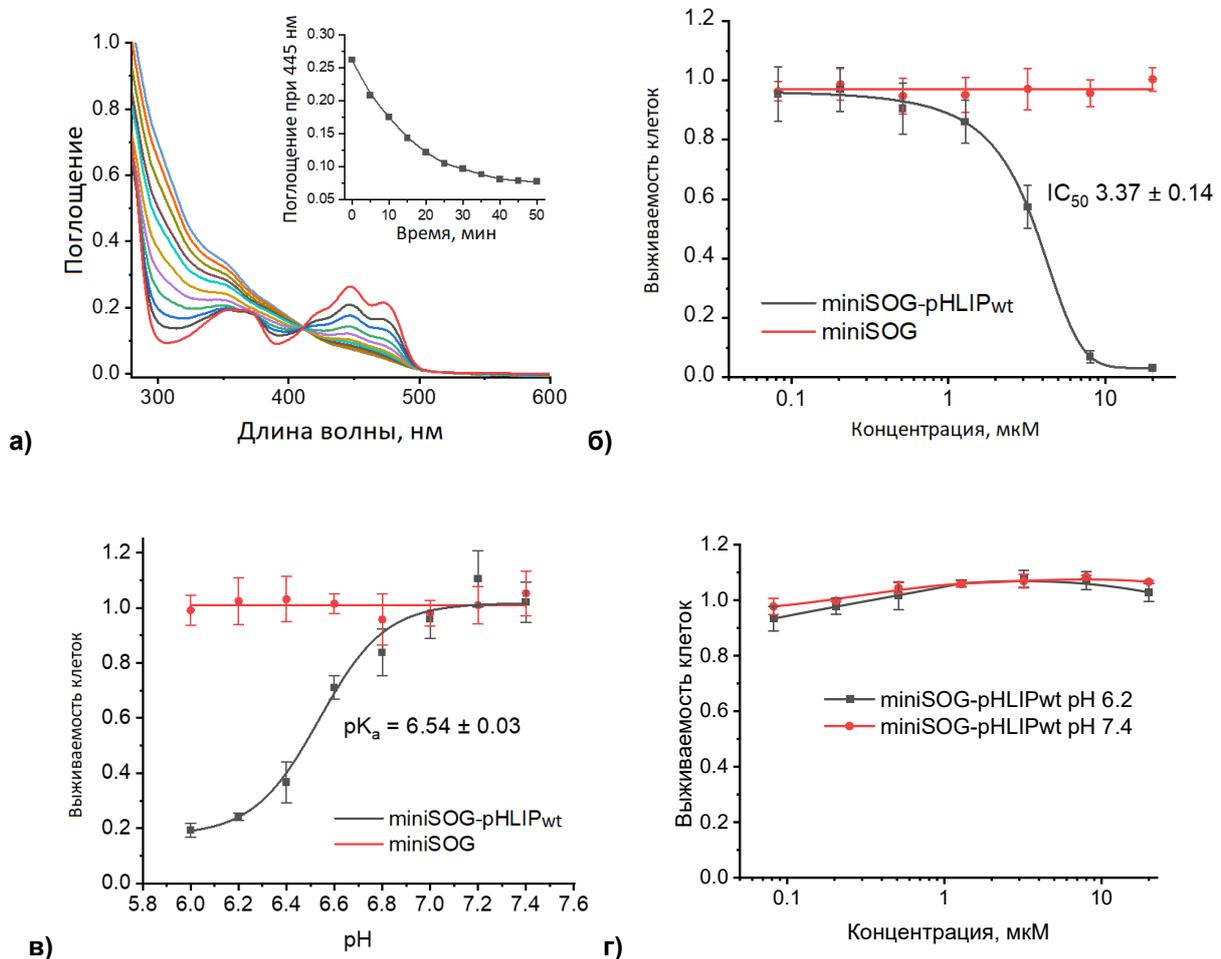


Рисунок 18. Изменение спектральных свойств miniSOG в результате фотообесцвечивания при облучении светом 460 нм (а). Фоточитотоксичность miniSOG-pHLIPwt (черный) и одного miniSOG (красный) в зависимости от изменений концентрации (б) и pH (в), определенная с помощью МТТ-теста. Цитотоксичность miniSOG-pHLIPwt в темноте при pH 7,4 (красный) и 6,2 (черный), определенная с помощью МТТ-теста (г).

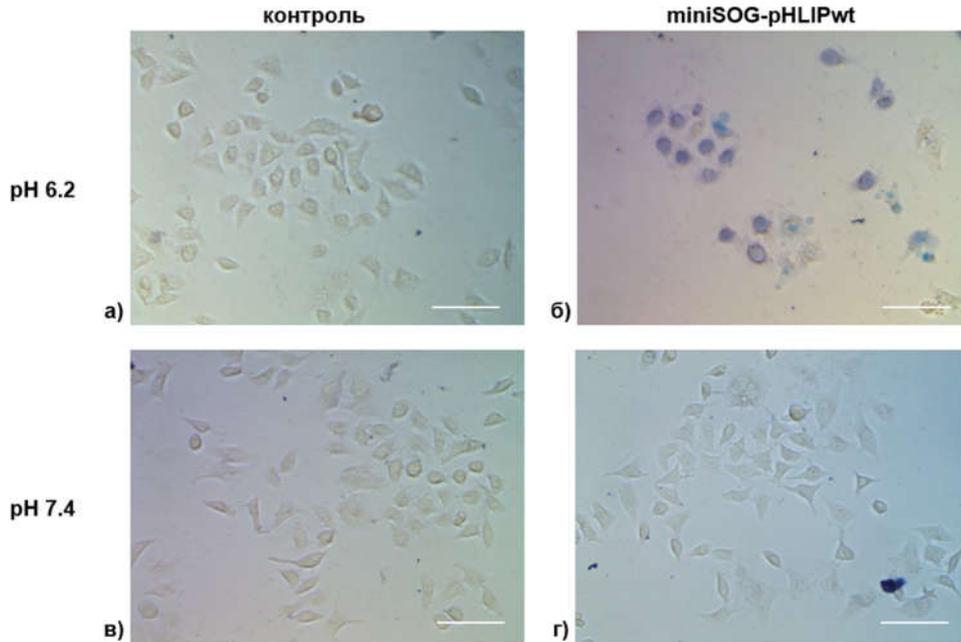


Рисунок 19. Фоточитотоксичность miniSOG-pHLIPwt, измеренная с помощью трипанового синего. Клетки в растворе трипанового синего после облучения, предварительно инкубированные в буферах pH 6,2 и 7,4 с miniSOG-pHLIPwt (б, г) и без него (а, в). Масштабный отрезок 100 мкм.

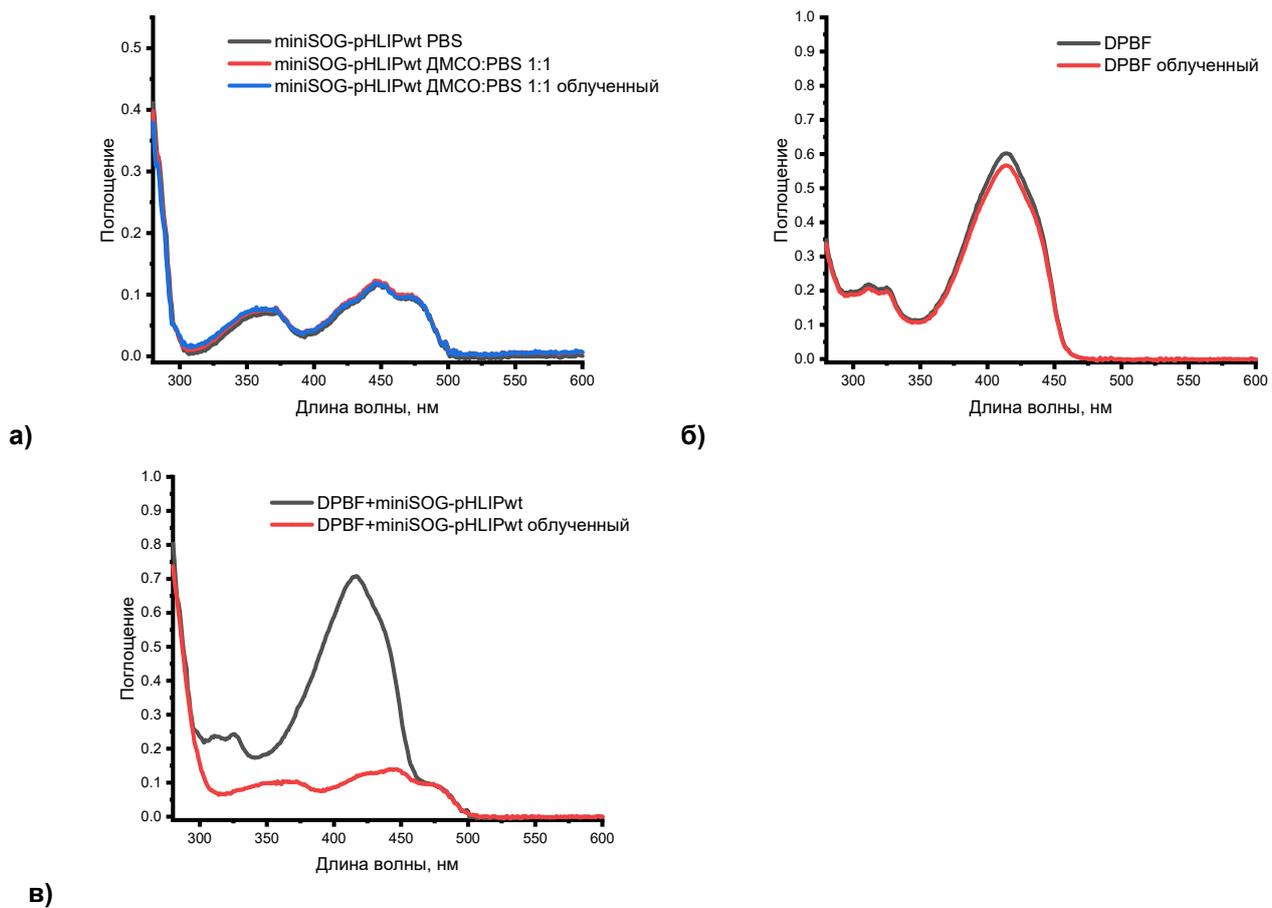


Рисунок 20. Анализ генерации АФК miniSOG-pHLIP в кювете с использованием DPBF. а) Спектры поглощения miniSOG-pHLIP в PBS (черная кривая), в смеси PBS:DMSO 1:1 до (красная кривая) и после облучения (синяя кривая). б) Спектры поглощения DPBF в растворе PBS:DMSO 1:1 до (черная кривая) и после облучения (красная кривая). в) Спектры поглощения miniSOG-pHLIP в присутствии DPBF в растворе PBS:DMSO 1:1 до (черная линия) и после облучения (красная кривая).

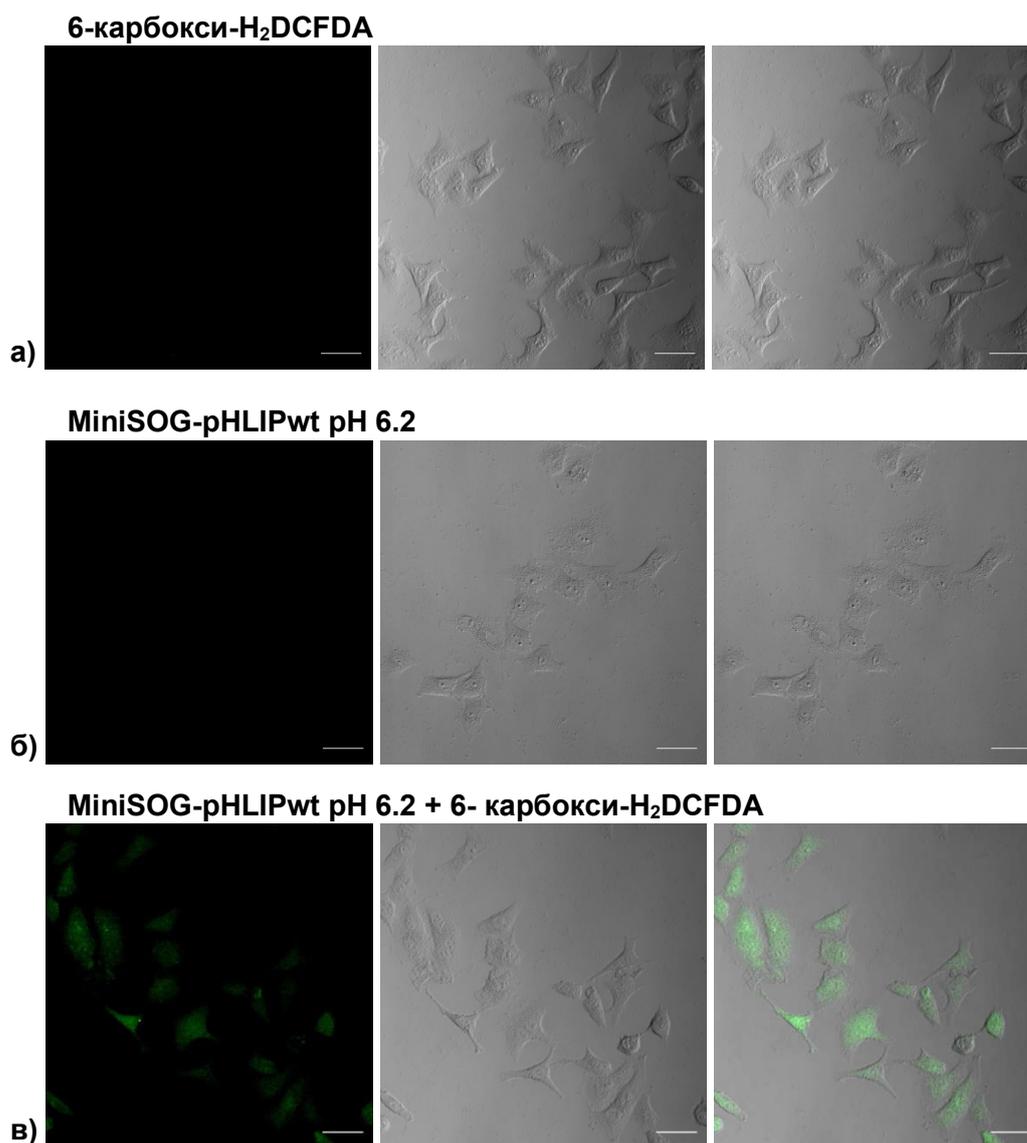


Рисунок 21. Анализ генерации АФК miniSOG-pHLIP с использованием 6-карбокси-Н₂DCFDA на живых клетках HeLa. Слева направо: изображения в зеленом цвете (6-карбокси-Н₂DCFDA, возбуждение 514 нм, эмиссия 516-676 нм), проходящем свете и их наложение. Клетки облучали светом 460 нм после обработки 6-карбокси-Н₂DCFDA (а), miniSOG-pHLIP при pH 6,2 (б) и обоими препаратами (в). Все изображения получены при одинаковых условиях получения и обработки. Масштабный отрезок 50 мкм.

4.3. Влияние линкерных последовательностей на свойства конструкций EGFP/pHLIP

В предыдущей части работы были описаны конструкции EGFP/pHLIP, содержащие короткий пептидный линкер –GS–, соединяющий белковую часть в виде EGFP с пептидом pHLIP. Далее были получены новые конструкции, на основе тех же функциональных частей (EGFP и пептидов pHLIP), но включающие удлиненную линкерную последовательность аминокислот –IEGRCS–, которая, с одной стороны, содержит заряженные группы, способствующие большей растворимости в водной среде, а с другой стороны, в целом является электро-нейтральной.

4.3.1. Эффективность созревания хромофора флуоресцентного белка в конструкциях EGFP/pHLIP.

Известно, что синтез хромофора ФБ происходит автокаталитически в присутствии кислорода в качестве окислителя. Один из ключевых факторов эффективности автокатализа – правильная упаковка белка [243]. В этом ключе ФБ – хороший модельный объект для демонстрации возможного влияния pHLIP и линкеров на функциональную активность белка в составе гибридной конструкции.

Было изучено влияние пептидов pHLIP на синтез хромофора EGFP в составе гибридных конструкций. Для этого регистрировали спектры поглощения каждой конструкции (рис. 22) и определяли общую концентрацию белково-пептидных конструкций при 280 нм и концентрации конструкций с полностью созревшим хромофором по поглощению при 488 нм. Степень созревания хромофора определяли отношением значений концентрации конструкций с полностью созревшим хромофором к общей концентрации. В контрольном белке EGFP степень созревания хромофора составила ~77% (табл. 1). В случае белково-пептидных конструкций, содержащих GS-линкер, хромофор синтезировался примерно на 20% хуже относительно контроля, а в конструкциях с линкером IEGRCGS – примерно на 30%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что пептид pHLIP в составе пептидно-белковых конструкций может влиять на эффективность синтеза хромофора ФБ, причем степень влияния зависит и от природы линкера. Нарушение процесса синтеза хромофора ФБ может быть вызвано как нарушением упаковки белка, так и аллостерическими эффектами.

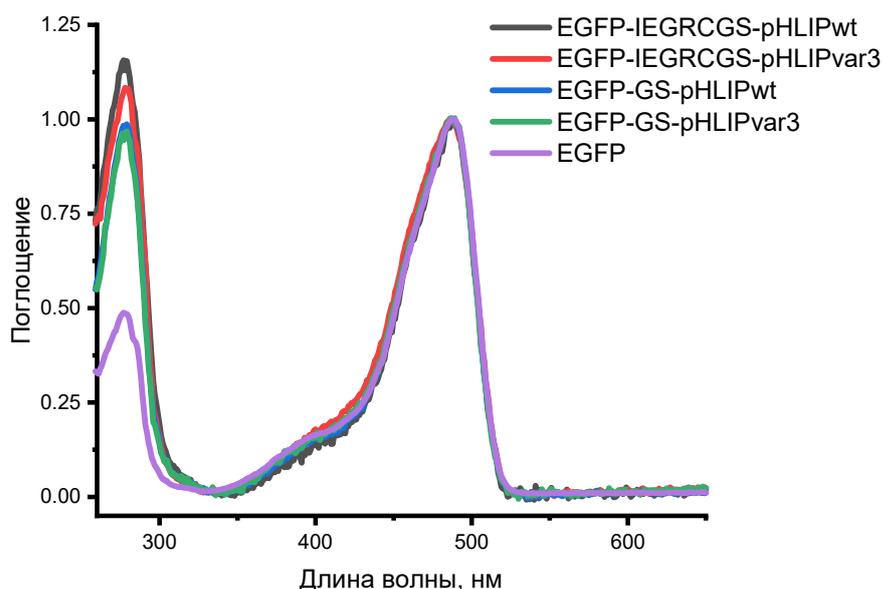


Рисунок 22. Нормализованные спектры поглощения конструкций EGFP/pHLIP и EGFP.

Таблица 1. Свойства конструкций EGFP/pHLIP и EGFP

№	Конструкция	$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно EGFP, %	Молекулярный вес, Да
1	EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt	34 380	55	71	32 122
2	EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3	32 890	55	71	31 232
3	EGFP-GS-pHLIPwt	34 380	64	83	31 564
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	32 890	63	81	30 674
5	EGFP (контроль)	20 400	77	100	27 429

4.3.2. pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIP с клетками HeLa согласно данным проточной цитофлуориметрии.

Для анализа связывания полученных гибридных конструкций с раковыми клетками HeLa при понижении pH использовали метод проточной цитофлуориметрии. Был протестирован диапазон значений pH 5.6–7.4 с шагом 0.2 единицы. В качестве контроля неспецифического связывания использовали свободный EGFP.

При нейтральных значениях pH клетки, обработанные EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt, обладали низким значением флуоресцентного сигнала, сопоставимым с контрольными клетками, обработанными EGFP. Однако при $\text{pH} < 6.8$ наблюдалось многократное увеличение флуоресцентного сигнала клеток с $\text{pK}_a \sim 6.4$ (рис. 23, табл. 2), при этом связывание конструкции, содержащей линкер IEGRCSG, было в несколько раз эффективнее. Аналогичный результат наблюдался при сравнительном тестировании конструкций EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3 и EGFP-GS-pHLIPvar3. В конструкциях, содержащих IEGRCSG-линкер, интенсивность флуоресцентного сигнала клеток оказалась выше. Это свидетельствует об однозначном увеличении эффективности связывания при замене GS-линкера на IEGRCSG в гибридных конструкциях (табл. 2).

Стоит также отметить, что pH-зависимое связывание EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3 с раковыми клетками характеризовалось двумя pK_a (наблюдалось два перегиба, табл. 2), при этом основное связывание происходит с $\text{pK}_a \sim 5.9$. Это свидетельствует о возникновении дополнительных pH-зависимых перестроек в этой конструкции, которые стали возможны при введении последовательности IEGRCSG в линкер. Однако несмотря на то, что эффективность связывания конструкции с pHLIPvar3 выросла, она все же остается ниже, чем у EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt.

Ранее сообщалось, что при доставке низкомолекулярных красителей pHLIPvar3 обладал улучшенными по сравнению с pHLIPwt показателями накопления в опухолях [80]. Однако при

тестировании этих пептидов в виде конъюгатов с белковым компонентом *in vitro* наблюдалась обратная ситуация: конструкции с pHLPwt демонстрировали более эффективное связывание при понижении pH в сравнении с pHLPvar3 при использовании одного и того же линкера. Полученные данные также подтверждают эту закономерность.

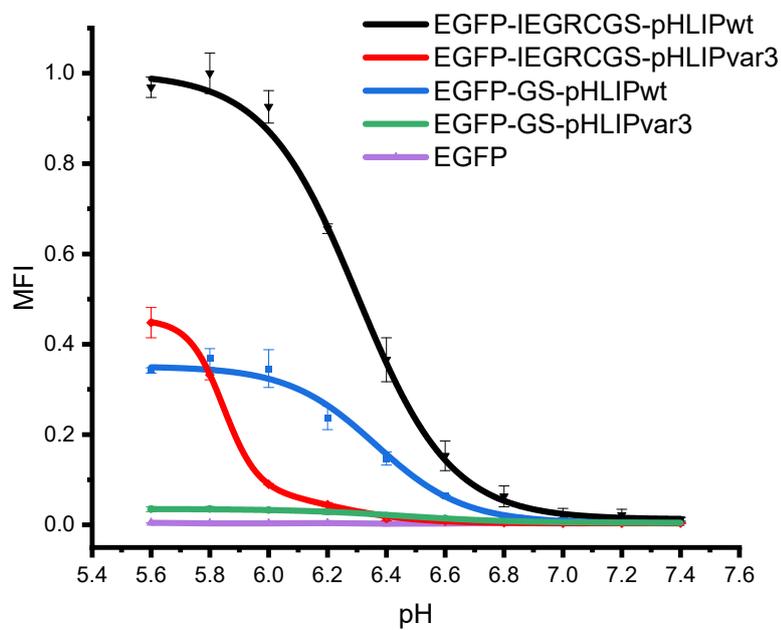


Рисунок 23. pH-зависимое связывание с клетками HeLa конструкций EGFP/pHLIPwt и EGFP/pHLIPvar3 с линкерами GS и IEGRCSGS при различных значениях pH. Значения медиан интенсивности флуоресценции (MFI) нормированы относительно EGFP-IEGRCSGS-pHLIPwt (наиболее эффективно связывающейся конструкции) с поправкой на степень созревания хромофора.

Таблица 2. Эффективность pH-зависимого связывания белково-пептидных конструкций с клетками HeLa

№	Конструкция	pK_a	Относительное количество белка, связавшегося с клетками*
1	EGFP-IEGRCSGS-pHLIPwt	6.30 ± 0.01	1
2	EGFP-GS-pHLIPwt	6.36 ± 0.03	0.35
3	EGFP-IEGRCSGS-pHLIPvar3	$6.22 \pm 0.33,$ 5.85 ± 0.03	0.46
4	EGFP-GS-pHLIPvar3	6.46 ± 0.02	0.035

* Количество белка, связавшегося с клетками, оценивали по значению F_a – кислотной базовой линии (см. раздел 3.2.16) относительно EGFP-IEGRCSGS-pHLIPwt.

4.3.3. pH-зависимое связывание конструкций EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa по данным флуоресцентной микроскопии

При помощи конфокальной флуоресцентной микроскопии были протестированы конструкции, которые продемонстрировали наиболее эффективное pH-зависимое связывание и оптимальные pK_a в цитофлуориметрическом исследовании – EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt и EGFP-GS-pHLIPwt. Эти конструкции инкубировали с клетками HeLa при pH 6.2 и 7.4, проводили отмывку при помощи PBS, фиксировали клетки 4%-ным раствором формалина и окрашивали ядра меткой Hoechst 33342.

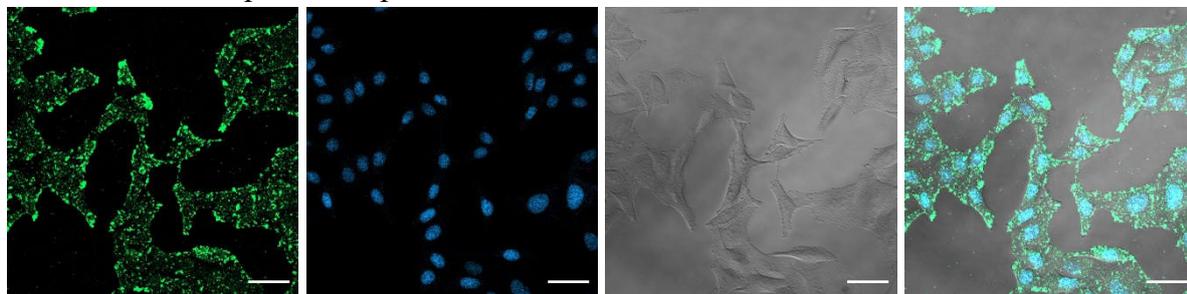
Согласно полученным данным, обе конструкции связывались с мембранами клеток при pH 6.2, однако уровень зеленого флуоресцентного сигнала был выше в случае обработки клеток EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt (рис. 24). При pH 7.4 ни одна из рекомбинантных конструкций не связывалась с мембранами клеток. На контрольных клетках, обработанных EGFP аналогичным образом при pH 6.2 и 7.4, в обоих случаях не наблюдалось связывания (см. приложение, рис. П3). Эти результаты подтверждают данные по pH-зависимому связыванию конструкций, полученные методом проточной цитофлуориметрии.

Следует отдельно отметить, что согласно литературным данным, все полученные ранее конструкции pHLIP с низкомолекулярными соединениями, липосомами и с наночастицами обладали также побочным неспецифическим связыванием с мембранами клеток при физиологических значениях pH [81, 140]. Однако полученные нами гибридные белково-пептидные конструкции демонстрировали селективное pH-зависимое связывание и практически полное отсутствие взаимодействия с мембраной клеток при нейтральных значениях pH. По-видимому, это обусловлено присутствием гидрофильного ФБ, который обеспечивает высокую водорастворимость полученных конструкций.

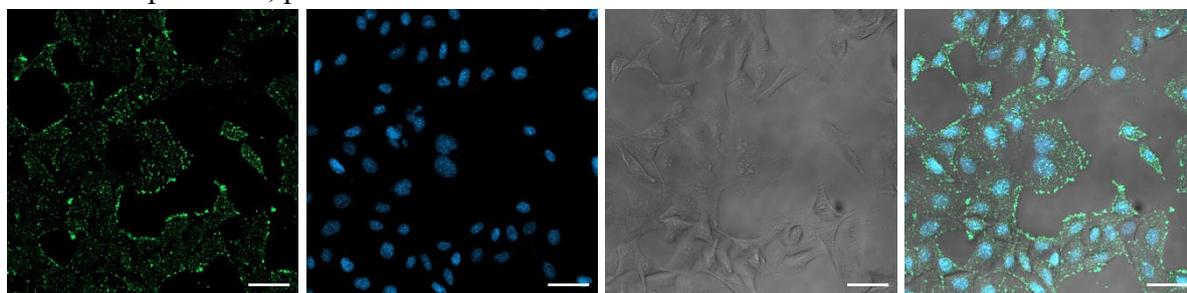
На примере белково-пептидных конструкций, состоящих из EGFP и двух вариантов pH-чувствительного пептида (pHLIPwt и pHLIPvar3), было показано влияние линкерной последовательности на функциональные свойства этих конструкций. Полученные конструкции содержали два вида линкеров: IEGRCGS и GS. Было установлено, что конструкции с линкером IEGRCGS более эффективно pH-зависимо связываются с клетками HeLa. Также было показано, что слияние EGFP с пептидами pHLIP в некоторой мере влияет на созревание хромофора этого ФБ. Кроме того, было продемонстрировано, что белково-пептидные конструкции, несущие pHLIPwt, более эффективно связываются с мембранами клеток при понижении pH, по сравнению с аналогичными конструкциями с pHLIPvar3. Оказалось, что получение pH-чувствительных конструкций на основе белков и пептидов pHLIP с сохранением их первоначальных функциональных свойств – нетривиальная задача, поскольку на эффективность pH-зависимого

связывания может влиять тип используемого линкера. Кроме того, в результате получения таких белково-пептидных конструкций могут нарушаться функциональные свойства белкового компонента, о чем свидетельствует изменение эффективности синтеза хромофора ФБ.

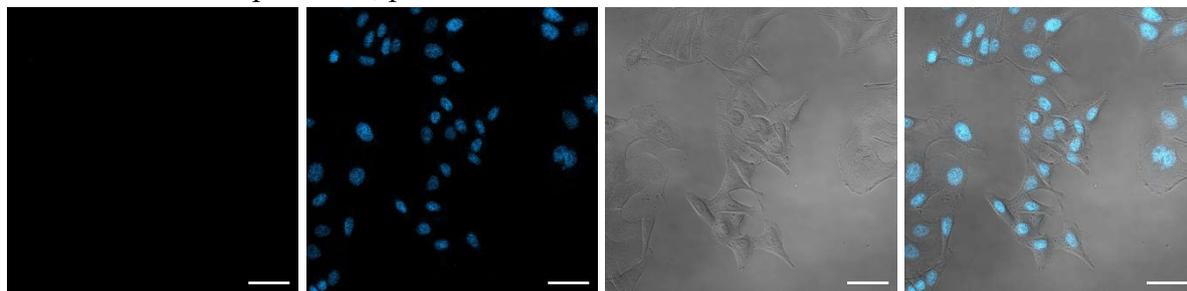
EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt, pH 6.2



EGFP-GS-pHLIPwt, pH 6.2



EGFP-IEGRCGS-pHLIPwt, pH 7.4



EGFP-GS-pHLIPwt, pH 7.4

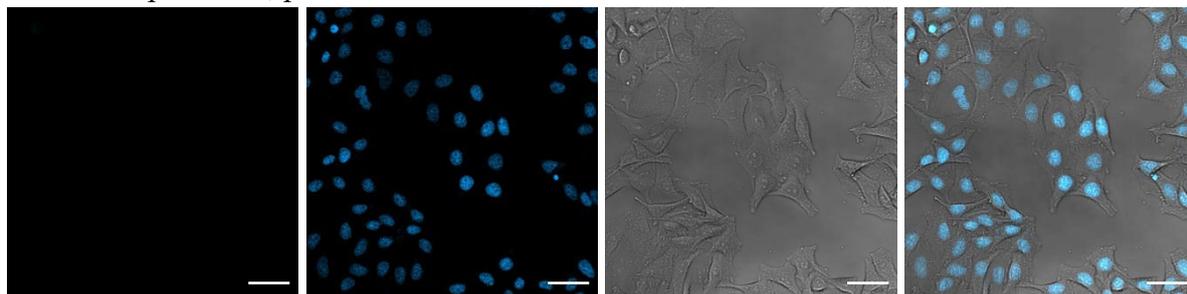


Рисунок 24. pH-зависимое связывание EGFP/pHLIPwt с клетками HeLa, определенное с помощью конфокальной микроскопии. Слева направо: изображения в зеленом (EGFP, возбуждение 488 нм, излучение 500–550 нм) и синем (Hoechst 33258, возбуждение 405 нм, излучение 420–470 нм) каналах флуоресценции, проходящем свете и их наложение. Масштабный отрезок 20 мкм.

4.4. Влияние линкерных последовательностей на свойства конструкций mCherry/pHLIP

4.4.1. Дизайн конструкций на основе mCherry и пептидов pHLIP

Ввиду получения конструкций на основе EGFP и пептидов pHLIP, способных к pH-селективному связыванию с разной эффективностью, было принято решение получить ряд pH-чувствительных конструкций на основе красного ФБ mCherry с целью подтверждения влияния последовательности линкера на степень pH-зависимого связывания, а также для их дальнейшего тестирования на моделях *in vivo*. К тому времени сообщалось о получении нового представителя семейства pHLIP – пептиде ATRAM, обладающего улучшенными pH-чувствительными свойствами и большей водорастворимостью. Таким образом, в данном исследовании были использованы пептиды pHLIPwt и ATRAM в сочетании с белком mCherry и несколькими линкерными последовательностями.

Модель данных конструкций была аналогична модели конструкций EGFP/pHLIP, с той разницей, что в данном случае использовался полноразмерный ФБ. С-концевой фрагмент, исключаемый в случае EGFP, имеет ту же аминокислотную последовательность, что и С-конец mCherry. Последовательность представлена заряженными а.к.о. (MDELYK).

В качестве линкеров были использованы последовательности, которые, по литературным данным, использовались при получении химерных конструкций на основе флуоресцентных белков (-SGLRSRAE-) или уже были использованы в работе лаборатории ранее (-GACGIERCGRS- и -GASEEGEEGIEGRCS-). Последовательность -SGLRSRAE- была использована как гибкий линкер, в то время как структура линкера -GACGIERCGRS- предполагала некую жесткость и упорядоченность. Заряд обеих последовательностей в целом обеспечивал электро-нейтральность. Также был использован линкер -GASEEGEEGIEGRCS-, несущий несколько отрицательно заряженных аминокислот, которые, как предполагалось, позволили бы обеспечить их электростатическое отталкивание с отрицательно заряженными а.к.о. пептидов pHLIP, делая их более доступными для взаимодействия с клеточными мембранами в составе гибридных конструкций.

Таким образом, был получен ряд конструкций на основе mCherry и пептидов pHLIPwt и ATRAM с различными линкерами в соответствии с ранее описанными протоколами (табл. 3, см. приложение рис. П5).

Таблица 3. Перечень полученных конструкций и их сокращений.

Конструкция	Сокращение
mCherry-SGLRSRAE-ATRAM	mCherry-8-ATRAM
mCherry-GACGIERC GS-ATRAM	mCherry-10-ATRAM
mCherry-GASEEGEEGIEGRCS-ATRAM	mCherry-16-ATRAM
mCherry-SGLRSRAE-pHLIPwt	mCherry-8-pHLIPwt
mCherry-GACGIERC GS-pHLIPwt	mCherry-10-pHLIPwt
mCherry-GASEEGEEGIEGRCS-pHLIPwt	mCherry-16-pHLIPwt

4.4.2. Эффективность созревания хромофора флуоресцентного белка гибридных конструкций

При помощи спектрофотометрии было изучено влияние пептидов на синтез хромофора mCherry в составе белково-пептидных конструкций. В этом случае степень созревания хромофора ФБ в составе гибридных структур была сопоставима со степенью контрольного белка mCherry (табл. 4) как в случае конструкций с пептидом АТРАМ (рис. 25), так и в случае с пептидом рНЛІРwt (данные не представлены ввиду аналогичных результатов).

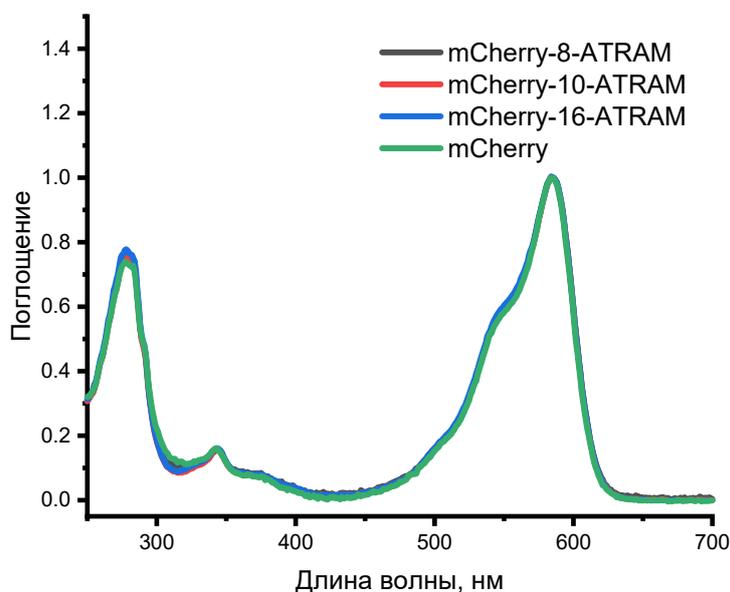
**Рисунок 25.** Нормализованные спектры поглощения конструкций mCherry/ATRAM и mCherry.

Таблица 4. Свойства конструкций mCherry/pHLIP и mCherry.

№	Конструкция	$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно mCherry, %	Молекулярный вес, Да
1	mCherry-8-pHLIPwt	48 360	67	89	32 837
2	mCherry-8-ATRAM	39 880	74	98	32 170
	mCherry-10-pHLIPwt	48 360	70	92	32 914
	mCherry-10-ATRAM	39 880	74	98	32 248
3	mCherry-16-pHLIPwt	48 360	71	93	33 523
4	mCherry-16-ATRAM	39 880	72	95	32 862
5	mCherry (контроль)	34 380	76	100	27 990

4.4.3. Изучение эффективности pH-зависимого связывания гибридных конструкций

Новые гибридные белково-пептидные конструкции были протестированы при помощи проточной цитофлуориметрии в соответствии с отработанным протоколом. В зависимости от структуры линкера, конструкции на основе mCherry и pH-чувствительных пептидов демонстрировали разную эффективность связывания, однако наблюдались следующие закономерности: 1) при использовании одного и того же линкера более эффективно при понижении pH связывались конструкции с пептидом ATRAM (рис. 26а, б); 2) наименее и наиболее эффективное связывание при понижении pH демонстрировали конструкции, содержащие линкер -SGLRSRAE- и -GASEEGEEGIEGRCS-, соответственно (рис. 26 а, б); 3) отсутствовало неспецифичное связывание у всех полученных конструкций при физиологическом значении pH (рис. 26 а, б). По-видимому, низкая эффективность связывания конструкций, содержащих линкер -SGLRSRAE- обусловлена межмолекулярным взаимодействием пептидов pHLIP с другими компонентами белковой нагрузки ввиду гибкости используемого линкера и, как следствие, их меньшей доступности пептидов pHLIP для клеточных мембран. Наиболее удачной из полученных оказалась конструкция на основе mCherry и ATRAM, объединенных линкером GASEEGEEGIEGRCS (mCherry-16-ATRAM, табл. 4). Ее связывание при pH 6.2 оказалось более эффективным в 20 раз по сравнению с полученной mCherry-9-ATRAM и примерно в 1,5 раза – по сравнению с аналогичной конструкцией с пептидом pHLIPwt (mCherry-16-pHLIPwt). Последние результаты коррелируют с литературными данными, согласно которым лучшим связыванием из двух представленных пептидов при пониженных значениях pH обладает ATRAM.

Было выполнено тестирование mCherry-16-ATRAM на клеточной линии Hela при помощи конфокальной микроскопии при понижении pH. При нейтральных значениях pH (7.0-7.4) на

полученных изображениях не наблюдалось связывания данной конструкции с клетками HeLa, тогда как при значениях pH 6.8 и ниже появлялся красный флуоресцентный сигнал, с локализацией на периферии клетки, который усиливался при дальнейшем понижении pH (рис. 27). Эти данные полностью соотносятся с результатами проточной цитофлуориметрии.

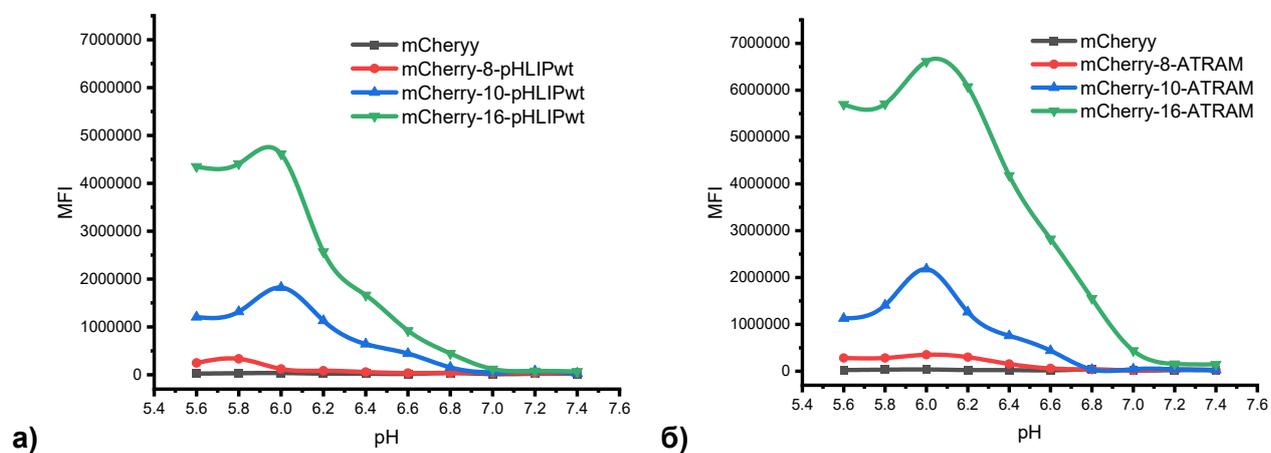


Рисунок 26. Связывание полученных гибридных конструкций с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении с mCherry. (а) Связывание конструкций на основе mCherry и pHILIPwt. (б) Связывание конструкций на основе mCherry и ATRAM.

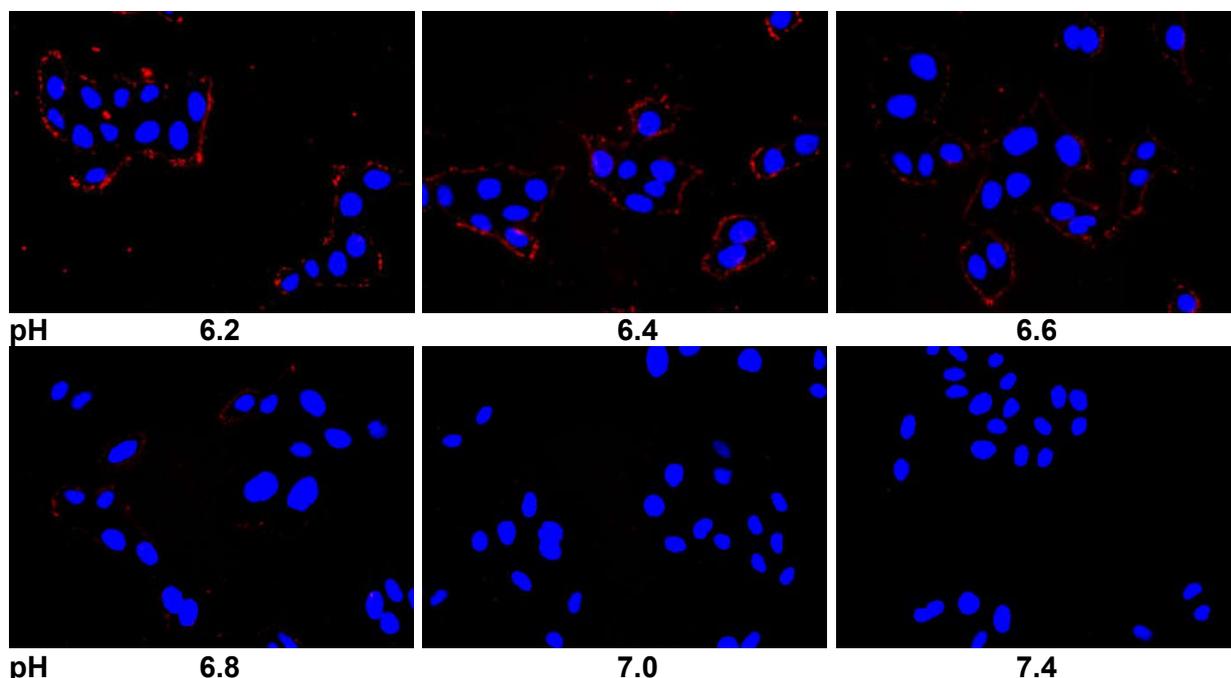


Рисунок 27. Связывание mCherry-16-ATRAM с клетками HeLa при разных значениях pH (снимок при pH 7.2 не представлен, поскольку аналогичен снимку при pH 7.4).

4.4.4. Изучение олигомерного состояния гибридных конструкций

Для детальной характеристики наиболее удачных конструкций для каждого из пептидов – mCherry-16-ATRAM и mCherry-16-pHLIPwt – было проведено изучение их олигомерного состояния методом гель-фильтрации. Помимо образцов исследуемых белков были нанесены и образцы-стандарты. В качестве последних использовались флуоресцентные белки, с известным олигомерным состоянием: mCherry (в качестве мономера), DsRed (в качестве тетрамера). В результате было установлено, что как mCherry-16-ATRAM, так и mCherry-16-pHLIPwt существуют в нескольких различных олигомерных состояниях (рис. 28), по-видимому, преимущественно в димерном в состоянии, а также тетрамерном. Данная олигомеризация, вероятно, объясняется гидрофобностью пептидов pHLIP и их гомоагрегацией.

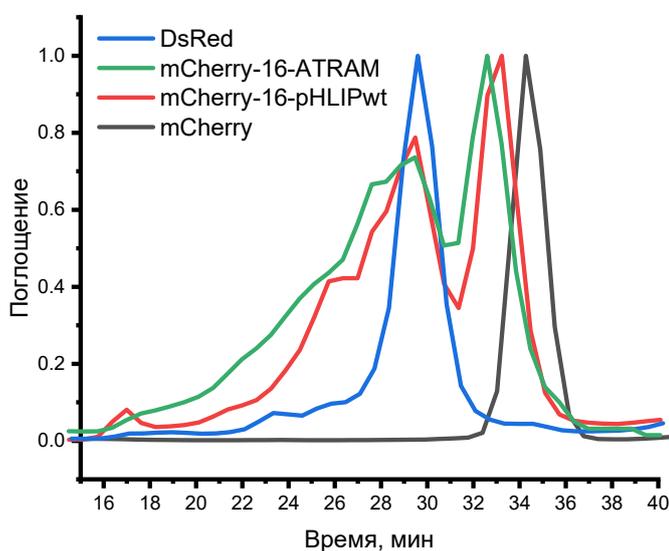


Рисунок 28. Гель-фильтрационный анализ белков.

4.4.5. Изучение распределения конструкции mCherry-16-ATRAM в организме модельного животного

Было проведено изучение распределения конструкции, демонстрирующей лучшую эффективность pH-зависимого связывания – mCherry-16-ATRAM – на моделях мышей с опухолью ЕМТ6 с помощью системы биовизуализации LumoTrace FLUO. Через 3 часа после введения гибридной конструкции при анализе *ex vivo* наблюдалось ее преимущественное накопление в почках (данные не представлены), что характерно для конструкций с массой, меньшей 60 кДа. Это обусловлено неоптимальным размером конструкции mCherry-16-ATRAM (33 кДа, табл. 4), что приводило к ее быстрому выведению из организма почками. Также значительное накопление данной конструкции было обнаружено в опухолях модельных животных, чего не наблюдалось в случае других жизненно важных органов (рис. 29 и 30) Контрольный белок mCherry также преимущественно локализовался в почках, однако

наблюдалось его накопление и в опухоли, что может быть обусловлено ее особыми свойствами (эффектом увеличенной проницаемости и удерживания веществ, гиперэкспрессией липопротеинов низкой плотности), приводящих к увеличенному поглощению различных веществ. Тем не менее, накопление конструкции mCherry-16-ATRAM в опухоли в сравнении с mCherry было более эффективным.

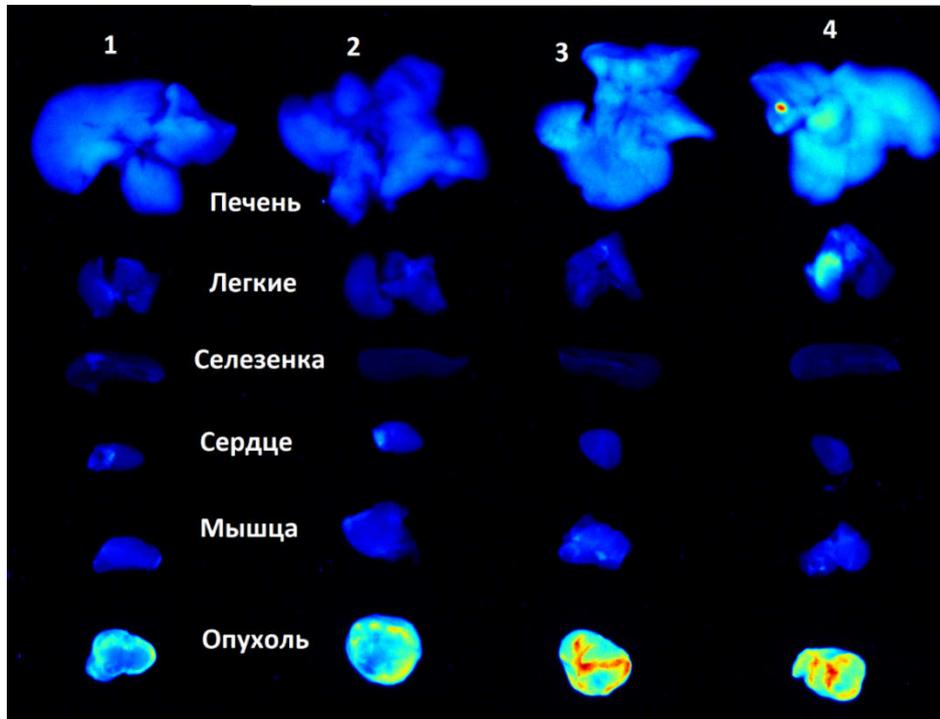


Рисунок 29. *Ex vivo* исследование распределения mCherry (1, 2) и mCherry-16-ATRAM (3, 4) в организме модельного животного после трех часов с момента инъекции.

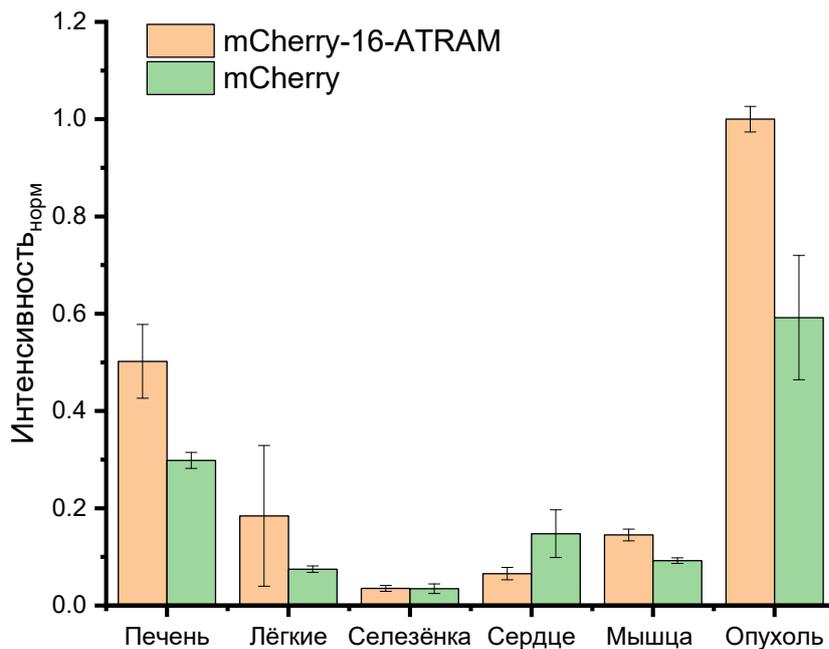


Рисунок 30. Распределение mCherry-16-ATRAM и mCherry в органах модельных животных после трех часов с момента инъекции (нормировка на максимальное значение интенсивности флуоресценции).

4.5. Влияние природы нагрузки на рН-специфичность пептида ATRAM

При анализе литературных данных было обнаружено, что конъюгаты пептидов рНLIP с различными низкомолекулярными метками неспецифично связываются с клеточными мембранами при физиологических значениях рН. Чтобы определить причины данного связывания, на основе пептида ATRAM был получен набор конъюгатов с различными низкомолекулярными красителями на основе молекул BODIPY: BODIPY-FL (BDP-FL) и BODIPY-R6G (BDP-R6G), не проявляющих токсичных свойств. Красители BODIPY являются гидрофобными молекулами и способны к неспецифичному накоплению в клеточной мембране или иных органеллах, поэтому также был использован и гидрофильный краситель – водорастворимая флуоресцентная метка sulfo-Cy5.

На С-конец пептида ATRAM был введен а.к.о. Cys для последующего мечения малеимидными производными красителей, обозначенных выше. Тестирование полученных конъюгатов (ATRAM-BDP-FL, ATRAM-BDP-R6G и ATRAM-sulfo-Cy5) проводили на клеточной линии HeLa при нейтральном и пониженном значениях рН (6,2).

Согласно полученным данным, все полученные конъюгаты связывалась с клетками при обоих значениях рН (рис. 31-33), однако более интенсивный сигнал наблюдался при рН 6.2, что свидетельствует о большей эффективности связывания при закислении. В отличие от красителей BODIPY, метка sulfo-Cy5 не связывалась с клетками HeLa при физиологических значениях рН. Таким образом, неспецифичное взаимодействие ATRAM-sulfo-Cy5 и других конъюгатов с клетками при нейтральном значении рН обусловлено гидрофобной природой рН-чувствительного пептида. Однако использование белковой матрицы в сочетании с пептидами рНLIP приводит к получению более гидрофильных конструкций и отсутствию их связывания при нейтральных рН, как было показано ранее.

На основе наиболее удачной конструкции mCherry-16-ATRAM, содержащей Cys в последовательности линкера, был получен конъюгат с малеимидной меткой BODIPY-R6G и изучены его рН-зависимые свойства. Связывание меченной конструкций с клетками HeLa отличалось от связывания исходной (рис. 27 и 34). В случае mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM наиболее эффективное связывание наблюдалось при рН 6.8 (рис. 34), тогда как конструкция до мечения демонстрировала наибольшую эффективность связывания при рН 6.2 (рис. 27). При дальнейшем понижении рН связывание mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM уменьшалось, по-видимому, за счет агрегации исследуемой конструкции. В отличие от конъюгатов пептида ATRAM с красителями BODIPY, конструкция mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM не связывалась с клетками при рН 7.0-7.4. Таким образом, на основе флуоресцентного белка mCherry и пептида ATRAM была получена новая рН-чувствительная конструкция, обладающая эффективным

связыванием только при значениях pH, ниже физиологического, для конъюгации с различными низкомолекулярными агентами и применения при тераностике раковых заболеваний.

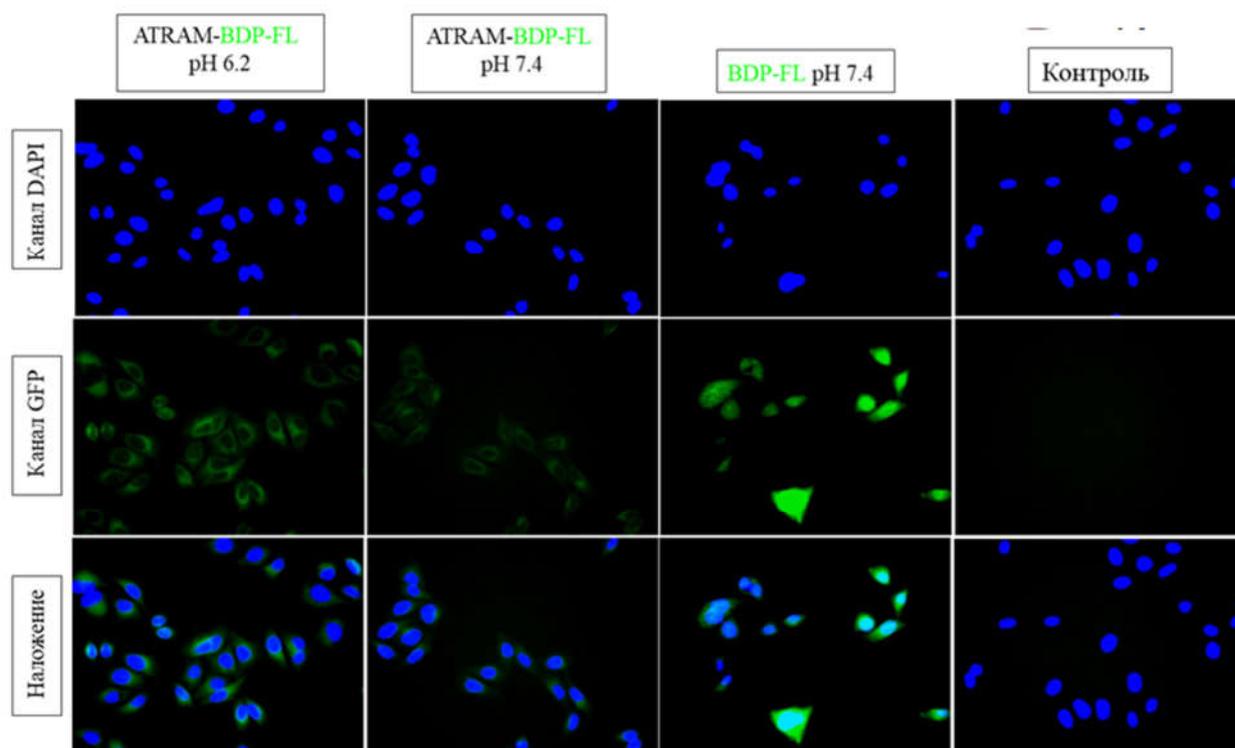


Рисунок 31. Связывание ATRAM-BDP-FL с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении со свободным красителем BDP-FL.

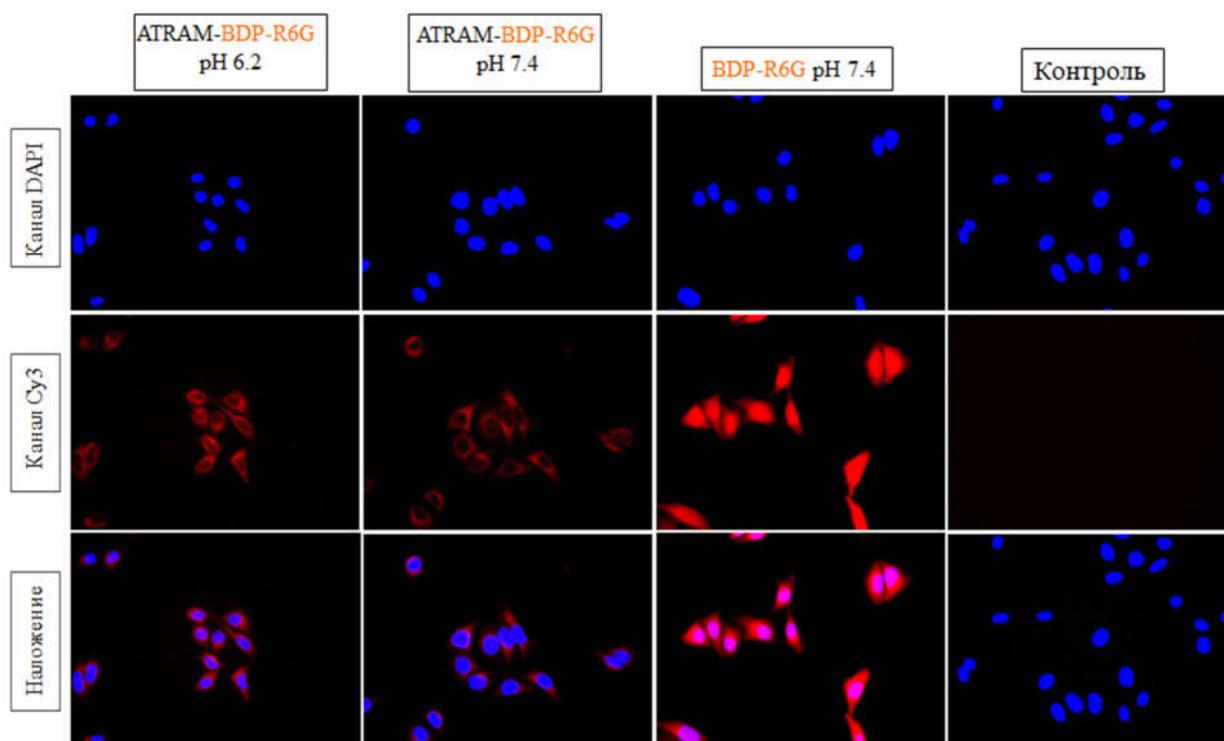


Рисунок 32. Связывание ATRAM-BDP-R6G с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении со свободным красителем BDP-R6G.

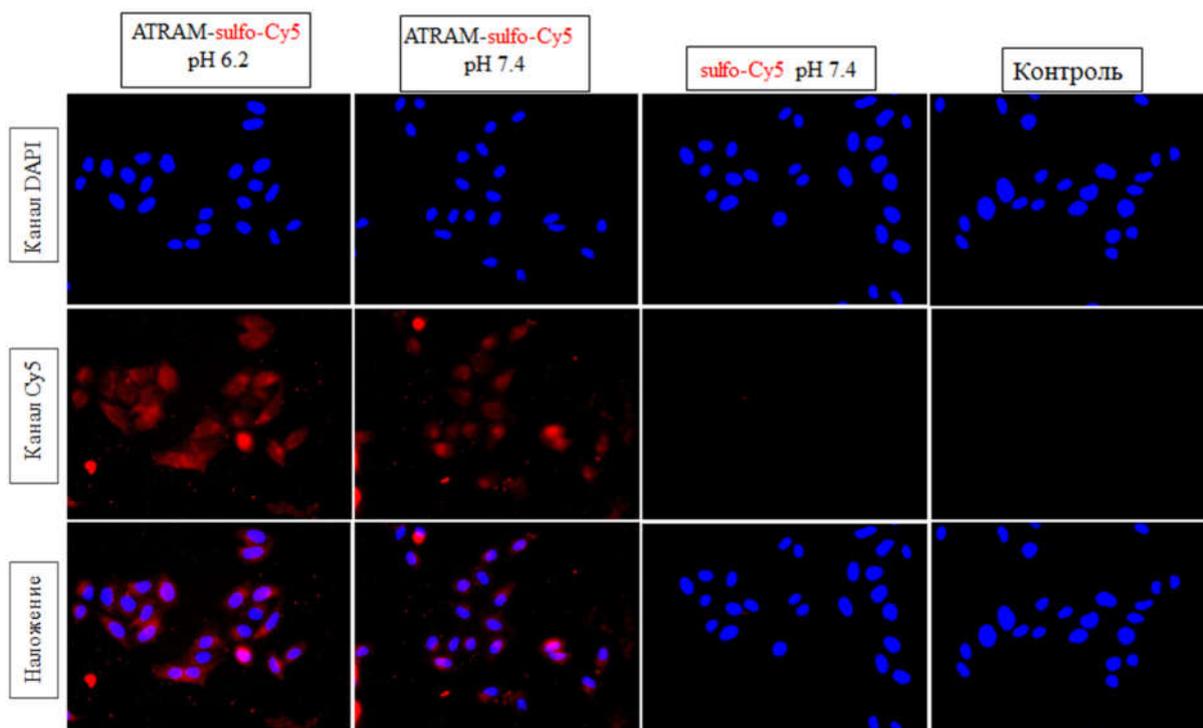


Рисунок 33. Связывание ATRAM-sulfo-Cy5 с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении со свободным красителем sulfo-Cy5.

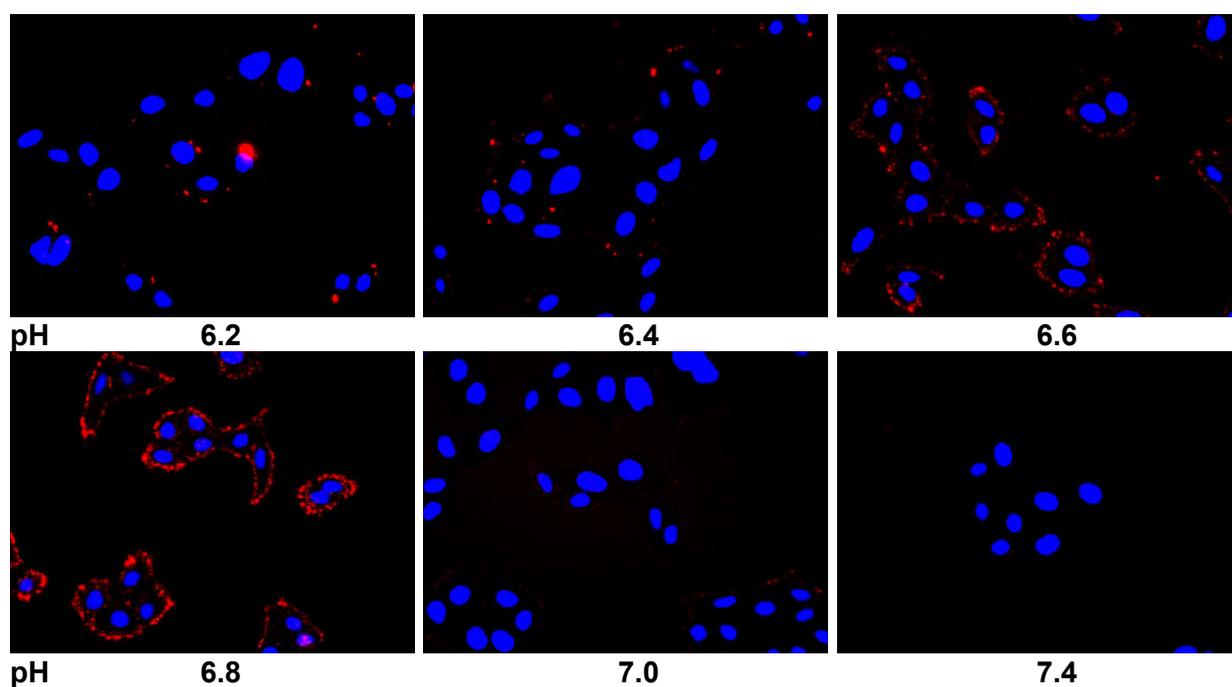


Рисунок 34. Связывание mCherry-16-BDP-R6G-ATRAM с клетками HeLa при разных значениях pH (снимки при pH 7.2 не представлены, поскольку аналогичны снимкам при pH 7.4).

4.6. Новый подход к получению оптимальных конструкций белков с пептидами pHLP

После анализа результатов экспериментов по получению оптимальной конструкции на основе mCherry и пептидов pHLPwt и ATRAM была выдвинута гипотеза о возможном межмолекулярном взаимодействии пептидов pHLP с другими компонентами белковой нагрузки (при использовании гибкого линкера между ними) и, как следствие, значительного уменьшения pH-чувствительности конструкций mCherry-8-ATRAM и mCherry-8-pHLPwt ввиду ограниченной доступности пептида для клеточных мембран. Как было показано ранее, данные конструкции были способны к pH-зависимому связыванию с клеточной мембраной (рис. 35а), но в гораздо меньшей степени (рис. 26а, б). Для проверки данной гипотезы сперва была получена конструкция ATRAM-GSASGSAS-EGFP (ATRAM-8-EGFP, данный линкер был использован ранее, для получения конструкции pHLPwt-EGFP), а затем на основе ее сочетания с mCherry-8-ATRAM была получена новая, в которой N- и C-конец пептида ATRAM несли флуоресцентные белки mCherry и EGFP, соответственно (mCherry-8-ATRAM-8-EGFP, рис. 35б, см. приложение, рис. П6), несущая на своем C-конце гексагистидиновую метку. Предполагалось, что использование сразу двух белковых компонентов со стабильной третичной структурой позволит увеличить доступность гидрофобного пептида для клеточной мембраны и внесет стерические затруднения для его воздействия с этими же белковыми компонентами.

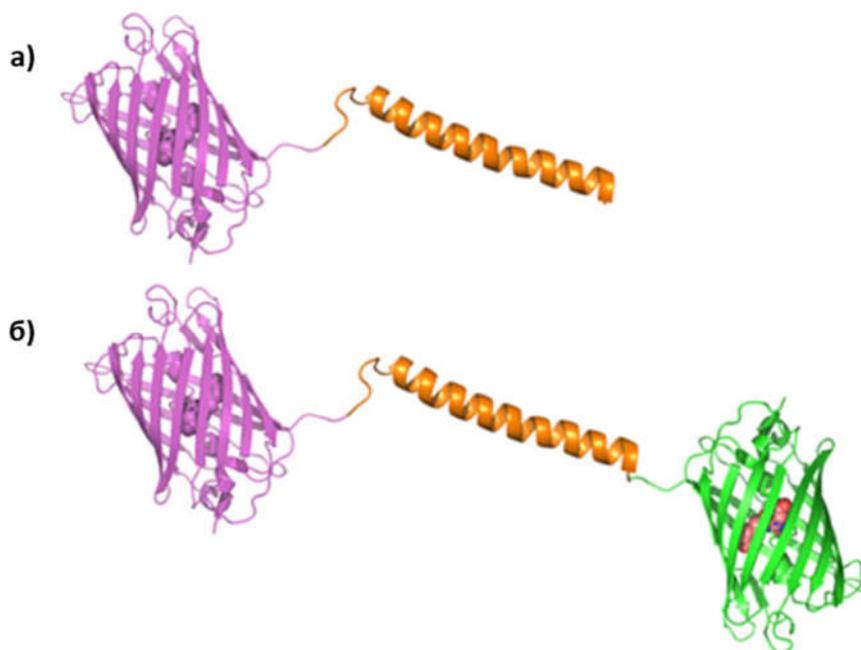


Рисунок 35. Модели пространственных структур гибридных конструкций mCherry-8-ATRAM (а) и mCherry-8-ATRAM-8-EGFP (б)

При анализе гибридных конструкций методом спектрометрии (рис. 36) было обнаружено, что степень синтеза хромофоров при сравнении гибридных конструкций с одним ФБ и двумя уменьшилась с 81 до 54% для EGFP и с 98 до 65% для mCherry (табл. 5). Было изучено связывание гибридных конструкций с клетками HeLa при помощи проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии при значениях pH ниже 7,4. В результате было установлено, что конструкция, несущая на обоих концах пептида ATRAM белковые матрицы, связывалась практически в 20 раз эффективнее исходных, несущих одну молекулу белка (рис. 37 а, б). Процесс связывания mCherry-8-ATRAM при понижении pH характеризовался значением pKa 6,4, что соотносилось с литературными данными [81], и выходом на плато при pH ниже 6,2. Однако в случае конструкции mCherry-8-ATRAM-8-EGFP pKa данного процесса сдвинулось в сторону физиологического значения pH и составило 6,8, а выход связывания на плато наблюдался при pH ниже 6,6 (рис. 37а).

Таким образом, показано, что получение pH-чувствительных конструкций на основе белков и пептидов pHILP, обладающих высокой эффективностью pH-зависимого связывания является нетривиальной задачей, поскольку данное свойство может зависеть от межмолекулярного взаимодействия белкового компонента с pH-чувствительным пептидом, которое зачастую является неочевидным.

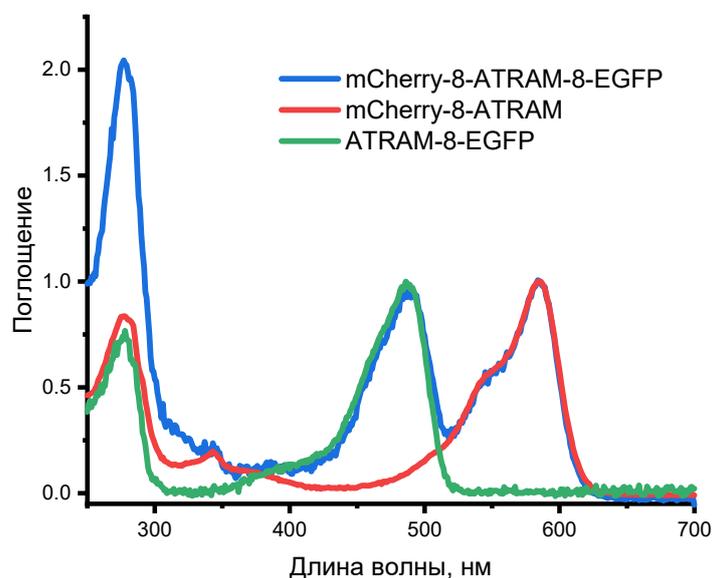
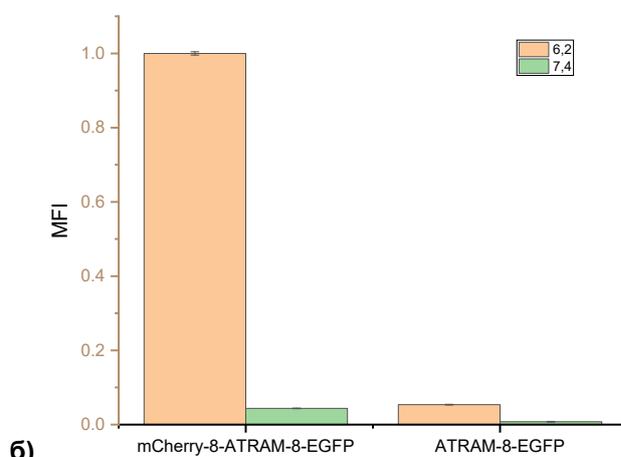
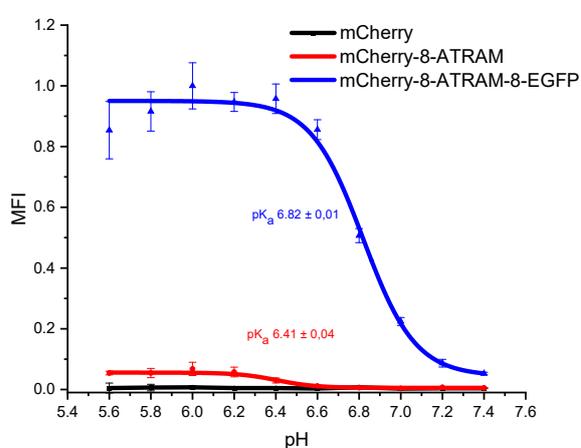


Рисунок 36. Нормализованные спектры поглощения конструкций гибридных конструкций.

Таблица 5 Свойства гибридных конструкций.

№	Конструкция	$\epsilon_{280}, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Степень созревания хромофора, %	Степень созревания хромофора относительно ФБ, %	Молекулярный вес, Да
1	ATRAM-8-EGFP	25 900	62	81	31 044
2	mCherry-8-ATRAM	39 880	74	98	32 170
3	mCherry-8-ATRAM-8-EGFP	60 280	EGFP: 41	EGFP: 54	58 474
			mCherry: 49	mCherry: 65	
4	EGFP (контроль)	20 400	77	100	27 429
5	mCherry (контроль)	34 380	76	100	27 990



а)

б)

Рисунок 37. Исследование гибридных конструкций при помощи цитофлуориметрии. (а) Кривые связывания mCherry-8-ATRAM и mCherry-8-ATRAM-8-EGFP с клетками HeLa при разных значениях pH в сравнении с mCherry (нормировка на максимальное значение интенсивности флуоресценции MFI в отдельном эксперименте, детекция сигнала от mCherry). (б) Гистограммы связывания mCherry-8-ATRAM-8-EGFP и ATRAM-8-EGFP с клетками HeLa при разных значениях pH (нормировка на максимальное значение интенсивности флуоресценции MFI в отдельном эксперименте, детекция сигнала от EGFP).

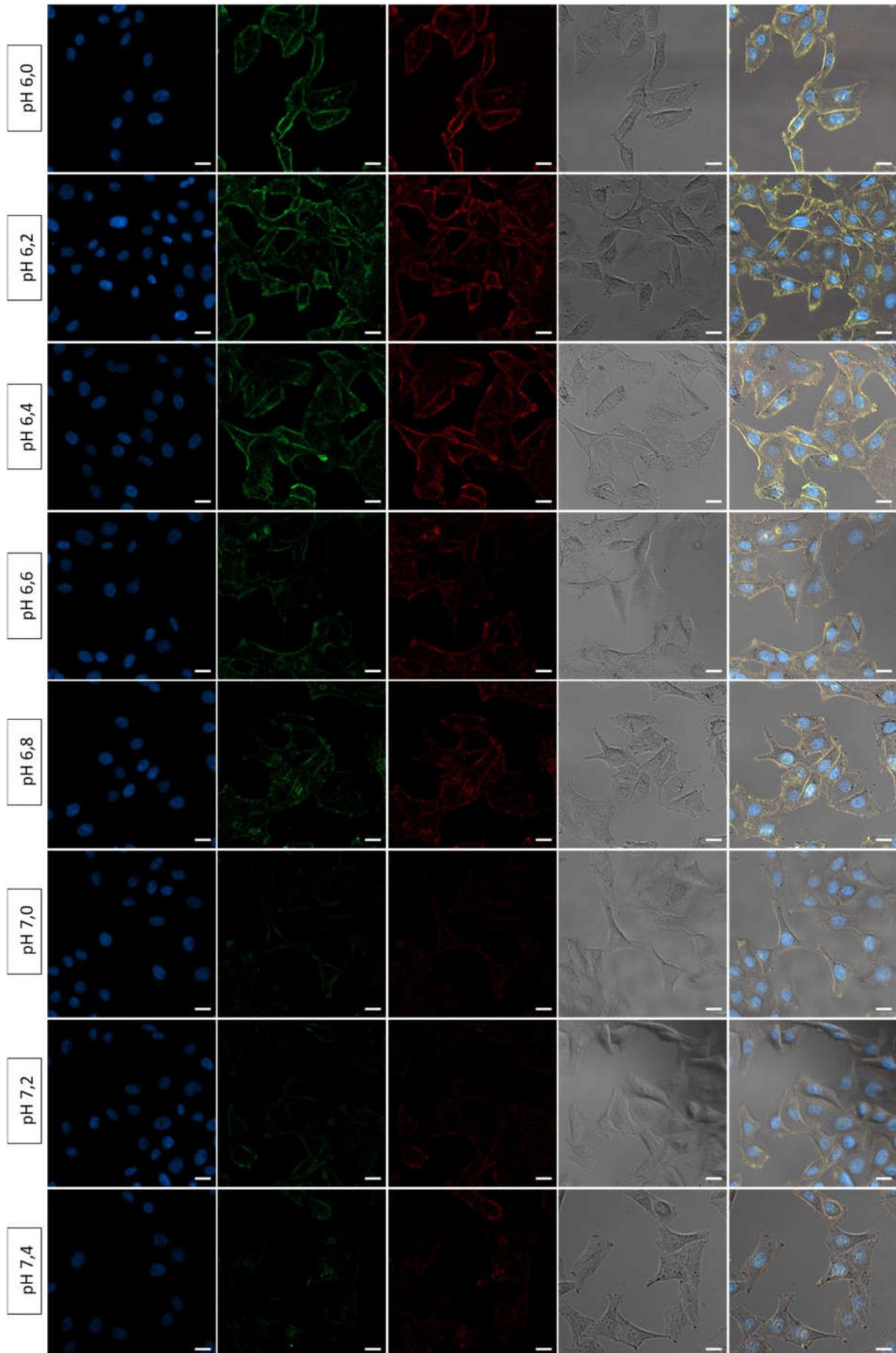


Рисунок 38. pH-зависимое связывание конструкции mCherry-8-ATRAM-8-EGFP с клетками HeLa. Масштабный отрезок 20 мкм.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пептиды pHLP широко используются для нацеливания на кислотное микроокружение опухолевых клеток. В течение последних десяти лет появлялось множество сообщений о применении pHLP-технологии для доставки разнообразных терапевтических и диагностических агентов, как низкомолекулярных, так и наноразмерных. Однако направление по доставке при помощи pHLP белковых молекул было слабо представлено в литературе. Несмотря на гипотетическую привлекательность данного направления (во-первых, за счет получения мультимодальных гибридных конструкций, в которых pHLP выполняет функцию нацеливания на опухоль, а белки, способные выполнять самые различные функции, определяли бы терапевтические или другие свойства целевых конструкций; во-вторых, за счет использования стандартных протоколов получения и наработки гибридных белков с использованием бактериальных систем, исключая этапы органического синтеза) к 2018 г (году начала диссертационного исследования) было известно о получении лишь двух конструкций такого рода [213, 214]. Ввиду этого настоящая работа была посвящена изучению вопросов совместимости pHLP-технологии в сочетании с высокомолекулярными белковыми компонентами для определения перспективности ее применения. В ходе данного исследования были получены десятки гибридных конструкций вида белок-pHLP и проведено их подробное систематическое изучение. В качестве белковых молекул были выбраны флуоресцентные белки, поскольку 1) они изначально обладают довольно стабильной третичной структурой, 2) по эффективности созревания хромофора можно судить об эффективности их фолдирования в составе гибридных конструкций и о степени влияния пептидов pHLP на первоначальные свойства белковой составляющей, 3) могут выполнять функцию флуоресцентной метки для визуализации pH-зависимой таргетной доставки.

Сначала были получены конструкции на основе EGFP и пептидов pHLPwt и pHLPvar3 – вариантом, обладающим улучшенными по сравнению с pHLPwt показателями накопления в опухолях при доставке низкомолекулярных красителей [46, 80]. Для изучения pH-зависимых свойств данных конструкций на клеточных моделях были разработаны оригинальные методики. В результате тестирования EGFP-GS-pHLPwt и EGFP-GS-pHLPvar3 было установлено, что в этом случае лучшим связыванием обладала конструкция, несущая pHLPwt. Такой же эффект наблюдался и при замене в данных гибридных конструкциях линкерной последовательности -GS- на -IEGRCS-, однако замена линкера привела к улучшению pH-зависимой эффективности связывания.

В 2023 г сообщалось о получении двух гибридных белковых конструкций, нацеливающих на опухоль при помощи pHLPwt хемокин CCL21 [228] и цитокин IL2 [230], которые, как предполагалось, будучи закрепленными на поверхности опухоли привлекали бы иммунные

клетки для противоопухолевого ответа. Однако ранее в результате выполнения настоящей работы на примере EGFP-GS-pHLIPwt было продемонстрировано, что конструкции вида белок-pHLIP при связывании с мембраной способны к быстрому проникновению внутрь клетки за счет различных механизмов эндоцитоза [244]. Данное явление стоит учитывать при разработке белковых препаратов в сочетании с pHLIP, поскольку оно может влиять на эффективность терапии.

На примере гибридной конструкции с фототоксичным доменом на основе мутантного варианта miniSOG и пептида pHLIP (miniSOG-pHLIPwt) был продемонстрирован потенциал их совместного применения: фототоксичность miniSOG-pHLIPwt наблюдалась только при значениях pH, ниже физиологического, и только после фотоактивации.

На примерах гибридных конструкций на основе mCherry и пептидов ATRAM и pHLIPwt, содержащих различные линкеры между флуоресцентной и pH-чувствительной частями, было также подтверждено влияние последовательности линкера на эффективность pH-зависимого связывания. Было установлено, что получение pH-чувствительных конструкций с сохранением их первоначальных функциональных свойств на основе белков и пептидов pHLIP – нетривиальная задача, поскольку на эффективность pH-зависимого связывания может влиять тип используемого линкера, от которого зависит степень доступности пептида для клеточной мембраны. Данная гипотеза была подтверждена объединением двух конструкций с пептидом ATRAM на N- или C-конце ФБ (mCherry-8-ATRAM и ATRAM-8-EGFP-H6), неэффективно связывающихся с клеточной мембраной при понижении pH, в одну mCherry-8-ATRAM-8-EGFP. Последняя демонстрировала высокоэффективное pH-зависимое связывание ввиду использования сразу двух белковых компонентов со стабильной третичной структурой, что привело к увеличению доступности гидрофобного пептида для клеточной мембраны, однако наблюдалось значительное уменьшение эффективности синтеза хромофоров для обоих ФБ.

Установлено, что конструкции ФБ-pHLIP, в отличие от конструкций pHLIP-метка (низкомолекулярный синтетический краситель), являются более pH-селективными: они практически не связываются с мембранами клеток при значениях pH 7,0-7,4. В случае же конструкций pHLIP-метка неспецифичное связывание при физиологических значениях pH заметно сильнее, и объясняется оно гидрофобной природой пептидов pHLIP. В то же время мечение белковой конструкции с pHLIP (mCherry-16-ATRAM) гидрофобным красителем на основе BODIPY вблизи pH-чувствительного пептида приводило к сдвигу ее максимального связывания с мембранами клеток от значения pH 6,2 (до мечения) до 6,8 (после мечения), при этом отсутствовало неспецифичное связывание при физиологическом значении pH.

Таким образом, в результате выполнения данной работы была обнаружена проблема получения гибридных белковых конструкций с pHLIP, обладающих эффективным pH-

зависимым связыванием. Были предложены новые подходы, направленные на преодоление данной проблемы. Также при получении гибридных конструкций такого рода для применения в диагностических, терапевтических или тераностических целях стоит обращать внимание на то, что их эффективность может быть снижена за счет влияния рНЛIP на фолдирование белкового компонента, а мечение гидрофобными низкомолекулярными соединениями может сдвигать рН-зависимый процесс встраивания в клеточную мембрану в сторону более физиологических значений. Представленные в данной работе результаты позволят заполнить пробелы в понимании верной стратегии получения оптимальных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP для противораковой терапии.

6. ВЫВОДЫ

1. Получен и подробно изучен ряд гибридных конструкций на основе флуоресцентных белков и нескольких пептидов семейства рНЛIP. Установлено, что гибридные конструкции на основе различных пептидов рНЛIP обладают разной эффективностью связывания при понижении рН. Обнаружено влияние последовательности пептидов рНЛIP на фолдирование белкового компонента в составе гибридной конструкции.
2. На основе выявленных закономерностей предложены новые подходы для получения конструкций, способных к эффективному связыванию с раковыми клетками при понижении рН. Эти подходы основаны на выборе оптимального линкера, соединяющего белковый и рН-чувствительный компоненты, а также заключении пептида рНЛIP между двумя белковыми компонентами (т.е. получение конструкции вида белок-рНЛIP-белок).
3. Продемонстрирован потенциал применения рНЛIP-технологии в сочетании с белковыми молекулами на примерах флуоресцентных белков, обладающих в том числе и фототоксичными свойствами, на моделях *in vivo* и *in vitro*.
4. Обнаруженное в предыдущих работах неспецифичное связывание конъюгатов рНЛIP с низкомолекулярными метками при физиологическом значении рН обусловлено гидрофобностью пептидов семейства рНЛIP. Введение компонента в виде ФБ увеличивает общую гидрофильность гибридной конструкции и приводит к связыванию только при пониженных значениях рН. Мечение белково-пептидных рН-чувствительных конструкций гидрофобной низкомолекулярной меткой вблизи последовательности рНЛIP не влияет на специфичность, однако приводит к сдвигу константы кислотно-основного равновесия в сторону физиологических значений рН.

7. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей:

1. A.Y. Frolova, A.A. Pakhomov, D. L. Kakuev, A.S. Sungurova, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Cancer cells targeting with genetically engineered constructs based on a pH-dependent membrane insertion peptide and fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022, 612, 141-146.
2. A.Y. Frolova, A.A. Pakhomov, D. L. Kakuev, A.S. Sungurova, A.A. Dremina, E.D. Mamontova, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Hybrid protein-peptide system for the selective pH-dependent binding and photodynamic ablation of cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2023, 249, 112803.
3. A.Y. Frolova, A.A. Pakhomov, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Influence of Peptide Linkers on the Functional Properties of Hybrid Structures with Selective pH-Dependent Binding to Cancer Cells. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2024, 50, 1141–1149.

Список тезисов конференций:

1. А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Разработка и изучение белковых структур для тераностики раковых заболеваний // XXVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2020, тезисы докладов.
2. А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Гибридные конструкции на основе пептида рНЛIP и флуоресцентных белков для адресной доставки к раковым клеткам и их элиминации в условиях ацидоза // XXXIII зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2021, тезисы докладов, с. 226.
3. А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Получение гибридных структур на основе флуоресцентных красителей и пептидов рНЛIP для адресной доставки к раковым клеткам // XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2021, тезисы докладов.
4. А.Ю. Фролова, Сунгурова А.С., А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Получение оптимальной гибридной конструкции на основе флуоресцентного белка mCherry и рН-чувствительного пептида для тераностики рака // XXXIV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, тезисы докладов, с. 157.

5. Сунгурова А.С., А.Ю. Фролова, А.А. Пахомов, В.И. Мартынов. Изучение и сравнение рН-зависимых свойств химерных конструкций на основе флуоресцентного белка EGFP и пептидов рHLIP // XXXIV зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2022, тезисы докладов, с. 154.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2024-536).

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

1. ATRAM – acid-triggered rational membrane – pH-чувствительный пептид
2. IGFBP3 – протеин-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста
3. DOPE – 1, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
4. DOPC – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин
5. DOTA – додекантетрауксусная кислота
6. DOX – доксорубицин
7. DSPE – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфорилэтаноламин
8. CA – карбоангидраза
9. CAR-T – химерный антигенный рецептор Т-клеток
10. CEACAM6 – молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 6
11. CPP – проникающий в клетку пептид
12. EGFR – рецептор эпидермального фактора роста
13. FPR – N-формилпептидный рецептор
14. FPR1 – лиганд формилпептидного рецептора
15. GLUT – транспортёр глюкозы
16. GPCR – рецептор, сопряженный с G-белками
17. HIF – факторы, индуцирующие гипоксию
18. ICG – индоцианин зеленый
19. ISRIB – ингибитор стрессовых гранул
20. JAM – молекула адгезии
21. JM – юкстамембранный домен
22. MCT – транспортеры монокарбоксилата
23. NHE1 – натрий-водородный антипортер
24. PAR1 – рецептор, активируемый протеазой
25. PDG – пируватдегидрогеназа
26. PDGK1 – киназа-1 пируватдегидрогеназы
27. PDPA – поли-2-(диизопропиламино)-этилметакрилат
28. pHILIP – pH low insertion peptide – pH-чувствительный пептид
29. PI3K – комплекс фосфатидилинозитол-3-киназы класса III
30. PMPC – поли-2-(метакрилоилокси)-этилфосфорилхолин
31. Trx – тиоредоксин
32. VEGF – vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия сосудов
33. А.к.о. – аминокислотный остаток
34. АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

35. АФК – активные формы кислорода
36. БТШ – белков теплового шока
37. ЗНЗ – золотые нанозвезды
38. НЧЗ – наночастицы золота
39. ИПП – ингибитор протонной помпы
40. миРНК – малые интерферирующие РНК
41. МРТ – магнитная резонансная томография
42. НЧ – наночастица
43. ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография
44. ПНЗС – полые золотые наносферы
45. ПНК – пептидно-нуклеиновые кислоты.
46. ПЦР – полимеразная цепная реакция
47. ПЭГ – полиэтиленгликоль
48. ФБ – флуоресцентный белок
49. Хеб – хлорин еб
50. ЦТК – цикл трикарбоновых кислот
51. ЭДТА – натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
52. ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hompland, T. Tumor Hypoxia as a Barrier in Cancer Therapy: Why Levels Matter / T. Hompland, C. S. Fjeldbo, H. Lyng // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 3. – P. 499.
2. Chronic and Cycling Hypoxia: Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF- κ B Activation: A Review of the Molecular Mechanisms / J. Korbecki, D. Simińska, M. Gąssowska-Dobrowolska [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 19. – P. 10701.
3. Hypoxia Alters the Expression of CC Chemokines and CC Chemokine Receptors in a Tumor— A Literature Review / J. Korbecki, K. Kojder, K. Barczak [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 16. – P. 5647.
4. Michiels, C. Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment / C. Michiels, C. Tellier, O. Feron // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2016. – Vol. 1866. – № 1. – P. 76-86.
5. Thomlinson, R. H. The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy / R. H. Thomlinson, L. H. Gray // *British Journal of Cancer*. – 1955. – Vol. 9. – № 4. – P. 539-549.
6. The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radiotherapy / L. H. Gray, A. D. Conger, M. Ebert [et al.] // *The British Journal of Radiology*. – 1953. – Vol. 26. – № 312. – P. 638-648.
7. Dewhirst, M. W. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response / M. W. Dewhirst, Y. Cao, B. Moeller // *Nature Reviews Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – № 6. – P. 425-437.
8. Dewhirst, M. W. Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress / M. W. Dewhirst // *Radiation Research*. – 2009. – Vol. 172. – № 6. – P. 653-665.
9. Perivascular oxygen tensions in a transplantable mammary tumor growing in a dorsal flap window chamber / M. W. Dewhirst, E. T. Ong, B. Klitzman [et al.] // *Radiation Research*. – 1992. – Vol. 130. – № 2. – P. 171-182.
10. Spectral imaging facilitates visualization and measurements of unstable and abnormal microvascular oxygen transport in tumors / B. S. Sorg, M. E. Hardee, N. Agarwal [et al.] // *Journal of Biomedical Optics*. – 2008. – Vol. 13. – № 1. – P. 014026.
11. Analysis of oxygen transport to tumor tissue by microvascular networks / T. W. Secomb, R. Hsu, M. W. Dewhirst [et al.] // *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. – 1993. – Vol. 25. – № 3. – P. 481-489.
12. Quantification of longitudinal tissue pO₂ gradients in window chamber tumours: impact on tumour hypoxia / M. W. Dewhirst, E. T. Ong, R. D. Braun [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 1999.

– Vol. 79. – № 11-12. – P. 1717-1722.

13. Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia / M. W. Dewhirst, H. Kimura, S. Rehmus [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 1996. – Vol. 74. – № SUPPL. XXVII.
14. The effect of flunarizine on erythrocyte suspension viscosity under conditions of extreme hypoxia, low pH, and lactate treatment / B. Kavanagh, B. Coffey, D. Needham [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 1993. – Vol. 67. – № 4. – P. 734-741.
15. Eddy, H. A. Development Hamster of the Vascular System in the Malignant Neurilemmoma p2 Random-bred male Syrian hamsters weighing 125-160 g , fed Purina Mouse Chow / H. A. Eddy, G. W. Casarett. – 1973. – Vol. 82. – P. 63-82.
16. Analysis of the Effects of Oxygen Supply and Demand on Hypoxic Fraction in Tumors / T. W. Secomb, R. Hsu, E. T. Ong [et al.] // *Acta Oncologica*. – 1995. – Vol. 34. – № 3. – P. 313-316.
17. Brown, J. M. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation / J. M. Brown // *The British Journal of Radiology*. – 1979. – Vol. 52. – № 620. – P. 650-656.
18. Dewhirst, M. W. Intermittent Hypoxia Furthers the Rationale for Hypoxia-Inducible Factor-1 Targeting / M. W. Dewhirst // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 3. – P. 854-855.
19. Chaplin, D. J. Acute hypoxia in tumors: Implications for modifiers of radiation effects / D. J. Chaplin, R. E. Durand, P. L. Olive // *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*. – 1986. – Vol. 12. – № 8. – P. 1279-1282.
20. Chen, C. Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma / C. Chen, T. Lou // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 28. – P. 46691-46703.
21. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors / G. NEUFELD, T. COHEN, S. GENGRINOVITCH, Z. POLTORAK // *The FASEB Journal*. – 1999. – Vol. 13. – № 1. – P. 9-22.
22. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 α reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism / J. Chen, S. Zhao, K. Nakada [et al.] // *American Journal of Pathology*. – 2003. – Vol. 162. – № 4. – P. 1283-1291.
23. Dengler, V. L. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors / V. L. Dengler, M. D. Galbraith, J. M. Espinosa // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 49. – № 1. – P. 1-15.
24. Judah, J. D. Oxidative Phosphorylation / J. D. Judah // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2011. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-16.
25. CHAFFEY, N. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell*. 4th edn. / N. CHAFFEY // *Annals of Botany*. – 2003. – Vol. 91. – № 3. – P. 401-401.
26. *Stryer Biochemie* / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer. – Berlin, Heidelberg :

Springer Berlin Heidelberg, 2018. – 1-1515 p.

27. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells / O. Warburg // *Science*. – 1956. – Vol. 123. – № 3191. – P. 309-314.
28. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia / J. Kim, I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, C. V. Dang // *Cell Metabolism*. – 2006. – Vol. 3. – № 3. – P. 177-185.
29. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption / I. Papandreou, R. A. Cairns, L. Fontana [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2006. – Vol. 3. – № 3. – P. 187-197.
30. Samanta, D. Metabolic adaptation of cancer and immune cells mediated by hypoxia-inducible factors / D. Samanta, G. L. Semenza // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2018. – Vol. 1870. – № 1. – P. 15-22.
31. Gatenby, R. A. Why do cancers have high aerobic glycolysis? / R. A. Gatenby, R. J. Gillies // *Nature Reviews Cancer*. – 2004. – Vol. 4. – № 11. – P. 891-899.
32. Glycolysis inhibition for anticancer treatment / H. Pelicano, D. S. Martin, R.-H. Xu, P. Huang // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25. – № 34. – P. 4633-4646.
33. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications / Z. Chen, W. Lu, C. Garcia-Prieto, P. Huang // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2007. – Vol. 39. – № 3. – P. 267-274.
34. Defining the Molecular Basis of Tumor Metabolism: a Continuing Challenge Since Warburg's Discovery / A. C. Santos de Souza, G. Zenker Justo, D. Ribeiro de Araújo, A. D. Martins Cavagis // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2011. – Vol. 28. – № 5. – P. 771-792.
35. Ganapathy-Kanniappan, S. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects / S. Ganapathy-Kanniappan, J.-F. H. Geschwind // *Molecular Cancer*. – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 152.
36. Locasale, J. W. Altered metabolism in cancer / J. W. Locasale, L. C. Cantley // *BMC Biology*. – 2010. – Vol. 8. – № 1. – P. 88.
37. Hamanaka, R. B. Targeting glucose metabolism for cancer therapy / R. B. Hamanaka, N. S. Chandel // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – Vol. 209. – № 2. – P. 211-215.
38. Lunt, S. Y. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation / S. Y. Lunt, M. G. Vander Heiden // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2011. – Vol. 27. – № 1. – P. 441-464.
39. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth / R. J. DeBerardinis, N. Sayed, D. Ditsworth, C. B. Thompson // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2008. – Vol. 18. – № 1. – P. 54-61.
40. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. / C. C. Wykoff, N. J. P. Beasley, P. H. Watson [et al.] // *Cancer research*. – 2000. – Vol. 60. – № 24. – P. 7075-83.

41. Potter, C. P. S. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer / C. P. S. Potter, A. L. Harris // *British Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 89. – № 1. – P. 2-7.
42. The Role of Carbonic Anhydrase 9 in Regulating Extracellular and Intracellular pH in Three-dimensional Tumor Cell Growths / P. Swietach, S. Patiar, C. T. Supuran [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284. – № 30. – P. 20299-20310.
43. Gillies, R. J. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work / R. J. Gillies, D. Verduzco, R. A. Gatenby // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 7. – P. 487-493.
44. Andreev, O. A. Targeting diseased tissues by pHLIP insertion at low cell surface pH / O. A. Andreev, D. M. Engelman, Y. K. Reshetnyak // *Frontiers in Physiology*. – 2014. – Vol. 5. – № March. – P. 1-7.
45. Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion / V. Estrella, T. Chen, M. Lloyd [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 5. – P. 1524-1535.
46. The pH low insertion peptide pHLIP Variant 3 as a novel marker of acidic malignant lesions / T. T. Tapmeier, A. Moshnikova, J. Beech [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 31. – P. 9710-9715.
47. Probe for the measurement of cell surface pH in vivo and ex vivo / M. Anderson, A. Moshnikova, D. M. Engelman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – Vol. 113. – № 29. – P. 8177-8181.
48. Applications of pHLIP Technology for Cancer Imaging and Therapy / L. C. Wyatt, J. S. Lewis, O. A. Andreev [et al.] // *Trends in Biotechnology*. – 2017. – Vol. 35. – № 7. – P. 653-664.
49. Corbet, C. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat / C. Corbet, O. Feron // *Nature Reviews Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – № 10. – P. 577-593.
50. V-ATPase as an effective therapeutic target for sarcomas / F. Perut, S. Avnet, C. Fotia [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2014. – Vol. 320. – № 1. – P. 21-32.
51. Carbonic Anhydrase IX Promotes Tumor Growth and Necrosis In Vivo and Inhibition Enhances Anti-VEGF Therapy / A. McIntyre, S. Patiar, S. Wigfield [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18. – № 11. – P. 3100-3111.
52. New Aspects of an Old Drug – Diclofenac Targets MYC and Glucose Metabolism in Tumor Cells / E. Gottfried, S. A. Lang, K. Renner [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e66987.
53. Na⁺/H⁺ antiporter (NHE1) and lactate/H⁺ symporters (MCTs) in pH homeostasis and cancer metabolism / L. Counillon, Y. Bouret, I. Marchiq, J. Pouyssegur // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. – 2016. – Vol. 1863. – № 10. – P. 2465-2480.
54. Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases / I. F. Robey, B. K. Baggett, N. D. Kirkpatrick [et al.] // *Cancer Research*. – 2009. – Vol. 69. – № 6. – P. 2260-2268.

55. Neutralization of Tumor Acidity Improves Antitumor Responses to Immunotherapy / S. Pilon-Thomas, K. N. Kodumudi, A. E. El-Kenawi [et al.] // *Cancer Research*. – 2016. – Vol. 76. – № 6. – P. 1381-1390.
56. Spontaneous, pH-Dependent Membrane Insertion of a Transbilayer α -Helix / J. F. Hunt, P. Rath, K. J. Rothschild, D. M. Engelman // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 49. – P. 15177-15192.
57. Paclitaxel-Loaded Polymersomes for Enhanced Intraperitoneal Chemotherapy / L. Simón-Gracia, H. Hunt, P. D. Scodeller [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2016. – Vol. 15. – № 4. – P. 670-679.
58. Enhanced drug delivery to melanoma cells using PMPC-PDPA polymersomes / C. Pegoraro, D. Cecchin, L. S. Gracia [et al.] // *Cancer Letters*. – 2013. – Vol. 334. – № 2. – P. 328-337.
59. Polymersome-Mediated Delivery of Combination Anticancer Therapy to Head and Neck Cancer Cells: 2D and 3D in Vitro Evaluation / H. E. Colley, V. Hearnden, M. Avila-Olias [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 11. – № 4. – P. 1176-1188.
60. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review / M. Kanamala, W. R. Wilson, M. Yang [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 85. – P. 152-167.
61. Endosomal escape and the knockdown efficiency of liposomal-siRNA by the fusogenic peptide shGALA / Y. Sakurai, H. Hatakeyama, Y. Sato [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – № 24. – P. 5733-5742.
62. A KALA-modified lipid nanoparticle containing CpG-free plasmid DNA as a potential DNA vaccine carrier for antigen presentation and as an immune-stimulative adjuvant / N. Miura, S. M. Shaheen, H. Akita [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – № 3. – P. 1317-1331.
63. Modifying Antigen-Encapsulating Liposomes with KALA Facilitates MHC Class I Antigen Presentation and Enhances Anti-tumor Effects / N. Miura, H. Akita, N. Tateshita [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2017. – Vol. 25. – № 4. – P. 1003-1013.
64. A Biophysical Study of Integral Membrane Protein Folding / J. F. Hunt, T. N. Earnest, O. Bousché [et al.] // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36. – № 49. – P. 15156-15176.
65. Reshetnyak, Y. K. Aiming the magic bullet: targeted delivery of imaging and therapeutic agents to solid tumors by pHLIP peptides / Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, D. M. Engelman // *Frontiers in Pharmacology*. – 2024. – Vol. 15. – № March. – P. 1-19.
66. Dharmaratne, N. U. Targeting the Hypoxic and Acidic Tumor Microenvironment with pH-Sensitive Peptides / N. U. Dharmaratne, A. R. Kaplan, P. M. Glazer // *Cells*. – 2021. – Vol. 10. – № 3. – P. 541.
67. A Monomeric Membrane Peptide that Lives in Three Worlds: In Solution, Attached to, and Inserted across Lipid Bilayers / Y. K. Reshetnyak, M. Segala, O. A. Andreev, D. M. Engelman // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 93. – № 7. – P. 2363-2372.

68. Energetics of peptide (pHLIP) binding to and folding across a lipid bilayer membrane / Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, M. Segala [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 40. – P. 15340-15345.
69. Tang, J. Dissecting the Membrane Binding and Insertion Kinetics of a pHLIP Peptide / J. Tang, F. Gai // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47. – № 32. – P. 8250-8252.
70. Zoonens, M. Bilayer Interactions of pHLIP, a Peptide that Can Deliver Drugs and Target Tumors / M. Zoonens, Y. K. Reshetnyak, D. M. Engelman // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 95. – № 1. – P. 225-235.
71. pH (low) insertion peptide (pHLIP) inserts across a lipid bilayer as a helix and exits by a different path / O. A. Andreev, A. G. Karabadzhak, D. Weerakkody [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 9. – P. 4081-4086.
72. Translocation of molecules into cells by pH-dependent insertion of a transmembrane helix / Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, U. Lehnert, D. M. Engelman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 17. – P. 6460-6465.
73. Mechanism and uses of a membrane peptide that targets tumors and other acidic tissues in vivo / O. A. Andreev, A. D. Dupuy, M. Segala [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – Vol. 104. – № 19. – P. 7893-7898.
74. Andreev, O. A. Targeting acidic diseased tissue: New technology based on use of the pH (Low) Insertion Peptide (pHLIP). / O. A. Andreev, D. M. Engelman, Y. K. Reshetnyak // *Chimica oggi*. – 2009. – Vol. 27. – № 2. – P. 34-37.
75. Accurate Analysis of Tumor Margins Using a Fluorescent pH Low Insertion Peptide (pHLIP) / J. Segala, D. M. Engelman, Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2009. – Vol. 10. – № 8. – P. 3478-3487.
76. A Novel Technology for the Imaging of Acidic Prostate Tumors by Positron Emission Tomography / A. L. Vāvere, G. B. Biddlecombe, W. M. Spees [et al.] // *Cancer Research*. – 2009. – Vol. 69. – № 10. – P. 4510-4516.
77. Tuning the insertion properties of pHLIP / M. Musial-Siwiek, A. Karabadzhak, O. A. Andreev [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2010. – Vol. 1798. – № 6. – P. 1041-1046.
78. Roles of Carboxyl Groups in the Transmembrane Insertion of Peptides / F. N. Barrera, D. Weerakkody, M. Anderson [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 413. – № 2. – P. 359-371.
79. Fendos, J. Aspartate Embedding Depth Affects pHLIP's Insertion p K a / J. Fendos, F. N. Barrera, D. M. Engelman // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52. – № 27. – P. 4595-4604.
80. Family of pH (low) insertion peptides for tumor targeting / D. Weerakkody, A. Moshnikova,

- M. S. Thakur [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 15. – P. 5834-5839.
81. A Novel Soluble Peptide with pH-Responsive Membrane Insertion / V. P. Nguyen, D. S. Alves, H. L. Scott [et al.] // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 54. – № 43. – P. 6567-6575.
82. Noncanonical Amino Acids to Improve the pH Response of pHLIP Insertion at Tumor Acidity / J. O. Onyango, M. S. Chung, C. Eng [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2015. – Vol. 54. – № 12. – P. 3658-3663.
83. Targeting cancer cells in acidosis with conjugates between the carnitine palmitoyltransferase 1 inhibitor etomoxir and pH (low) insertion peptides / M. Deskevire, J. Lan, E. Dierge [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 624. – № March. – P. 122041.
84. Arginine Residues Modulate the Membrane Interactions of pHLIP Peptides / T. F. D. Silva, H. Visca, C. Klumpp [et al.] // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2023. – Vol. 63. – № 14. – P. 4433-4446.
85. A double-switch pHLIP system enables selective enrichment of circulating tumor microenvironment-derived extracellular vesicles / Z. Zong, X. Liu, Z. Ye, D. Liu // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2023. – Vol. 120. – № 2. – P. 2017.
86. Modulation of the pHLIP Transmembrane Helix Insertion Pathway / A. G. Karabadzha, D. Weerakkody, D. Wijesinghe [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2012. – Vol. 102. – № 8. – P. 1846-1855.
87. Lipid Headgroups Modulate Membrane Insertion of pHLIP Peptide / A. Kyrychenko, V. Vasquez-Montes, M. B. Ulmschneider, A. S. Ladokhin // *Biophysical Journal*. – 2015. – Vol. 108. – № 4. – P. 791-794.
88. Kinetics of pHLIP peptide insertion into and exit from a membrane / G. Slaybaugh, D. Weerakkody, D. M. Engelman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117. – № 22. – P. 12095-12100.
89. Bilayer Thickness and Curvature Influence Binding and Insertion of a pHLIP Peptide / A. G. Karabadzha, D. Weerakkody, J. Deacon [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2018. – Vol. 114. – № 9. – P. 2107-2115.
90. pHLIP Peptide Interaction with a Membrane Monitored by SAXS / T. Narayanan, D. Weerakkody, A. G. Karabadzha [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120. – № 44. – P. 11484-11491.
91. Peptides of pHLIP family for targeted intracellular and extracellular delivery of cargo molecules to tumors / L. C. Wyatt, A. Moshnikova, T. Crawford [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 115. – № 12. – P. E2811-E2818.
92. Comparison of lipid-dependent bilayer insertion of pHLIP and its P20G variant / V. Vasquez-Montes, J. Gerhart, K. E. King [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. –

2018. – Vol. 1860. – № 2. – P. 534-543.

93. Schleich, J. P. Ions at the Interface: Pushing the pK of pHLIP / J. P. Schleich // *Biophysical Journal*. – 2019. – Vol. 117. – № 5. – P. 793-794.

94. Phosphatidylserine Asymmetry Promotes the Membrane Insertion of a Transmembrane Helix / H. L. Scott, F. A. Heberle, J. Katsaras, F. N. Barrera // *Biophysical Journal*. – 2019. – Vol. 116. – № 8. – P. 1495-1506.

95. Ca²⁺-dependent interactions between lipids and the tumor-targeting peptide pHLIP / V. Vasquez-Montes, V. Tyagi, E. Sikorski [et al.] // *Protein Science*. – 2022. – Vol. 31. – № 9. – P. 1-15.

96. Therapeutic Efficacy of a Family of pHLIP–MMAF Conjugates in Cancer Cells and Mouse Models / K. E. Burns, H. Hensley, M. K. Robinson, D. Thévenin // *Molecular Pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 14. – № 2. – P. 415-422.

97. Measuring Tumor Aggressiveness and Targeting Metastatic Lesions with Fluorescent pHLIP / Y. K. Reshetnyak, L. Yao, S. Zheng [et al.] // *Molecular Imaging and Biology*. – 2011. – Vol. 13. – № 6. – P. 1146-1156.

98. Targeting Breast Tumors with pH (Low) Insertion Peptides / R.-C. Adochite, A. Moshnikova, S. D. Carlin [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 11. – № 8. – P. 2896-2905.

99. Targeting Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Acidic Microenvironment / Z. Cruz-Monserrate, C. L. Roland, D. Deng [et al.] // *Scientific Reports*. – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 4410.

100. pHLIP-FIRE, a Cell Insertion-Triggered Fluorescent Probe for Imaging Tumors Demonstrates Targeted Cargo Delivery In Vivo / A. G. Karabadzak, M. An, L. Yao [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – P. 2545-2553.

101. Comparative Study of Tumor Targeting and Biodistribution of pH (Low) Insertion Peptides (pHLIP® Peptides) Conjugated with Different Fluorescent Dyes / R.-C. Adochite, A. Moshnikova, J. Golijanin [et al.] // *Molecular Imaging and Biology*. – 2016. – Vol. 18. – № 5. – P. 686-696.

102. Polyamines drive myeloid cell survival by buffering intracellular pH to promote immunosuppression in glioblastoma / J. Miska, A. Rashidi, C. Lee-Chang [et al.] // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7. – № 8.

103. pHLIP Peptides Target Acidity in Activated Macrophages / H. Visca, M. DuPont, A. Moshnikova [et al.] // *Molecular Imaging and Biology*. – 2022. – Vol. 24. – № 6. – P. 874-885.

104. Efficient ¹⁸F-Labeling of Large 37-Amino-Acid pHLIP Peptide Analogues and Their Biological Evaluation / P. Daumar, C. A. Wanger-Baumann, N. Pillarsetty [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2012. – Vol. 23. – № 8. – P. 1557-1566.

105. In Vivo pH Imaging with ^{99m}Tc-pHLIP / S. Macholl, M. S. Morrison, P. Iveson [et al.] // *Molecular Imaging and Biology*. – 2012. – Vol. 14. – № 6. – P. 725-734.

106. Understanding the pharmacological properties of a metabolic PET tracer in prostate cancer /

- N. T. Viola-Villegas, S. D. Carlin, E. Ackerstaff [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 20. – P. 7254-7259.
107. PET Imaging of Extracellular pH in Tumors with ⁶⁴Cu- and ¹⁸F-Labeled pHLIP Peptides: A Structure–Activity Optimization Study / D. W. Demoin, L. C. Wyatt, K. J. Edwards [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2016. – Vol. 27. – № 9. – P. 2014-2023.
108. An Experimental Study on [¹²⁵I]I-pHLIP (Var7) for SPECT/CT Imaging of an MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Mouse Model by Targeting the Tumor Microenvironment / M. Yu, Y. Sun, G. Yang, Z. Wang // *Molecular Imaging*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1-9.
109. Synthesis and Evaluation of Technetium-99m-Labeled pH (Low) Insertion Peptide Variant 7 for Early Diagnosis of MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer by Targeting the Tumor Microenvironment / Y. Chen, Y. Su, X. Pang [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – № April. – P. 1-8.
110. Synthesis and Evaluation of Radioiodine-Labeled pH (Low) Insertion Peptide Variant 7-Like Peptide as a Noninvasive Tumor Microenvironment Imaging Agent in a Mouse MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Model / F. Wu, Y. Chen, D. Li [et al.] // *Molecular Imaging and Biology*. – 2022. – Vol. 24. – № 4. – P. 570-579.
111. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment / C. J. Cheng, R. Bahal, I. A. Babar [et al.] // *Nature*. – 2015. – Vol. 518. – № 7537. – P. 107-110.
112. Acidification of Tumor at Stromal Boundaries Drives Transcriptome Alterations Associated with Aggressive Phenotypes / N. Rohani, L. Hao, M. S. Alexis [et al.] // *Cancer Research*. – 2019. – Vol. 79. – № 8. – P. 1952-1966.
113. Eradication of tumors and development of anti-cancer immunity using STINGa targeted by pHLIP / A. Moshnikova, M. DuPont, H. Visca [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – № October. – P. 1-16.
114. Suppressing miR-21 activity in tumor-associated macrophages promotes an antitumor immune response / M. Sahraei, B. Chaube, Y. Liu [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2019. – Vol. 129. – № 12. – P. 5518-5536.
115. Targeting acidic pre-metastatic niche in lungs by pH low insertion peptide and its utility for anti-metastatic therapy / T. Matsui, Y. Toda, H. Sato [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2023. – Vol. 13. – № November. – P. 1-15.
116. pHLIP ICG for delineation of tumors and blood flow during fluorescence-guided surgery / T. Crawford, A. Moshnikova, S. Roles [et al.] // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 18356.
117. Targeted imaging of urothelium carcinoma in human bladders by an ICG pHLIP peptide ex vivo / J. Golijanin, A. Amin, A. Moshnikova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – Vol. 113. – № 42. – P. 11829-11834.

118. Acid specific dark quencher QC1 pHLIP for multi-spectral optoacoustic diagnoses of breast cancer / S. Roberts, A. Strome, C. Choi [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 8550.
119. Targeting bladder urothelial carcinoma with pHLIP-ICG and inhibition of urothelial cancer cell proliferation by pHLIP-amanitin / A. Moshnikova, B. Golijanin, A. Amin [et al.] // *Frontiers in Urology*. – 2022. – Vol. 2. – № August. – P. 1-13.
120. Ex-vivo Imaging of Upper Tract Urothelial Carcinoma Using Novel pH Low Insertion Peptide (Variant 3), a Molecular Imaging Probe / J. Brito, B. Golijanin, O. Kott [et al.] // *Urology*. – 2020. – Vol. 139. – P. 134-140.
121. iNOS Regulates the Therapeutic Response of Pancreatic Cancer Cells to Radiotherapy / P. M. R. Pereira, K. J. Edwards, K. Mandleywala [et al.] // *Cancer Research*. – 2020. – Vol. 80. – № 8. – P. 1681-1692.
122. PET Imaging of Acidic Tumor Environment With ⁸⁹Zr-labeled pHLIP Probes / D. Bauer, H. Visca, A. Weerakkody [et al.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – Vol. 12. – № May. – P. 1-13.
123. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – Vol. 64. – № SUPPL. – P. 4-17.
124. Tuning a polar molecule for selective cytoplasmic delivery by a pH (Low) insertion peptide / D. Wijesinghe, D. M. Engelman, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – № 47. – P. 10215-10222.
125. pH-(low)-insertion-peptide (pHLIP) translocation of membrane impermeable phalloidin toxin inhibits cancer cell proliferation / M. An, D. Wijesinghe, O. A. Andreev [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 47. – P. 20246-20250.
126. Antiproliferative Effect of pHLIP-Amanitin / A. Moshnikova, V. Moshnikova, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52. – № 7. – P. 1171-1178.
127. A smart tumor targeting peptide–drug conjugate, pHLIP-SS-DOX: synthesis and cellular uptake on MCF-7 and MCF-7/Adr cells / Q. Song, X. Chuan, B. Chen [et al.] // *Drug Delivery*. – 2015. – Vol. 23. – № 5. – P. 1-13.
128. Münter, K. Characterization of a transporting system in rat hepatocytes. Studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport / K. Münter, D. Mayer, H. Faulstich // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 1986. – Vol. 860. – № 1. – P. 91-98.
129. Burns, K. E. Inhibition of Cancer Cell Proliferation and Breast Tumor Targeting of pHLIP–Monomethyl Auristatin E Conjugates / K. E. Burns, M. K. Robinson, D. Thévenin // *Molecular Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 12. – № 4. – P. 1250-1258.
130. Abstract B141: Evaluation of antigen-agnostic anti-tumor activity and immunological memory

- induced by CBX-15 (alphalexTM-MMAE) in the rat syngeneic breast cancer model / S. Gayle, T. Paradis, Q. Zhang [et al.] // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2023. – Vol. 22. – № 12_Supplement. – P. B141-B141.
131. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability / Y. Pommier, Y. Sun, S. N. Huang, J. L. Nitiss // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2016. – Vol. 17. – № 11. – P. 703-721.
132. Correction to ‘Tumor-selective, antigen-independent delivery of a pH sensitive peptide-topoisomerase inhibitor conjugate suppresses tumor growth without systemic toxicity’ / S. Gayle, R. Aiello, N. Leelatian [et al.] // *NAR Cancer*. – 2021. – Vol. 3. – № 4. – P. 1-13.
133. Burns, K. E. Cellular delivery of doxorubicin mediated by disulfide reduction of a peptide-dendrimer bioconjugate / K. E. Burns, J. B. Delehanty // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 545. – № 1-2. – P. 64-73.
134. pHLIP targeted intracellular delivery of calicheamicin / M. DuPont, C. Klumpp, M. Iraca [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 654. – № November 2023. – P. 123954.
135. Ricart, A. D. Antibody-Drug Conjugates of Calicheamicin Derivative: Gemtuzumab Ozogamicin and Inotuzumab Ozogamicin / A. D. Ricart // *Clinical Cancer Research*. – 2011. – Vol. 17. – № 20. – P. 6417-6427.
136. Inotuzumab Ozogamicin versus Standard Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia / H. M. Kantarjian, D. J. DeAngelo, M. Stelljes [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 375. – № 8. – P. 740-753.
137. Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide / P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt // *Science*. – 1991. – Vol. 254. – № 5037. – P. 1497-1500.
138. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules / M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen [et al.] // *Nature*. – 1993. – Vol. 365. – № 6446. – P. 566-568.
139. Saabach, J. Peptide nucleic acid (PNA) and its applications in chemical biology, diagnostics, and therapeutics / J. Saabach, P. M. Sabale, N. Winssinger // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2019. – Vol. 52. – P. 112-124.
140. Tumor-Targeted, Cytoplasmic Delivery of Large, Polar Molecules Using a pH-Low Insertion Peptide / A. A. Svoronos, R. Bahal, M. C. Pereira [et al.] // *Molecular Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 17. – № 2. – P. acs.molpharmaceut.9b00883.
141. Ku80-Targeted pH-Sensitive Peptide–PNA Conjugates Are Tumor Selective and Sensitize Cancer Cells to Ionizing Radiation / A. R. Kaplan, H. Pham, Y. Liu [et al.] // *Molecular Cancer Research*. – 2020. – Vol. 18. – № 6. – P. 873-882.

142. Feng, Y.-H. Emerging role of microRNA-21 in cancer / Y.-H. Feng, C.-J. Tsao // *Biomedical Reports*. – 2016. – Vol. 5. – № 4. – P. 395-402.
143. Redefined Nomenclature for Members of the Carcinoembryonic Antigen Family / N. Beauchemin, P. Draber, G. Dveksler [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 1999. – Vol. 252. – № 2. – P. 243-249.
144. Blumenthal, R. D. Inhibition of Adhesion, Invasion, and Metastasis by Antibodies Targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen) / R. D. Blumenthal, H. J. Hansen, D. M. Goldenberg // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – № 19. – P. 8809-8817.
145. Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers / R. D. Blumenthal, E. Leon, H. J. Hansen, D. M. Goldenberg // *BMC Cancer*. – 2007. – Vol. 7. – № 1. – P. 2.
146. Dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 expression in predicting the overall survival of gastric cancer patients / M. Zang, L. Hu, S. Cao [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 10773.
147. MicroRNA 29a therapy for CEACAM6-expressing lung adenocarcinoma / S.-M. Son, J. Yun, D.-W. Kim [et al.] // *BMC Cancer*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 843.
148. Malek, E. Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer / E. Malek, S. Jagannathan, J. J. Driscoll // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5. – № 18. – P. 8027-8038.
149. NF- κ B-HOTAIR axis links DNA damage response, chemoresistance and cellular senescence in ovarian cancer / A. R. Özeş, D. F. Miller, O. N. Özeş [et al.] // *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35. – № 41. – P. 5350-5361.
150. Therapeutic targeting using tumor specific peptides inhibits long non-coding RNA HOTAIR activity in ovarian and breast cancer / A. R. Özeş, Y. Wang, X. Zong [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 894.
151. pH low insertion peptide mediated cell division cycle-associated protein 1 -siRNA transportation for prostatic cancer therapy targeted to the tumor microenvironment / Z. Zhao, C. Li, B. Song [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 503. – № 3. – P. 1761-1767.
152. Therapeutic Effect of pHLIP-mediated CEACAM6 Gene Silencing in Lung Adenocarcinoma / S.-M. Son, J. Yun, S.-H. Lee [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 11607.
153. Nanoparticle-based materials in anticancer drug delivery: Current and future prospects / S. Ajith, F. Almomani, A. Elhissi, G. A. Hussein // *Heliyon*. – 2023. – Vol. 9. – № 11. – P. e21227.
154. Application of Nanoparticles in Cancer Treatment: A Concise Review / M. Sell, A. R. Lopes, M. Escudeiro [et al.] // *Nanomaterials*. – 2023. – Vol. 13. – № 21. – P. 2887.
155. Smart nanoparticles for cancer therapy / L. Sun, H. Liu, Y. Ye [et al.] // *Signal Transduction*

and Targeted Therapy. – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. 418.

156. PHLIP®-mediated delivery of PEGylated liposomes to cancer cells / L. Yao, J. Daniels, D. Wijesinghe [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2013. – Vol. 167. – № 3. – P. 228-237.
157. pH dependent transfer of nano-pores into membrane of cancer cells to induce apoptosis / D. Wijesinghe, M. C. M. Arachchige, A. Lu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2013. – Vol. 3. – № 1. – P. 3560.
158. Wang, Y.-Q. Endoplasmic reticulum-targeted glutathione and pH dual responsive vitamin lipid nanovesicles for tocopheryl DM1 delivery and cancer therapy / Y.-Q. Wang, M.-Y. Ji, C. Wang // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 582. – № April. – P. 119331.
159. Moghassemi, S. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review / S. Moghassemi, A. Hadjizadeh // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Vol. 185. – № 1. – P. 22-36.
160. Riccardi, D. Liposomes, transfersomes and niosomes: production methods and their applications in the vaccinal field / D. Riccardi, L. Baldino, E. Reverchon // *Journal of Translational Medicine*. – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 339.
161. pH-sensitive pHLIP® coated niosomes / M. C. Pereira, M. Pianella, D. Wei [et al.] // *Molecular Membrane Biology*. – 2016. – Vol. 33. – № 3-5. – P. 51-63.
162. Decoration of Nanovesicles with pH (Low) Insertion Peptide (pHLIP) for Targeted Delivery / F. Rinaldi, P. N. Hanieh, E. Del Favero [et al.] // *Nanoscale Research Letters*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. 391.
163. Zhang, A. The Refined Application and Evolution of Nanotechnology in Enhancing Radiosensitivity During Radiotherapy: Transitioning from Gold Nanoparticles to Multifunctional Nanomaterials / A. Zhang, L. Gao // *International Journal of Nanomedicine*. – 2023. – Vol. Volume 18. – № October. – P. 6233-6256.
164. pH-controlled delivery of luminescent europium coated nanoparticles into platelets / A. Davies, D. J. Lewis, S. P. Watson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 6. – P. 1862-1867.
165. pHLIP peptide targets nanogold particles to tumors / L. Yao, J. Danniels, A. Moshnikova [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. – № 2. – P. 465-470.
166. Enhancement of radiation effect on cancer cells by gold-pHLIP / M. P. Antosh, D. D. Wijesinghe, S. Shrestha [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112. – № 17. – P. 5372-5376.
167. Gold Nanoparticles Enhance Radiation Therapy at Low Concentrations, and Remain in Tumors for Days / B. Sah, S. Shrestha, J. Wu [et al.] // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2019. – Vol. 15. – № 9. – P. 1960-1967.

168. Synthesis and characterization of pHLIP[®] coated gold nanoparticles / J. L. Daniels, T. M. Crawford, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak // *Biochemistry and Biophysics Reports*. – 2017. – Vol. 10. – № February. – P. 62-69.
169. pH-Dependent Transmembrane Activity of Peptide-Functionalized Gold Nanostars for Computed Tomography/Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy / Y. Tian, Y. Zhang, Z. Teng [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2017. – Vol. 9. – № 3. – P. 2114-2122.
170. Photosensitizer-Loaded pH-Responsive Hollow Gold Nanospheres for Single Light-Induced Photothermal/Photodynamic Therapy / M. Yu, F. Guo, J. Wang [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2015. – Vol. 7. – № 32. – P. 17592-17597.
171. A pH-Driven and photoresponsive nanocarrier: Remotely-controlled by near-infrared light for stepwise antitumor treatment / M. Yu, F. Guo, J. Wang [et al.] // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 79. – P. 25-35.
172. Acidic pH-Targeted Chitosan-Capped Mesoporous Silica Coated Gold Nanorods Facilitate Detection of Pancreatic Tumors via Multispectral Optoacoustic Tomography / M. R. Zeiderman, D. E. Morgan, J. D. Christein [et al.] // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2016. – Vol. 2. – № 7. – P. 1108-1120.
173. pH- and photothermal-driven multistage delivery nanoplatfrom for overcoming cancer drug resistance / W. Huang, H. Zhao, J. Wan [et al.] // *Theranostics*. – 2019. – Vol. 9. – № 13. – P. 3825-3839.
174. pH-Dependent Cellular Internalization of Paramagnetic Nanoparticle / B. Janic, M. P. I. Bhuiyan, J. R. Ewing, M. M. Ali // *ACS Sensors*. – 2016. – Vol. 1. – № 8. – P. 975-978.
175. Tumor-targeted pH-low insertion peptide delivery of theranostic gadolinium nanoparticles for image-guided nanoparticle-enhanced radiation therapy / W. Liu, J. Deacon, H. Yan [et al.] // *Translational Oncology*. – 2020. – Vol. 13. – № 11. – P. 100839.
176. ES-MION-Based Dual-Modality PET/MRI Probes for Acidic Tumor Microenvironment Imaging / X. Wei, H. Zhao, G. Huang [et al.] // *ACS Omega*. – 2022. – Vol. 7. – № 4. – P. 3442-3451.
177. Arsenic Trioxide Controls the Fate of the PML-RAR α Oncoprotein by Directly Binding PML / X.-W. Zhang, X.-J. Yan, Z.-R. Zhou [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – № 5975. – P. 240-243.
178. Real-Time Monitoring of Arsenic Trioxide Release and Delivery by Activatable T₁ Imaging / Z. Zhao, X. Wang, Z. Zhang [et al.] // *ACS Nano*. – 2015. – Vol. 9. – № 3. – P. 2749-2759.
179. An extracellular pH-driven targeted multifunctional manganese arsenite delivery system for tumor imaging and therapy / K. Zhang, H. Lin, J. Mao [et al.] // *Biomaterials Science*. – 2019. – Vol. 7. – № 6. – P. 2480-2490.
180. pH-responsive pHLIP (pH low insertion peptide) nanoclusters of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a tumor-selective MRI contrast agent / Y. Wei, R. Liao, A. A. Mahmood [et al.] //

Acta Biomaterialia. – 2017. – Vol. 55. – P. 194-203.

181. Supporting data and methods for the characterization of iron oxide nanoparticles conjugated with pH-(low)-insertion peptide, testing their cytotoxicity and analyses of biodistribution in SCID mice bearing MDA-MB231 tumor / A. G. Pershina, O. Y. Brikunova, N. A. Perekucha [et al.] // Data in Brief. – 2020. – Vol. 29. – P. 105062.

182. pH-triggered delivery of magnetic nanoparticles depends on tumor volume / A. G. Pershina, O. Y. Brikunova, A. M. Demin [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 23. – № xxxx. – P. 102086.

183. Smart Design of a pH-Responsive System Based on pHLIP-Modified Magnetite Nanoparticles for Tumor MRI / A. M. Demin, A. G. Pershina, A. S. Minin [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2021. – Vol. 13. – № 31. – P. 36800-36815.

184. Variation in tumor pH affects pH-triggered delivery of peptide-modified magnetic nanoparticles / A. G. Pershina, O. Y. Brikunova, A. M. Demin [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2021. – Vol. 32. – № xxxx. – P. 102317.

185. Genetic Encoding of Targeted Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Tumor Imaging / S. Schuerle, M. Furubayashi, A. P. Soleimany [et al.] // ACS Synthetic Biology. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. 392-401.

186. Alphanđ©ry, E. Applications of Magnetosomes Synthesized by Magnetotactic Bacteria in Medicine / E. Alphanđ©ry // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2014. – Vol. 2. – № MAR. – P. 1-6.

187. pH-(Low)-Insertion Peptide-Assisted Detection and Diagnosis of Cancer Using Zinc Gallate-Based Persistent Luminescence Nanoparticles / K. S. Sharma, S. Raju M., D. Goswami [et al.] // ACS Applied Bio Materials. – 2021. – Vol. 4. – № 1. – P. 742-751.

188. Multimodal Applications of Zinc Gallate-Based Persistent Luminescent Nanoparticles in Cancer Treatment: Tumor Margining, Diagnosis, and Boron Neutron Capture Therapy / K. S. Sharma, S. Raju M, S. Phapale [et al.] // ACS Applied Bio Materials. – 2022. – Vol. 5. – № 7. – P. 3134-3145.

189. X-ray induced photodynamic therapy with copper-cysteamine nanoparticles in mice tumors / S. Shrestha, J. Wu, B. Sah [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – Vol. 116. – № 34. – P. 16823-16828.

190. Effects of Nanoparticle Size and Radiation Energy on Copper-Cysteamine Nanoparticles for X-ray Induced Photodynamic Therapy / B. Sah, J. Wu, A. Vanasse [et al.] // Nanomaterials. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 1087.

191. Hollow copper sulfide nanoparticles carrying ISRIB for the sensitized photothermal therapy of breast cancer and brain metastases through inhibiting stress granule formation and reprogramming tumor-associated macrophages / F. Tong, H. Hu, Y. Xu [et al.] // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2023.

– Vol. 13. – № 8. – P. 3471-3488.

192. Mahboubi, H. Cytoplasmic stress granules: Dynamic modulators of cell signaling and disease / H. Mahboubi, U. Stochaj // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2017. – Vol. 1863. – № 4. – P. 884-895.

193. Microenvironment-triggered multimodal precision diagnostics / L. Hao, N. Rohani, R. T. Zhao [et al.] // *Nature Materials*. – 2021. – Vol. 20. – № 10. – P. 1440-1448.

194. Glutathione-Activated NO-/ROS-Generation Nanoparticles to Modulate the Tumor Hypoxic Microenvironment for Enhancing the Effect of HIFU-Combined Chemotherapy / Q. Li, J. Zhang, J. Li [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2021. – Vol. 13. – № 23. – P. 26808-26823.

195. β -lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers / Y. Yang, X. Zhou, M. Xu [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 2681.

196. A Controlled-Release Nanocarrier with Extracellular pH Value Driven Tumor Targeting and Translocation for Drug Delivery / Z. Zhao, H. Meng, N. Wang [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2013. – Vol. 52. – № 29. – P. 7487-7491.

197. Active Targeting Significantly Outperforms Nanoparticle Size in Facilitating Tumor-Specific Uptake in Orthotopic Pancreatic Cancer / W. M. MacCuaig, B. L. Fouts, M. W. McNally [et al.] // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2021. – Vol. 13. – № 42. – P. 49614-49630.

198. Cell membrane-anchoring covalent organic framework nanosheets for single-laser-triggered synergistic tumor therapy / Y. Chen, T. Wu, S. Liu [et al.] // *Chemical Communications*. – 2021. – Vol. 57. – № 88. – P. 11685-11688.

199. Burns, K. E. Down-regulation of PAR1 activity with a pHLIP-based allosteric antagonist induces cancer cell death / K. E. Burns, D. Thevenin // *Biochemical Journal*. – 2015. – Vol. 472. – № 3. – P. 287-295.

200. pHLIP(Var7)-P1AP suppresses tumor cell proliferation in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer by targeting protease activated receptor 1 / M. Yu, Y. Chen, Z. Wang, X. Ding // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2020. – Vol. 180. – № 2. – P. 379-384.

201. Chen, Y. H. Inhibition of MDA-MB-231 cell proliferation by pHLIP(Var7)-P1AP and SPECT imaging of MDA-MB-231 breast cancer-bearing nude mice using ^{125}I -pHLIP(Var7)-P1AP / Y. H. Chen, M. M. Yu, Z. G. Wang // *Nuklearmedizin - NuclearMedicine*. – 2021. – Vol. 60. – № 03. – P. 240-248.

202. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides / L. Covic, A. L. Gresser, J. Talavera [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99. – № 2. – P. 643-648.

203. Identification of a Novel Cell Death Receptor Mediating IGFBP-3-induced Anti-tumor Effects

- in Breast and Prostate Cancer / A. R. Ingermann, Y.-F. Yang, J. Han [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 39. – P. 30233-30246.
204. Joyce, S. Blocking transmembrane219 protein signaling inhibits autophagy and restores normal cell death / S. Joyce, A. M. Nour // *PLOS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 6. – P. e0218091.
205. Burns, K. E. pH-Selective Cytotoxicity of pHLIP-Antimicrobial Peptide Conjugates / K. E. Burns, T. P. McCleerey, D. Thévenin // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 28465.
206. Tumor treatment by pHLIP-targeted antigen delivery / M. DuPont, H. Visca, A. Moshnikova [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2023. – Vol. 10. – № January. – P. 1-19.
207. Selective Display of a Chemoattractant Agonist on Cancer Cells Activates the Formyl Peptide Receptor 1 on Immune Cells** / E. L. Sikorski, J. Wehr, N. J. Ferraro [et al.] // *ChemBioChem*. – 2022. – Vol. 23. – № 8. – P. 1-6.
208. Enhanced Natural Killer Cell Immunotherapy by Rationally Assembling Fc Fragments of Antibodies onto Tumor Membranes / T. Ji, J. Lang, B. Ning [et al.] // *Advanced Materials*. – 2019. – Vol. 31. – № 6. – P. 1-8.
209. Yarden, Y. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology / Y. Yarden, G. Pines // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 8. – P. 553-563.
210. Inhibiting Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Signaling Through Targeted Delivery of a Juxtamembrane Domain Peptide Mimic / J. Gerhart, A. F. Thévenin, E. Bloch [et al.] // *ACS Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 13. – № 9. – P. 2623-2632.
211. Ebrahimi, S. B. Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design / S. B. Ebrahimi, D. Samanta // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 2411.
212. Leader, B. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification / B. Leader, Q. J. Baca, D. E. Golan // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2008. – Vol. 7. – № 1. – P. 21-39.
213. pHLIP-mediated targeting of truncated tissue factor to tumor vessels causes vascular occlusion and impairs tumor growth / S. Li, Y. Tian, Y. Zhao [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 27. – P. 23523-23532.
214. Robust Anticancer Efficacy of a Biologically Synthesized Tumor Acidity-Responsive and Autophagy-Inducing Functional Beclin 1 / G. Bin Ding, J. Sun, G. Wu [et al.] // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2018. – Vol. 10. – № 6. – P. 5227-5239.
215. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy / S. Pattingre, A. Tassa, X. Qu [et al.] // *Cell*. – 2005. – Vol. 122. – № 6. – P. 927-939.
216. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene / X. Qu, J. Yu, G. Bhagat [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Vol. 112. – № 12. – P. 1809-1820.
217. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient

- tumor suppressor / Z. Yue, S. Jin, C. Yang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 25. – P. 15077-15082.
218. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 / X. H. Liang, S. Jackson, M. Seaman [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 402. – № 6762. – P. 672-676.
219. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm / LaVallie Edward, DiBlasio Elizabeth, Kovacic Charlotte [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 1993. – P. 187-193.
220. Mendoza, C. Using the Power of Junctional Adhesion Molecules Combined with the Target of CAR-T to Inhibit Cancer Proliferation, Metastasis and Eradicate Tumors / C. Mendoza, D. Mizrachi // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10. – № 2. – P. 381.
221. Genetic deficiency or pharmacological inhibition of miR-33 protects from kidney fibrosis / N. L. Price, V. Miguel, W. Ding [et al.] // *JCI Insight*. – 2019. – Vol. 4. – № 22.
222. Targeted Suppression of miRNA-33 Using pHLIP Improves Atherosclerosis Regression / X. Zhang, N. Rotllan, A. Canfrán-Duque [et al.] // *Circulation Research*. – 2022. – Vol. 131. – № 1. – P. 77-90.
223. Qi Ye, Juyeon Jo, Chih-Yen Wang, Heavin Oh, Tiffany J. Choy, Kyoungin Kim, Angelo D'Alessandro, Yana K. Reshetnyak, Sung Yun Jung, Zheng Chen, S. P. M. and H. K. L. Astrocytic Slc4a4 regulates blood-brain barrier integrity in healthy and stroke brains via a NO-CCL2-CCR2 pathway / S. P. M. and H. K. L. Qi Ye, Juyeon Jo, Chih-Yen Wang, Heavin Oh, Tiffany J. Choy, Kyoungin Kim, Angelo D'Alessandro, Yana K. Reshetnyak, Sung Yun Jung, Zheng Chen // *bioRxiv*. – 2023. – P. 10.1101/2023.04.03.535167.
224. pH (low) insertion peptide (pHLIP) targets ischemic myocardium / E. A. Sosunov, E. P. Anyukhovskiy, A. A. Sosunov [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110. – № 1. – P. 82-86.
225. Alkaline nucleoplasm facilitates contractile gene expression in the mammalian heart / A. Hulikova, K. C. Park, A. A. Loonat [et al.] // *Basic Research in Cardiology*. – 2022. – Vol. 117. – № 1. – P. 1-25.
226. Molecularly engineered tumor acidity-responsive plant toxin gelonin for safe and efficient cancer therapy / G.-B. Ding, C. Zhu, Q. Wang [et al.] // *Bioactive Materials*. – 2022. – Vol. 18. – № January. – P. 42-55.
227. Combination of antibody targeting and PTD-mediated intracellular toxin delivery for colorectal cancer therapy / M. C. Shin, J. Zhang, K. A. Min [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Vol. 194. – P. 197-210.
228. Display of CCL21 on cancer cell membrane through genetic modification using a pH low insertion peptide / Z. Liu, S. Wu, H. Zuo [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*.

– 2023. – P. 125944.

229. Alrumaihi, F. The Multi-Functional Roles of CCR7 in Human Immunology and as a Promising Therapeutic Target for Cancer Therapeutics / F. Alrumaihi // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2022. – Vol. 9. – № July. – P. 1-12.

230. Tumor-Targeted Delivery of IL-2 by Fusing with a pH Low Insertion Peptide for Antitumor Immunotherapy / T. Chu, B. Cao, P. Wang [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2023. – Vol. 34. – № 10. – P. 1894-1901.

231. Moore, R. M. ACID PRODUCTION IN THE FUNCTIONING HEART UNDER CONDITIONS OF ISCHEMIA AND OF CONGESTION / R. M. Moore, M. M. Greenberg // *American Journal of Physiology-Legacy Content*. – 1937. – Vol. 118. – № 2. – P. 217-224.

232. Mechanistic insights into the pH-dependent membrane peptide ATRAM / V. P. Nguyen, L. Palanikumar, S. J. Kennel [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 298. – № January. – P. 142-153.

233. Highly hydrophilic carbon nanoparticles: uptake mechanism by mammalian and plant cells / L. Chen, H. Wang, X. Li [et al.] // *RSC Advances*. – 2018. – Vol. 8. – № 61. – P. 35246-35256.

234. Optimization of the method for analyzing endocytosis of fluorescently tagged molecules: Impact of incubation in the cell culture medium and cell surface wash with glycine-hydrochloric acid buffer / N. Kamei, S. Yamamoto, H. Hashimoto [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 310. – № June. – P. 127-140.

235. Nanoparticle Geometry and Surface Orientation Influence Mode of Cellular Uptake / H. Herd, N. Daum, A. T. Jones [et al.] // *ACS Nano*. – 2013. – Vol. 7. – № 3. – P. 1961-1973.

236. Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs / H. Lin, B. Singla, P. Ghoshal [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2018. – Vol. 175. – № 18. – P. 3640-3655.

237. Dimitrov, D. S. *Therapeutic Proteins : Methods in Molecular Biology*. Vol. 899 / D. S. Dimitrov; eds. V. Voynov, J. A. Caravella. – Totowa, NJ : Humana Press, 2012. – 1-26 p.

238. GFP-like Proteins Stably Accumulate in Lysosomes / H. Katayama, A. Yamamoto, N. Mizushima [et al.] // *Cell Structure and Function*. – 2008. – Vol. 33. – № 1. – P. 1-12.

239. Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells / A. P. Ryumina, E. O. Serebrovskaya, M. V. Shirmanova [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2013. – Vol. 1830. – № 11. – P. 5059-5067.

240. No Photon Wasted: An Efficient and Selective Singlet Oxygen Photosensitizing Protein / M. Westberg, M. Bregnhøj, M. Etzerodt, P. R. Ogilby // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2017. – Vol. 121. – № 40. – P. 9366-9371.

241. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic

- therapy / J. Zhang, C. Jiang, J. P. Figueiró Longo [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. 137-146.
242. Self-luminescent photodynamic therapy using breast cancer targeted proteins / E. H. Kim, S. Park, Y. K. Kim [et al.] // *Science Advances*. – 2020. – Vol. 6. – № 37. – P. 1-13.
243. Impact of external amino acids on fluorescent protein chromophore biosynthesis revealed by molecular dynamics and mutagenesis studies / A. A. Pakhomov, A. Y. Frolova, V. M. Tabakmakher [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – Vol. 206. – № October 2019. – P. 111853.
244. Cancer cells targeting with genetically engineered constructs based on a pH-dependent membrane insertion peptide and fluorescent protein / A. Y. Frolova, A. A. Pakhomov, D. L. Kakuev [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2022. – Vol. 612. – P. 141-146.

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

EGFP

MRGSHHHHHHGSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRI
 ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
 PVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLG*

EGFP-GS-pHLIPwt

MRGSHHHHHHGSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRI
 ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
 PVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGS~~AEQNPIYWARYADWLFTTPLL~~LDL
 ALLVDADEGT*

EGFP-GS-pHLIPvar3

MRGSHHHHHHGSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRI
 ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
 PVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGS~~ADDQNPWRAYLDLLFPTD~~LLDL
 W*

EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt

MRGSHHHHHHGSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRI
 ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
 PVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLIEGRCSG~~AEQNPIYWARYADWLFTT~~PL
 LLLDLALLVDADEGT*

EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3

MRGSHHHHHHGSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRI
 ELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
 PVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLIEGRCSG~~ADDQNPWRAYLDLLFPTD~~TL
 LLDLLW*

pHLIPwt-(GSAS)₂-EGFP

MAEQNPIYWARYADWLFTTPLL~~LDLALLVDADEGT~~GSASGSASMSVSKGEELFTGVVPILVELDGDV
 NGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPE
 GYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQK
 NGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTA
 AGITLGH~~HHHHH~~*

ATRAM-(GSAS)₂-EGFP

MGLAGLAGLLGLEGLLGLPLGLLEGLWGLELEGN~~GSASGSASMSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNG~~
 HKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY
 VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEEDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNG
 IQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGI
 TLGH~~HHHHH~~*

Рисунок III. Аминокислотные последовательности EGFP и гибридных конструкций EGFP/pHLIP. Гексагистидиновая последовательность показана синим цветом, флуоресцентный белок – зеленым, линкер – лиловым и черным, pHLIPwt, pHLIPvar3 и ATRAM – оранжевым.

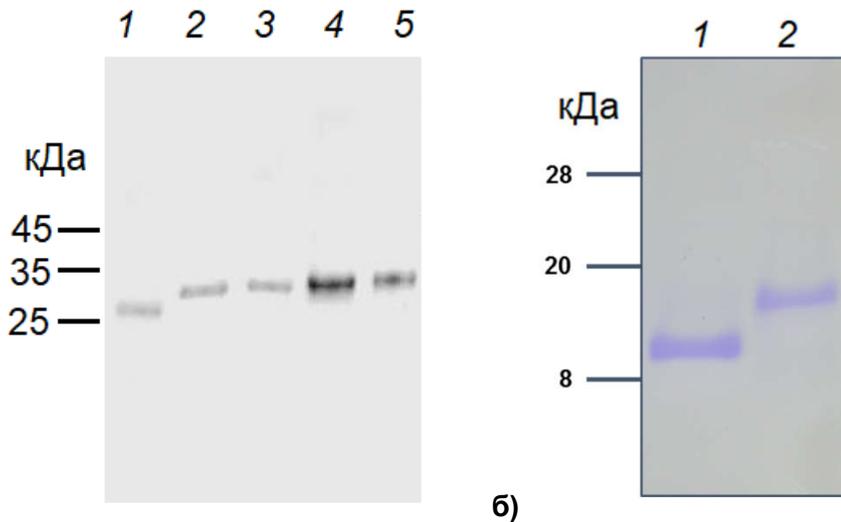


Рисунок П2. Электрофоретический анализ гибридных белков в 12%-ном SDS-ПААГ. (а) 1 – EGFP, 2 – EGFP-GS-pHLIPvar3, 3 – EGFP-GS-pHLIPwt, 4 – EGFP-IEGRCSG-pHLIPvar3, 5 – EGFP-IEGRCSG-pHLIPwt. (б) 1 – miniSOG, 2 – miniSOG-pHLIPwt

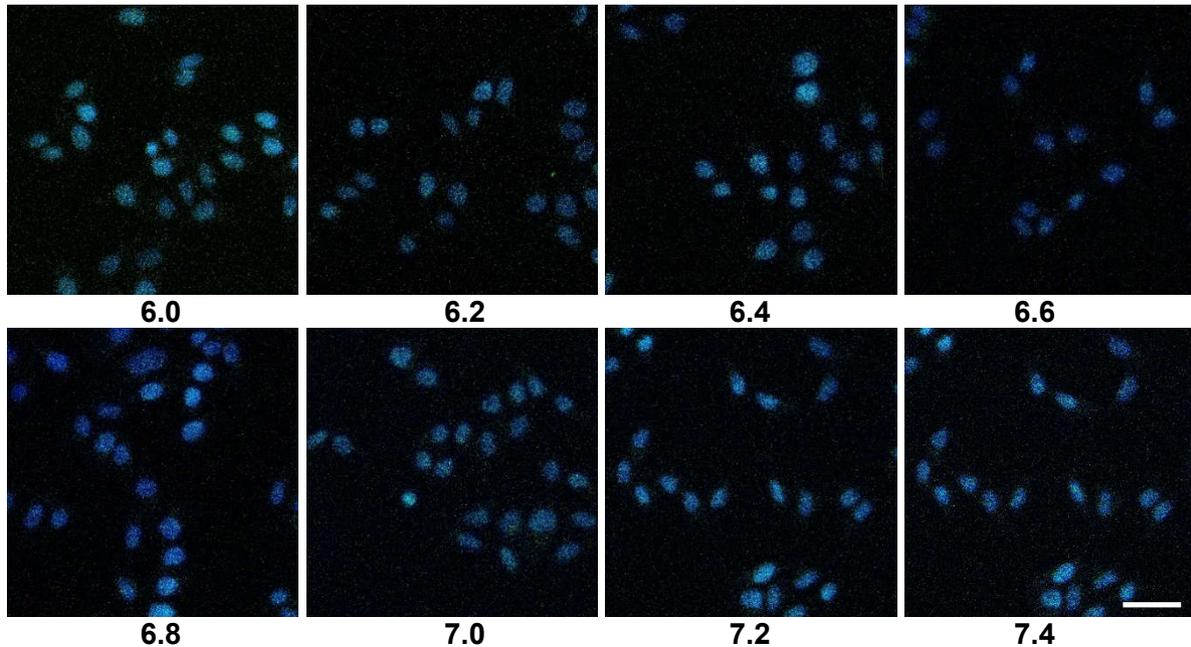


Рисунок П3. Тестирование EGFP на клетках HeLa при различных значениях pH. Масштабный отрезок 50 мкм.

MiniSOG

MRGSHHHHHHGS EKSFVITDPRLPDNPIIFASDGFLELTEYSREEILGRNGRFLQGPETDQATVQKIRDAI
RDQREITVQLINYTKSGKKFLNLLNLQPIRDQKGELQAFIVQVDG*

MiniSOG-pHLIPwt

MRGSHHHHHHGS EKSFVITDPRLPDNPIIFASDGFLELTEYSREEILGRNGRFLQGPETDQATVQKIRDAI
RDQREITVQLINYTKSGKKFLNLLNLQPIRDQKGELQAFIVQVDG GNSGSAEQNPIYWARYADWLFT
TPLLLDLALLVDADEGT*

Рисунок П4. Аминокислотные последовательности miniSOG и miniSOG-pHLIPwt. Гексагистидиновая последовательность показана синим цветом, флуоресцентный белок – светлозеленым, линкер – черным, pHLIPwt – оранжевым.

mCherry

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYK*

mCherry-SGLRSRAE-pHLIPwt (mCherry-8-pHLIPwt)

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSRAEAEQNPIYWARYAD
 WLFTTPLLDDLALLVDADEGT*

mCherry-GACGIERCGRS-pHLIPwt (mCherry-10-pHLIPwt)

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKGACGIERCGRSAEQNPIYWARY
 ADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT*

mCherry-GASEEGEEGIEGRCS-pHLIPwt (mCherry-16-pHLIPwt)

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKGASEEGEEGIEGRCSAEQNPI
 YWARYADWLFTTPLLDDLALLVDADEGT*

mCherry-SGLRSRAE-ATRAM (mCherry-8-ATRAM)

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSRAEGLAGLAGLLGLEGL
 LLGLPLGLLEGLWLGLELEGN*

mCherry-GACGIERCGRS-ATRAM (mCherry-10-ATRAM)

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKGACGIERCGRSGLAGLAGLLGLEGL
 ELLGLPLGLLEGLWLGLELEGN*

mCherry-GASEEGEEGIEGRCS-ATRAM (mCherry-16-ATRAM)

MRGSHHHHHHGSVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKG
 GPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAK
 KPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKGASEEGEEGIEGRCSGLAGL
 AGLLEGLLEGLWLGLELEGN*

Рисунок П5. Аминокислотные последовательности mCherry и гибридных конструкций mCherry/pHLIP. Гексагистидиновая последовательность показана синим цветом, флуоресцентный белок – лиловым, линкер – черным, pHLIPwt и ATRAM – оранжевым.

mCherry-SGLRSRAE-ATRAM-(GSAS)₂-EGFP (mCherry-8-ATRAM-8-EGFP)

MVSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSP
 QFMYGSKAYVKHPADIPDYKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFP
 DGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVN
 IKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKSGLSRAEGLAGLAGLLGLEGLLGLPLGLEGL
 WLGLELEGNGSASGSASMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSSEGEEDATYGKLT
 LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD
 TLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIQVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN
 TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMVLLLEFVTAAGITLGHHHHHH*

Рисунок П6. Аминокислотная последовательность mCherry-SGLRSRAE-ATRAM-(GSAS)₂-EGFP. Гексагистидиновая последовательность показана синим цветом, mCherry – лиловым, EGFP – зеленым, линкер – черным, АТРАМ – оранжевым.