

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Государственный научный центр Российской Федерации  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук*

( ГНЦ ИБХ РАН )

*На правах рукописи*

Гилева Анастасия Михайловна

**Наноносители для доставки биомакромолекул и противоопухолевых  
лекарств: получение и изучение в 3D модели *in vitro***

Специальность 1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук  
Марквичева Елена Арнольдовна

Москва – 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....                                                            | 6  |
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                     | 9  |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                    | 15 |
| 1.1 Основные подходы к лечению онкологических заболеваний .....                    | 15 |
| 1.2 Концепция направленной доставки противоопухолевых препаратов .....             | 17 |
| 1.3 Основные требования к наноносителям и их классификация .....                   | 20 |
| 1.3.1 Наноносители на основе липидов .....                                         | 22 |
| 1.3.2 Наноносители на основе полимеров .....                                       | 29 |
| 1.3.3 Неорганические наноносители .....                                            | 38 |
| 1.3.4 Выбор наноносителя для создания системы направленной доставки препарата .... | 41 |
| 1.4 Модификация наноносителей .....                                                | 42 |
| 1.4.1 Увеличение стабильности наноносителей .....                                  | 43 |
| 1.4.1.1 Использование защитных полимеров .....                                     | 43 |
| 1.4.1.2 Создание «остеклованной» поверхности .....                                 | 44 |
| 1.4.1.3 Усиление EPR-эффекта .....                                                 | 46 |
| 1.4.2 Создание систем доставки с контролируемым высвобождением препарата .....     | 48 |
| 1.4.2.1 pH-чувствительные наноносители .....                                       | 49 |
| 1.4.2.2 Термочувствительные наноносители .....                                     | 51 |
| 1.4.2.3 Наноносители с магнитными наночастицами .....                              | 51 |
| 1.4.3 Наноносители для таргетной доставки лекарств .....                           | 53 |
| 1.4.3.1 Низкомолекулярные лиганды .....                                            | 54 |
| 1.4.3.2 Пептидные лиганды .....                                                    | 55 |
| 1.4.3.3 Белковые лиганды .....                                                     | 56 |
| 1.4.3.4 Нуклеотидные лиганды .....                                                 | 59 |
| 1.4.3.5 Углеводные лиганды .....                                                   | 59 |
| 1.5 Тестирование наноносителей <i>in vitro</i> .....                               | 60 |
| 1.5.1 Монослойная культура клеток (2D модель <i>in vitro</i> ) .....               | 60 |
| 1.5.2 Мультиклеточные сфероиды (3D модель <i>in vitro</i> ) .....                  | 61 |
| 1.5.2.1 Метод висячей капли .....                                                  | 63 |
| 1.5.2.2 Метод суспензионного культивирования клеток .....                          | 64 |
| 1.5.2.3 Метод культивирования клеток в матриксах .....                             | 64 |
| 1.5.2.4 Метод спонтанной самоагрегации клеток .....                                | 65 |
| 1.5.2.5 Метод самосборки клеток, индуцируемой RGD-пептидом .....                   | 66 |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.5.3 Гетеротипные мультиклеточные сфероиды (3D модель <i>in vitro</i> ) .....             | 67 |
| Заключение .....                                                                           | 68 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....                                                          | 70 |
| 2.1 Реактивы и материалы .....                                                             | 70 |
| 2.2 Работа с культурами клеток .....                                                       | 71 |
| 2.2.1 Стерилизация .....                                                                   | 71 |
| 2.2.2 Приготовление среды для культивирования клеток .....                                 | 71 |
| 2.2.3 Ведение клеточных культур .....                                                      | 71 |
| 2.2.4 Методика подсчета клеток с помощью камеры Горяева .....                              | 72 |
| 2.2.5 Хранение и размораживание клеточных культур .....                                    | 72 |
| 2.2.6 Замораживание клеточных культур .....                                                | 72 |
| 2.2.7 Получение мультиклеточных сфероидов .....                                            | 73 |
| 2.3 Получение наноносителей .....                                                          | 73 |
| 2.3.1 Получение наноносителей на основе липидов .....                                      | 73 |
| 2.3.1.1 Получение ПЭГилованных липосом и липоплексов .....                                 | 73 |
| 2.3.1.2 Получение керасом .....                                                            | 74 |
| 2.3.1.3 Получение фолат-конъюгированных липосом .....                                      | 74 |
| 2.3.2 Получение наноносителей на основе биodeградируемых полимеров .....                   | 75 |
| 2.3.2.1 Получение полиэлектролитных наноконтейнеров .....                                  | 75 |
| 2.3.2.2 Получение полиэлектролитных мультислойных капсул .....                             | 76 |
| 2.4 Исследование физико-химических свойств наноносителей .....                             | 76 |
| 2.4.1 Исследование размеров и $\zeta$ -потенциала наноносителей .....                      | 76 |
| 2.4.2 Исследование морфологии наноносителей .....                                          | 77 |
| 2.4.3 Исследование стабильности наноносителей при хранении .....                           | 77 |
| 2.4.4 Исследование эффективности инкапсулирования препарата в наноносители .....           | 77 |
| 2.4.5 Исследование кинетики высвобождения препарата из наноносителей .....                 | 78 |
| 2.5 Исследование накопления наноносителей в 2D и 3D модели <i>in vitro</i> .....           | 78 |
| 2.5.1 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в 2D и 3D моделях <i>in vitro</i> .... | 78 |
| 2.5.2 Проточная цитофлуориметрия в 2D модели <i>in vitro</i> .....                         | 80 |
| 2.5.3 Флуориметрия в 3D модели <i>in vitro</i> .....                                       | 81 |
| 2.6 Исследование цитотоксичности наноносителей в 2D и 3D модели <i>in vitro</i> .....      | 81 |
| 2.7 Исследование эффективности трансфекции клеток липоплексами .....                       | 82 |
| 2.7.1 Изучение эффективности трансфекции клеток pGL3-липopleксами .....                    | 82 |
| 2.7.2 Изучение эффективности трансфекции клеток мiРНК-липopleксами .....                   | 83 |

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.8 Исследование ПЭГилированных липосом в модели <i>in vivo</i> .....                                                  | 84  |
| 2.9 Статистическая обработка данных .....                                                                              | 85  |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....                                                                              | 86  |
| 3.1 Выбор клеточных линий и получение мультиклеточных опухолевых сфероидов .....                                       | 86  |
| 3.2 Наносители на основе липидов .....                                                                                 | 87  |
| 3.2.1 ПЭГилированные липосомы и липоплексы на основе катионных липопептидов .....                                      | 88  |
| 3.2.1.1 Получение липосом и липоплексов .....                                                                          | 88  |
| 3.2.1.2 Исследование физико-химических свойств липосом и липоплексов .....                                             | 88  |
| 3.2.1.3 Исследование цитотоксичности липосом .....                                                                     | 90  |
| 3.2.1.4 Исследование трансфекции клеток с липоплексами .....                                                           | 91  |
| 3.2.1.5 Исследование накопления липосом и липоплексов в клетках .....                                                  | 91  |
| 3.2.1.6 Получение ПЭГилированных липосом и липоплексов .....                                                           | 94  |
| 3.2.1.7 Исследование физико-химических свойств ПЭГилированных липосом и<br>липоплексов .....                           | 94  |
| 3.2.1.8 Исследование цитотоксичности ПЭГилированных липосом .....                                                      | 96  |
| 3.2.1.9 Исследование трансфекции клеток ПЭГилированными липоплексами ...                                               | 97  |
| 3.2.1.10 Исследование накопления ПЭГилированных липосом в клетках .....                                                | 100 |
| 3.2.1.11 Исследование ПЭГилированных липоплексов в модели <i>in vivo</i> .....                                         | 102 |
| Заключение .....                                                                                                       | 104 |
| 3.2.2 Керасомы .....                                                                                                   | 105 |
| 3.2.2.1 Получение керасом .....                                                                                        | 105 |
| 3.2.2.2 Исследование физико-химических свойств керасом .....                                                           | 107 |
| 3.2.2.3 Исследование накопления керасом в клетках .....                                                                | 109 |
| 3.2.2.4 Исследование цитотоксичности керасом .....                                                                     | 111 |
| Заключение .....                                                                                                       | 113 |
| 3.2.3 Фолат-конъюгированные катионные липосомы .....                                                                   | 114 |
| 3.2.3.1 Получение фолат-конъюгированных липосом .....                                                                  | 114 |
| 3.2.3.2 Исследование физико-химических свойств фолат-конъюгированных<br>липосом .....                                  | 115 |
| 3.2.3.3 Исследование цитотоксичности фолат-конъюгированных липосом для<br>выбора наиболее перспективного образца ..... | 116 |
| 3.2.3.4 Исследование накопления фолат-конъюгированных липосом в клетках ..                                             | 117 |
| 3.2.3.5 Исследование цитотоксичности фолат-конъюгированных липосом .....                                               | 125 |
| Заключение .....                                                                                                       | 130 |

|                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3 Наноносители на основе полимеров .....                                                      | 131 |
| 3.3.1 Полиэлектролитные биodeградируемые наноконтейнеры на основе природных полисахаридов ..... | 132 |
| 3.3.1.1 Получение и модификация наноконтейнеров .....                                           | 132 |
| 3.3.1.2 Исследование физико-химических свойств наноконтейнеров .....                            | 133 |
| 3.3.1.3 Исследование накопления наноконтейнеров в клетках .....                                 | 134 |
| 3.3.1.4 Исследование цитотоксичности наноконтейнеров .....                                      | 139 |
| Заключение .....                                                                                | 141 |
| 3.3.2 Полиэлектролитные капсулы, модифицированные лигандом DR5-B .....                          | 141 |
| 3.3.2.1 Получение и характеристика полиэлектролитных капсул .....                               | 141 |
| 3.3.2.2 Исследование накопления полиэлектролитных капсул в клетках .....                        | 143 |
| 3.3.2.3 Исследование цитотоксичности полиэлектролитных капсул .....                             | 148 |
| Заключение .....                                                                                | 154 |
| ВЫВОДЫ .....                                                                                    | 156 |
| БЛАГОДАРНОСТИ .....                                                                             | 157 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....                                                          | 158 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ .....                                                                                | 175 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- $\alpha$ -MEM – среда Игла,  $\alpha$ -модификация (от англ. Eagle's minimal essential medium);
- AUC – интеграл кривой зависимости концентрации от времени (после однократного введения или в стационарном состоянии);
- AUMC – область под кривой первого момента;
- Bj-5ta – клеточная линия фибробластов крайней плоти человека;
- C6 – клеточная линия глиобластомы головного мозга крысы;
- $C_{\max}$  – максимальная концентрация препарата в плазме крови после введения;
- CFLA – керасом-образующие липоаминокислоты (от англ. cerasome-forming lipoamino acids);
- Cyclo-RGDfK(TPP) – циклический RGD-пептид, модифицированный трифосфониевым ионом (TPP);
- DLS – динамическое рассеяние света (от англ. dynamic light scattering);
- DMEM – среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (от англ. Dulbecco's modified Eagle's medium);
- DOPE – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (от англ. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine);
- DOX – доксорубицин (от англ. doxorubicin);
- DPPC – 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин (от англ. 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine);
- DR5 – рецептор смерти 5 (от англ. Death receptor 5);
- DR5-B – мутантный вариант цитокина TRAIL, который селективно связывается с рецептором смерти опухолевых клеток DR5;
- DS – сульфат декстрана (от англ. dextran sulfate);
- EPR-effect – эффект повышенной проницаемости и удержания (от англ. enhanced permeability and retention effect);
- FBS – эмбриональная телячья сыворотка (от англ. fetal bovine serum);
- FITC – флуоресцеин-изотиоцианат (от англ. fluorescein isothiocyanate);
- FLp – фолат-конъюгированные липосомы;
- FLp-ПМ – фолат-конъюгированные липосомы, полученные методом пост-модификации;
- FLp-ТП – фолат-конъюгированные липосомы, полученные методом гидратации тонкой липидной пленки;
- GFP – зеленый флуоресцентный белок (от англ. green fluorescent protein);
- HCT116 – клеточная линия колоректальной карциномы человека;
- HEK293T – клеточная линия эмбриональной почки человека;
- HeLa – клеточная линия рака шейки матки человека;

НepG2 – клеточная линия рака печени человека;

IC50 – полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток (от англ. the half maximal inhibitory concentration);

LbL – метод послойной адсорбции (от англ. layer-by-layer technique);

Lf – Липофектамин 2000 (от англ. Lipofectamine 2000);

Lp – липосомы из DOPE (100 % масс.) без лигандов;

MCF-7 – клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека;

M3 – клеточная линия меланомы кожи мыши;

MSC – мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека;

MW – молекулярный вес (от англ. molecular weight);

N/P – соотношение положительных зарядов на атомах азота (N) и отрицательных зарядов на атомах фосфора (P) в нуклеиновой кислоте;

PArg – поли-L-аргинин (от англ. poly-L-arginine);

PBS – фосфатно-солевой буфер (pH ~ 7.4);

PDI – индекс полидисперсности, мера неоднородности размеров частиц в образце;

pGL3 – ДНК-плазида без промотора для измерения активности промоторных и энхансерных последовательностей с помощью люциферазного анализа;

R6G – родамин 6G (от англ. Rhodamine 6G);

RGD – синтетический циклический трипептид с последовательностью аминокислот аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (Arg-Gly-Asp);

RLU – относительные световые единицы (от англ. relative light units);

$t_{1/2}$  – время, необходимое для достижения половины начальной концентрации введенного препарата;

$T_{max}$  – время, необходимое для достижения  $C_{max}$ ;

TRAIL – цитокин семейства факторов некроза опухоли, вызывающий апоптоз (от англ. tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand);

TQ – тимохинон (от англ. thymoquinone);

U-87MG – клеточная линия глиобластомы головного мозга человека;

UTR – участок гена, комплементарный модельной миРНК;

UTR-HCV-pDNA – ДНК-плазида, кодирующая UTR-регион вируса гепатита С с промотором GFP;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ГК – гиалуроновая кислота;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ДЭАЭ-декстран – диэтиламиноэтилдекстран;

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия;  
миРНК – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота;  
МТТ – 3-(4,5- диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид;  
ПЛ – поли-L-лизин;  
ПМК – полиэлектролитные мультислойные капсулы;  
ПМК<sub>500</sub> – ПМК до термической обработки;  
ПМК<sub>300</sub> – ПМК после термической обработки;  
ПМК<sub>500</sub>-DR5-B – ПМК до термической обработки, модифицированные лигандом DR5-B;  
ПМК<sub>300</sub>-DR5-B – ПМК после термической обработки, модифицированные лигандом DR5-B;  
ПН – полиэлектролитные наноконтейнеры;  
ПН-ПЛ – полиэлектролитные наноконтейнеры, модифицированные поли-L-лизином;  
ПН-ПЭГ – полиэлектролитные наноконтейнеры, модифицированные полиэтиленгликолем;  
ПЦР – полимеразная цепная реакция;  
ПЭГ – полиэтиленгликоль;  
СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;  
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия;  
ФР – фолатные рецепторы;  
ЭДТА – динатриевая соль этилендиамин N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты;  
ЭПС – эндоплазматическая сеть клетки.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Разработка различных типов наноносителей в качестве систем направленной доставки противоопухолевых препаратов позволяет решить ряд проблем, возникающих при традиционной химиотерапии. Как известно, большинство противоопухолевых препаратов плохо растворяются в воде, высокотоксичны и малоселективны, что приводит к побочным эффектам при их использовании в клинике. Наноносители с инкапсулированными в них лекарствами позволяют обеспечить адресную доставку лекарств в раковые клетки и обеспечить их пролонгированное высвобождение непосредственно в опухоли, повышая тем самым эффективность терапии и уменьшая побочные эффекты.

Согласно отчету Grand View Research, Inc., в 2025 году рынок новых систем доставки противоопухолевых препаратов достигнет \$26,62 млрд [Market Research Report, 2017]. Однако уже используемые наноносители, обладают рядом недостатков, в частности низкой стабильностью, экономической или технологической неэффективностью производства, отсутствием универсальности по отношению к различным видам рака и т.д. С другой стороны, необходимы новые универсальные 3D *in vitro* модели для тестирования быстро расширяющего спектра наноносителей с лекарством, поскольку традиционные монослойные культуры клеток (2D модель *in vitro*) плохо имитируют малые солидные (от англ. solid) опухоли *in vivo*. Так, в 2D модели, как известно, нарушены межклеточные контакты и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом, клетки теряют некоторые тканеспецифические функции, изменяются профили экспрессии генов, характерные для клеток, растущих в 3D условиях (в тканях, органах, опухолях). Кроме того, использование 3D модели *in vitro*, в частности на основе мультиклеточных сфероидов, позволяет оптимизировать и удешевить последующие предклинические испытания и, следовательно, сократить финансовые и временные затраты на вывод препарата на фармацевтический рынок.

**Цель и задачи работы.** Цель работы – разработка различных наноносителей для доставки гидрофильных/липофильных противораковых препаратов или биомакромолекул (РНК, ДНК, белки) в опухолевые клетки; исследование их физико-химических свойств, а также цитотоксичности в 3D модели *in vitro* на основе опухолевых сфероидов, полученных с использованием RGD-пептида.

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи:

1. Разработать наноносители на основе липопептидов, загруженные противораковыми препаратами или биомакромолекулами, в частности катионные липосомы, включая

«стелс»-системы с пассивной доставкой; керасомы с пролонгированным высвобождением препарата; катионные липосомы для таргетной доставки, а также липоплексы (с миРНК или ДНК).

2. Получить полимерные наноносители (наноконтейнеры и мультислойные полиэлектролитные капсулы) для пассивной или таргетной доставки в опухолевые клетки как липофильных, так и гидрофильных препаратов.
3. Изучить некоторые физико-химических параметры всех наноносителей (средний размер и распределение по размерам,  $\zeta$ -потенциал, стабильность при хранении, высвобождение препарата в модели *in vitro* и т. д.).
4. Исследовать накопление и локализацию наноносителей в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*) и мультиклеточных опухолевых сфероидов (3D модель *in vitro*).
5. Изучить цитотоксичность всех полученных наноносителей в 2D и 3D моделях *in vitro*.

**Научная новизна работы.** В работе получена и исследована серия новых наноносителей для направленной доставки противоопухолевых препаратов, в частности катионные липосомы на основе липопептидов (OrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub>, OrnOrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub>, (Orn)<sub>2</sub>OrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub>, OrnAsp(C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>)<sub>2</sub> и др.), а также полимерные наноконтейнеры/капсулы на основе природных биоразлагаемых полисахаридов (хитозан, ДЭАЭ-декстран, ксантановая камедь, сульфат декстрана (DS), поли-L-аргинин (PArg)).

В работе впервые получены и охарактеризованы:

- катионные липоплексы (с включенной в них модельной миРНК или плазмидой ДНК), модифицированные новыми производными ПЭГ;
- нейтральные и катионные керасомы с пролонгированным высвобождением доксорубина (DOX);
- катионные липосомы, полученные методом пост-модификации их поверхности лигандами фолиевой кислоты и загруженные DOX;
- полиэлектролитные наноконтейнеры (ПН) состава хитозан / ксантановая камедь или ДЭАЭ-декстран / ксантановая камедь, загруженные тимохиноном (TQ) и модифицированные полиэтиленгликолем (ПЭГ) или поли-L-лизином (ПЛ);
- полиэлектролитные мультислойные капсулы (ПМК) состава (PArg/DS)<sub>3</sub>, модифицированные лигандом DR5-B и загруженные DOX в субтоксичной концентрации, обладающих синергетическим цитотоксическим эффектом.

Впервые все наноносители изучены в 3D моделях *in vitro* (на основе мультиклеточных опухолевых сфероидов), сформированных разработанным ранее в ИБХ РАН методом индуцированной самосборки клеток под действием циклического RGD-пептида.

Цитотоксичность наноносителей изучена с использованием 10 линий раковых и нормальных (нераковых) клеток, а также проведен сравнительный анализ результатов для 2D и 3D моделей.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные результаты позволяют расширить фундаментальные знания как в области дизайна наноносителей для доставки лекарств, так и в части их тестирования с применением новых 3D моделей *in vitro*.

Практическая значимость работы заключается в том, что на основе разработанных систем доставки могут быть созданы новые эффективные препараты для лечения онкологических заболеваний, в том числе для таргетной терапии рака.

**Личный вклад автора.** Личный вклад автора включает проведение анализа и систематизацию литературных данных по теме исследования, а также выявление актуальных проблем и пробелов в существующих исследованиях. Автор самостоятельно спланировал и выполнил экспериментальную часть работы, осуществлял обработку, контроль и анализ полученных результатов, а также принимал непосредственное участие в подготовке статей и представлении результатов исследований на российских и международных конференциях.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов подтверждается применением различных современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования, а также статистической обработки данных. Научная ценность работы подтверждена статьями в российских и зарубежных журналах. Основные результаты работы были представлены в виде 41 постерного и устного доклада на следующих конференциях: 23<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> и 26<sup>th</sup> International Conference on Bioencapsulation (2015 г, Делфт, Нидерланды; 2016 г, Лиссабон, Португалия; 2019 г, Страсбург, Франция), 6<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent advances safety-toxicology and ecology issues» (2015-2019 и 2021 гг, Крит, Греция), 33rd Conference of The European Colloid and Interface Society (2019 г, Левин, Бельгия), EUPOC 2018: Biomimetic Polymers by Rational Design, Imprinting and Conjugation (2018 г, Комо, Италия), 10th Microencapsulation Training School (2018 г, Тронхейм, Норвегия), International conference Biocatalysis-2015: Fundamentals & applications (2015 г, Москва, Россия), 4th International Symposium and School for young scientists on «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine» (2019 г, Москва, Россия), IV и V Международная Школа молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (2024-2025 гг, Москва, Россия), XXVII-XXXIII и XXXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2015-2021 и 2025 гг, Москва, Россия), III и

IV Международная конференция «Физика - наукам о жизни» (2019 и 2021 гг, Санкт-Петербург, Россия), The second International Online Conference on Polymer Science: Polymers and Nanotechnology for Industry 4.0, IOCPS 2021 (2021 г, онлайн-конференция), Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии МКХТ-2019 (2019 г, Москва, Россия), Межвузовская научная студенческая конференция МГУ "Студенческий биохимический форум» (2018 г, Москва, Россия), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (2018 г, Москва, Россия), Biomembranes'18 (2018 г, Москва, Россия), Sechenov International Biomedical Summit 2018 (2018 г, Москва, Россия), IX Научная конференция молодых ученых "Инновации в химии: достижения и перспективы" (2018 г, Москва, Россия), VII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2017» (2017 г, Москва, Россия).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 17 статей, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science или входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России:

1. Trushina D., **Gileva A.**, Yagolovich A., Gasparian M., Kurbanova L., Burov S., Bukreeva T., Borodina T.N., Artemov V., Oleinikov V., Markvicheva E., Synergistic effect of DR5-targeted capsules loaded with doxorubicin in drug-resistant 3D tumour spheroids // Journal of Microencapsulation. 2025. 42(7): 736–751
2. Afanasyeva K.A., Budanova U.A., Sebyakin Yu. L., **Gileva A.M.**, Drozdova M.G., Markvicheva E., Fluorescently labeled cationic liposomes with sunitinib and the BODIPY-FL/L-carnitine conjugate for theranostics // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2025. 51: 2812–2822
3. **Гилева А.М.**, Куликова Д.И., Куковьякина Е.В., Яголович А.В., Кушнерёв К.С., Кусков А.Н., Марквичева Е.А., Исследование цитотоксичности наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, загруженных куркумином, на 2D- и 3D-моделях in vitro аденокарциномы яичника человека // Российский онкологический журнал. 2024. 29(3): 93–104
4. Afanasyeva K.A., **Gileva A.M.**, Markvicheva E.A., Budanova U.A., Sebyakin Y.L., Glycolipotriptide (N-Lactitol-Gly)2-LysC16 and its fluorescently labeled analog for visualizing vector systems for the delivery of biologically active substances to target cells // Moscow University Chemistry Bulletin. 2023. 78(5): 283–291
5. **Gileva A.M.**, Koloskova O.O., Nosova A.S., Vishniakova L.I., Simonova V.A., Kurbanova L.S., Egorenkov E.A., Smirnov V.V., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L., Suzina N.E., Khaitov M.R., Markvicheva E.A., Transfection efficacy and drug release depends upon the PEG

- derivative in cationic lipoplexes: Evaluation in 3D in vitro model and in vivo // Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials. 2023. 111(9): 1614–1628
6. Denieva Z.G., Koloskova O.O., **Gileva A.M.**, Budanova U.A., Sebyakin Y.L., Mixed cationic liposomes based on L-amino acids as efficient delivery systems of therapeutic molecules into cells // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2023. 17(2): 136–147
  7. Agapova I., Efimov A.E., Mochalov K.E., Solovyeva D.O., **Gileva A.M.**, Markvicheva E.A., Yakovlev D.V., Lyundup A.V., Oleinikov V.A., Agapov I.I., Gautier S.V., Correlative fluorescent scanning probe nanotomography used to study the intracellular distribution of doxorubicin in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells // Doklady Biological Sciences. 2023. 509(1): 103–106
  8. **Gileva A.**, Trushina D., Yagolovich A., Gasparian M., Kurbanova L., Smirnov I., Burov S., Markvicheva E., Doxorubicin-loaded polyelectrolyte multilayer capsules modified with antitumor DR5-specific TRAIL variant for targeted drug delivery to tumor cells // Nanomaterials (Basel). 2023. 13(5): 902
  9. Yagolovich A., Isakova A., Artykov A., Vorontsova Y., Mazur D., Antipova N., Pavlyukov M., Shakhparonov M., **Gileva A.**, Markvicheva E., Plotnikova E., Pankratov A., Kirpichnikov M., Gasparian M., Dolgikh D., DR5-selective TRAIL variant DR5-B functionalized with tumor-penetrating iRGD peptide for enhanced antitumor activity against glioblastoma // International Journal of Molecular Sciences. 2022. 23(20): 12687
  10. Yagolovich A., Kuskov A., Kulikov P., Kurbanova L., **Gileva A.**, Markvicheva E., Antitumor cytokine DR5-B-conjugated polymeric poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles with enhanced cytotoxicity in human colon carcinoma 3D cell spheroids // Materials Proceedings. 2021. 7(1):8
  11. Yagolovich A., Kuskov A., Kulikov P., Kurbanova L., Bagrov D., Artykov A., Gasparian M., Sizova S., Oleinikov V., **Gileva A.**, Kirpichnikov M., Dolgikh D., Markvicheva E., Amphiphilic poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles conjugated with DR5-specific antitumor cytokine DR5-B for targeted delivery to cancer cells // Pharmaceutics. 2021. 13(9): 1413
  12. **Gileva A.**, Borodina T., Akasov R., Trushina D., Burov S., Klyachko N., González-Alfaro Y., Bukreeva T., Markvicheva E., Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D in vitro model // Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials. 2021. 109(4): 527–537
  13. **Gileva A.**, Sarychev G., Kondrya U., Mironova M., Sapach A., Selina O., Budanova U., Burov S., Sebyakin Yu., Markvicheva E., Lipoamino acid-based cerasomes for doxorubicin delivery: preparation and in vitro evaluation // Materials Science and Engineering C. 2019. 100: 724–734

14. Koloskova O.O., Suzina N.E., Grechihina M.V., **Gileva A.M.**, Drozdova M.G., Markvicheva E.A., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L., Shilovskiy I.P., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I., Khaitov M.R., Effect of lipopeptide structure on gene delivery system properties: evaluation in 2D and 3D in vitro models // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018. 167: 328–336
15. Akasov R., **Gileva A.**, Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva E., 3D in vitro co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly // Biotechnology Letters. 2017. 39(1): 45–53
16. Akasov R., Borodina T., Zaytseva E., **Sumina (Gileva) A.**, Bukreeva T., Burov S., Markvicheva E., Ultrasonically assisted polysaccharide microcontainers for delivery of lipophilic antitumor drugs: preparation and in vitro evaluation // ACS Applied Materials & Interfaces. 2015. 5, 7(30): 16581–16589
17. Koloskova O.O., Budanova U.A., **Sumina (Gileva) A.M.**, Sarychev G.A., Sebyakin Yu.L., Ornithine and lysine based lipotriptides: synthesis and comparison of transfection efficiency // Mendelev Communications. 2014. 24: 262–263

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 180 страницах, включает 88 рисунков и 32 таблицы. В работе представлены следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы, Приложение. Список цитируемой литературы включает 274 источника.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Онкологические заболевания остаются одной из главных проблем современного здравоохранения, занимая третье место в мире по общей смертности населения. На сегодняшний день основные методы лечения онкологических заболеваний ограничены химиотерапией, лучевой терапией и хирургией, имеющих ряд существенных ограничений. При этом сложность терапии усугубляется особенностями самого заболевания: трудностями ранней диагностики, проблемами эффективного лечения на начальных стадиях и сложностью контроля метастазирования на поздних этапах.

За последнее десятилетие прорыв в развитии нанотехнологий открыл новые перспективы для медицины. Особую значимость приобрели наноносители, обладающие уникальными возможностями модификации и адаптации под конкретные терапевтические задачи. Так, применение наноносителей позволяет существенно улучшить фармакокинетику противоопухолевых препаратов: продлить время циркуляции в организме и обеспечить их направленное высвобождение в пораженных тканях. Это не только повышает эффективность лечения, но и минимизирует побочные эффекты терапии.

Современные нанотехнологии демонстрируют впечатляющие результаты в области таргетной диагностики и лечения онкологических заболеваний. Параллельно развивается направление доклинических исследований: создаются усовершенствованные системы тестирования *in vitro*, которые позволяют оптимизировать процесс разработки противоопухолевых препаратов и ускорить их внедрение в клиническую практику.

В данном обзоре обобщены основные стратегии направленной доставки противоопухолевых препаратов, а также описаны основные типы наночастиц, с помощью которых она может осуществляться.

### 1.1 Основные подходы к лечению онкологических заболеваний

На конец 2020 года уровень заболеваемости онкологическими заболеваниями возрос до 19,3 млн случаев, из которых 10 млн приводят к летальному исходу (Рисунок 1). По оценкам Международного агентства по изучению рака, во всем мире у 1 из 5 человек в течение жизни развивается рак, а 1 из 8 мужчин и 1 из 11 женщин умирают от этого заболевания. К середине 2023 г в мире было зарегистрировано уже 24,6 млн онкобольных и ежегодно фиксируется в среднем 18 млн новых случаев: по статистике 1,3 % населения в мире являются онкобольными [1]. Таким образом, не только сохраняется, но и резко обостряется потребность в разработке новых противораковых препаратов, систем их доставки и

тестирования, а также совершенствовании диагностических методов, позволяющих систематически выявлять онкологические заболевания на ранних стадиях развития.

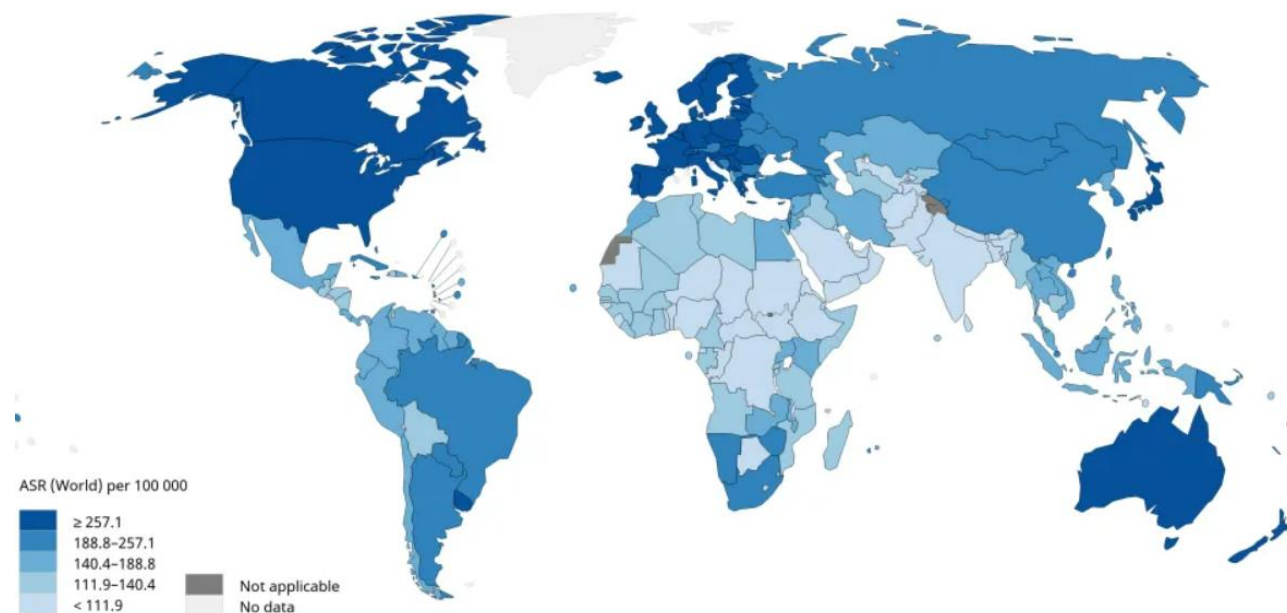


Рисунок 1 – Показатели смертности (в мире) от всех видов онкологических заболеваний для обоих полов и всех возрастов по данным Международного агентства по изучению рака (по состоянию на конец 2020 г) [1]

Существующие на сегодняшний день методы противораковой терапии можно разделить на хирургические и терапевтические, среди которых химиотерапия, фотодинамическая терапия, иммунотерапия и гормональная терапия [2]. Однако все эти методы имеют ряд недостатков, к которым также добавляются ограничения, связанные с физиологическими особенностями пациента и спецификой определенного вида рака. Например, хирургия и фотодинамическая терапия в большинстве случаев позволяют эффективно удалить исключительно первичный очаг заболевания, не затрагивая при этом метастазы. Гормональная терапия, в свою очередь, является не универсальным методом, поскольку подходит для лечения исключительно гормоночувствительных видов рака, таких как рак молочной железы, рак яичников, рак простаты и т.д. Именно поэтому при лечении онкологических заболеваний в большинстве случаев применяется комбинация из нескольких вышеперечисленных методов, причем химиотерапия используется чаще всего.

Классический подход к химиотерапии подразумевает использование различных препаратов, оказывающих цитотоксическое или цитостатическое воздействие. Цитотоксические препараты вызывают гибель клеток вследствие их интоксикации, разрушения оболочки и ядра клетки, и, в итоге, некроз опухоли. Цитостатические лекарства блокируют размножение раковых клеток и вызывают их апоптоз. Однако, вне зависимости

от механизма действия, применяемые в химиотерапии препараты являются токсичными для всех (в том числе и здоровых) активно делящихся клеток организма [3]. Одним из ограничений в использовании таких лекарственных средств является их неравномерное распределение по организму, что объясняется разным уровнем кровоснабжения отдельных регионов тела. Таким образом, может возникнуть ситуация, в которой очага заболевания достигает лишь небольшая часть лекарственного средства. При этом большая часть препарата может оседать в различных биологических барьерах, встречающихся на пути его следования, например, в различных органах, тканях и клетках. Это может привести как к инаktivации действующего вещества, так и к различным негативным последствиям для здоровых клеток организма, вызванным высокой токсичностью препарата. На данный момент при проведении химиотерапии, врачи вынуждены компенсировать недостаточное накопление действующего вещества в целевых органах увеличением его общей вводимой дозы. Это, в свою очередь, вызывает множество побочных эффектов, а также значительное повышение стоимости лечения. Кроме того, большая часть известных противоопухолевых препаратов по своей природе являются липофильными, что затрудняет их инъекционное введение и ограничивает перемещение по кровотоку. Например, многие природные вещества (куркумин [4], тимохинон [5] и другие), которые могли бы стать перспективными противораковыми агентами, способными селективно воздействовать только на опухолевые клетки, также обладают низкой растворимостью в воде [6].

Очевидно, что для более эффективного клинического применения противоопухолевых препаратов требуется решить ряд проблем, возникающих на этапе введения действующего вещества в организм пациента. Одним из предложенных решений является концепция создания систем направленной доставки противоопухолевых препаратов.

## **1.2 Концепция направленной доставки противоопухолевых препаратов**

Концепция направленной доставки была впервые предложена немецким врачом Полом Эрлихом в первой половине XX века и была названа им «магическая пуля» [7]. Идеальный вариант направленной доставки подразумевает локальное накопление большей части действующего вещества непосредственно в очаге заболевания, вне зависимости от места и метода введения препарата пациенту. При этом его концентрация в клетках здоровых тканей не должна превышать определенного минимального уровня, что позволит снизить или даже полностью предотвратить побочные эффекты. Достоинства направленной доставки не вызывают сомнений: такой метод позволяет существенно снизить необходимую концентрацию препарата, и, как следствие, минимизировать негативные последствия химиотерапии, а также уменьшить ее стоимость.

Первоначальная концепция подразумевала, что любая система направленной доставки препаратов состоит из двух частей, первая из которых должна отвечать за «нацеливание» на очаг заболевания, а вторая – оказывать терапевтический эффект. Однако в настоящее время предложено уже достаточно много методов, выходящих за пределы вышеописанной модели. Например, в ряде случаев в этих подходах используются особенности региона, в который должна быть осуществлена доставка лекарственного средства. Известно, что морфологическое окружение опухолевых клеток имеет ряд отличий от клеток и тканей здорового организма [8,9]. Эти особенности, отличающие очаг заболевания от здоровых тканей организма, позволяют создавать принципиально новые системы доставки противоопухолевых препаратов. Стоит отметить, что для создания системы доставки требуется носитель, который позволит физически или химически иммобилизовать или инкапсулировать лекарственный препарат. При этом препарат может быть помещен как внутрь носителя, так и закреплен на его поверхности.

В основе направленной доставки лежит так называемый эффект повышенной проницаемости и удержания – Enhanced Permeability and Retention (EPR) эффект [10], который впервые был обнаружен японскими учеными еще в 1986 г [11]. Известно, что нормальная (здоровая) сосудистая сеть представляет собой равномерно распределенные, хорошо дифференцированные артерии, артериолы, капилляры, венулы и вены. В противоположность этому, опухолевые сосуды представляют собой хаотичное смешение абнормальных, иерархически неорганизованных сосудов, имеющих множество структурных и функциональных отличий от здоровых тканей. В частности к таким отличиям относится увеличенный диаметр пор опухолевых кровеносных сосудов, характеризующихся по этой причине повышенной проницаемостью для наночастиц соответствующего размера. Это связано с тем, что при ангиогенезе твердых опухолей образуется прерывистый эндотелий, через поры которого могут проникать частицы, чей средний диаметр не превышает 400 нм [12]. Кроме того, опухоли характеризуются слабой лимфодренажной системой, благодаря чему частицы надолго задерживаются в опухолевых тканях (Рисунок 2) [13].

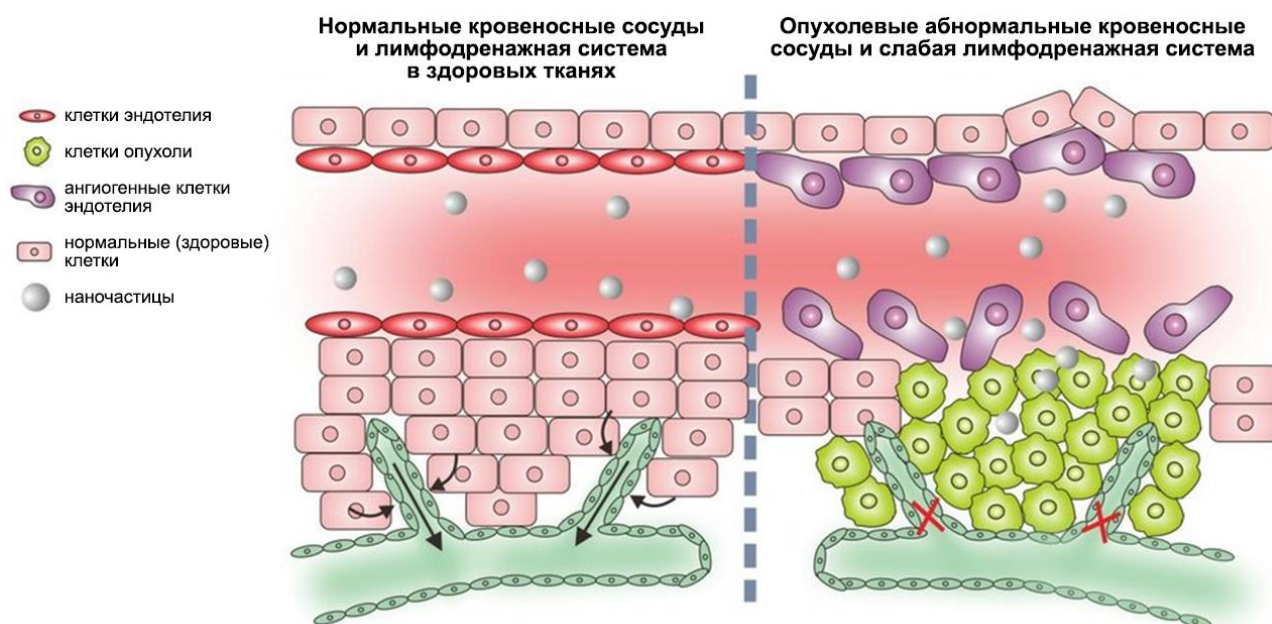


Рисунок 2 – Схематичное изображение эффекта повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффект) наночастиц в опухолях [13]

Таким образом, за счет EPR-эффекта наночастицы накапливаются преимущественно в опухолевых тканях, тогда как их концентрация в нормальных (не опухолевых) клетках здоровых органов сравнительно невелика (т.к. диаметр пор в их сосудах составляет около 15–30 нм). Это позволяет существенно снизить побочные терапевтические эффекты, что особенно важно при лечении онкологических заболеваний.

Проникнув в опухоль за счет EPR-эффекта, наночастицы могут различным образом взаимодействовать с раковыми клетками и оказывать терапевтический эффект. Таким образом, в первоначальной концепции направленной доставки лекарственных средств было выделено два подхода: активная и пассивная направленная доставка (Рисунок 3) [14,15]. В первом случае (активная направленная доставка) наночастица должна иметь лиганд – векторную молекулу, которая будет селективно взаимодействовать с определенными рецепторами на поверхности раковых клеток и проникать в них по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза. Такие системы доставки обладают повышенной избирательностью и позволяют максимально сократить воздействие препарата на здоровые клетки организма, однако страдают от нехватки универсальности и требуют больших финансовых затрат на этапе производства из-за более сложного синтеза. Во втором случае (пассивная направленная доставка) наночастица не имеет лигандов и может высвобождать лекарственный препарат как непосредственно в опухолевом окружении (межклеточное пространство), так и проникать в раковые клетки посредством эндоцитоза. Это позволяет

сделать систему более универсальной (подходящей для терапии разных видов рака), а также производить ее с меньшими финансовыми и временными затратами.

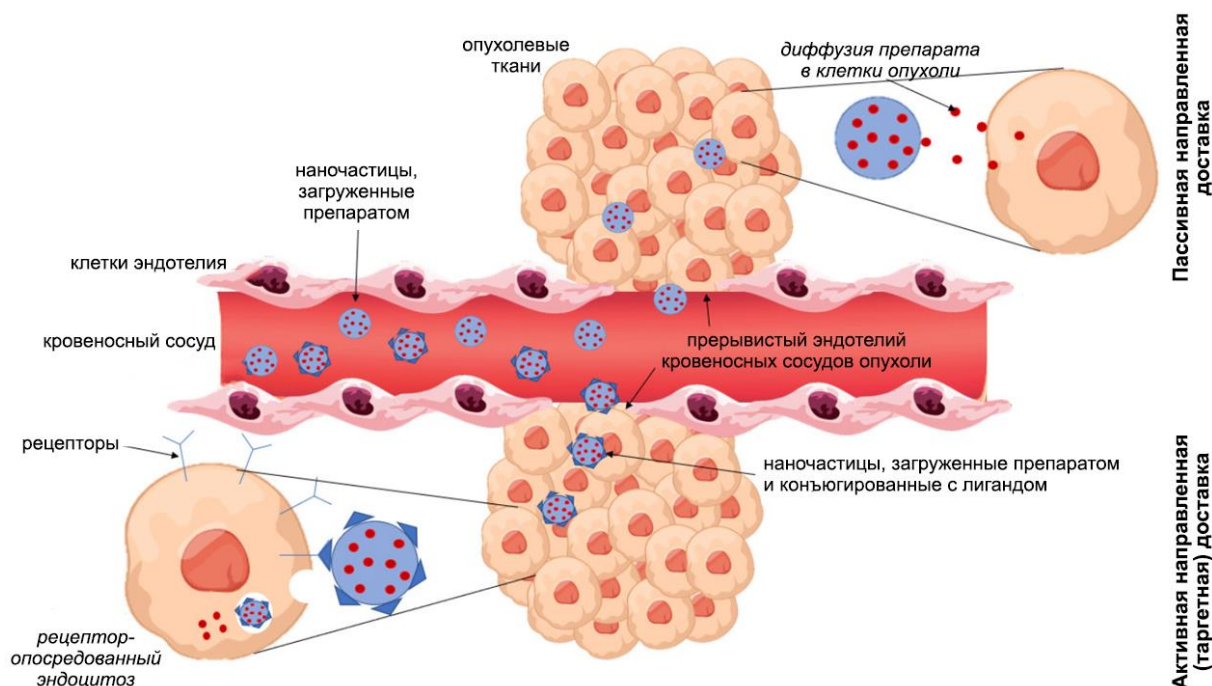


Рисунок 3 – Схематичное изображение пассивной (сверху) и активной (снизу) направленной доставки наночастиц в опухоль [14]

Как уже отмечалось выше, для осуществления направленной доставки требуется наноноситель. На данный момент большинство ученых отдает предпочтение носителям, способным инкапсулировать препарат во внутреннем объеме, что позволяет повысить его биодоступность, а также защитить от преждевременного разрушения и выведения из организма. Кроме того, многие наноносители впоследствии могут быть модифицированы для осуществления дополнительных функций (например, диагностических) и позволяют комбинировать несколько препаратов [16]. Очевидно также, что эффективность направленной доставки напрямую зависит от физико-химических свойств используемых наноносителей: его диаметра, стабильности, количества инкапсулированного препарата, кинетики его высвобождения и т.д. Таким образом, выбор подходящего наноносителя является одной из главных задач при разработке систем доставки противоопухолевых лекарств.

### 1.3 Основные требования к наноносителям и их классификация

Учитывая все вышеизложенное, очевидно, что разработка новых наноносителей является комплексной и сложной задачей, в которой необходимо принимать во внимание множество различных факторов. Кроме того, после успешного получения новой системы

доставки, она требует тщательного исследования в условиях *in vitro* и *in vivo*, в ходе которых оценивается ее потенциал для перехода к последующим предклиническим и клиническим испытаниям (Рисунок 4). Таким образом, разработка и вывод нового препарата на фармацевтический рынок может занимать 15 лет и более: за последние 20 лет только около 80 наномедицинских препаратов были одобрены для клинического применения в США и Европе [17].

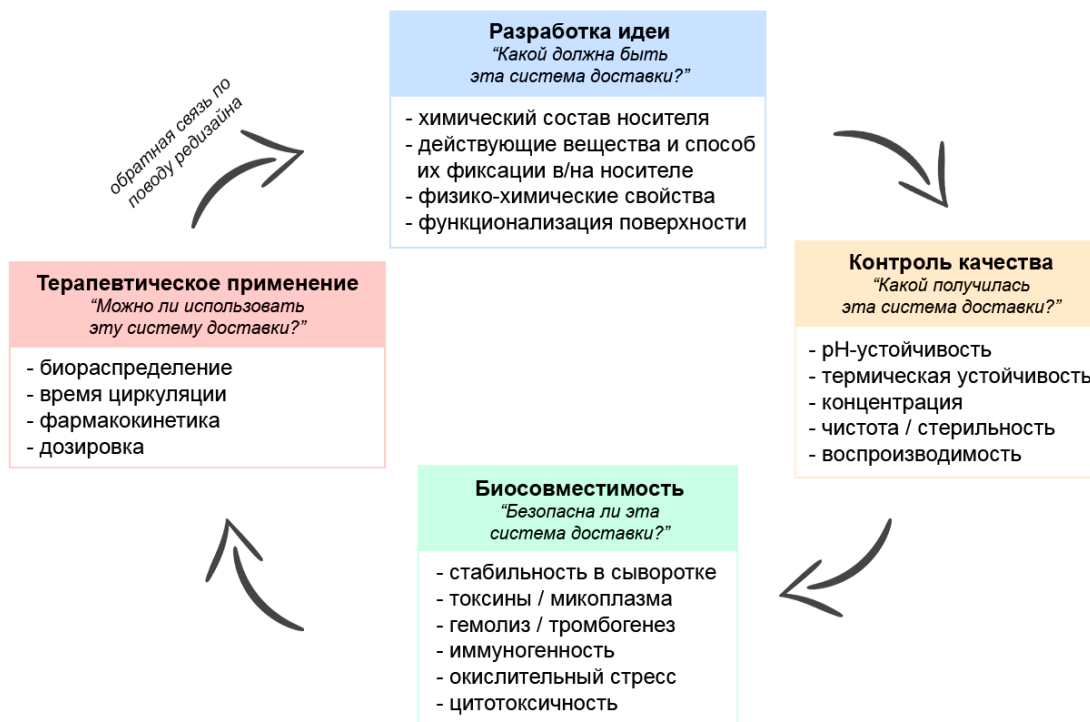


Рисунок 4 – Схема стандартного цикла исследования наноносителей

Существует несколько классификаций наноносителей (по размерам, по структуре, по химической природе). Последняя классификация предлагает разделение наноносителей на полимерные (органические), неорганические и липидные (Рисунок 5) [18].



Рисунок 5 – Классификация наноносителей для доставки противораковых препаратов [18]

### 1.3.1 Наноносители на основе липидов

Липиды представляют собой большую группу малополярных жиров и жироподобных веществ, содержащихся в животных и растительных тканях. В частности, фосфолипиды представляют собой амфифильные молекулы, способные формировать устойчивые агрегаты различных типов, форма которых зависит от геометрического соотношения гидрофобной и гидрофильных частей липида (Рисунок 6) [19]. Как видно из Рисунка 6, при равном соотношении этих частей происходит формирование липидного бислоя, который замыкается в сферические агрегаты – липосомы. В случае же геометрического преобладания одной из частей липида (полярной головки или гидрофобных остатков), формируются нормальные или обратные мицеллы. При этом полярные группы липидов обращены в сторону водной фазы, тогда как гидрофобные компоненты выталкиваются из воды и занимают термодинамически наиболее выгодное положение.

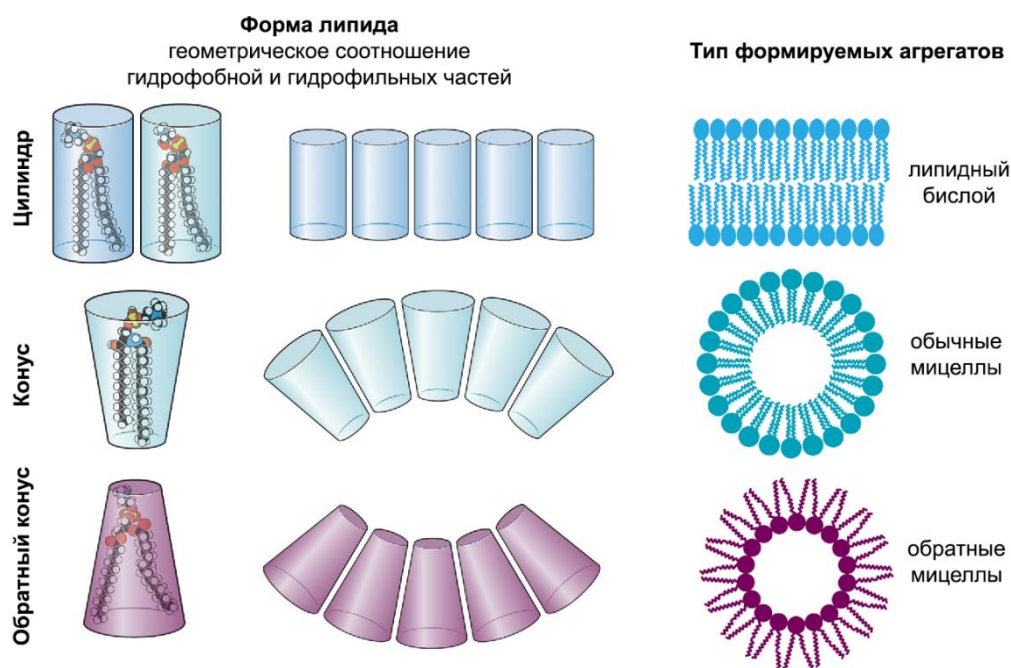


Рисунок 6 – Влияние формы липида на тип формируемых агрегатов [19]

Липосомы – сферические агрегаты, состоящие из одного (моноламеллярные липосомы) или нескольких (мультиламеллярные липосомы) липидных бислоев (Рисунок 7) [20]. Размер липосом может варьироваться в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких микрометров. Однако, размер липосом (в основном моноламеллярных) для направленной доставки препаратов составляет обычно 50–450 нм, что обеспечивает EPR-эффект.

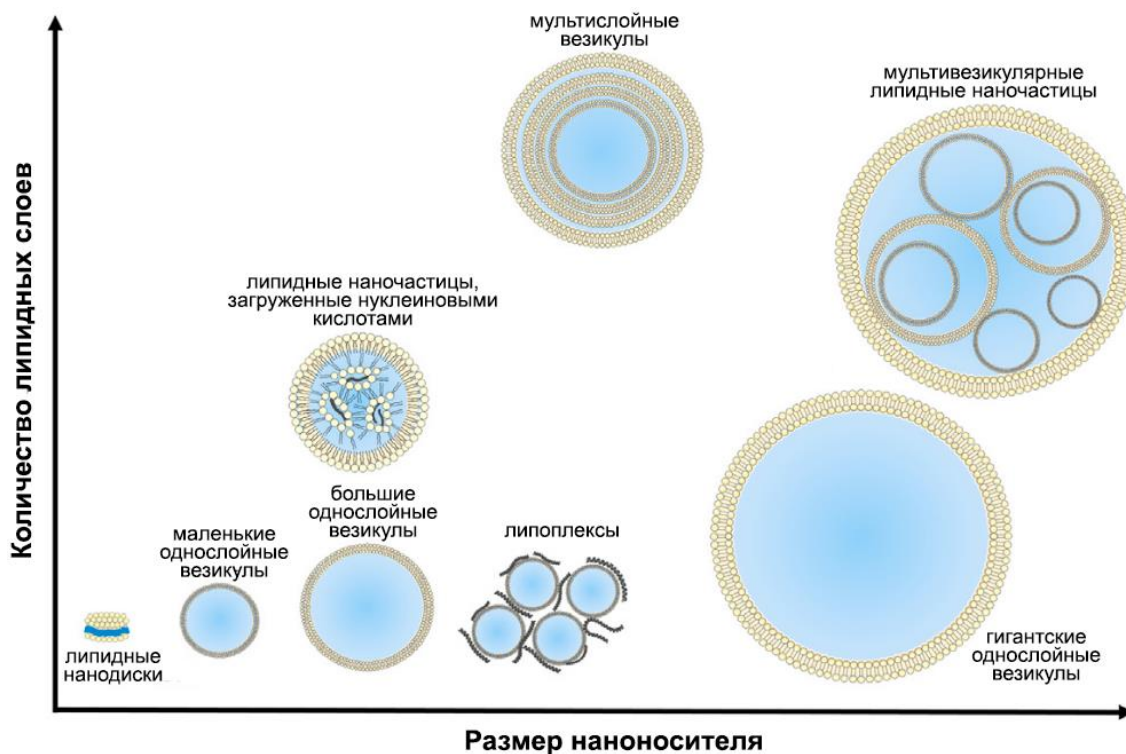


Рисунок 7 – Классификация систем доставки на основе липидов в зависимости от их размера и количества слоев [20]

Впервые липосомы были предложены в качестве модели для изучения плазматической мембраны клетки английским биофизиком Алемом Бэнгхемом в 1964 году [21]. Однако затем было отмечено, что амфифильная природа липосом не только имитирует плазматическую мембрану клетки, но и обеспечивает их высокое сродство, что позволяет липосомам значительно быстрее и легче проникать в клетку по сравнению со многими другими системами доставки лекарственных средств (Рисунок 8). Именно по этой причине липосомы стали одной из самых первых систем, предложенных для доставки лекарственных препаратов [22]. Другим важным преимуществом является возможность загрузки в них одновременно гидрофильных (во внутреннюю полость липосомы) и липофильных (в липидный бислой) молекул, причем инкапсулирование происходит самопроизвольно, непосредственно в процессе формирования наночастиц, что делает процесс производства таких систем доставки простым и экономичным [23]. Важно отметить, что большинство применяемых в медицине противоопухолевых препаратов (например, паклитаксел, цисплатин и т.д.) жирорастворимы. Таким образом, липосомы подходят для комбинированной доставки двух и более препаратов разной природы. Однако липосомы обладают достаточно плотной упаковкой липидного бислоя, что снижает степень загрузки липофильных веществ, а, следовательно, и эффективность их применения.

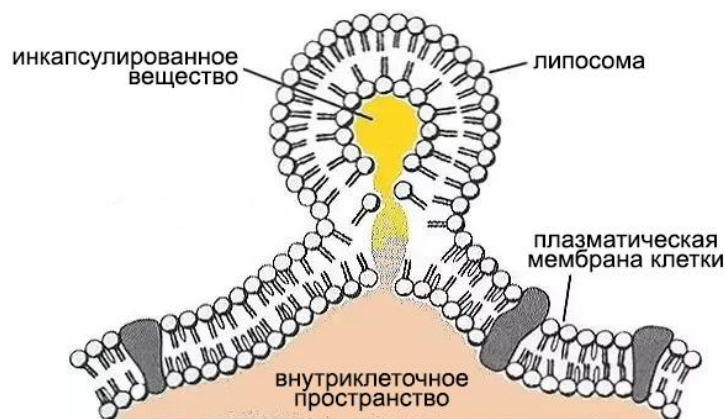


Рисунок 8 – Схематичное изображение проникновения липосомы в клетку посредством ее слияния с плазматической мембраной [23]

Таким образом, липосомы являются одной из наиболее изученных и широко используемых систем доставки лекарственных средств. Так, за последние 30 лет на фармацевтическом рынке США и Европы появилось 23 липосомальных препарата и еще несколько десятков находятся на разных этапах клинических испытаний (Рисунок 9, Таблица 1) [24–27]. При этом 84 % из этих препаратов предложены для внутривенного администрирования, а 63 % приходится непосредственно на терапию онкологических заболеваний [28].

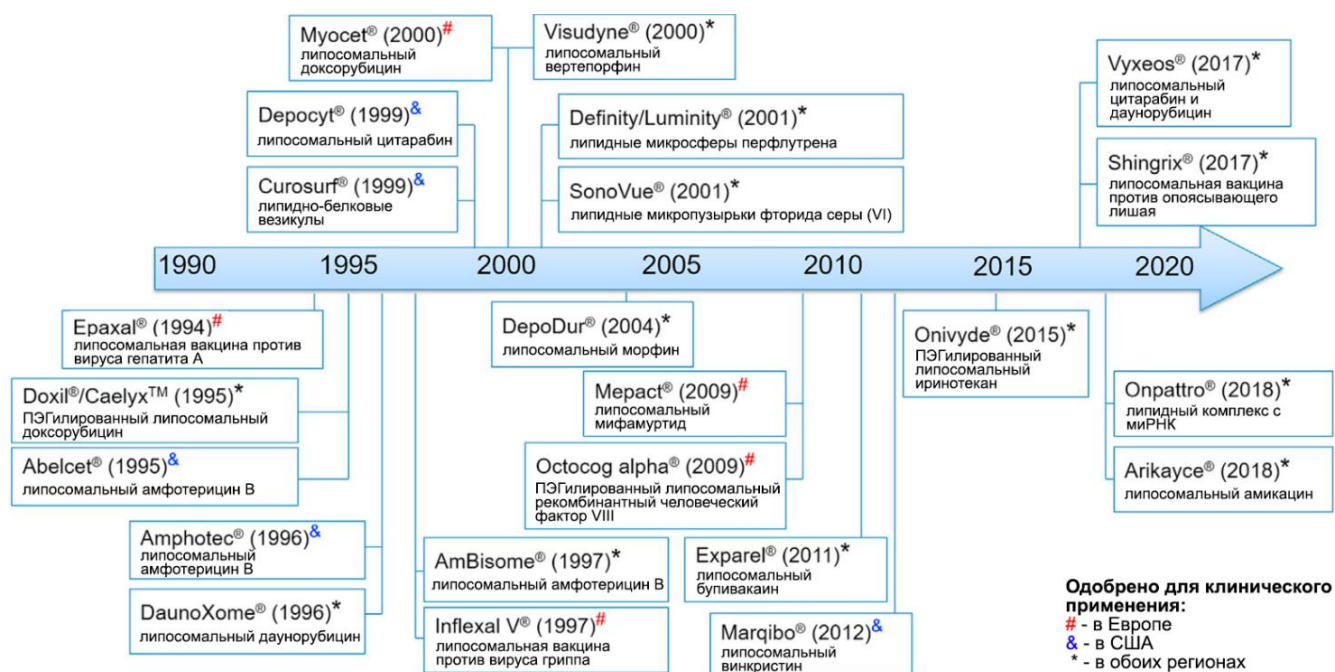


Рисунок 9 – Хронология выхода на фармацевтический рынок липосомальных препаратов, одобренных для клинического применения [20]

Таблица 1 – Некоторые липосомальные препараты, одобренные для клинического применения [20]

| Название препарата,<br>производитель и год выпуска                             | Инкапсулированное<br>вещество | Назначение                                        | Способ<br>введения |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Abelcet</b><br>Leadiant Biosciences, Inc. 1995                              | амфотерицин В                 | противогрибковое<br>средство                      | в/в                |
| <b>Ambisome</b><br>Fujisawa Healthcare, Inc. and<br>Gilead Sciences, Inc. 1997 |                               |                                                   |                    |
| <b>Amphocil</b><br>Zeneca Pharmaceuticals 1993                                 |                               |                                                   |                    |
| <b>Amphotec</b><br>Sequus Pharmaceuticals Inc.<br>1996                         |                               |                                                   |                    |
| <b>Arikayce</b><br>Insmed, Inc. of Bridgewater, NJ.<br>2018                    | амикацин                      | антибактериальное<br>средство                     | перорально         |
| <b>DaunoXome</b><br>Galen US, Inc. 1996                                        | даунорубицин                  | химиотерапия                                      | в/в                |
| <b>DepoDur</b><br>Pacira Pharmaceuticals, Inc. 2004                            | сульфат морфина               | анальгетик                                        | эпидурально        |
| <b>Doxil</b><br>Johnson & Johnson 1995                                         | доксорубицин                  | химиотерапия                                      | в/в                |
| <b>Evacet</b><br>Liposome Company Inc. 1995                                    |                               |                                                   |                    |
| <b>Lipodox</b><br>Sun Pharmaceutical Industries<br>Ltd. 1995                   |                               |                                                   |                    |
| <b>Myocet</b><br>Zeneus Pharma Ltd. 2000                                       |                               |                                                   |                    |
| <b>Marqibo</b><br>Acrotech Biopharma, LLC 2012                                 | винкристин                    | вакцина                                           | в/м                |
| <b>Epaxal</b><br>Johnson & Johnson 1993                                        | антиген вируса<br>гепатита А  |                                                   |                    |
| <b>Inflexal V</b><br>Johnson & Johnson 1997                                    | антиген вируса<br>гриппа      |                                                   |                    |
| <b>Exparel</b><br>Pacira Pharmaceuticals, Inc. 2011                            | бупивакаин                    | анастетик                                         | в/в                |
| <b>Mepact</b><br>Takeda Pharmaceutical Limited<br>2004                         | мифамуртид                    | иммуномодулятор,<br>противоопухолевый<br>препарат | в/в                |
| <b>Onivyde</b><br>Merrimack Pharmaceuticals, Inc.<br>2015                      | иринотекан                    | химиотерапия                                      | в/в                |
| <b>Visudyne</b><br>Novartis International AG 2000                              | вертепорфин                   | фотосенсибилизатор                                | в/в                |

Способ введения: в/в – внутривенный, в/м – внутримышечный.

Появление на рынке препарата Doxil на основе липосом с включенным в них доксорубицином, является, пожалуй, одной из наиболее значительных вех в развитии наномедицины, за которой последовал расцвет первого поколения липосомальных препаратов [29]. Эти липосомы в основном содержали низкомолекулярные химиотерапевтические препараты и значительно улучшили их фармакокинетические профили, что приводило к снижению побочных эффектов, позволяя достичь более высоких терапевтических показателей [30]. Другие продукты, разработанные в этот период, включают липосомальные вакцины (такие как Erahal и Inflexal V) и липидные везикулы, используемые в качестве ультразвуковых контрастных веществ (Definity и SonoVue).

Однако известно, что липосомальные дисперсии склонны к агрегации, приводящей к увеличению размера частиц и, следовательно, их быстрому выведению из системного кровотока или уничтожению макрофагами [31]. Еще одним недостатком липосом, существенно ограничивающим их эффективность, является низкая стабильность и быстрое высвобождение инкапсулированного препарата [32].

Стоит отметить, что большой интерес представляют катионные липосомы, которые формируются на основе синтетических катионных липидов или липопептидов и обладают более высокой стабильностью по сравнению с обычными (анионными) липосомами. При этом липосома может состоять как только из катионных липидов, так и из смеси анионных (например, природных фосфолипидов) и катионных липидов для создания положительного заряда (Рисунок 10) [33].

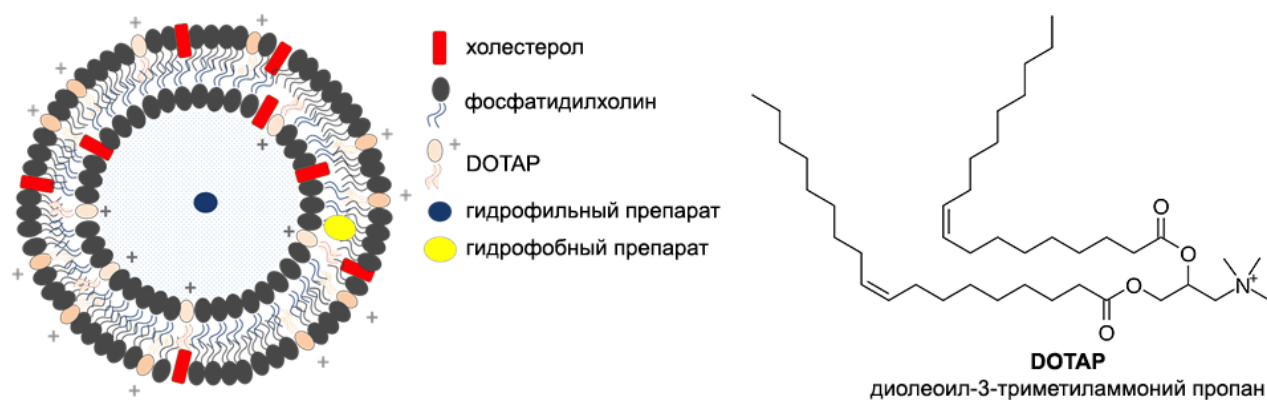


Рисунок 10 – Схематичное изображение катионной липосомы, положительный заряд в которой формируется за счет включения в бислой из природных липидов (фосфатидилхолин и холестерол) катионных липидов DOTAP [33]

Впервые катионные липосомы как системы для эффективного включения в них отрицательно заряженных нуклеиновых кислот и плазмид были предложены для генной терапии в конце XX века [34]. Вскоре, появившиеся в качестве альтернативы вирусным

векторам, катионные липосомы прочно зарекомендовали себя как эффективные системы инкапсулирования и доставки генетического материала *in vivo* и *in vitro* [35]. Они обладают рядом преимуществ по сравнению с вирусами в качестве векторов для переноса генов: в отличие от вирусов, катионные липосомы неиммуногенны, технически просты и экономичны в получении, а также способны переносить генетический материал практически любого размера. Однако катионные липосомы могут использоваться для доставки не только генетического материала, но и других препаратов [36,37] или их комбинаций [38–40]. Предполагается, что положительный заряд на поверхности таких наночастиц позволяет им быстрее и эффективнее взаимодействовать с отрицательно-заряженной поверхностью клетки.

Кроме того интерес также вызывает пока необъяснимая способность катионных липосом селективно воздействовать на сосудистую сеть опухоли [41]. Существующие на данный момент другие системы доставки, направленные на сосудистую сеть опухоли, не используются для монотерапии, так как они не показали убедительных результатов в клинических испытаниях. Это связано с тем, что антиангиогенные препараты в системах сосудистого нацеливания не могут полностью уничтожить опухоль, а только подавляют ее рост. При этом выжившие раковые клетки начинают активно пролиферировать и метастазировать. Таким образом, для получения положительных терапевтических результатов необходимо сочетать такие системы доставки с традиционной цитотоксической химиотерапией или лучевой терапией, ориентированной непосредственно на опухолевые клетки. Катионные липосомы обладают избирательным сродством к опухолевому сосудистому эндотелию и позволяют решить эту проблему при комбинированном инкапсулировании в них цитотоксических и антиангиогенных препаратов. Такое нацеливание противораковых препаратов на опухолевые сосуды с помощью катионных липосом зарекомендовало себя как перспективный метод по ряду причин [42]. Известно, что выживаемость раковых клеток напрямую зависит от клеток сосудистого эндотелия: гибель одной клетки опухолевого кровеносного сосуда приводит к гибели более ста раковых клеток [43]. Следовательно, у таких систем доставки нет необходимости проникать в глубокие слои опухоли, что существенно снижает число физиологических барьеров, встречающихся на их пути [44]. Кроме того, сосудистая сеть опухоли не зависит от ее типа, поэтому использование катионных липосом для уничтожения пролиферирующих эндотелиальных клеток может быть эффективным при различных видах злокачественных новообразований.

На данный момент разработано множество катионных липосом, применяющихся в качестве систем доставки противоопухолевых и антиангиогенных препаратов. Многие из

них успешно прошли доклинические испытания и на данный момент находятся на стадии клинических испытаний (Таблица 2) [45].

Таблица 2 – Результаты некоторых доклинических исследований *in vivo* катионных липосом с инкапсулированным противоопухолевым препаратом [45]

| Состав липосом, инкапсулированный препарат и вид опухоли                                             | Результат                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DOTAP/DOPC + паклитаксел (меланома человека A-375)                                                   | подавление ангиогенеза и ингибирование роста опухоли, увеличение продолжительности жизни                                |
| DOTAP/DOPC + паклитаксел (меланома человека A-Mel-3)                                                 | подавление роста опухоли и локальное подавление метастаз в лимфатических узлах                                          |
| DOTAP/DOPC + паклитаксел (меланома человека A-Mel-3)                                                 | замедление роста опухоли, уменьшение плотности и микроциркуляции опухолевых сосудов                                     |
| DOTAP/DOPC + паклитаксел (меланома человека A-Mel-3)                                                 | острое нарушение микроциркуляции и повышенное содержание тромбоцитов в опухоли и снижение капиллярного индекса перфузии |
| лецитин/холестерол/стеариламин/ $\alpha$ -токоферол + этопозид (твёрдотельная фибросаркома человека) | снижение роста опухоли, увеличение продолжительности жизни, пониженная цитотоксичность                                  |
| HSPC/CHOL/TRX-20 + цисплатин (остеосаркома)                                                          | подавление роста опухоли, улучшенное накопление, снижение системной токсичности, увеличение продолжительности жизни     |
| EPC/CHOL/DDAB + доксорубицин (рак полости рта человека)                                              | улучшенное накопление, увеличение продолжительности жизни                                                               |
| DOPC/DOTAB/CHOL/DOPE-PEG + доксорубицин (рак поджелудочной железы человека)                          | улучшенное накопление в опухолевом эндотелии и ингибирование роста опухоли                                              |
| DOTAP + камптотецин (карцинома легких Льюиса)                                                        | подавление роста опухоли, снижение числа метастаз, уменьшение плотности и микроциркуляции опухолевых сосудов            |
| HSPC/CHOL/DC-6-14/mPEG2000-DSPE + оксалиплатин (меланома мыши B16B16)                                | селективное связывание и ингибирование ангиогенеза опухоли, сниженное связывание с эритроцитами                         |
| HSPC/CHOL/DC-6-14/mPEG2000-DSPE + оксалиплатин (карцинома легких Льюиса)                             | подавление роста опухоли и увеличение продолжительности жизни                                                           |

**DOTAP** – диолеоил-3-триметиламмоний пропан

**DOPC** – дипальмитоилфосфатидилхолин

**HSPC** – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин (от англ. hydrogenated soybean phosphatidylcholine)

**CHOL** – холестерол

**TRX-20** – 3,5-дипентадецилоксибензамидина гидрохлорид

**DOTAB** – додецилтриметиламмоний хлорид

**DOPE-PEG** – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000]

**DC-6-14** – O,O'-дитетрадеканойл-N-( $\alpha$ -триметиламмонийацетил)диэтаноламин хлорид

**mPEG2000-DSPE** – [(2R)-2,3-ди(октадеканойлокси)пропил] 2-(2-метоксикарбониламино)этилфосфат натрия

Как описано выше, при неравномерном геометрическом соотношении гидрофобной и гидрофильной частей липида происходит формирование обычных или обратных мицелл (см. Рисунок 6). Мицеллы представляют собой коллоидные дисперсии сферических частиц со средним диаметром 5–150 нм. Такие наночастицы чрезвычайно просты с точки зрения получения, так как формирование агрегатов происходит самопроизвольно при достижении липидом критической концентрации мицеллообразования. В качестве систем направленной доставки лекарственных средств наибольшее внимание уделяется обычным мицеллам, в которых полярные компоненты липидов обращены в сторону окружающей водной среды, а гидрофобные остатки – внутрь агрегата. Такие частицы позволяют переносить липофильные препараты, инкапсулированные во внутреннюю полость мицеллы [46]. Однако на сегодняшний день особое внимание уделяется полимерным мицеллам, которые будут рассмотрены далее в разделе 1.3.2.

### 1.3.2 Наносистемы на основе полимеров

Полимерные наночастицы представляют собой агрегаты диаметром от 1 до 1000 нм, формируемые с использованием полимеров или блок-сополимеров (Рисунок 11) [47,48].

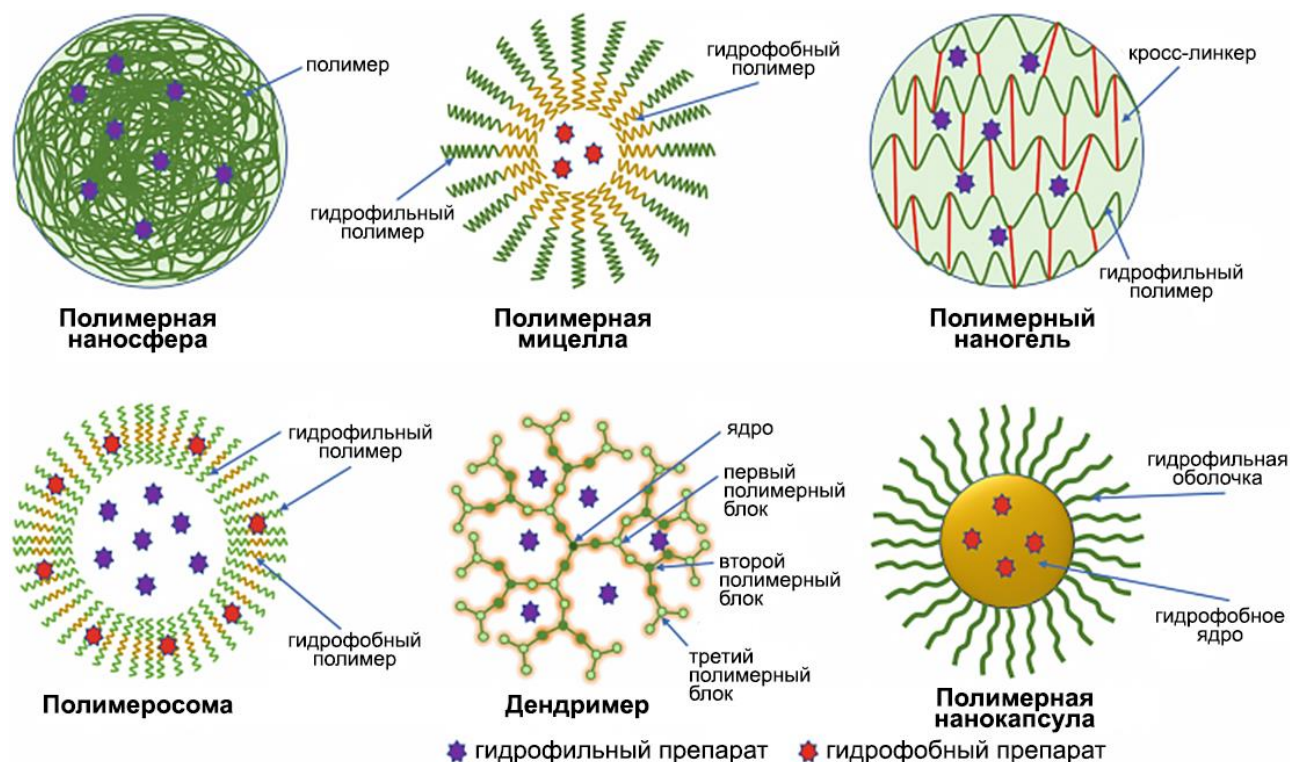


Рисунок 11 – Схематичное изображение основных типов полимерных наночастиц, применяемых для создания систем направленной доставки [47]

Несмотря на широкое разнообразие полимеров (как натуральных, так и синтетических) и типов наноносителей на их основе, на сегодняшний день уже существуют обширные базы данных, включающие подробную информацию о свойствах формируемых систем доставки [49–51]. Во многом это связано как с простыми и технологичными методами их получения, так и с возможностью легко контролировать физико-химические свойства формируемых наночастиц. К преимуществам использования полимерных наночастиц в качестве систем доставки лекарств можно отнести также их высокую стабильность, контролируемое распределение по размерам и возможность эффективно инкапсулировать как липофильные, так и гидрофильные препараты. Кроме того, как и другие системы доставки, полимерные наночастицы могут быть легко модифицированы векторами направленной доставки и другими функциональными молекулами.

Как было отмечено выше, широкое внимание привлечено к разработке полимерных мицелл на основе высокомолекулярных блок-сополимеров, позволяющих осуществлять различные структурные и функциональные модификации формируемой системы доставки (Рисунок 12) [52–54].

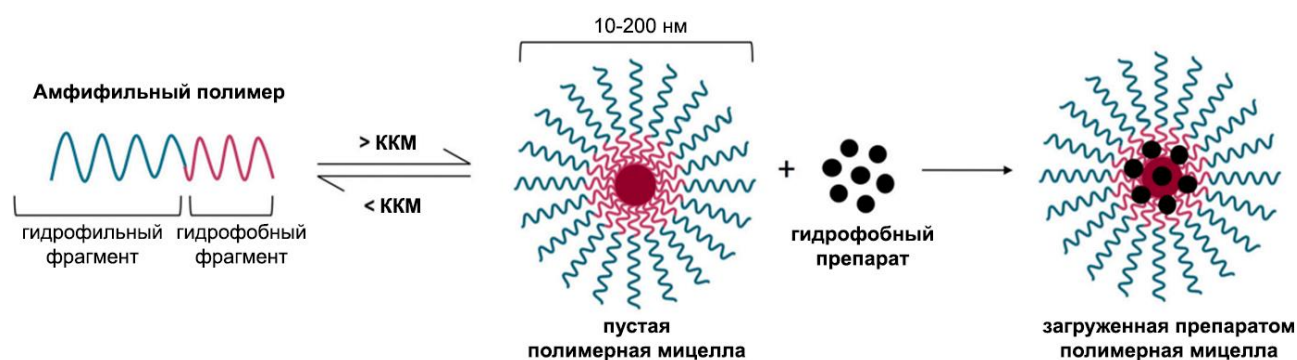


Рисунок 12 – Схематичное изображение самосборки полимерных мицелл из амфифильных блок-сополимеров. ККМ – критическая концентрация мицеллообразования [53]

Полимерные мицеллы имеют несколько преимуществ по сравнению с другими наноносителями для доставки лекарств. К ним относится, например, маленький размер формируемых агрегатов, что очень важно для нормальной трансудации частиц при администрировании их в кровь [55]. Кроме того, гидрофильная полимерная оболочка мицеллы обеспечивает ее пространственную стабильность и позволяет избежать быстрого поглощения ретикулоэндотелиальной системой, что приводит к длительному времени циркуляции наночастиц в организме [56]. Этот факт заслуживает особого внимания, так как все прочие типы наноносителей, применяемых для доставки лекарств, нуждаются в дополнительных модификациях с целью придания им стабильности. Кроме того, как было отмечено ранее, липосомальные системы доставки способны переносить гидрофобные

препараты, загруженные в липидный бислой, внутренний объем которого весьма ограничен. В отличие от липосом, в мицеллы можно инкапсулировать гидрофобные лекарства или их комбинации, при этом используя весь внутренний объем, который ограничен только размером формируемых агрегатов.

В качестве гидрофильных полимеров для производства полимерных мицелл чаще всего используют полиэтиленгликоль. Такой выбор обусловлен тем, что ПЭГ коммерчески доступен, способен стабилизировать формируемые частицы, а также обладает высокой биосовместимостью и низкой токсичностью для организма [52,56,57]. Гидрофобный блок-сополимер должен обладать высокой емкостью для эффективного наполнения лекарственным средством и хорошей совместимостью с инкапсулируемым препаратом. Другими часто используемыми полимерами для образования гидрофобного ядра являются сложные и простые полиэфиры, а также полиаминокислоты [58].

Некоторые мицеллярные дисперсии, загруженные противоопухолевыми препаратами, уже попали на фармацевтический рынок или находятся на разных стадиях клинических испытаний (Таблица 3) [59].

Таблица 3 – Примеры лекарственных препаратов на основе полимерных мицелл, проходящих клинические испытания или одобренных для клинического применения [59]

| Название препарата и производитель                                     | Инкапсулированное вещество | Статус                                               |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Genexol PM</b><br>Samyang Biopharmaceuticals Corp                   | паклитаксел                | одобрено в Южной Корее, Филиппинах, Индии и Вьетнаме |
| <b>Nanoxel M</b><br>Samyang Biopharmaceuticals Corp                    | доцетаксел                 | одобрено в Южной Корее                               |
| <b>NK105</b><br>Nippon Kayaku Co., Ltd.                                | паклитаксел                | завершена третья фаза клинических испытаний          |
| <b>NC-6004</b><br>NanoCarrier Co., Ltd.<br>Orient Europharma Co., Ltd. | цисплатин                  |                                                      |
| <b>SP1049C</b><br>SoftKemo Pharma Corp                                 | доксорубицин               | завершена вторая фаза клинических испытаний          |
| <b>NK012</b><br>NanoCarrier Co., Ltd.<br>Nippon Kayaku Co., Ltd.       | SN-38                      |                                                      |
| <b>CPC6346 (CriPec)</b><br>Cristal Therapeutics                        | доцетаксел                 | активная вторая фаза клинических испытаний           |
| <b>NK911</b><br>Nippon Kayaku Co., Ltd.                                | доксорубицин               | завершена первая фаза клинических испытаний          |
| <b>NC-4016</b><br>NanoCarrier Co., Ltd.                                | оксалиплатин               |                                                      |

Однако, стоит отметить, что широкое внедрение полимерных мицелл в клинические испытания и их вывод на фармацевтический рынок ограничен рядом факторов. Так, главным недостатком полимерных носителей является зависимость их физико-химических параметров от множества внешних и внутренних факторов, которые могут вызывать постепенную деградацию полимерных составляющих. К ним относится в частности непредсказуемое изменение свойств полимерных наночастиц при длительном хранении и циркуляции в кровотоке. Также на данный момент все еще плохо изучено поведение полимерных мицелл в условиях *in vivo* (например, при распределении в тканях и при интернализации клетками) [60].

Таким образом, на сегодняшний день ведется поиск способов решения вышеописанных проблем, а также активно разрабатываются другие типы полимерных наноносителей. К ним, в частности, относятся полимерные нанокапсулы и наносферы (Рисунок 13) [61]. Наносферы характеризуются матричной организацией полимерных цепей, в то время как нанокапсулы представляют собой масляное ядро, окруженное достаточно тонкой полимерной мембраной. При этом действующее вещество может быть как физически инкапсулировано во внутреннюю полость наноносителя, так и адсорбировано на его поверхности [62]. Следовательно, нанокапсулы и наносферы открывают широкие возможности для транспортировки сразу нескольких лекарственных препаратов, что делает их интересными моделями для лечения и диагностики онкологических заболеваний.

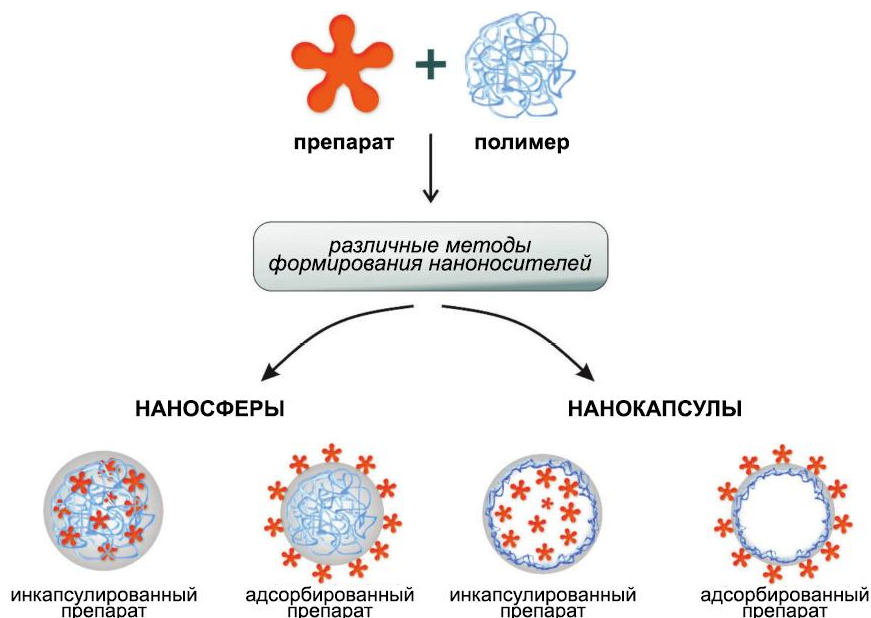


Рисунок 13 – Схематичное изображение полимерных наносфер и нанокапсул с применением различных методов инкапсулирования препарата [61]

Для формирования нанокапсул и наносфер применяют биосовместимые, биоразлагаемые и нетоксичные полимеры, например гидрофобные сополимеры поли(лакто-со-гликолевой кислоты), полиалкилцианоакрилат, хитозан, желатин и другие. Стоит отметить, что именно наноносители на основе полиалкилцианоакрилата стали первыми полимерными системами доставки, достигшими III фазы клинических испытаний [63]. Кроме того в последние годы активно изучается способность полимерных наносфер на основе полиалкилцианоакрилата эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер, что открывает широкие перспективы для лечения опухолей мозга [64].

Полимерные нанокапсулы, в свою очередь, представляют собой резервуарную систему и позволяют добиться более длительного (продолжительного) высвобождения препарата по сравнению с наносферами [65]. На Рисунке 14 представлена схема получения нанокапсул методом послойной адсорбции полиэлектролитов (layer-by-layer technique, LbL). Для этого на твердую матрицу последовательно адсорбируют слои противоположно заряженных полимеров, после чего матрицу растворяют, а образовавшуюся полость (ядро) загружают препаратом. В качестве матрицы чаще всего используются наночастицы ватерита ( $\text{CaCO}_3$ ), поскольку имеют пористую структуру, позволяют контролировать размер формируемых капсул и легко растворяются в физиологических условиях [66]. Установлено, что для обеспечения механической стабильности оболочка капсул должна содержать по крайней мере 2 полимерных бислоя, а термическая обработка уже сформированных капсул приводит к их эффективной компактизации за счет уплотнения полимерных слоев [67].

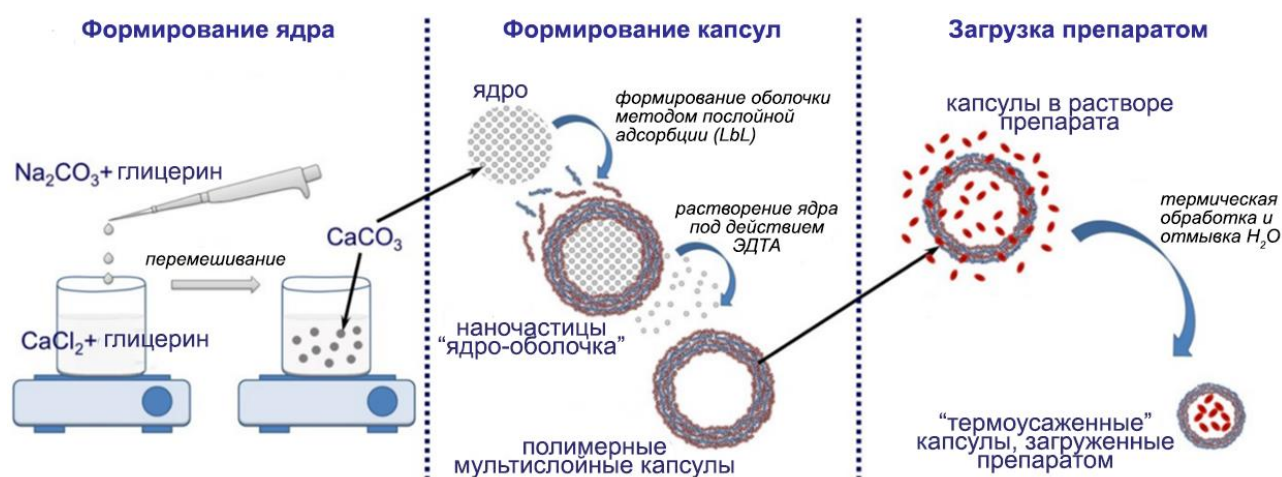


Рисунок 14 – Схема поэтапного формирования наночастиц  $\text{CaCO}_3$ , сборки и уплотнения оболочки полимерных нанокапсул, а также их загрузки препаратом

Другой тип полимерных носителей, вызывающий широкий интерес с точки зрения создания систем доставки противоопухолевых препаратов – дендримеры (от греч. «dendron» – дерево). От обычных полимеров дендримеры отличаются разветвленной трехмерной

наноархитектурой молекулы с очень низким индексом полидисперсности и высокой функциональностью. В структуре дендримеров можно выделить три основных уровня организации: 1) ядро; 2) отходящие от него многослойные концентрические полимерные блоки; 3) периферийные функциональные группы [68,69]. Ассоциация дендримера с лекарственным препаратом может осуществляться ковалентным присоединением действующего вещества к внешним функциональным группам полимера, физической (нековалентной) его инкапсуляцией во внутренней области наночастицы или адсорбцией (Рисунок 15) [70]. Первый способ закрепления препарата (ковалентное конъюгирование) позволяет использовать специальные отщепляющиеся линкеры, способные высвободить действующее вещество непосредственно в очаге заболевания. Второй способ (нековалентная инкапсуляция) подходит для транспортировки липофильных веществ.

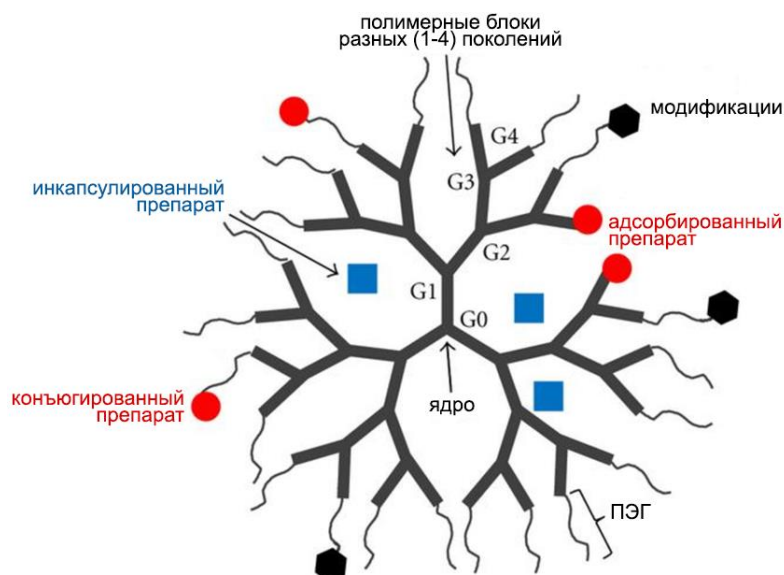


Рисунок 15 – Схематичное изображение возможной структуры дендримера [70]

Одним из несомненных преимуществ дендримеров является достаточно простая технология их синтеза, которая сводится к многократному повторению нескольких химических реакций, за счет которых происходит наращивание ветвей дендримера. Таким образом, дендримеры являются одними из самых перспективных классов наноконтейнеров с точки зрения коммерциализации их производства и доступности лекарственных форм на их основе. Кроме того, средний диаметр дендримеров составляет 10–100 нм, благодаря чему они могут осуществлять пассивную направленную доставку, а множество функциональных групп на поверхности частиц открывает возможности для прикрепления лигандов и осуществления активной направленной доставки в клетку-мишень. Возможность жестко контролировать структуру, размер и форму образующихся агрегатов, а также их хорошая водорастворимость и широкий спектр доступных модификаций делают дендримеры

перспективными наноносителями, применимыми в самых разных областях биомедицины [71,72]. Например, поли(амидоамин)-дендримеры стали первыми коммерчески доступными дендримерами, запатентованными торговой маркой Starburst в начале 1990-х гг, и активно используемыми для создания систем направленной доставки [73].

Одним из главных вопросов при разработке новых дендримерных структур является их биологическая безопасность для пациента. Известно, что синтетические вещества, на основе которых выстраивается дендримерная структура, могут быть токсичными и иммуногенными для организма [74]. Например, ряд исследований показал, что на токсичность дендримеров напрямую влияет их размер и поверхностный заряд [75–77]. В последнее десятилетие было синтезировано множество дендримеров с ограниченной цитотоксичностью [75,78]. Чаще всего для этих целей в качестве центрального ядра используют биосовместимые натуральные вещества, а для функционализации поверхности дендримеров применяются стратегии ПЭГилирования, ацетилирования и гликозилирования.

Стоит, однако, отметить некоторую нехватку данных относительно фармакодинамики и фармакокинетики наноносителей на основе дендримеров, сдерживающую их широкое применение [79]. Так, например, на сегодняшний день все еще недостаточно изучено биораспределение и выведение дендримеров из организма. Кроме того существует проблема ограниченной способности к конъюгации лекарственных средств без изменения характеристик самого дендримера. Однако, несмотря на вышеописанные препятствия, как минимум 18 дендримерных наноносителей на данный момент успешно проходят предклинические испытания, а один из них уже выведен на фармацевтический рынок (Starpharma, Австралия) [80].

Другой не менее значимой группой полимерных носителей являются наногели, которые представляют собой гидрофильные трехмерные полимерные сети, состоящие из гомополимеров или сополимеров (Рисунок 16) [81]. Наночастицы гидрогеля (или наногели) – это коллоидные стабильные структуры размером от 100 нм до 1 мкм, изготовленные из гидрогелей с наноразмерными гидрофильными полимерными матрицами. Такие наноконтейнеры объединяют в себе свойства гидрогелей и наночастиц, что делает их перспективными носителями лекарственных препаратов. В наногелях гидрофильные полимерные компоненты могут быть сшиты между собой как ковалентно (химическое сшивание), так и с помощью нековалентных связей (физическое сшивание) (см. Рисунок 16) [82]. Сшивание обеспечивает стабильность агрегатов, которая имеет решающее значение для поддержания матричной структуры гидрогелей, а также для предотвращения растворения гидрофильных цепей полимеров.

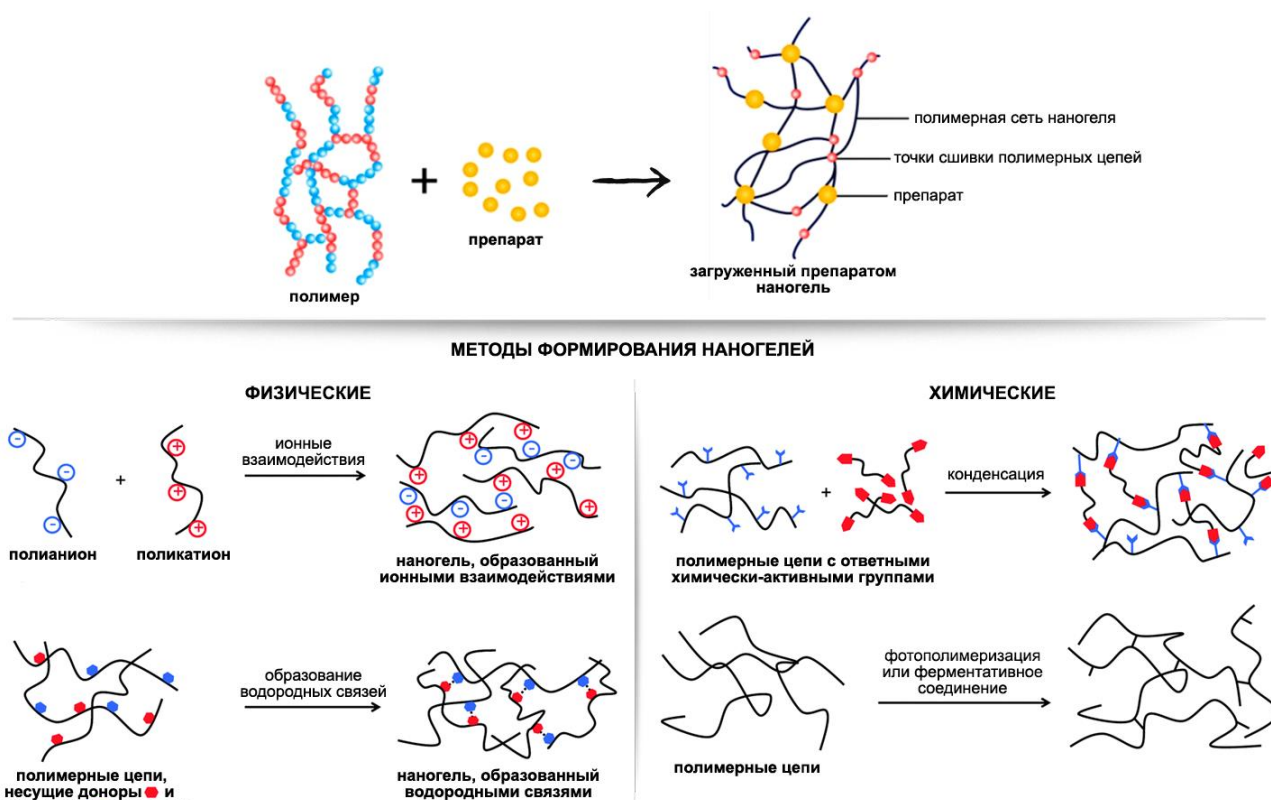
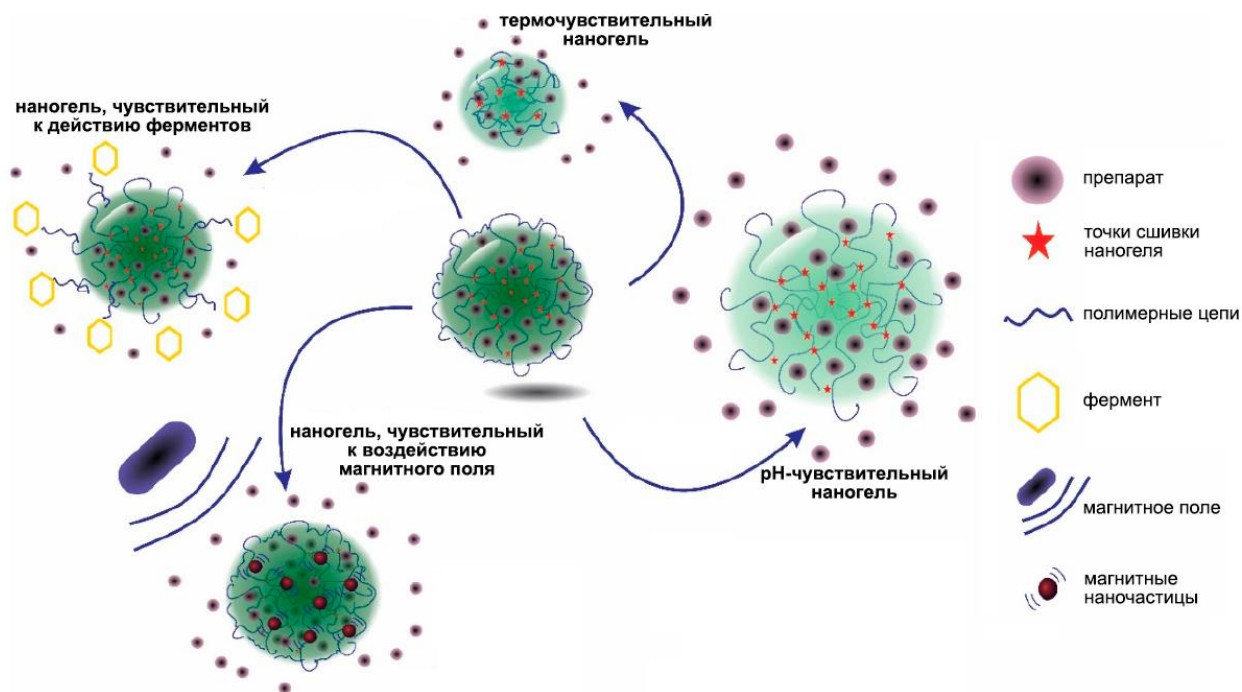


Рисунок 16 – Схематичное изображение наногеля с инкапсулированным препаратом [81], а также методов сшивания наногель-образующих полимеров [82]

Наногели широко можно легко адаптировать для доставки лекарств, а также диагностических систем [83]. Они эффективно устраняют ограничения традиционной лекарственной терапии, такие как плохая стабильность, большой размер частиц и низкая эффективность загрузки лекарственного средства. Так, например, наногели демонстрируют более длительный период полувыведения из сыворотки крови, поскольку избегают быстрого почечного клиренса [84], обладают повышенной способностью ко-инкапсулировать множество соединений (как биомакромолекулы, так и вещества с низкой молекулярной массой) в одну систему доставки [85,86], а кроме того остаются неактивными в системном кровообращении и внутренней водной среде, сводя к минимуму риск иммунного ответа [87]. Другим несомненным преимуществом наногелей является их универсальность. В случае других наночастиц, инкапсулируемый в них препарат должен вводиться непосредственно на стадии формирования контейнеров. Наногели же могут быть синтезированы в отсутствие лекарственного средства, а затем загружены им с использованием механизма нековалентного взаимодействия между препаратом и полимерной матрицей гидрогеля.

Стоит также отметить, что наногели находят широкое применение в контролируемой доставке терапевтических средств, снижая побочные эффекты лекарств и позволяя уменьшить терапевтические дозы [88,89]. Это связано с их чувствительностью к различным

внешним воздействиям, в ответ на которые происходит изменение физических параметров наногеля и высвобождение нековалентно инкапсулированного в нем вещества (Рисунок 17). Это позволяет создавать наногели с контролируемым высвобождением лекарственного препарата, не прибегая к дополнительным модификациям.



Несмотря на множество очевидных преимуществ, на данный момент наногели пока не нашли широкого применения в клинической практике [90]. В частности, это связано с низкой воспроизводимостью наногелей: многие реакции конъюгации приводят к переменной стехиометрии, что затрудняет получение однородных партий наногелей, особенно при функционализации их поверхности биомолекулами. Также существуют трудности с контролем высвобождения препарата, поскольку нерегулярная структура наногелей часто приводит к неконтролируемому/неравномерному высвобождению лекарства. Наконец, наногели имеют ограничения в доставке к целевым тканям и не всегда способны достичь центра опухоли из-за особенностей межклеточного транспорта и высокого давления межстициальной жидкости. Тем не менее, стоит отметить, что такие наноносители – достаточно новая ветвь развития систем направленной доставки препаратов, которая в будущем может найти свое место в сфере противоопухолевой терапии. В частности, несколько препаратов на основе наногелей уже проходят предклинические испытания [91].

### 1.3.3 Неорганические наночастицы

Неорганические материалы, используемые для создания наночастиц, включают углерод (углеродные нанотрубки и фуллерен), мезопористый диоксид кремния и металлы, такие как золото, серебро и оксид железа (Рисунок 18) [92]. Наночастицы этого класса обычно используются для диагностики и визуализации, хотя они также могут применяться и в качестве терапевтических средств, учитывая их уникальные физико-химические свойства, которые облегчают такие подходы, как фототермическая терапия.

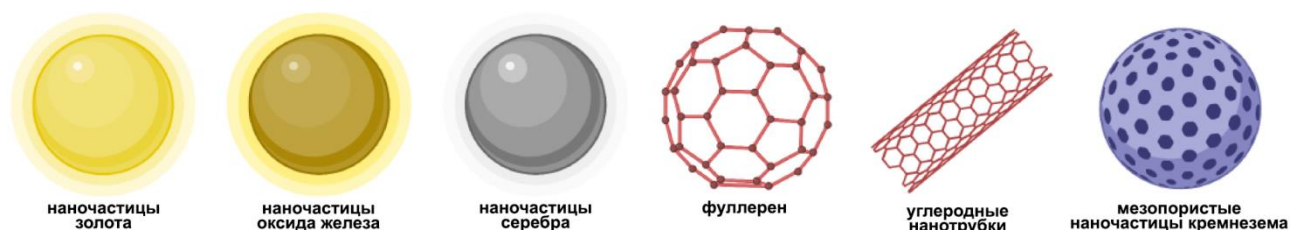


Рисунок 18 – Схематичное изображение основных типов неорганических наночастиц, применяемых для создания систем направленной доставки [92]

В последние годы неорганические материалы продемонстрировали большой потенциал в качестве систем доставки лекарств, поскольку обладают высокой стабильностью, хорошей биосовместимостью и фармакологическими свойствами [93]. Так, например, мезопористые кремнеземные материалы имеют большую площадь поверхности, регулируемый диаметр пор и множество легко модифицируемых участков, что позволяет широко использовать их в качестве носителей для создания комбинированных систем доставки лекарств [94]. Такая пористая структура позволяет связывать терапевтические агенты на стенках каналов, инкапсулировать их во внутренней полости благодаря гидрофильности кремнезема или связывать их с помощью линкеров, поскольку силоксановые группы могут быть легко функционализированы для этих целей. Стоит также отметить, что объемное внутреннее пространства каналов подходит также для инкапсуляции различных биомакромолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Такие системы уже продемонстрировали высокую эффективность доставки химиотерапевтических препаратов [95], белков [96] и нуклеиновых кислот [97].

Наночастицы золота также являются одним из наиболее глубоко изученных наноматериалов и широко используются в физике, химии, сенсорике, катализе и биомедицине. Интересно, что такие носители могут различаться по форме, их размеры можно легко регулировать, а поверхность – модифицировать для придания дополнительных свойств (Рисунок 19) [98].

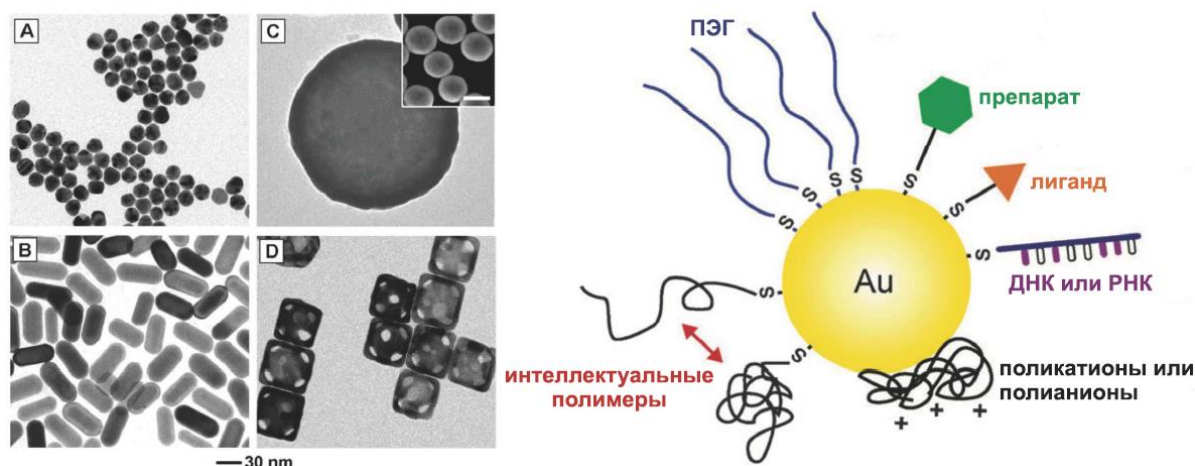


Рисунок 19 – Морфология и возможная модификация поверхности наночастиц золота [98]

Несмотря на то, что изначально наночастицы золота были предложены для применения в диагностических целях, в последние годы во многих исследованиях они использовались в качестве систем доставки препаратов, поскольку обладают хорошей способностью к загрузке лекарств, биосовместимостью и стабильностью [99]. В случае сферических или стержнеобразных наночастиц золота лекарственные средства могут быть закреплены на их поверхности, тогда как в случае носителей с полой структурой препарат может быть непосредственно инкапсулирован во внутреннюю полость. Кроме того, наночастицы золота также могут поглощать световую энергию и преобразовывать ее в тепловую, что делает их привлекательными платформами для комбинирования химиотерапии и фототермической терапии, а также для создания тераностических систем [100,101].

Другим перспективным неорганическим носителем являются наночастицы оксида железа, чья терапевтическая эффективность обусловлена их способностью воздействовать на ткани, активировать лекарственное средство, локально вызывать повышение температуры после (или без) применения внешнего источника энергии, модифицировать гены или активировать различные биологические материалы [102]. Благодаря этим механизмам действия они потенциально могут быть использованы для лечения целого ряда различных заболеваний, таких как заражение крови, рак, болезнь Паркинсона, анемия. В частности, наночастицы оксида железа показали хорошие результаты в лечении рака простаты, а их способность влиять на поляризацию макрофагов и потенциально подавлять рост опухоли открывает широкие возможности в иммунотерапии рака [103,104]. Кроме того, перспективные результаты были получены при ассоциировании наночастиц оксида железа с различными противоопухолевыми препаратами: паклитакселом, доксорубицином, доцетакселом, цисплатином, карбоплатином и другими [105].

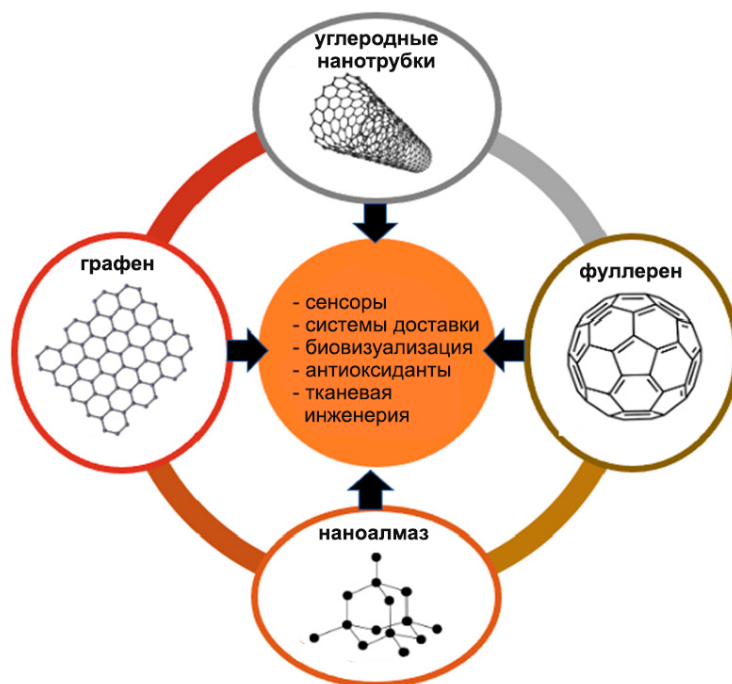


Рисунок 20 – Схематическое изображение различных наноуглеродных материалов для фармацевтического применения [106]

Углеродные наноматериалы (графен, углеродные нанотрубки, фуллерен и наноалмазы) также перспективны благодаря своим свойствам и гибкой размерной структуре, что делает их пригодными для доставки лекарств и генов, а также для большого числа других фармацевтических направлений (Рисунок 20) [106]. Функционализация поверхности углеродного наноматериала может изменить его химические и физические свойства, а также улучшить способность к загрузке лекарственного средства, биосовместимость, подавлять иммунный ответ и иметь возможность направлять доставку лекарственного средства к целевому участку. Углеродные наноматериалы также могут быть изготовлены в виде композитов с белками и лекарственными препаратами для снижения токсичности и повышения эффективности в фармацевтической области. Таким образом, углеродные наноматериалы очень эффективны для применения в фармацевтических или биомедицинских системах.

Основным недостатком, ограничивающим широкое применение неорганических наноносителей, является их потенциальная токсичность и сложность выведения из организма [93]. Стоит отметить, что несмотря на подобные затруднения, некоторые препараты на основе неорганических наноносителей (например, Sienna+, Ferumoxtran10, Combidex, Sineren, AuroLase, Feraheme, Rienso и др) уже находятся на различных стадиях клинических испытаний [107]. При этом несколько неорганических наночастиц (Feridex IV, Endorem, Resovist, Rienso, Gastromark и др), в основном представляющих из себя агенты для диагностики, уже попало на фармацевтический рынок.

### 1.3.4 Выбор наноносителя для создания системы направленной доставки препарата

Как было отмечено выше, наноносители позволяют создавать системы доставки лекарственных веществ или их комбинаций, обладающих рядом преимуществ по сравнению со свободным препаратом, а именно повышенной биодоступностью препарата (увеличение растворимости), высокой стабильностью и защитой препарата от преждевременного разрушения и выведения из организма (увеличенное время удержания как в кровотоке, так и в межклеточном пространстве). Кроме того, нельзя не отметить возможность внесения дополнительных модификаций для создания тераностических систем доставки, систем с контролируемым высвобождением препарата, а также систем таргетной доставки препарата в раковые клетки (снижение побочных эффектов).

Таким образом, выбор наноносителя оказывает прямое влияние на эффективность создаваемой системы доставки. Природу, размер и другие свойства наноносителя следует выбирать уже на первом этапе разработки, исходя из цели исследования и знаний о достоинствах и недостатках различных наночастиц (Таблица 4) [81].

Таблица 4 – Сравнение наночастиц с точки зрения создания систем направленной доставки лекарственных препаратов

| Параметр                     | Липидные наноносители                                           | Полимерные наноносители                                                                                   | Неорганические наноносители                                               |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Размер                       | 10–500 нм                                                       | 10–200 нм                                                                                                 | наноразмерные                                                             |
| Стабильность                 | средняя                                                         | высокая                                                                                                   |                                                                           |
| Загрузка препарата           | средняя                                                         | высокая                                                                                                   |                                                                           |
| Способность к модификациям   | высокая                                                         |                                                                                                           | низкая                                                                    |
| Биораспределение в организме | могут преодолевать биологические барьеры                        |                                                                                                           | могут преодолевать биологические барьеры, могут накапливаться в организме |
| Биосовместимость             | высокая                                                         |                                                                                                           | средняя                                                                   |
| Иммуногенность               | низкая                                                          | средняя                                                                                                   | высокая                                                                   |
| Основные преимущества        | высокая способность к ко-инкапсулированию нескольких препаратов | легко контролировать физико-химические свойства, высокая способность инкапсулировать липофильные вещества | подходят для создания тераностических систем                              |
| Основные недостатки          | высокая вариабельность от партии к партии                       | деградация полимеров может привести к потере стабильности                                                 | потенциальная токсичность                                                 |

## 1.4 Модификация наночастиц

Несмотря на существование большого числа разнообразных наночастиц, спектр их модификаций не имеет существенных различий и примерно одинаков для всех типов наночастиц. С точки зрения создания систем доставки противоопухолевых препаратов среди основных стратегий их функционализации можно выделить следующие направления (Рисунок 21):

- увеличение стабильности носителей;
- внедрение диагностических компонентов;
- введение лигандов для создания систем активной направленной (таргетной) доставки;
- создание систем с контролируемым высвобождением препарата.

Стоит отметить, что в большинстве случаев эти модификации не ограничивают друг друга и могут внедряться в систему доставки как по отдельности, так и совместно.

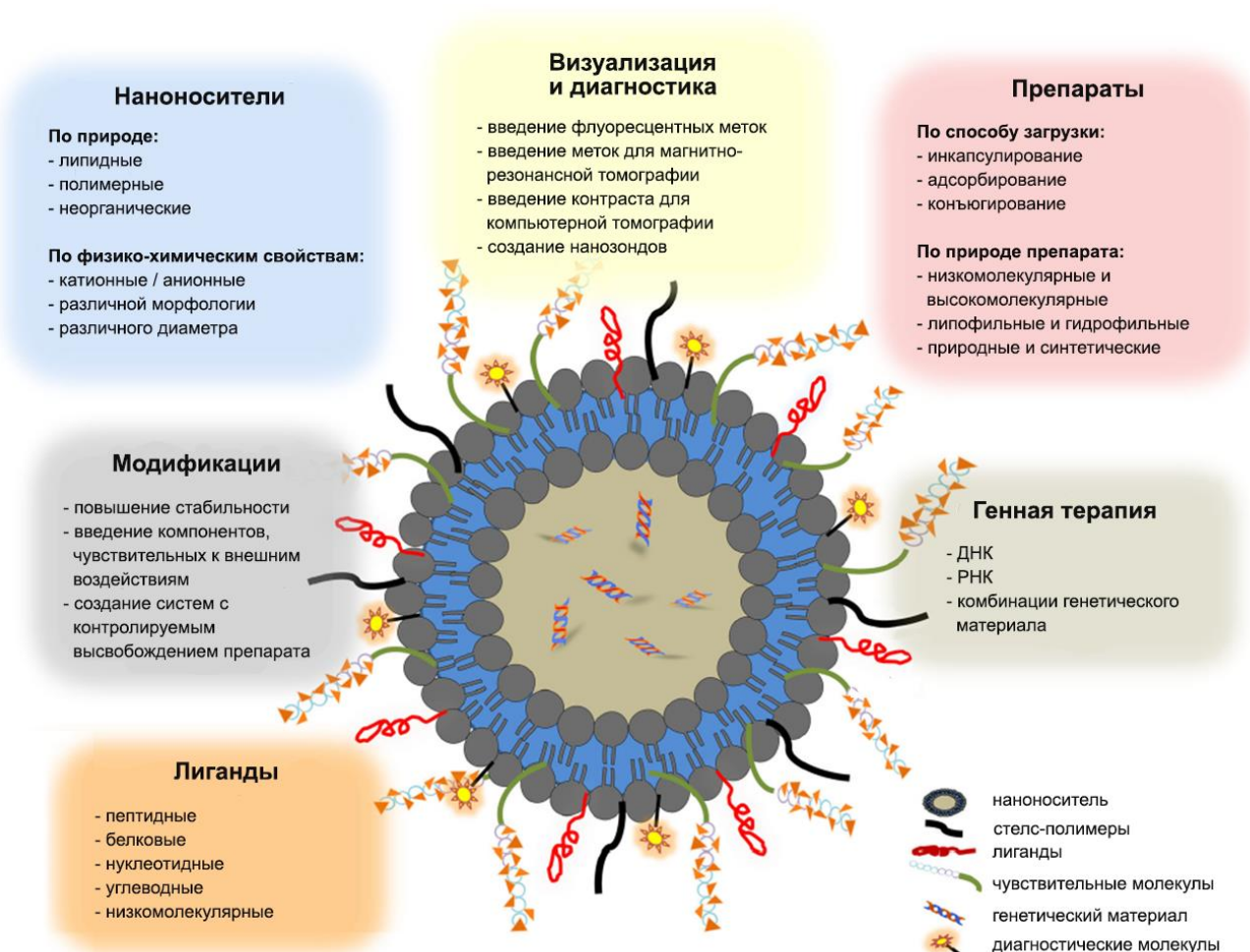


Рисунок 21 – Возможные модификации наночастиц для направленной доставки противоопухолевых препаратов на примере липосом [108]

### 1.4.1 Увеличение стабильности наноносителей

Зачастую наноносители удаляются из организма быстрее, чем будет достигнута необходимая для терапевтического эффекта концентрация. В среднем, после применения систем пассивной направленной доставки, концентрация наночастиц в опухоли приблизительно в два раза превышает их концентрацию в здоровых тканях [13]. Такие результаты могут объясняться большим числом различных биологических барьеров, возникающих на пути следования наноносителей в организме. Таким образом, при их разработке первоочередной задачей является увеличение их стабильности и, как следствие, времени их циркуляции в кровотоке [109,110]. Пролонгированное время циркуляции наночастиц позволяет поддерживать требуемую концентрацию действующего вещества в течение длительного времени после однократного введения, что существенно облегчает клиническое применение препарата.

#### 1.4.1.1 Использование защитных полимеров

Одним из возможных решений этой проблемы является «маскировка» наноносителей с помощью гидрофильных защитных полимеров с гибкой цепью, которые образуют вокруг наночастиц плотные конформационные «облака» и стерически предотвращают взаимодействие с их поверхностью (Рисунок 22) [111]. Показано, что даже при небольших концентрациях, защитные полимеры эффективно замедляют клиренс наноносителей макрофагами ретикулоэндотелиальной системы [112].

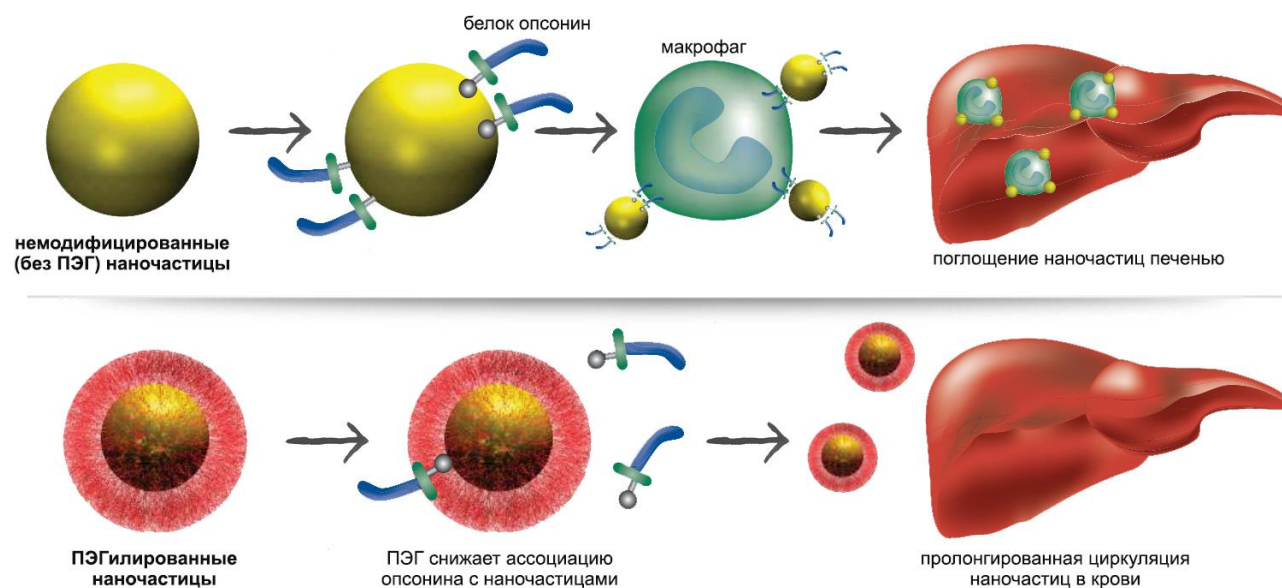


Рисунок 22 – Схематичное изображение механизма, с помощью которого защитный полимер полиэтиленгликоль снижает захват наночастиц макрофагами ретикулоэндотелиальной системы [112]

Одним из наиболее доступных и часто применяемых в медицинской химии защитных полимеров является ПЭГ [113,114]. Известно, что ПЭГилирование является универсальным способом стабилизации наноносителей при разработке «стелс» систем доставки лекарственных препаратов. Так, показано, что ПЭГ высокоэффективен с точки зрения стабилизации различных систем доставки лекарственных средств, таких как липосомы [115,116], мицеллы [117,118], полиэлектролитные наночастицы [119] и т.д. Некоторые такие ПЭГилированные препараты (Doxil/Caelyx, Myocet, DaunoXome, Marqibo и др.) на сегодняшний день уже активно применяются в лечении онкологических заболеваний (см. Таблицу 1) [29,120,121].

Тем не менее, подобный способ повышения стабильности имеет свои ограничения, поскольку в некоторых случаях приводит к появлению нежелательных побочных эффектов. В частности, ПЭГилированные липосомы могут вызывать токсическое поражение кожи, известное как «ладонно-подошвенный синдром» [122,123]. Среди других защитных полимеров можно перечислить полиакриламид, поливинилпирролидон (повидон), полиакрилоил морфолина и некоторые другие [124,125].

#### 1.4.1.2 Создание «остеклованной» поверхности

В начале 2000-х гг в качестве альтернативы ПЭГилированию для увеличения стабильности липосом активно разрабатывались стратегии покрытия их мембраны кремнеземной оболочкой – такие наноносители получили название «липосилы» [126,127]. Для получения липосилов в качестве матрицы используются липосомы, на поверхность которых последовательно наносится один или несколько слоев диоксида кремния. Было показано, что такая оболочка существенно увеличивает стабильность наноносителя и позволяет пролонгировать высвобождение инкапсулированного препарата [128]. Однако, свободные частицы диоксида кремния, образующиеся при деградации липосилов, имеют серьезные недостатки с точки зрения введения в организм (низкая биоразлагаемость и биосовместимость, высокая жесткость).

Таким образом, в качестве альтернативы липосилам в 1999 г были разработаны керасомы («cerasome» от англ. *ceramic* и *liposome*) – липосомы на основе органических и неорганических соединений, липидный бислой которых также покрыт кремневой оболочкой [129]. Для получения керасом используются молекулы липидной природы, к полярной группе которых ковалентно присоединены различные силоксановые производные – керасом-образующие липиды (Рисунок 23) [130]. При этом на этапе самопроизвольного формирования липосом из тонкой пленки должно происходить одновременное связывание силоксановых групп между собой. Таким образом, технология формирования керасом

практически не отличается от стандартных методик получения липосомальных дисперсий. Силоксановая сеть на поверхности керасом замедляет их деградацию в организме и снижает вероятность их захвата макрофагами, что, тем самым, приводит к пролонгированной циркуляции в организме и более эффективной доставке препарата в опухолевые клетки. Сравнительные исследования липосом, липосилов и керасом показали, что керасомы обладают наиболее высокой стабильностью и наиболее низкими уровнями высвобождения инкапсулированного препарата при хранении (см. Рисунок 23) [131]. Кроме того, керасомы характеризуются более высокой биосовместимостью по сравнению с липосилами.

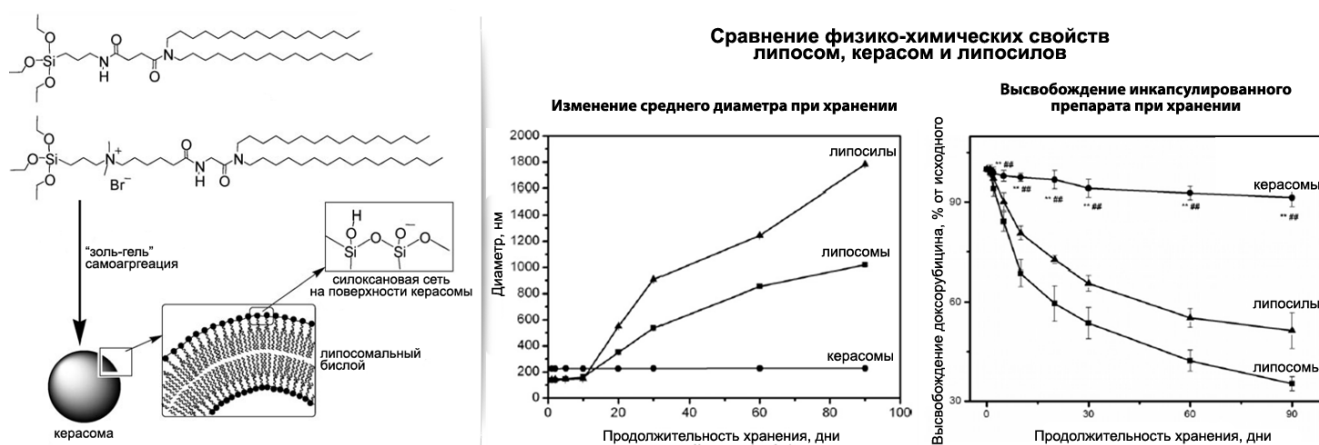


Рисунок 23 – Структура некоторых керасом-образующих липидов и схематичное изображение керасомальной мембраны [130], а также сравнение физико-химических свойств керасом, липосом и липосилов [131]

Однако, слишком устойчивая полисилоксановая сеть на поверхности керасом может также создавать затруднения для высвобождения лекарственного препарата в условиях *in vitro* и *in vivo*. Например, было установлено, что некоторые препараты (в том числе доксорубин) способны образовывать устойчивые комплексы с отрицательно заряженными компонентами керасомальной мембраны [131]. Решением данной проблемы стало создание керасом смешанного типа, состоящих из керасом-образующих липидов с включением некоторого количества обычных («разрыхляющих») липидов, например дипальмитоил-фосфатидилглицерола (DPPG) или дипальмитоил-фосфатидилгхолина (DPPC) (Рисунок 24) [132]. Введение разрыхляющих липидов в оболочку керасомы уменьшает число взаимодействий препарата с силоксановой сетью, увеличивая тем самым концентрацию действующего вещества, свободно циркулирующего во внутреннем объеме керасомы. При попадании таких смешанных керасом в клетку, в первую очередь будет происходить расщепление разрыхляющих липидов, не защищенных кремниевой оболочкой. В результате

в керасомальной мембране образуются поры, через которые происходит постепенное высвобождение инкапсулированного препарата.

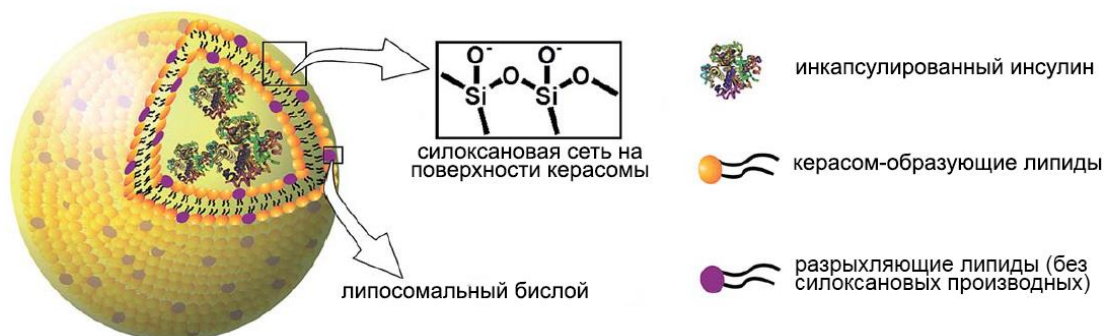


Рисунок 24 – Схематичное изображение керасомы смешанного типа на основе керасом-образующих и разрыхляющих липидов, загруженной инсулином [132]

Таким образом, с точки зрения систем доставки противоопухолевых и других лекарственных препаратов керасомы обладают несомненным преимуществом перед обычными липосомами. Остеклованная поверхность таких частиц существенно увеличивает их стабильность и, как следствие – время циркуляции в кровотоке. Кроме того, стабильность и эффективность высвобождения препарата из керасом смешанного типа можно легко регулировать, изменяя содержание разрыхляющих липидов в их составе.

#### 1.4.1.3 Усиление EPR-эффекта

Другим возможным решением проблемы быстрого клиренса наночастиц может стать устранение возникающих на их пути физиологических барьеров. Известно, что одним из главных недостатков EPR-эффекта является его гетерогенность: эффективность лечения существенно варьируется в зависимости от патологических и физиологических особенностей пациента и клинического состояния [133]. Так, например, если систолическое кровяное давление пациента составляет около 90 мм ртутного столба (вместо 120-130 в норме), гидродинамическая сила, толкающая кровь из полостной части сосуда в ткань опухоли, существенно падает, что приводит к снижению EPR-эффекта. Помимо физиологических параметров, EPR-эффект может также нарушаться различными заболеваниями: например, сосудистая эмболия препятствует току крови через прерывистый эндотелий опухолевых сосудов. Также важно отметить, что во многих патологических ситуациях целостность сосудистого эндотелия остается неизменной, что делает невозможным использование EPR-опосредованных систем пассивной доставки. Таким образом, EPR-эффект, лежащий в основе накопления любых наноносителей в опухолевых тканях, характеризуется значительной гетерогенностью и подвержен влиянию множества

физиологических и патологических факторов. Это обуславливает существенную вариабельность эффективности терапии у разных пациентов и ограничивают клиническую применимость данного подхода. Следовательно, существует острая потребность как углубленном изучении механизмов EPR-эффекта, так и в разработке стратегий его регулирования и усиления.

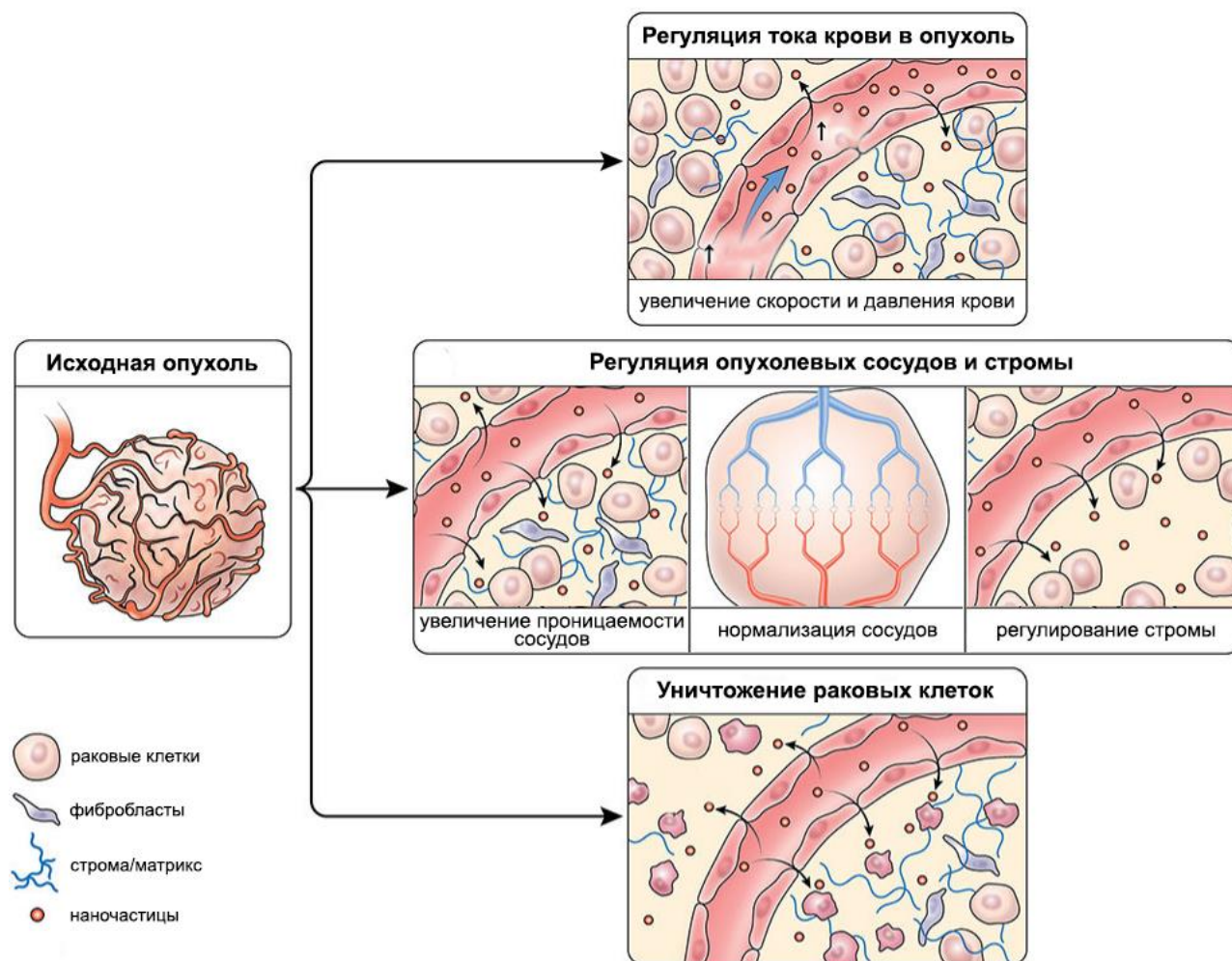


Рисунок 25 – Методы повышения эффективности EPR-эффекта на основе манипулирования различными физиологическими барьерами [134]

Проанализировав основные препятствия, мешающие активному накоплению наночастиц в опухолевых клетках, группа ученых из США предложила несколько перспективных методов повышения эффективности EPR-эффекта [134]. Среди них можно выделить три основных направления работы (Рисунок 25):

- Изменение нормального физиологического состояния пациента без изменения окружающей среды опухоли. К этой группе методов относится, например, регулирование кровяного давления и скорости тока крови. Так, при введении сосудосуживающих препаратов, нормальные сосуды сужаются, ограничивая кровоток в

здоровых тканях. При этом опухолевые сосуды никак не реагируют на препарат из-за слабо развитой мышечной составляющей стенок сосудов. Это приводит к некоторому дополнительному увеличению проницаемости опухолевых тканей [135].

- Моделирование опухолевых сосудов и стромы. Существует несколько антиангиогенных препаратов, с помощью которых можно физиологически модифицировать сосудистую сеть опухоли: например, при использовании бевацизумаба нарушается ангиогенез опухоли, приводящий к подавлению ее роста за счет уменьшения кровотока и сосудистой проницаемости. Также было установлено, что применение антиангиогенных препаратов приводит к нормализации сосудистой системы и лучшему распределению крови в центре опухоли, что повышает эффективность доставки некоторых лекарственных средств [136].
- Уничтожение раковых клеток с целью уменьшить их барьерную функцию. Установлено, что каждое последующее применение противораковой терапии эффективнее предыдущего. Вероятно, это связано с тем, что сами опухолевые клетки действуют как барьер для более глубокого проникновения наночастиц внутрь опухоли. Таким образом, при их разрушении временно увеличивается проницаемость сосудов, и EPR-эффект возрастает примерно в 2,2 раза [137]. Тем не менее, при определенных условиях эти способы могут также привести к повреждению самих кровеносных сосудов опухоли, что приведет к существенному снижению их проницаемости из-за образования тромбов.

#### 1.4.2 Создание систем доставки с контролируемым высвобождением препарата

Как отмечалось выше, при применении EPR-опосредованных систем пассивной направленной доставки накопление наночастиц происходит преимущественно в опухолевых тканях. Однако при этом некоторая концентрация действующего вещества наблюдается также и в здоровых клетках организма, вызывая ряд побочных эффектов, хоть и в значительно меньшей степени, чем при лечении препаратом в чистом виде. Дополнительно минимизировать негативное воздействие лекарственного средства на здоровые ткани организма можно, обеспечив его высвобождение исключительно в опухолевых клетках. Добиться этого можно модификацией наночастиц, основанной на их чувствительности к различным физиологическим параметрам [138]. Этот подход использует, например, различия в значениях pH и температуры характерных для нормальных тканей и патологических областей (опухолей, воспалительных процессов и т.д.). Преимуществом систем доставки с контролируемым высвобождением препарата состоит в том, что даже при равномерном распределении наноносителей по всему организму, их биodeградация и высвобождение действующего вещества будет происходить только в целевой области. Таким образом, для

рационального и эффективного использования наночастиц с контролируемым высвобождением препарата, необходимо обладать глубоким пониманием особенностей микросреды опухоли и ее отличий от здоровых тканей организма. Стоит также отметить, что ряд наноносителей с контролируемым высвобождением препарата уже находится на разных этапах клинических испытаний [139].

#### 1.4.2.1 pH-чувствительные наноносители

Известно, что многие виды рака характеризуются ацидозом, т.е. низким pH по сравнению со здоровыми тканями организма [140–142]. Для опухолевого метаболизма характерен процесс аэробного гликолиза (эффект Варбурга), при котором раковые клетки производят энергию преимущественно с помощью активного гликолиза с последующим образованием молочной кислоты. Для поддержания постоянного нейтрального уровня pH, в раковых клетках интенсифицированы процессы протонного транспорта, отвечающие за перенос лишних протонов в межклеточное пространство. При этом из-за слабо развитой опухолевой лимфодренажной системы, протоны, выведенные из раковых клеток, надолго задерживаются в межклеточном матриксе, в результате чего в нем создается кислотная среда. Таким образом, в большинстве случаев опухоли (как на ранней стадии развития, так и в случае более поздних стадий, а также в виде метастаз) имеют значительно более низкий внеклеточный уровень pH (варьируется для различных видов рака в зависимости от его типа, размера опухоли и ее анатомического расположения), чем окружающие их нормальные ткани (величина pH которых составляет около 7,4) [143]. Следует отметить, что низкий pH в опухолях существенно ограничивает применение некоторых противораковых препаратов в свободной форме (без инкапсулирования в наноносители). Так, например, ацидоз опухоли может привести к снижению активности некоторых лекарств, таких как доксорубин, а также к деградации различных биомакромолекул [144]. Таким образом, сохранение активности действующего вещества является одной из первоочередных задач противоопухолевой терапии, что в очередной раз подтверждает перспективность использования наноносителей в качестве систем доставки препаратов.

Однако, низкие pH опухоли могут быть также использованы в качестве преимущества при создании систем доставки с контролируемым высвобождением препарата. Так, недавние исследования продемонстрировали развитие этой области наномедицины вследствие разработки нескольких перспективных pH-чувствительных носителей. Среди них можно перечислить такие типы наночастиц, как: липосомы [145–147], мицеллы [148], конъюгаты вида «полимер-препарат» [149], наногели [150], дендримеры [151], полимерные наносферы [152] и т.д.

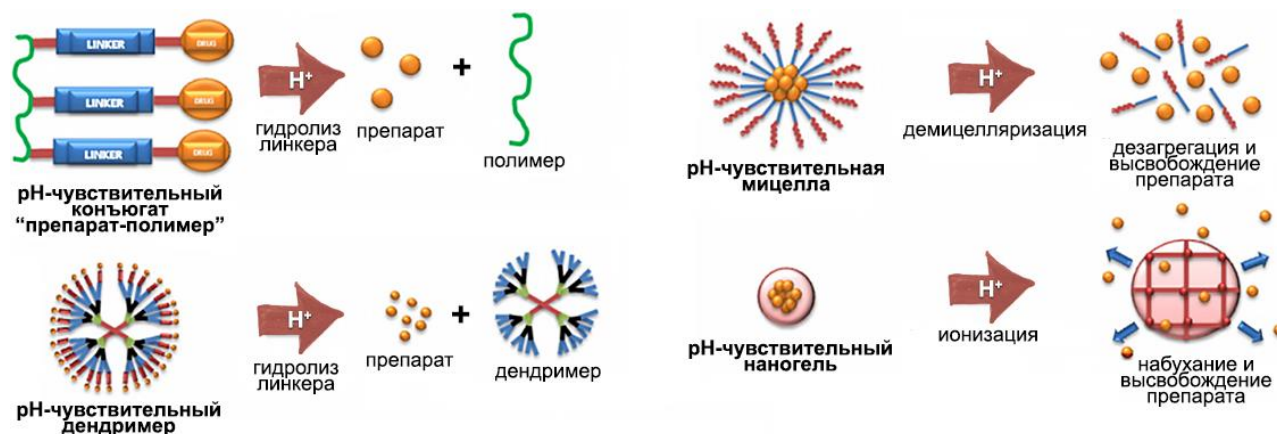


Рисунок 26 – Схематичное изображение механизма высвобождения лекарственного препарата из различных типов pH-чувствительных наноносителей [153]

Принцип действия pH-чувствительных систем доставки сводится к введению в их структуру различных pH-чувствительных компонентов [153]. После накопления таких наноносителей в опухоли (за счет EPR-эффекта) низкий уровень pH в этой области вызывает изменение конформации pH-чувствительных компонентов или их биodeградацию. В результате этого процесса в носителе образуются поры (или он подвергается полному разрушению), что вызывает локальное высвобождение препарата (Рисунок 26). При этом наноносители, попавшие в здоровые ткани организма, будут подвергаться гораздо более медленной биodeградации, не вызывая резкого накопления действующего вещества, что позволяет существенно снизить возможные побочные эффекты.

#### 1.4.2.2 Термочувствительные наноносители

На сегодняшний день гипертермическая химиотерапия является одной из наиболее изученных и развитых технологий контролируемого высвобождения препарата [154]. Она основана на внедрении в структуру наноносителя различных термочувствительных компонентов. После администрирования таких носителей в кровь и их распределения в организме за счет EPR-эффекта, очаг заболевания подвергается внешнему термическому воздействию (чаще всего для этих целей применяется ультразвук или инфракрасное излучение). В результате термочувствительные компоненты разрушаются или претерпевают конформационные преобразования, вызывающие «раскрытие» наноносителя и высвобождение действующего вещества. Впервые этот метод был предложен еще в 1978 году [155], и использовался для доставки метотрексата в опухоль (карцинома легких Льюиса) с помощью термочувствительных нанолипосом [156]. При этом эффективность накопления препарата в опухолевых клетках возрастала в 3-4 раза по сравнению со свободным метотрексатом.

Предполагается, что термочувствительные наночастицы должны сохранять свою стабильность при физиологической температуре (около 37°C) и при этом быстро осуществлять высвобождение препарата в локально нагреваемой области (40–42°C). Дополнительным преимуществом гипертермической химиотерапии считается тот факт, что она увеличивает скорость кровотока, и тем самым местно усиливает EPR-эффект уже при 41–43°C. Однако применимость данного метода закономерно ограничивается как физической доступностью опухоли для термического воздействия, так и нормальными физиологическими параметрами пациента. В частности, гипертермия не применима для пациентов с повышенной температурой тела (что является частым побочным эффектом при химиотерапии, а также на поздних стадиях онкологических заболеваний) или воспалительными процессами. Тем не менее, на сегодняшний день несколько типов термочувствительных наноносителей (липосомы, мицеллы, конъюгаты «неорганический наноноситель/лекарственный препарат») находятся на различных этапах предклинических и клинических испытаний [157].

#### 1.4.2.3 Наноносители с магнитными наночастицами

Другой способ осуществления контролируемого высвобождения препарата из наноносителей основан на внедрении в их структуру магнитных наночастиц [158]. Механизм работы таких систем доставки заключается в раскрытии наноносителя и локальном высвобождении инкапсулированного препарата под воздействием переменного магнитного поля на очаг опухоли. При этом в качестве магнитных частиц чаще всего используется оксид железа  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  – магнетит: такие частицы легко синтезировать, они обладают хорошей биосовместимостью и могут быть функционализированы с помощью полимерных покрытий или молекул-лигандов [159]. Магнетит уже нашел широкое применение в различных областях медицины, в частности для магнитно-резонансной томографии, отслеживания клеток в условиях *in vivo*, а также в гипертермической химиотерапии [160].

Стоит отметить, что диаметр магнитных частиц может варьироваться в среднем от 5 до 500 нм, причем их размер, форма и количество оказывают прямое влияние на механизм высвобождения инкапсулированного препарата и его интенсивность [158]. Тем не менее, подавляющее большинство исследований использует магнетит с диаметром частиц в диапазоне от 5 до 20 нм. Эти ограничения связаны с необходимостью размещения магнитных частиц внутри наноразмерных систем доставки, а также с минимизацией нагрева магнетита в магнитном поле [161].

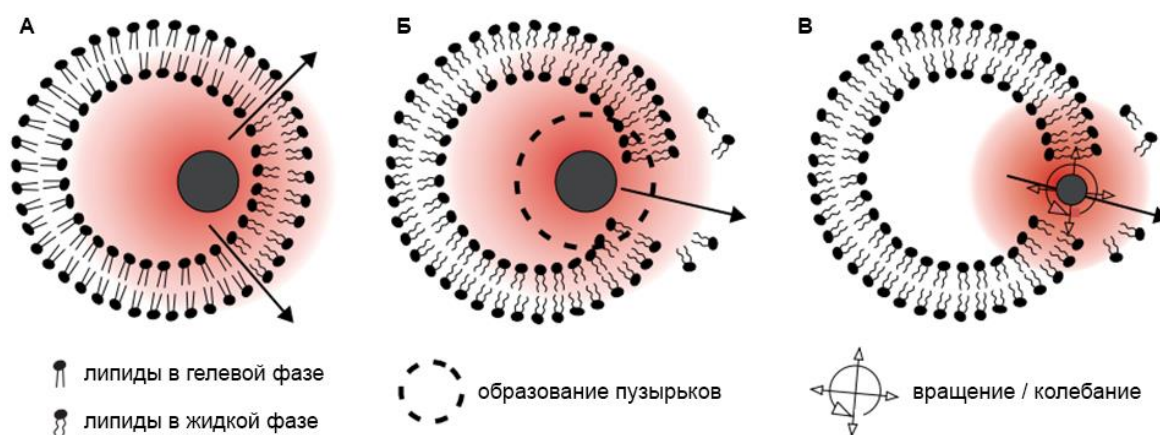


Рисунок 27 – Схематичное изображение механизма высвобождения препарата с помощью магнитных частиц на примере магнитных липосом [162]

Существуют различные механизмы высвобождения препарата из наноносителя с помощью магнитных частиц (Рисунок 27) [162]. Так, например, некоторые методы основаны на импульсном воздействии магнитного поля, вызывающем нагревание магнетита. Это, в свою очередь, приводит к различным конформационным изменениям в структуре носителя (Рисунок 27А) и диффузионному высвобождению препарата. В жидкой внутренней среде носителя нагретые магнитные наночастицы могут вызывать образование пузырьков, которые при высвобождении из носителя будут вызывать повреждение его оболочки и высвобождение лекарственного средства (Рисунок 27Б). Существует также технология механически-индуцированного раскрытия контейнера вызванного вращением магнитных частиц (Рисунок 27В).

Стоит также отметить, что использование магнитных частиц в составе наноносителя позволяет не только создавать системы с контролируемым высвобождением препарата, но также и осуществлять магнитное нацеливание носителя на опухоль. Успешное использование метода магнитного нацеливания в мелких кровеносных сосудах, расположенных близко к поверхности тела, было продемонстрировано уже 1983 г [163].

Однако, несмотря на значительный прогресс в области использования магнитных наночастиц, их продвижение к коммерчески доступным препаратам сталкивается с рядом препятствий. В первую очередь, ограничением такого способа доставки является невозможность использовать его в крупных кровеносных сосудах (например, в аорте) [164]. Это связано с высокой скоростью тока крови и кровяным давлением, размывающим эффект магнитного поля. Также существует потребность в более тщательном изучении использования магнитных систем доставки с точки зрения их безопасности для организма [165]. Помимо этого, современные технологии способны захватывать и удерживать магнитные частицы лишь на небольшом удалении от источника магнитного поля. Таким

образом, на сегодняшний день такие системы могут эффективно применяться для терапии исключительно поверхностных опухолей (например, рака кожи). Тем не менее, широкий ряд наноносителей с магнитными частицами находится на различных этапах клинических испытаний в качестве систем доставки с контролируемым высвобождением препарата, диагностических систем, систем с магнитным нацеливанием, а также систем для гипертермической химиотерапии. Кроме того, препарат NanoTherm компании MagForce, предназначенный для лечения солидных опухолей (метод основан на прямом введении магнитных наночастиц в опухоль и последующем нагревании в переменном магнитном поле) уже одобрен на фармацевтическом рынке Европы [166].

#### 1.4.3 Наноносители для таргетной доставки лекарств

Известно, что в некоторых случаях пораженный регион не имеет существенных отличий от нормальных тканей организма, что затрудняет или делает невозможным терапевтическое применение систем пассивной направленной доставки. Еще одним недостатком таких систем является невозможность их использования для лечения поздних стадий онкологических заболеваний. Как правило, уже со второй стадии заболевания начинается процесс метастазирования, который может продолжаться даже при хирургическом удалении основного очага опухоли. При этом в мелких метастазах (менее 100 мм<sup>3</sup>) отсутствует развитая сеть кровеносных сосудов, поэтому они труднодоступны для EPR-опосредованных систем пассивной направленной доставки [167]. Для того, чтобы свести к минимуму или полностью предотвратить негативные побочные эффекты противоопухолевой терапии, было предложено использование специфичных наночастиц, получивших название систем активной направленной (таргетной) доставки. Для создания таких систем используется связывание лекарственного препарата или наноносителя с молекулой-лигандом. Такие векторные молекулы способны распознавать специфические рецепторы (белки, гликопротеины) на поверхности клеток и связываться с ними, осуществляя тем самым прямой контакт наночастицы с раковой клеткой.

Основная задача при создании систем активной направленной доставки заключается в выборе векторной молекулы (лиганда), которая обеспечит взаимодействие частиц преимущественно/только с целевыми (опухолевыми) клетками. Таким образом, при выборе подходящего лиганда необходимо руководствоваться информацией о мембранных рецепторах опухолевых клеток. На сегодняшний день изучено большое число векторных молекул с точки зрения их применимости для нацеливания только на опухолевые клетки [168]. Среди них чаще всего используются такие классы лигандов, как антитела или их фрагменты, нуклеиновые кислоты, белки, пептиды, гормоны, моно-, олиго- и полисахариды,

а также различные низкомолекулярные лиганды, такие, например, как фолиевая кислота. Формально, все лиганды можно разделить на следующие группы: низкомолекулярные соединения, пептиды, а также лиганды белковой, нуклеотидной или углеводной природы.

Модификация наноносителя лигандами может осуществляться как химическим (ковалентная сшивка), так и физическим (адсорбция) способом. Стоит отметить, что ковалентное присоединение лиганда к наноносителю может существенно усложнить синтез и, следовательно, повысить затраты на производство. Так, например, на Рисунке 28 представлена стандартная структура лиганд-конъюгированного липида, которая должна содержать набор необходимых блоков. Блок I представляет собой лиганд (векторная молекула), отвечающий за специфическое связывание с определенными рецепторами на поверхности клеток. Блок II является спейсером, который позволяет дистанцировать лиганд от поверхности липосомы и, таким образом, уменьшить стерические затруднения при контакте с клетками. Блок III – линкер, обычно представляющий собой остаток низкомолекулярного вещества с несколькими функциональными группами, необходимыми для связывания спейсера с липидной частью молекулы. Блоки IV и V формируют гидрофильный и гидрофобный домены, соответственно.

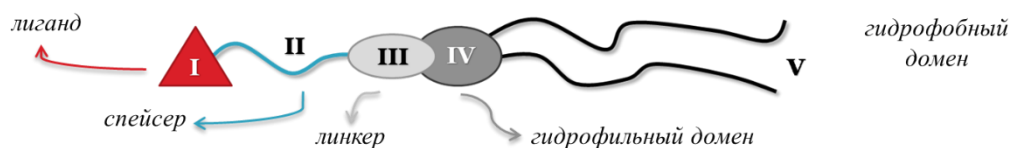


Рисунок 28 – Схематичное изображение стандартных структурных блоков лиганд-конъюгированных липидов

#### 1.4.3.1 Низкомолекулярные лиганды

Использование низкомолекулярных соединений ( $< 10$  кДа) для проникновения в солидные опухоли предпочтительнее за счет их более высокой проникающей способности, поскольку из-за плотной стромы и высокого давления интерстициальной жидкости солидных опухолей проникновение в них соединений с более высокой молекулярной массой может быть затруднено. Кроме того, низкомолекулярные лиганды обладают низкой стоимостью и высокой стабильностью. Одним из наиболее изученных и часто применяющихся при создании систем активной направленной доставки лигандом является фолиевая кислота [169]. Известно, что многие виды раковых клеток (например, рак яичников, молочной железы, предстательной железы, матки, почек, головного мозга и легких) обладают значительно более высокими уровнями экспрессии фолатных рецепторов сравнению с нормальными (нераковыми) клетками [170,171]. Таким образом, фолиевая

кислота является в некоторой степени универсальным лигандом, подходящим для нацеливания на многие виды опухолей. Поскольку фолиевая кислота относится к группе витаминов В (витамин В9), она является неиммуногенным и нетоксичным лигандом, стабильным в широком диапазоне температур и pH.

Известно, что конъюгированные с фолиевой кислотой наноносители могут эффективно связываться с фолатными рецепторами на поверхности раковых клеток и подвергаться рецептор-опосредованному эндоцитозу [172]. Широкий спектр наноносителей, конъюгированных с фолиевой кислотой (липосомы, мицеллы, полимеры, дендримеры и неорганические наноматериалы) уже продемонстрировал высокий потенциал в качестве систем активной направленной доставки противораковых лекарств (например, доксорубицина, паклитаксела, доцетаксела, 5-фторурацила, эрлотиниба, куркумина, ресвератрол и др.), ряд этих препаратов уже находится на разных этапах клинических испытаний [169,173].

Тем не менее, одной из проблем, связанных с фолат-конъюгированными наноносителями, является экспрессия фолатных рецепторов также и здоровыми клетками организма, что может приводить к частичному неспецифическому накоплению в них противоопухолевого препарата.

#### 1.4.3.2 Пептидные лиганды

Пептиды также обладают высоким потенциалом в качестве лигандов благодаря небольшому размеру, простому синтезу, высокой специфичности и сродству к широкому кругу терапевтических мишеней [174]. В некотором смысле они также могут рассматриваться как низкомолекулярные лиганды, однако из-за высокого структурного разнообразия их часто выделяют в отдельную группу векторов для направленной доставки. Эти лиганды можно разделить на следующие подгруппы пептидов, нацеленные на: 1) сосуды опухоли; 2) внеклеточный матрикс; 3) связанные с опухолью макрофаги.

Одним из наиболее широко используемых пептидных лигандов, нацеленных на опухолевые сосуды, является RGD-пептид (трипептид, состоящий из L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты) или его производные [175]. Эффективность таких лигандов связана с их способностью селективно связываться с белками-интегринами (преимущественно с  $\alpha V\beta 3$  и  $\alpha V\beta 5$ ), сверхэкспрессируемыми на поверхности опухолевых клеток, что обеспечивает таргетную доставку наночастиц непосредственно в опухолевые ткани [176]. Так, способность RGD-пептида эффективно проникать в различные виды опухолей (меланома, глиома, аденокарцинома, рак яичников, легких, шейки матки, немелкоклеточный рак легких и др.) была доказана в 2009 г, а затем различные

исследовательские группы выяснили, что RGD-пептид также увеличивает накопление лекарств (доксорубицина, паклитаксела и др.) и их эффективность при ряде онкологических заболеваний [177,178]. Так, в 2024 г сообщалось о том, что более 30 различных систем доставки, модифицированных RGD-лигандами, находятся на различных стадиях клинических испытаний [175]. Тем не менее, большая часть из них представляет собой диагностические композиции – радиофармпрепараты на основе RGD-пептидов, меченые изотопами с коротким периодом полураспада, такими как  $^{68}\text{Ga}$  и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Использование этих композиций в сочетании с методами позитронной эмиссионной томографии и компьютерной томографии позволяет визуализировать и оценить степень ангиогенеза и характеристики опухоли.

Поскольку известно, что клетки солидных опухолей в больших количествах экспрессируют компоненты внеклеточного матрикса, в частности коллаген, фактор роста фибробластов, версикан, протеогликаны хондроитинсульфат и др., был разработан ряд пептидных лигандов, нацеленных на эти компоненты [179–181]. Некоторые из предложенных препаратов уже успели хорошо зарекомендовать себя. Например, BT1718, нацеленный на матриксную металлопротеиназу-14 (фермент, избыточно экспрессируемый в клетках некоторых солидных опухолей) уже находится на II-ой фазе клинических испытаний у пациентов с раком молочной железы и немелкоклеточным раком легких [182].

Наконец, третья группа пептидных лигандов представляет собой векторные молекулы, направленные на связанные с опухолью макрофаги. Известно, что противовоспалительные опухолевые макрофаги являются основными эффекторами метастазирования, ангиогенеза и иммуносупрессии [183]. Они перемещаются по микроокружению опухоли, запуская опухолевый ангиогенез и образуя недолговечные поры в кровеносных сосудах для проникновения раковых клеток внутрь. Благодаря этим признакам опухолевые макрофаги представляют собой перспективную терапевтическую мишень. В последние годы был предложен ряд пептидных лигандов, способных индуцировать апоптоз или иным способом блокировать опухолевые макрофаги [184–186].

#### 1.4.3.3 Белковые лиганды

Белки природного или синтетического (моноклональные антитела, рекомбинантные белки и белки слияния/химерные белки) происхождения широко используются в качестве лигандов для формирования систем активной направленной доставки противоопухолевых препаратов. Особое внимание уделяется антителам или их фрагментам благодаря их высокой специфичности и сродству к соответствующим антигенам. Известно, что антитела могут не только нейтрализовать антиген-мишень, предотвращая нежелательные клеточные процессы,

но и напрямую взаимодействовать с иммунными клетками хозяина, инициируя гибель раковых клеток [187]. На данный момент пять конъюгатов антитело–лекарственное средство уже получили одобрение для клинического применения в США и Европе [188]. Также ведется разработка наноносителей, модифицированных антителами или их фрагментами. Так, уже получены различные типы иммунолипосом, иммуномицелл и полимерные частицы, модифицированные антителами [189]. Однако стоит отметить, что использование антител в качестве лигандов ограничено из-за их высокой молекулярной массы, стоимости, потенциальной иммуногенности, а также возможной потери стабильности и биологической активности после конъюгации с поверхностью наноносителей [190].

Другой перспективный белковый лиганд – трансферрин, мономерный гликопротеин, состоящий из 679 аминокислот (MW 78 кДа). Известно, что рецепторы трансферрина в больших количествах экспрессируются в некоторых незрелых эритроидных клетках, эндотелии сосудов капилляров головного мозга и активно пролиферирующих раковых клетках [191]. Таким образом, высокое сродство к трансферрину и сверхэкспрессия его рецепторов в раковых клетках делают этот лиганд привлекательной молекулой для создания систем активной направленной доставки. В последние годы было разработано множество трансферрин-ассоциированных наноносителей (липосомы, дендримеры, неорганические и полимерные частицы), некоторые из которых продемонстрировали многообещающие результаты при лечении различных видов рака [192–194]. Так, например, в клиническом исследовании II фазы показаны многообещающие результаты комбинированной терапии свободным темозоломидом с трансферрин-модифицированными липосомами для доставки гена-супрессора опухоли p53 у пациентов с глиобластомой [195].

Еще одним широко исследуемым белковым лигандом является TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). Это мембранный гликопротеин, способный избирательно индуцировать апоптоз опухолевых клеток, не затрагивая при этом нормальные (нераковые) клетки организма [196]. TRAIL представляет из себя цитокин, участвующий в клеточно-опосредованном иммунном ответе на метастазирование и рост опухоли путем активации двух специфических опухолевых рецепторов, индуцирующих апоптоз – DR4 и DR5 [197]. Таким образом, TRAIL является не только лигандом, но и терапевтическим агентом, что позволяет создавать уникальные комбинированные системы доставки на его основе (Рисунок 29) [198,199]. Например, предложен ряд наноносителей, осуществляющих комбинированное цитотоксическое воздействие путем совместного инкапсулирования TRAIL и различных противоопухолевых препаратов. Также разработаны тераностические системы, в которых помимо TRAIL в наночастицы введены диагностические составляющие, в частности магнитные или золотые наночастицы.

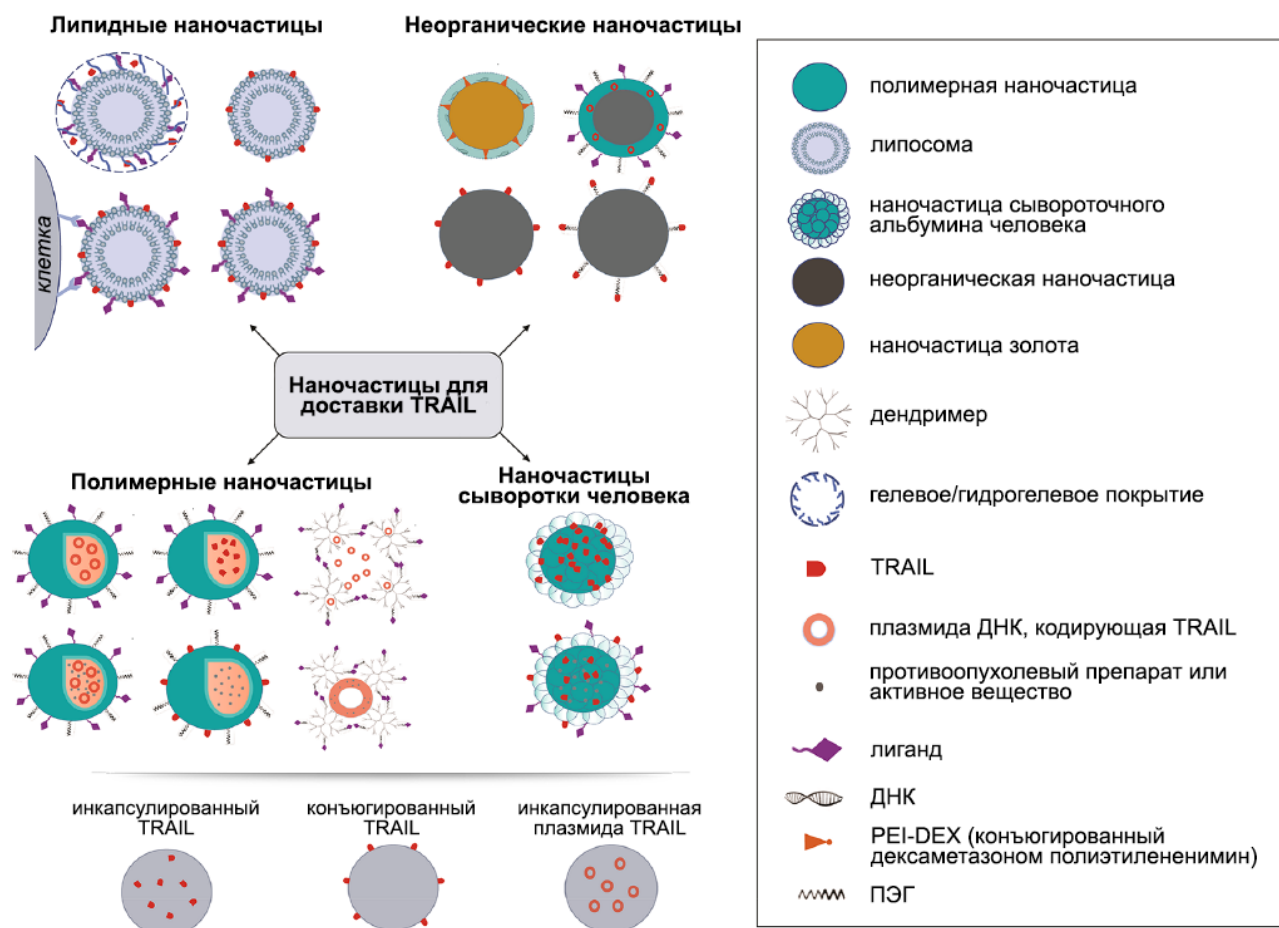


Рисунок 29 – Схематичное изображение некоторых видов TRAIL-ассоциированных наноносителей, предложенных для противоопухолевой терапии [198]

Показано, что такие TRAIL-ассоциированные системы доставки обладают значительно более высоким апоптотическим потенциалом по сравнению со свободным TRAIL за счет увеличения времени циркуляции в кровотоке и повышенной стабильности [200]. Однако некоторые линии раковых клеток обладают устойчивостью к действию TRAIL, что связано с наличием помимо DR4 и DR5 трех других рецепторов, с которыми также может связываться TRAIL – TR3, TR4 и остеопротегерин. Они также называются «рецепторами-приманками», поскольку конкурируют с DR4 и DR5 за связывание лиганда, но при этом не запускают апоптоз [201]. Вызванная этим устойчивость раковых клеток к действию TRAIL является важной проблемой, способной существенно ограничить применение данного лиганда в клинической практике. В настоящее время уже разрабатываются различные подходы, позволяющие обойти данные ограничения, в частности с использованием синтетических аналогов (рекомбинантных белков) или модифицированных версий TRAIL, которые селективно взаимодействуют только с одним рецептором, индуцирующим апоптоз (DR4 или DR5, соответственно) [202,203].

#### 1.4.3.4 Нуклеотидные лиганды

В качестве нуклеотидных лигандов чаще всего рассматриваются и используются аптамеры – одноцепочечные олигонуклеотиды ДНК или РНК, которые могут связываться со специфическими веществами-мишенями, включая лекарственные средства, белки и рецепторы. Они обладают рядом уникальных свойств, в частности имеют малый размер (около 15 кДа), низкую иммуногенность и способны биоразлагаться [204]. Кроме того, аптамеры получают методом твердофазного синтеза, отличающимся технологической простотой, и обеспечивающим высокую специфичность продукта при относительно низких производственных затратах. Аптамеры подобны антителам с точки зрения их высокой чувствительности и специфичности в качестве нацеливающих агентов, однако они обладают при этом более высокой проникающей способностью в опухолевые клетки, длительным временем удержания в них и гомогенным распределением [205]. Благодаря небольшому размеру, их можно размещать на поверхности наночастиц более плотно, чем объемные белковые макромолекулы антител [206]. Благодаря всем перечисленным свойствам аптамеры перспективны для создания систем активной направленной доставки. На сегодняшний день уже получен ряд аптамеров, специфически нацеленных на различные рецепторы (мишени) в раковых клетках (например, муцин 1, фактор роста тромбоцитов, фактор роста эндотелия сосудов, лиганд программируемой смерти 1 и др.), а на их основе разработаны различные системы доставки [207–210].

Недостатком аптамеров, существенно ограничивающим их применение в качестве лигандов, является их нежелательное взаимодействие с различными белками и пептидами организма (например, неспецифическими сывороточными связывающими белками), что приводит к снижению эффективности связывания аптамера с мишенью [211]. Также описана частичная или полная деградация аптамеров в кровотоке [204].

#### 1.4.3.5 Углеводные лиганды

Углеводные лиганды представляют собой широко распространенный класс векторных молекул, используемых для создания систем таргетной доставки лекарственных препаратов. К числу наиболее распространенных углеводных лигандов относятся манноза, галактоза, фукоза и гиалуроновая кислота (ГК), причем последняя занимает лидирующие позиции благодаря уникальным свойствам и способности селективно взаимодействовать с рецепторами на поверхности клеток-мишеней [212]. ГК – природный линейный полисахарид, состоящий из D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Молекулярная масса ГК варьируется от тысяч до миллионов дальтон, что

определяет ее физико-химические свойства и физиологическую роль [213]. Известно, что ГК присутствует в синовиальном и внеклеточном матриксе и обладает высокой биосовместимостью, биodeградируемостью, влагоудерживающей способностью и регулируемыми вязкоупругими свойствами [214]. Кроме того, она способна селективно связываться с рецептором CD44 – трансмембранным гликопротеином, необходимым для высвобождения цитокинов, активации лимфоцитов и регуляции метаболизма ГК [215]. Это делает ГК перспективным лигандом для противоопухолевой терапии, поскольку рецептор CD44 является ранним индикатором пролиферации раковых клеток и широко используется в качестве биомаркера при диагностике различных опухолей (рака молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы, кишечника и предстательной железы и т.д.) [216].

Таким образом, благодаря сверхэкспрессии CD44 в различных раковых клетках ГК можно использовать в качестве лиганда при разработке систем для таргетной доставки противоопухолевых лекарств [217]. Было показано, что конъюгация наноносителей с ГК увеличивает их накопление в раковых клетках посредством CD44-опосредованного эндоцитоза, а также продлевает циркуляцию в крови (поскольку ГК снижает иммуногенность наноносителей и является альтернативой ПЭГ) [214,218]. На данный момент разработано большое число диагностических систем, а также систем доставки противоопухолевых препаратов и генетического материала, ассоциированных с ГК или ее производными, а часть из них уже достигла клинических испытаний [219].

## 1.5 Тестирование наноносителей *in vitro*

Тестирование цитотоксичности новых перспективных молекул с противораковой активностью, а также наноносителей, загруженных этими молекулами, начинается с использования различных клеточных линий в моделях *in vitro*.

### 1.5.1 Монослойная культура клеток (2D модель *in vitro*)

На первом этапе исследования цитотоксичности новых противоопухолевых препаратов и/или наноносителей в большинстве лабораторий мира используют монослойные культуры опухолевых клеток (2D модель *in vitro*). Такая модель представляет собой однослойную популяцию клеток, равномерно распределенную по дну культурального флакона. 2D модели просты, недороги и хорошо подходят для автоматизированного высокопроизводительного скрининга лекарств или наноносителей с включенными в них препаратами.

Однако также известно, что микроокружение опухоли состоит из гетерогенной популяции клеток, образованной раковыми и инфильтрирующими иммунными клетками, ассоциированными с опухолью фибробластами, а также клетками-супрессорами

миелоидного происхождения (Рисунок 30) [8]. Все эти клетки в сложной трехмерной конструкции взаимодействуют друг с другом посредством выработки ряда сигнальных молекул и играют важную роль в росте, развитии и метастазировании опухоли [220].

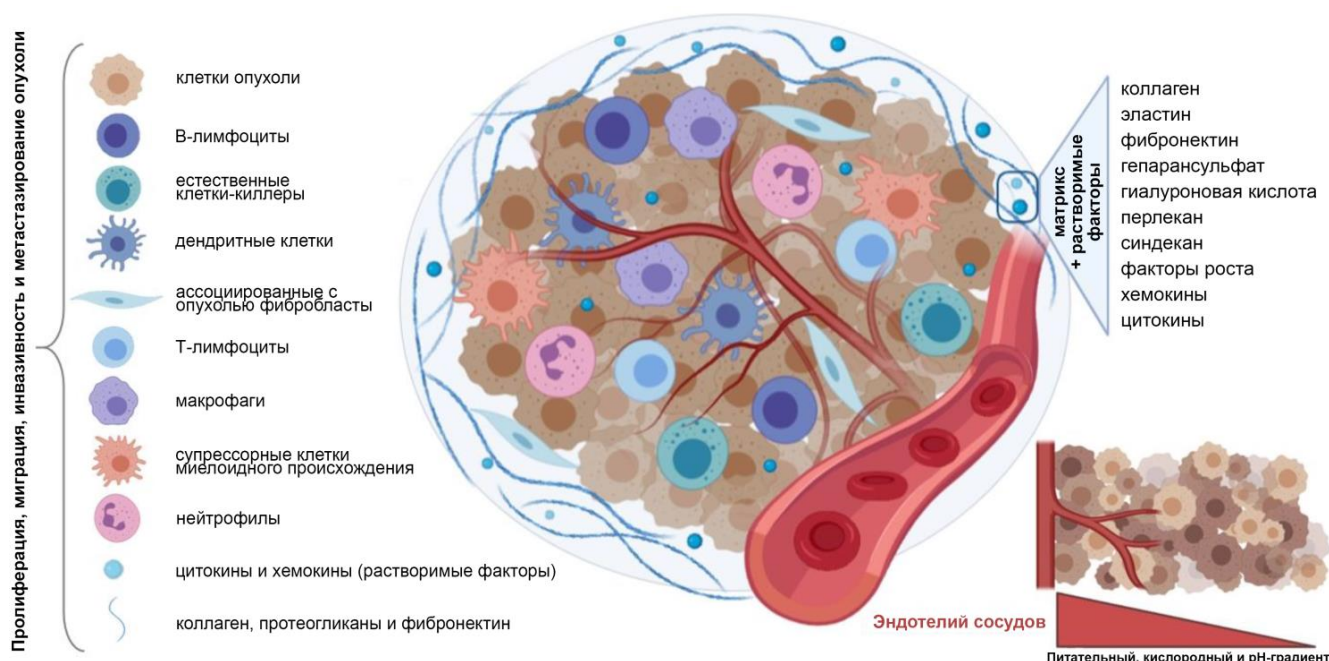


Рисунок 30 – Схематическое изображение микроокружения опухоли [221]

Следовательно, в 2D модели *in vitro* нарушены межклеточные контакты, а также взаимодействие раковых клеток с естественным внеклеточным матриксом, характерные для малых солидных (от англ. solid) опухолей *in vivo* [222]. Кроме того, в 2D модели могут также изменяться профили экспрессии генов, в результате чего клетки могут потерять ряд тканеспецифических функций. Таким образом, 2D модель *in vitro* не может адекватно имитировать условия и особенности солидных опухолей *in vivo*, поскольку не отражают в полной мере влияние микроокружения опухоли на резистентность к препарату, эффективность его накопления и цитотоксичность [223]. Это приводит к тому, что многие новые лекарственные препараты и наноносители, исследование которых выполнялось исключительно с помощью 2D моделей, часто показывают неудачные результаты в последующих предклинических и клинических испытаниях [224].

### 1.5.2 Мультиклеточные сфероиды (3D модель *in vitro*)

В современной научной практике при исследовании новых наноносителей наблюдается растущая тенденция к использованию 3D моделей *in vitro*. Мультиклеточные опухолевые сфероиды (3D модель *in vitro*) были предложены в качестве альтернативы монослойной

клеточной культуре, поскольку они более точно воспроизводят гетерогенность и физиологию опухоли *in vivo*. Так, например, они способны более адекватно отразить влияние таких факторов как кислородный градиент (гипоксические условия), межклеточные взаимодействия, коммуникации с внеклеточным матриксом, pH, повышенную резистентность, доступ к питательным веществам и проницаемость, свойственные солидным опухолям *in vivo* [225,226]. Это подтверждается многочисленными исследованиями, проводимых с использованием как 2D, так и 3D моделей *in vitro*, что критически важно для оценки эффективности и безопасности разрабатываемых систем доставки [227–230]. Так, в большинстве случаев, опухолевые сфероиды демонстрировали значительно более реалистичную реакцию на наноносители по сравнению с монослойными культурами клеток, особенно в отношении их устойчивости к цитотоксическому воздействию. Таким образом, опухолевые сфероиды позволяют более эффективно оценить влияние физико-химических параметров наноносителей (размер,  $\zeta$ -потенциал, стабильность и т.д.) на их терапевтическую эффективность (в первую очередь – накопление в опухоли и цитотоксичность).

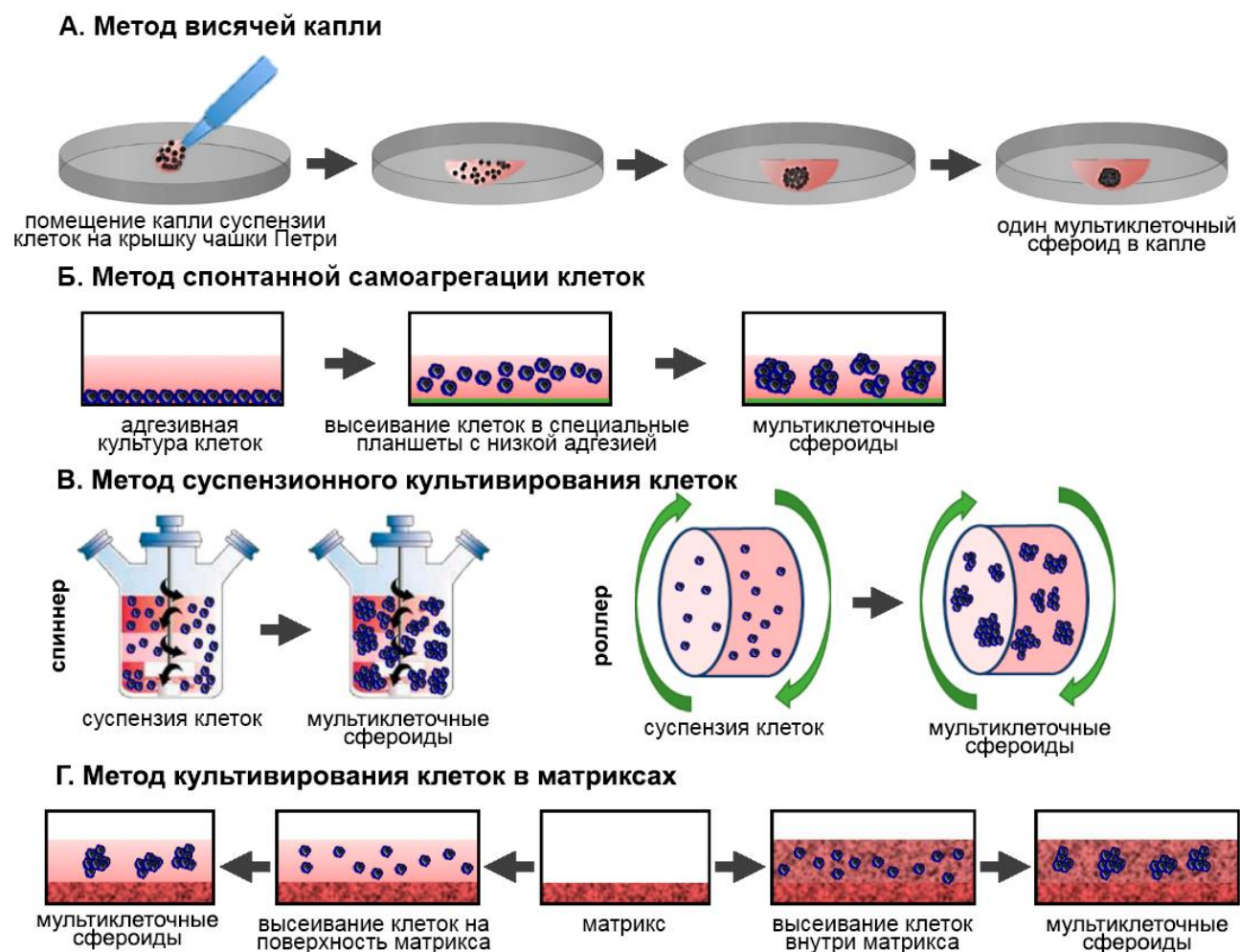


Рисунок 31 – Наиболее распространенные способы получения опухолевых сфероидов (3D модель *in vitro*) [231]

Однако, несмотря на доказанную эффективность, широкое применение 3D моделей *in vitro* все еще сдерживается рядом ограничений, связанных с тем, что существующие методики получения сфероидов характеризуются либо высокой сложностью реализации, либо значительной стоимостью, что делает их недоступными для многих исследовательских лабораторий. Так, на сегодняшний день среди наиболее распространенных методов получения опухолевых сфероидов можно перечислить следующие: метод висячей капли, метод спонтанной самоагрегации клеток, метод суспензионного культивирования и метод культивирования в матриксах (Рисунок 31) [231].

#### 1.5.2.1 Метод висячей капли

Одним из наиболее доступных и широко применяемых методов получения сфероидов является «метод висячей капли», поскольку он не требует специального оборудования или реактивов. Он сводится к нанесению капли среды для культивирования, содержащей необходимое количество раковых клеток, на нижнюю сторону крышки чашки Петри (см. Рисунок 31А) [232]. Крышку, на которой капля удерживается благодаря поверхностному натяжению, затем помещают в чашку Петри, которая содержит фосфатный буфер (pH 7,4) для предотвращения высыхания капель. Клетки скапливаются на кончике капли на границе раздела воздух-жидкость, самопроизвольно агрегируют и, наконец, образуют сфероиды. Этот способ максимально экономичен и позволяет легко контролировать размер формируемых сфероидов, изменяя количество раковых клеток в капле. Однако, при этом образуется всего один сфероид на каплю, обладающий, к тому же, весьма низкой механической устойчивостью [233]. Таким образом, этот метод, несмотря на свою простоту крайне трудоемкий. Кроме того, может возникнуть проблема нарушения целостности сфероида при замене среды.

Стоит отметить, что до сих пор ведутся активные исследования, направленные на модификацию и улучшение вышеописанной методики [234]. В частности, сообщается о том, что применение гидрофобного покрытия (например, из силиконового эластомера), на которое наносится капля, позволяет ускорить образование клеточных агрегатов и снизить вариабельность размеров и формы сфероидов. Также обсуждается возможность использования различных добавок для культуральной среды (например, метилцеллюлозы и коллагена) для ускорения агрегации клеток, но отмечается, что они могут влиять на взаимодействие клеток друг с другом и другими компонентами среды.

### 1.5.2.2 Метод суспензионного культивирования клеток

Принцип метода заключается в том, что поверхностно-зависимые клетки (монослойные культуры) культивируют в суспензии при непрерывном перемешивании, что предотвращает их прикрепление ко дну или к стенкам культурального сосуда. В результате клетки агрегируют, прикрепляясь друг к другу, что со временем приводит к увеличению в размерах клеточных агрегатов, их уплотнению и формированию из них сфероидов (см. Рисунок 31В) [235]. Существует несколько способов суспензионного культивирования: в роллерах (цилиндрические стеклянные сосуды, вращающихся вокруг своей оси с помощью специальной подставки), спиннерах (стеклянные сосуды с подвешенной механической мешалкой, в которую вмонтирован магнит для перемешивания) и в биореакторах (сложные системы, в которых контролируют pH среды, содержание кислорода и другие параметры).

Стоит отметить, что все суспензионные методы культивирования обеспечивают для клеток непрерывный доступ к питательным веществам и кислороду, причем клетки также могут свободно выделять продукты метаболизма [236]. Суспензионное культивирование позволяет получать большое количество сфероидов, однако формируемые таким образом сфероиды имеют широкое (не унимодальное) распределение по размерам. По этой причине собранные сфероиды необходимо пропускать через несколько специальных сит (различающихся размерами пор), чтобы собрать отдельные фракции сфероидов с узким распределением по размерам. Кроме того, известно, что механическое перемешивание может привести к стрессу и повреждению клеток, что может вызвать изменение их морфологии и физиологии или даже гибель.

На данный момент биореакторы являются более продвинутыми системами суспензионного культивирования по сравнению с роллерами и спиннерами, поскольку позволяют контролировать главные параметры культивирования, а перемешивание в них может быть организовано без механической мешалки (с помощью подаваемой струи воздуха – аэрифта) [237]. Это обеспечивает более комфортные условия для клеток, однако сфероиды получаются также полидисперсными и перед их использованием требуется фракционирование на ситах. Помимо этого, биореакторы относятся к классу достаточно дорогостоящего лабораторного оборудования.

### 1.5.2.3 Метод культивирования клеток в матриксах

Поскольку известно, что *in vivo* взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом может влиять на их организацию, функции и реакцию на терапию, представляется интересной такая трехмерная модель, которая могла бы воспроизвести эти взаимодействия *in*

*vitro*. Таким образом, был предложен метод культивирования клеток в гидрогелях, которые представляют собой биосовместимые полимерные матриксы, используемые для прикрепления, роста и пролиферации животных клеток (см. Рисунок 31Г) [238]. Гидрогели получают на основе природных полимеров (матригель, коллаген, альгинат, фиброин и пр.), синтетических полимеров (ПЭГ) или искусственных полимеров, которые получают путем химических модификаций природных полимеров (например, гиалуронан, полипептиды) [239]. При этом чаще всего сначала получают гидрогели (матриксы), а затем засевают их клетками, которые растут либо только на поверхности матрикса (в случае микропористой структуры, например пленки), либо распределяются не только по поверхности, но и проникают в макропоры, что обеспечивает 3D рост клеток по всему объему матрикса (в случае его макропористой структуры). Реже клетки помещают непосредственно в раствор биосовместимого полимера, например альгината натрия, а уже затем проводят процесс гелеобразования путем замены натрия на ионы кальция, при этом клетки остаются иммобилизованными в образовавшемся гидрогеле и растут внутри его.

Матриксы натурального происхождения (из природных материалов) представляют большой интерес с точки зрения их биосовместимости и биоразлагаемости, однако часто имеют плохие механические свойства, могут быстро биodeградировать, а некоторые даже вызывать иммуногенные реакции. Кроме того, высокая вариабельность их физико-химических свойств (набухание, размер пор, скорость деградации) влияет на воспроизводимость результатов и, как результат, ограничивает использование таких матриксов для скрининга лекарственных препаратов [240].

Использование гидрогелей из синтетических полимеров, напротив, позволяет варьировать и даже контролировать биохимические и механические свойства [241]. Однако такие гидрогели, как правило, требуют дополнительной модификации, например, путем введения в их структуру молекул для усиления клеточной адгезии, в частности RGD-пептидов, коллагена, фиброина и др.

Гидрогели из искусственных полимеров представляют собой промежуточный вариант, поэтому объединяют достоинства и недостатки описанных выше матриксов. Так, обладая биологически активными свойствами натуральных биоматериалов, они в то же время позволяют более жестко контролировать свойства матрикса.

#### 1.5.2.4 Метод спонтанной самоагрегации клеток

Метод спонтанной самоагрегации поверхностно-зависимых клеток заключается в самосборке клеток в агрегаты за счет адгезии друг к другу, что объясняется отсутствием

возможности их прикрепления к поверхности (подложке) (см. Рисунок 31Б). Для реализации этого подхода используют инертное покрытие (например, агарозное или поли-2-гидроксиэтилметакрилатное) дна лунок планшета или культурального флакона, препятствующее адгезии клеток к поверхности [231]. В результате клетки вынуждены расти в суспензии и, следовательно, взаимодействовать друг с другом, постепенно формируя плотные агрегаты (сфероиды). На рынке также представлены специальные культуральные планшеты и флаконы с предварительно подготовленной (обработанной) поверхностью, однако можно обработать поверхность и собственными силами.

Данный подход, в отличие от метода висячей капли, позволяет получать сразу несколько десятков механически устойчивых сфероидов в каждой лунке планшета и легко проводить замену среды для культивирования [242]. Однако, существуют проблемы, связанные с высокой полидисперсностью сфероидов, размеры и форма которых могут быть слишком неоднородными [243].

#### 1.5.2.5 Метод самосборки клеток, индуцируемой RGD-пептидом

В Лаборатории биомедицинских материалов ИБХ РАН недавно был разработан новый метод получения сфероидов с использованием спонтанной самоагрегации опухолевых клеток (Рисунок 32) [244]. При этом получение сфероидов из отдельных клеток индуцируется добавлением непосредственно в монослойную культуру клеток (в среду культивирования) коммерчески доступного циклического RGD-пептида, модифицированного трифенилфосфониевым ионом – cyclo-RGDfK(TPP).

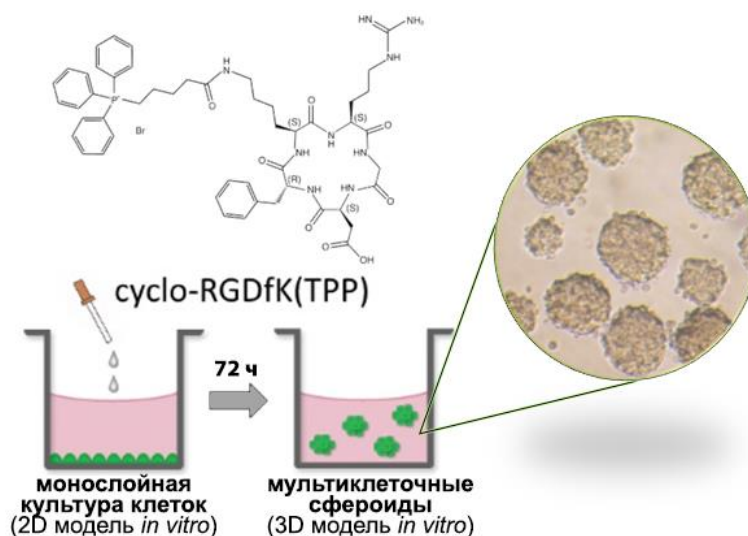


Рисунок 32 – Схема получения мультиклеточных сфероидов с помощью RGD-пептида, индуцирующего спонтанную самоагрегацию клеток в агрегаты

Стоит отметить, что предложенный метод отличается простотой реализации, поскольку самосборка клеток в мультиклеточные сфероиды происходит в течение 72 ч непосредственно из монослойной культуры. Кроме того метод обладает высокой универсальностью и эффективностью, так как подходит для большинства линий опухолевых клеток, используемых при тестировании лекарств, и позволяет получать несколько десятков монодисперсных сфероидов в одной лунке.

### 1.5.3 Гетеротипные мультиклеточные сфероиды (3D модель *in vitro*)

Следует подчеркнуть, что на сегодняшний день в большинстве представленных в литературе исследований, использовались сфероиды, состоящие только из одного типа опухолевых клеток. Несмотря на то, что такие модели обладают гораздо более высоким сродством к малым солидным опухолям *in vivo*, они все же не могут в полной мере отобразить их сложную природу. Таким образом, на сегодняшний день особый интерес представляет разработка более сложно организованных опухолевых 3D моделей *in vitro* – гетеротипных сфероидов, состоящих из различных клеточных культур (например, раковых клеток и макрофагов или эндотелиальных клеток) и органоидов (солидных опухолей, полученных пациентом *ex vivo*) (Рисунок 33) [245,246].

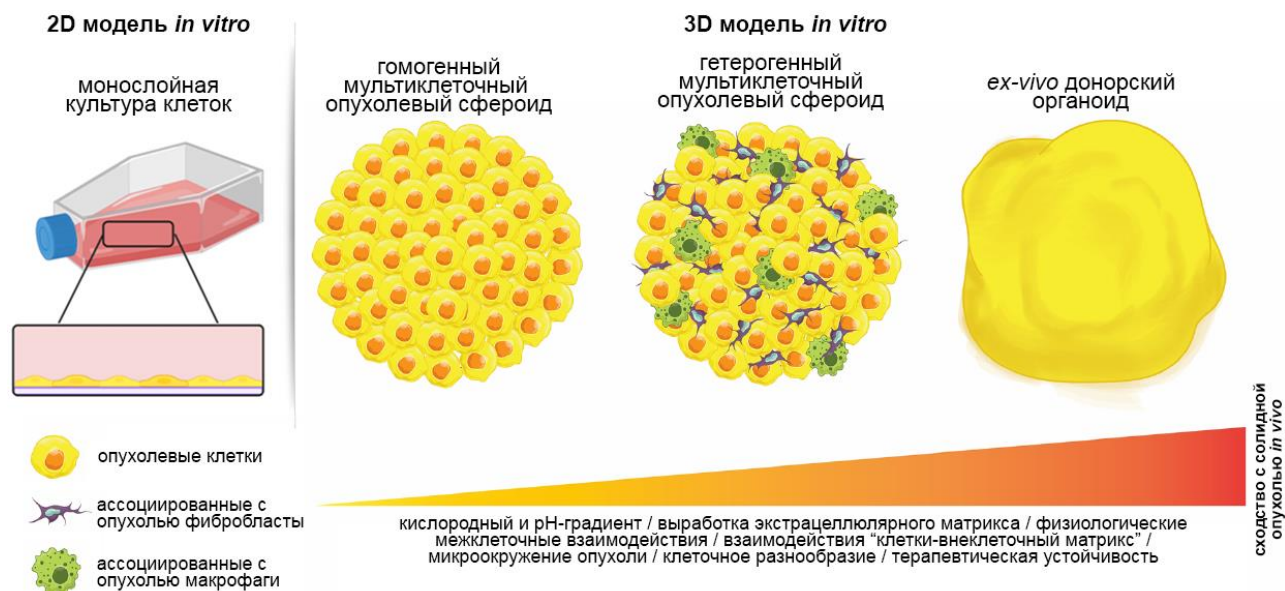


Рисунок 33 – Монослойная культура клеток (2D модель *in vitro*) и виды опухолевых сфероидов (3D модель *in vitro*), а также уровень их сходства с солидной опухолью *in vivo*

[245]

На данный момент получение гетеротипных сфероидов является одним из наиболее перспективных направлений разработки *in vitro* моделей для тестирования противораковых препаратов и систем их доставки. Тем не менее, формирование гетеротипных сфероидов осложняется нехваткой отработанных методик их получения и неоднородностью образуемых сфероидов (распределение по размерам, количественное и качественное распределение клеток разных линий внутри сфероида и т.д.).

### Заключение

Разработка наноносителей как систем доставки противораковых лекарств открывает перспективы для преодоления ряда существенных ограничений традиционной химиотерапии. Так, основными проблемами большинства противоопухолевых препаратов являются низкая растворимость в воде, затрудняющая их эффективную доставку к опухолевым клеткам и оптимальное биораспределение в организме пациента, а также высокая неспецифическая токсичность в отношении нормальных (нераковых) клеток, приводящая к развитию выраженных побочных эффектов. Инкапсулирование лекарств в наноносители позволяет обеспечить их направленную доставку непосредственно в опухоль, и, тем самым, снизить токсическое воздействие на нормальные клетки. Кроме того, инкапсулирование лекарств в наноносители защищает их от преждевременного разрушения и выведения из организма, обеспечивая пролонгированное и/или контролируемое действие. Последний аспект особенно актуален для лекарственных средств на основе биоактивных белков, пептидов, олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот – класса соединений, активно изучаемого в последние десятилетия. Таким образом, разработка новых наноносителей открывает перспективы для снижения стоимости терапии при одновременном повышении ее эффективности и минимизации побочных эффектов. Стоит особенно подчеркнуть прогресс в разработке мультифункциональных наноносителей для тераностики – платформ, совмещающих диагностические и терапевтические функции. Такие системы позволяют одновременно решать задачи визуализации опухоли и ее направленного лечения, что открывает новые возможности в персонализированной онкологии.

Также важно учитывать, что при постоянно расширяющемся спектре предлагаемых противораковых препаратов и новых систем их доставки, все актуальнее становится потребность в создании новых простых и универсальных методов их тестирования *in vitro*. Традиционные исследования цитотоксических эффектов лекарств/наноносителей в 2D модели *in vitro*, широко применяемые в большинстве лабораторий, демонстрируют ограниченную прогностическую ценность. Такие модели недостаточно адекватно

воспроизводят морфологические, биохимические и функциональные характеристики солидных опухолей *in vivo*, что снижает их релевантность для оценки эффективности и безопасности новых лекарственных форм. Следовательно, существует острая потребность в разработке новых и совершенствовании уже существующих систем тестирования противоопухолевых препаратов *in vitro*, позволяющих существенно сократить финансовые и временные затраты, а также ускорить переход к последующим предклиническим и клиническим испытаниям, снизив при этом количество испытаний на животных. Таким образом, на сегодняшний день активно разрабатываются методы получения мультিকлеточных опухолевых сфероидов (3D модель *in vitro*), которые являются промежуточной ступенью между монослойными культурами и предклиническими испытаниями на животных. Предполагается, что такие более релевантные модели солидных опухолей лучше имитируют 3D рост раковых клеток по сравнению с монослойной культурой, что позволяет повысить прогностическую ценность полученных результатов исследований в условиях *in vitro* и ускорить вывод новых противораковых лекарств и систем их доставки на фармацевтический рынок.

Таким образом, несмотря на достигнутые успехи в области разработки систем доставки противоопухолевых препаратов, задача создания новых высокоэффективных наноносителей и адекватных *in vitro* моделей для их тестирования остается актуальной и требует дальнейших исследований.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Реактивы и материалы

*Компоненты для приготовления питательной среды.* Пенициллин – стрептомицин, 100-кратный раствор, L-глутамин, эмбриональная телячья сыворотка (FBS), пируват натрия, питательная среда Dulbecco Modified Essential Medium (DMEM), питательная среда Игла,  $\alpha$ -модификация ( $\alpha$ -MEM) – ПанЭко, Россия. 2-меркаптоэтанол (1M) – Sigma-Aldrich, США.

*Полимеры.* Поли-L-лизин (MW 40-60 кДа), полиэтиленгликоль (MW 1,5 и 2 кДа), ксантановая камедь из *Xanthomonas campestris* (20-300 сП), ДЭАЭ-декстран (MW 150 кДа), поли-L-лизин (MW 30-70 кДа), поли-L-аргинин (MW 15-70 кДа), сульфат декстрана (MW 500 кДа), хитозан (20-300 сП) – Sigma-Aldrich, Германия.

*Инкапсулируемые биомакромолекулы и препараты.* Доксорубицина гидрохлорид – Sigma-Aldrich, Германия. 2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон (тимохинон) – Santa Cruz Biotechnology, Германия. ДНК-плазмида люциферазы (pGL3), UTR-HCV-pDNA (ДНК-плазмида, кодирующая UTR-регион вируса гепатита С с промотором GFP), модельная миРНК, нацеленная на 5'-UTR-регион вируса гепатита С – ДНК-Технологии, Россия. Липофектамин 2000 (Lf) – Invitrogen, США.

*Растворители и буферные растворы.* Диметилсульфоксид (ДМСО; 99,5 %) – Хеликон, Россия. Этиловый спирт, хлороформ, метанол – Химреактив, Россия. Фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4), уксусная кислота, соляная кислота, хлорид натрия (физ.раствор; ос.ч.) – ПанЭко, Россия. Буферы Glo lysis, RLT, RW1, RPE – Promega, США.

*Флуоресцентные красители.* Hoechst 33258, Calcein-AM – ПанЭко, Россия. Neuro-DiO, Nile Red, LysoTracker, родамин 6G (R6G), флуоресцеин-изотиоцианат (FITC), сульфоцианин3-малеимид (Cy3), пирен, Vic, ER-tracker – Sigma Aldrich, Германия.

*Наноносители.* ПЭГилированные липосомы, керасомы и фолат-конъюгированные липосомы получены в Российском технологическом университете МИРЭА (кампус МИТХТ). Полиэлектrolитные наноконтейнеры и полимерные мультислойные капсулы получены в Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН.

*Прочее.* Трипсин-ЭДТА (0,02 % раствор трипсина с 0,05 % ЭДТА), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) – ПанЭко, Россия. Соевое масло, CC/Mount fluorophor protector – Sigma-Aldrich, Германия. Пептид cyclo-RGDfK(TPP) – Цитомед, Россия. Формалин – ЛенРеактив, Россия. Субстрат люциферазы – Promega, США. Зонды и праймеры для ПЦР, набор реагентов ОТ-1 для обратной транскрипции – Синтол, Россия. Набор для твердофазной экстракции Rneasy Mini – Qiagen, Германия.

## 2.2 Работа с культурами клеток

### 2.2.1 Стерилизация

Все растворы, буферы, лабораторный пластик (SPL Lifesciences, Корея) и инструменты для работы с клетками стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 30 мин (International PBI SpA, Италия). Перед добавлением к клеткам компонентов среды или суспензий наноносителей их стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм или 0,45 мкм, Corning, США). Для обеспечения стерильности все операции с культурами клеток проводили в ламинарном боксе (Flow Laboratories, США) при включенной газовой горелке.

### 2.2.2 Приготовление среды для культивирования клеток

Для приготовления среды для культивирования смешивали 146 мг L-глутамина; 55 мг пирувата натрия; 0,025 мл 2-меркаптоэтанола (1М) и 5 мл пенициллина–стрептомицина (100-кратный раствор). К этой смеси добавляли 5 мл деионизированной воды, перемешивали и фильтровали (0,22 мкм, Corning, США) в 450 мл стерильной среды (DMEM или  $\alpha$ -MEM). Приготовленную среду хранили при 4°C.

### 2.2.3 Ведение клеточных культур

В работе использовали следующие клетки и клеточные линии:

- Bj-5ta – фибробласты крайней плоти человека;
- C6 – глиобластома головного мозга крысы;
- HCT116 – колоректальная карцинома человека;
- HEK293T – клетки эмбриональной почки человека;
- HeLa – рак шейки матки человека;
- HepG2 – гепатоцеллюлярная карцинома человека;
- M3 – меланома кожи мыши;
- MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека;
- MSC – мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека;
- U-87MG – глиобластома головного мозга человека.

Клетки MSC культивировали в среде  $\alpha$ -MEM (10 % FBS), остальные клетки – в среде DMEM (10 % FBS) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в газовой среде, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>, при 37°C (Heraeus B5060 EK/CO<sub>2</sub>, Германия). Наблюдение за ростом клеток осуществляли ежедневно с помощью светового инвертированного микроскопа (Reichert Microstar 1820E, Германия). При пересеве клеток старую среду удаляли, клетки промывали и добавляли 2 мл раствора

трипсина–ЭДТА (0,02 % раствор трипсина с 0,05 % ЭДТА) и оставляли флакон на 5 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Действие трипсина–ЭДТА инактивировали 2 мл среды (0 % FBS), после чего полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 300 g (Электрон ЦЛМН-Р-10-02, Россия). Осадок клеток ресуспендировали в 5 мл свежей культуральной среды (10 % FBS), часть клеток возвращали в культуральный флакон для последующего ведения и доводили общий объем среды до 5 мл.

#### 2.2.4 Методика подсчета клеток с помощью камеры Горяева

Подсчет клеток выполняли в камере Горяева (МиниМед, Россия). Для этого отбирали аликвоту суспензии клеток (100 мкл) и вносили ее в лунку камеры. Подсчет клеток осуществляли по формуле:

$$N = (X)/(5 \cdot 16),$$

где N – число млн клеток в 1 мл суспензии; X – число клеток в камере Горяева; 5·16 – общее число больших и малых квадратов в камере (5 и 16, соответственно).

#### 2.2.5 Хранение и размораживание клеточных культур

Замороженные культуры клеток хранили в криопробирках (SPL Lifesciences, Корея) при –135°C. После оттаивания при комнатной температуре суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 200 g (Электрон ЦЛМН-Р-10-02, Россия). Осадок клеток ресуспендировали в 15 мл охлажденной до 4°C среды (0 % FBS), а затем снова центрифугировали (5 мин, 300 g). Надосадочную жидкость декантировали, а к осадку добавляли 5 мл свежей культуральной среды (15 % FBS). Далее суспензию клеток переносили в 25 см<sup>2</sup> культуральный флакон (SPL Lifesciences, Корея) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 ЕК/CO<sub>2</sub>, Германия). Через 24 ч проводили замену среды на свежую (15 % FBS).

#### 2.2.6 Замораживание клеточных культур

Перед заморозкой клетки открепляли со дна культурального флакона (см. раздел 2.2.3) и суспендировали в среде для замораживания (10 % ДМСО, 90 % FBS) из расчета 1 мл среды на 1 млн клеток. Суспензию переносили в предварительно охлажденные криопробирки (SPL Lifesciences, Корея) и помещали их в морозильную камеру (–20°C) на 40 мин для предварительного замораживания. По истечению этого времени криопробирки перемещали в криостат (–135°C) и оставляли в нем на длительное хранение.

## 2.2.7 Получение мультиклеточных сфероидов

Получение мультиклеточных сфероидов осуществляли по методике, разработанной ранее в Лаборатории биомедицинских материалов ИБХ РАН [244]. Для этого в 96-луночный планшет (SPL Lifesciences, Корея) вносили суспензию клеток (7500 клеток на лунку в 100 мкл среды, 10 % FBS) и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 EK/CO<sub>2</sub>, Германия) на 24 ч. Затем старую среду заменяли 150 мкл свежей среды (10 % FBS), содержащей 40 мкМ синтетического циклического пептида cyclo-RGDfK(TPP). Планшет переносили в CO<sub>2</sub>-инкубатор, где в течение 72 ч происходила самопроизвольная агрегация клеток с образованием сфероидов. Наблюдение за процессом формирования сфероидов осуществляли ежедневно с помощью светового инвертированного микроскопа (Reichert Microstar 1820E, Германия).

## 2.3 Получение наноносителей

### 2.3.1 Получение наноносителей на основе липидов

#### 2.3.1.1 Получение ПЭГилированных липосом и липоплексов

Липосомы были получены из предварительно синтезированных дипептида OrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub>, трипептида OrnOrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub> или тетрапептида (Orn)<sub>2</sub>OrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub> [247] методом гидратации тонкой липидной пленки [248]. Для этого липопептиды (2 мг/мл) растворяли в хлороформе, а затем удаляли растворитель на ротаторном испарителе Heidolph Laborota 4000 (Германия) и лиофилизировали в течение 6 ч. Полученную тонкую липидную пленку гидратировали в 1 мл дистиллированной воды, подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин при 65°C и 35 кГц (Сапфир-1.3 ТТЦ, Россия), после чего пятикратно пропускали через ручной шприцевой экстраuder (LiposoFast-Basic Avestin, Англия) с поликарбонатными мембранами (диаметр пор 100 нм) до получения гомогенной липосомальной дисперсии. Получение ПЭГилированных липосом осуществляли по аналогичной методике с использованием смеси липопептидов и производных ПЭГ **а**, **б** и **в** (2, 4, 5, 6, 8, 10, 15 мол. %) [249]. Для получения липоплексов липосомы смешивали с модельной миРНК или плазмидой pCL3 (соотношение N/P = 64/1 или 32/1) и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Для флуоресцентной визуализации липосом и липоплексов на этапе формирования тонкой липидной пленки в них был загружен краситель пирен (5 %, об). Для визуализации миРНК к ней была ковалентно присоединена флуоресцентная метка Vic.

Липосомальную суспензию и липоплексы хранили при 4°C.

### 2.3.1.2 Получение керасом

Для получения керасом было синтезировано два типа керасом-образующих липидов (CFLA), как описано ранее [250]. Далее CFLA использовали для формирования керасом по двум модифицированным методикам гидратации тонкой липидной пленки.

Согласно первой методике, CFLA (100 %, масс) или смесь CFLA с DPPC (1:1, масс) растворяли в хлороформе, а затем удаляли растворитель на роторном испарителе Heidolph Laborota 4000 (Германия). Полученную тонкую пленку гидратировали раствором уксусной кислоты (5 % об., в дистиллированной воде, pH 3,0), содержащим доксорубин (40 %, масс.), и помещали на магнитную мешалку при 35°C на 1 ч (Heidolph MR Hei-Standard, Германия).

По второй методике, CFLA (100 %, масс) или смесь CFLA с DPPC (1:1, масс) растворяли в 3 мл раствора HCl (10 % об., в этиловом спирте, pH 3,0). Полученную дисперсию помещали на магнитную мешалку (35°C, 1 ч), а затем добавляли 1,5 мл хлороформа. Раствор выпаривали до получения тонкой пленки, а затем лиофилизировали в течение 6 ч. Полученную сухую липидную пленку гидратировали PBS (pH 7,4), содержащим DOX (40 %, масс).

В обоих подходах на заключительном этапе проводили ультразвуковую обработку керасомальной дисперсии в течение 30 мин при 45°C и 35 кГц (Сапфир-1.3 ТТЦ, Россия), а затем пятикратно пропускали ее через экструдер (LiposoFast-Basic Avestin, Англия) с диаметром пор 400 нм. Избыток доксорубина удаляли диализом (cut off 12 кДа) при перемешивании в PBS (pH 7,4). Суспензию керасом хранили при 4°C.

### 2.3.1.3 Получение фолат-конъюгированных липосом

Для получения фолат-конъюгированных липосом (FLp) синтезировали два типа липидов без лигандов и два типа фолат-конъюгированных липидов. Формирование липосом осуществляли двумя разными методами.

Согласно первой методике, FLp получали методом гидратации тонкой липидной пленки. Для этого смесь липидов без лигандов и фолат-содержащих липидов (95:5 %, масс) растворяли в хлороформе (2 мг/мл), а затем удаляли растворитель на роторном испарителе Heidolph Laborota 4000 (Германия) и лиофилизировали в течение 6 ч. Полученную тонкую липидную пленку гидратировали 1 мл PBS (pH 7,4), содержащим DOX (40 %, масс), и подвергали ультразвуковой обработке в течение 15 мин при 65°C и 35 кГц (Сапфир-1.3 ТТЦ, Россия).

Согласно второй методике, FLp получали методом пост-модификации. Для этого на первом этапе по описанной выше методике гидратации тонкой липидной пленки получали липосомы из липидов без лигандов, но содержащих алкильные функциональные группы в полярной головке. Затем полученную липосомальную дисперсию обрабатывали O-( $\beta$ -азидопропил)-O-(глицин-N-фолат)-полиэтиленгликолем-3400 в присутствии CuI, что приводило к «клик»-реакции 1,3-дипольного циклоприсоединения с образованием триазольного кольца между концевыми алкильными и азидными группами. Получение целевого соединения подтверждено данными масс-спектрометрии (Perkin Elmer, США), MS (MALDI) финального соединения: 4619,15 [M+].

Вне зависимости от методики формирования липосом, дисперсию далее пятикратно пропускали через экструдер (LiposoFast-Basic Avestin, Англия) с диаметром пор 400 нм до получения гомогенной липосомальной дисперсии. Избыток DOX удаляли диализом (cut off 12 кДа) при перемешивании в PBS (pH 7,4). Суспензию липосом хранили при 4°C.

## 2.3.2 Получение наноносителей на основе биodeградируемых полимеров

### 2.3.2.1 Получение полиэлектролитных наноконтейнеров

ПН получали методом эмульсификации с использованием низкочастотного ультразвука [251,252]. Равные объемы 0,25 % растворов (pH 2,0) ксантановой камеди и хитозана или ДЭАЭ-декстрана смешивали при комнатной температуре (общий объем водной фазы – 5 мл). Затем добавляли 10 мкл соевого масла, содержащего флуоресцентный краситель Nile Red (10 мг/мл) или тимохинон (100 мг/мл). Титановый соноотрод (диаметр 7 мм) помещали на границе раздела фаз масло/вода и подвергали систему обработке в охлаждающей ячейке ультразвукового гомогенизатора Ultrasonic Processor UP400S (Hielscher Ultrasonics GmbH, Германия) в течение 5 мин (56 Вт/см<sup>2</sup>, 20 кГц). Полученную суспензию ПН центрифугировали в течение 5 мин при 1,7 g (Eppendorf Minispin, США), надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 1 мл физраствора и снова центрифугировали при тех же параметрах. Описанную процедуру отмывки ПН повторяли трижды.

Модификацию поверхности ПН проводили электростатической адсорбцией полимеров. Соотношение ПН/полимер подбирали таким образом, чтобы эффективность модификации составила 100 %. К отмытым ПН добавляли 500 мкл раствора поли-L-лизина (MW 30-70 кДа; 0,2 % масс. в 0,15 M NaCl) или ПЭГ (MW 1,5 кДа; 0,4 % масс. дистиллированной воде) и перемешивали в течение 20 мин. Затем ПН отделяли с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 1,7 g и трижды промывали физраствором для удаления избытка полимера. Суспензию ПН хранили в физрастворе при 4°C.

### 2.3.2.2 Получение полиэлектролитных мультислойных капсул

Получение ПМК осуществляли методом LbL, как описано ранее [253]. Кратко, в качестве матрицы использовали коллоидные частицы ватерита  $\text{CaCO}_3$ , на которые адсорбировали слои полиэлектролитов поли-L-аргинина (MW 15-70 кДа) и дектрансульфата (MW 500 кДа) из их растворов (по 2 мг/мл в 0,15 М растворе NaCl). Последовательные стадии адсорбции включали 15 мин инкубацию с каждым раствором полиэлектролита с последующим центрифугированием при 12000 g в течение 5 мин (Eppendorf Minispin, США), промывку деионизированной водой и ресуспендирование. Этот процесс повторяли до тех пор, пока не были сформированы три бислоя, в результате чего финальный состав оболочки ПМК соответствовал (PArg/DS)<sub>3</sub>. Затем ПМК в течение 10 мин инкубировали в растворе ЭДТА (0,2 М) до полного растворения  $\text{CaCO}_3$  и дважды промывали деионизированной водой. После получения полых ПМК проводили их термическую обработку при 90°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Эффективность термоусадки определяли как:

$$100\% \times \left( \frac{1 - D_{\text{термообработанных капсул}}}{D_{\text{исходных капсул}}} \right).$$

В качестве инкапсулируемых веществ использовали DOX (1 мл, 0,02 мг/мл) или флуоресцентные красители R6G (0,1 М) и FITC (0,1 мг/мл) из расчета на  $10^{10}$  капсул. Загрузка осуществлялась инкубированием ПМК в растворе препарата/красителя в течение 1 ч при перемешивании с последующим центрифугированием (12000 g, 5 мин) и трехкратной отмывкой деионизированной водой. Для модификации поверхности лигандом DR5-B к сухому осадку ПМК добавляли раствор DR5-B (0,8 мг/мл), подвергали ультразвуковой обработке (10 мин, 60 Вт) и выдерживали при перемешивании в течение 1 ч. Затем полученную смесь центрифугировали (9000 g, 5 мин) и дважды отмывали деионизированной водой. ПМК хранили в физрастворе при 4°C.

## 2.4 Исследование физико-химических свойств наноносителей

### 2.4.1 Исследование размеров и ζ-потенциала наноносителей

Средний гидродинамический диаметр, индекс полидисперсности (PDI) и заряд поверхности (ζ-потенциал) наноносителей измеряли с помощью анализатора размера частиц (Zetasizer ZN Malvern Instruments, Англия). Измерение среднего размера наноносителей осуществлялось методом динамического рассеяния света (DLS), а измерение ζ-потенциала - методом электрофоретического рассеяния света, соответственно. Измерения проводили в воде в стандартных кварцевых кюветах и усредняли по результатам трех последовательных серий (100 прогонов каждая). Для некоторых наноносителей средний диаметр определяли

также путем анализа микрофотографий, полученных с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) или сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

#### 2.4.2 Исследование морфологии наночастиц

Морфологию наночастиц оценивали с помощью ТЭМ (LEO 912 ABOMEGA Carl Zeiss, Германия) или СЭМ (Jeol 7401F, Япония).

Микрофотографии ТЭМ получали при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для этого каплю дисперсии наночастиц помещали на медные решетки, покрытые формваром, на 2 мин, после чего избыток образца удаляли. После высыхания образцы обрабатывали 0,3 % раствором уранилацетата (рН 4,0) для получения отрицательного окрашивания.

Микрофотографии СЭМ получали с помощью электронного пучка напряжением 5 кВ на рабочем расстоянии 8,0 мм. Для этого дисперсию наночастиц промывали водой и помещали в пробирку для СЭМ-анализа. После высыхания в течение 12 ч образец покрывали золотым напылением непосредственно перед проведением СЭМ-анализа.

#### 2.4.3 Исследование стабильности наночастиц при хранении

Для определения агрегационной и седиментационной стабильности суспензии наночастиц при 4°C определяли изменение ее оптической плотности во времени с помощью спектрофотометра. Эталона – дистиллированная вода. Длина волны для пустых наночастиц – 400 нм; для наночастиц, загруженных DOX – 470 нм. Стабильность наночастиц отражали в виде зависимости оптической плотности от времени. Биологическую стабильность липоплексов, а именно стабильность эффективности трансфекции липоплексами, оценивали путем еженедельной трансфекции клеток HEK293T.

#### 2.4.4 Исследование эффективности инкапсулирования препарата в наночастицы

Избыток инкапсулируемого препарата удаляли диализом (cut off 12 кДа) непосредственно после получения наночастиц. Концентрацию оставшегося в супернатанте DOX измеряли спектрофотометрически при длине волны 470 нм (Perkin Elmer Lambda 650, США) по калибровочной кривой, построенной для растворов DOX с известными концентрациями. Эффективность инкапсуляции препарата рассчитывали следующим образом:

$$\text{эффективность инкапсулирования препарата} = \frac{C_{\text{исх}} - C_{\text{супер}}}{C_{\text{исх}}} \cdot 100 \% ;$$

где  $C_{\text{исх}}$  – общее количество препарата, добавленного к наночастицам,  $C_{\text{супер}}$  – общее количество препарата в супернатанте.

## 2.4.5 Исследование кинетики высвобождения препарата из наноносителей

Для количественного определения эффективности высвобождения препарата наноносители помещали в диализные мешки (cut off 12 кДа) в PBS (pH 7,4) при постоянном перемешивании. Через определенные временные интервалы количество DOX в супернатанте измеряли спектрофотометрически при длине волны 470 нм (Экотест 2020, Россия), после чего старый супернатант заменяли свежим PBS (pH 7,4). Концентрацию высвободившегося препарата в пробах супернатанта определяли следующим образом:

$$\text{эффективность высвобождения DOX} = \frac{\text{ОП}_{\text{супер}}}{\text{ОП}_{\text{исх}}} \cdot 100 \% ;$$

где ОП<sub>исх</sub> – оптическая плотность исходного раствора препарата, добавленного к наноносителям; ОП<sub>супер</sub> – оптическая плотность пробы супернатанта в определенный промежуток времени.

## 2.5 Исследование накопления наноносителей в 2D и 3D модели *in vitro*

### 2.5.1 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия в 2D и 3D моделях *in vitro*

Качественную оценку эффективности накопления и локализации наноносителей и свободного препарата (контроль) в монослойной культуре клеток и мультиклеточных сфероидов проводили с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Для этого клетки (100 тыс клеток на лунку) или предварительно сформированные сфероиды высевали на покровные стекла в 6-луночную планшете и инкубировали (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 ЕК/CO<sub>2</sub>, Германия) в течение 24 ч в стандартной культуральной среде (10 % FBS). Затем старую среду удаляли и заменяли свежей, содержащей необходимые флуоресцентные красители (Таблица 5).

Таблица 5 – Характеристики флуоресцентных красителей, использованных для визуализации клеточных структур

| Краситель            | Визуализируемый объект         | $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ , нм | Рабочая концентрация | Время инкубации, мин |
|----------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Hoechst 33258</b> | ядра клеток                    | 352/464                                        | 50 мкМ               | 20 мин               |
| <b>LysoTracker</b>   | лизосомы клеток                | 577/590                                        | 50 нМ                | 30 мин               |
| <b>ER-tracker</b>    | эндоплазматическая сеть клеток | 374/430                                        | 300 нМ               | 15 мин               |
| <b>Neuro-DiO</b>     | внутриклеточные мембраны       | 484/501                                        | 10 мкМ               | 20 мин               |
| <b>Calcein AM</b>    | цитоплазма живых клеток        | 495/515                                        | 5 мкМ                | 30 мин               |

По истечению заданного времени инкубации, несвязавшиеся красители удаляли трехкратной отмывкой PBS (pH 7,4), добавляли к клеткам дисперсию наноносителей или контрольных препаратов и инкубировали в течение заданных временных интервалов (Таблица 6).

Таблица 6 – Параметры инкубации наноносителей с клетками для изучения эффективности из накопления методом конфокальной микроскопии в 2D и 3D моделях *in vitro*

| Наноносители                     | Краситель и его $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм       | Рабочая концентрация                          | Время инкубации           |                           |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                                  |                                                        |                                               | 2D модель <i>in vitro</i> | 3D модель <i>in vitro</i> |
| На основе липидов:               |                                                        |                                               |                           |                           |
| ПЭГилированные липосомы          | – пирен (334/375);<br>– Vic (525/546)                  | 0,5 мкл суспензии наноносителей на 1 мл среды | 5 и 30 мин;<br>3 ч        | 30 мин;<br>1, 3 и 4 ч     |
| керасомы                         | DOX (475/595)                                          |                                               | 15 мин<br>и 1 ч           | 30 мин<br>и 2 ч           |
| фолат-конъюгированные липосомы   |                                                        |                                               | 15 и 30 мин;<br>1 ч       | 15 и 30 мин;<br>1-3 ч     |
| На основе полимеров:             |                                                        |                                               |                           |                           |
| полимерные наноконтейнеры        | Nile Red (543/628)                                     | 0,5 мкл суспензии наноносителей на 1 мл среды | 15 мин и 1 ч              | 1 и 4 ч                   |
| полимерные мультислойные капсулы | – R6G (525/590)<br>– FITC (495/519)<br>– Cy3 (548/563) |                                               | 15 мин и 1 ч              |                           |

После завершения инкубации несвязавшиеся наноносители или препараты удаляли трехкратной отмывкой PBS (pH 7,4), а клетки или сфероиды фиксировали с помощью CC/Mount Fluorophor protector и изучали на инвертированном конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon TE-2000 (Япония), снабженном конфокальной лазерной системой C1, лазерами Kr (408), Ar (488), G-NeHe (543). Оценка распределения наноносителей или препаратов во внутреннем объеме выполнялась с помощью снятия микрофотографий поперечных срезов сфероидов на различной глубине (с фиксированным шагом, z-stack).

Количественная оценка накопления наноносителей в клетках была выполнена обработкой конфокальных микрофотографий с использованием программного обеспечения ImageJ Software (США). При этом эффективность накопления наноносителей в клетках определялась как средняя интенсивность флуоресценции в обработанных клетках по сравнению с интенсивностью флуоресценции исходной суспензии наноносителей.

## 2.5.2 Проточная цитофлуориметрия в 2D модели *in vitro*

Для количественной оценки эффективности накопления наночастиц в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*) был использован метод проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки высевали в 24-луночный планшет (50 тыс клеток на лунку) в питательной среде (10 % FBS) с последующей инкубацией в течение 24 ч (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 ЕК/CO<sub>2</sub>, Германия). Затем старую культуральную среду удаляли и добавляли свежую (10 % FBS), содержащую дисперсию наночастиц или контрольных препаратов, и инкубировали в течение заданных временных интервалов (Таблица 7).

Таблица 7 – Параметры инкубации наночастиц с клетками для изучения эффективности их накопления методом проточной цитофлуориметрии в 2D модели *in vitro*

| Наноносители                     | Краситель и его $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм       | Рабочая концентрация                          | Время инкубации    |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|
| На основе липидов:               |                                                        |                                               |                    |
| ПЭГилированные липосомы          | пирен (334/375)                                        | 0,5 мкл суспензии наноносителей на 1 мл среды | 30 мин; 1, 4 и 8 ч |
| керасомы                         | DOX (475/595)                                          |                                               | 30 мин; 2 и 8 ч    |
| фолат-конъюгированные липосомы   |                                                        |                                               | 30 мин; 1, 2 и 5 ч |
| На основе полимеров:             |                                                        |                                               |                    |
| полимерные наноконтейнеры        | Nile Red (543/628)                                     | 0,5 мкл суспензии наноносителей на 1 мл среды | 30 мин; 1, 2 и 4 ч |
| полимерные мультислойные капсулы | – R6G (525/590)<br>– FITC (495/519)<br>– Cy3 (548/563) |                                               | 5 и 30 мин; 1 ч    |

После завершения инкубации несвязавшиеся наночастицы или препараты удаляли трехкратной отмывкой PBS (pH 7,4), открепляли клетки с помощью раствора трипсин/ЭДТА и переносили в пробирки для проточной цитофлуориметрии. Суспензию центрифугировали в течение 5 мин (300 g), надосадочную жидкость декантировали и добавляли к осадку формалин (5 %) для фиксации клеток. Эффективность накопления наночастиц в клетках измеряли на флуоресцентно-активируемом проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (США) с программным обеспечением BD CellQuest. Данные проточной цитофлуориметрии выражали как среднюю интенсивность флуоресценции, деленную на фоновую интенсивность контрольной группы (необработанные клетки).

### 2.5.3 Флуориметрия в 3D модели *in vitro*

Количественный анализ эффективности накопления наночастиц в мультиклеточных сфероиды (3D модель *in vitro*) был выполнен с помощью флуориметрии. Для этого к предварительно сформированным сфероиды добавляли среду (10 % FBS), содержащую дисперсию наночастиц или контрольных препаратов, и инкубировали в течение заданных временных интервалов (Таблица 8).

Таблица 8 – Параметры инкубации наночастиц с клетками для изучения эффективности их накопления методом флуориметрии в 3D модели *in vitro*

| Наночастицы                      | Краситель и его $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм       | Рабочая концентрация                       | Время инкубации       |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------|
| На основе липидов:               |                                                        |                                            |                       |
| ПЭГилированные липосомы          | пирен (334/375)                                        | 0,5 мкл суспензии наночастиц на 1 мл среды | 30 мин; 1, 4 и 8 ч    |
| керасомы                         | DOX (475/595)                                          |                                            | 1, 2 и 4 ч            |
| фолат-конъюгированные липосомы   |                                                        |                                            | 30 мин; 2, 4 и 8 ч    |
| На основе полимеров:             |                                                        |                                            |                       |
| полимерные наноконтейнеры        | Nile Red (543/628)                                     | 0,5 мкл суспензии наночастиц на 1 мл среды | 30 мин; 1, 2, 4 и 8 ч |
| полимерные мультислойные капсулы | – R6G (525/590)<br>– FITC (495/519)<br>– Cy3 (548/563) |                                            | 1,3 и 7 ч             |

После завершения инкубации несвязавшиеся наночастицы или препараты удаляли трехкратной отмычкой PBS (pH 7,4) и обрабатывали клетки ДМСО. Эффективность накопления наночастиц в клетках измеряли с помощью Promega GloMax-Multi detection system (США). Эффективность накопления выражали в процентах от флуоресценции клеток по сравнению с флуоресценцией исходного раствора.

### 2.6 Исследование цитотоксичности наночастиц в 2D и 3D модели *in vitro*

Исследование цитотоксичности наночастиц или свободных препаратов в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*) и мультиклеточных сфероиды (3D модель *in vitro*) было выполнено с помощью МТТ–теста. Для этого клетки (5 тыс на лунку) или предварительно сформированные сфероиды высевали в 96-луночный планшет, после чего помещали его в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 ЕК/CO<sub>2</sub>, Германия). Через сутки среду в лунках заменяли средой, смешанной с образцами (параметры инкубации см. в Таблице 9) и инкубировали в течение заданных временных интервалов. Затем из лунок

планшета удаляли старую среду, добавляли по 0,1 мл среды DMEM без сыворотки, содержащую 10 % МТТ (0,5 мг/мл) и оставляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе на 2–3 ч. Далее раствор МТТ заменяли на 0,1 мл ДМСО и инкубировали в течение 10 мин. Поглощение формазана измеряли на многоканальном спектрофотометре (Flow Laboratories, США) при длине волны 540 нм. Полуингибирующую концентрацию (IC<sub>50</sub>) определяли, как концентрацию наночастиц/препарата, вызывающую гибель 50 % клеток. Клетки или сфероиды, не подвергавшиеся воздействию носителей, использовали в качестве контроля (100 % жизнеспособных клеток).

Таблица 9 – Параметры инкубации наночастиц с клетками для изучения их цитотоксичности методом МТТ–теста в 2D и 3D моделях *in vitro*

| Наночастицы                      | 2D модель <i>in vitro</i>                       |                    | 3D модель <i>in vitro</i>                       |                    |
|----------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------|--------------------|
|                                  | Концентрация                                    | Время инкубации, ч | Концентрация                                    | Время инкубации, ч |
| <i>На основе липидов:</i>        |                                                 |                    |                                                 |                    |
| ПЭГилированные липосомы          | липopeптид / DMEM (1:1, об)                     | 24                 | –                                               | –                  |
| керасомы                         | 0,01; 0,10; 1,00; 5,00 и 10,00 мкМ (по DOX)     | 24, 48, 72         | –                                               | –                  |
| фолат-конъюгированные липосомы   | 1; 5, 10; 25 и 50 мкМ (по DOX)                  | 24, 48, 72         | 10; 25; 50 и 100 мкМ (по DOX)                   | 24, 48, 72         |
| <i>На основе полимеров:</i>      |                                                 |                    |                                                 |                    |
| полимерные наноконтейнеры        | 0,06; 0,13; 0,25 и 0,5 мг/мл (по TQ)            | 24, 48, 72         | –                                               | –                  |
| полимерные мультислойные капсулы | 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 и 1000,0 нг/мл (по DR5-B) | 24, 48, 72         | 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 и 1000,0 нг/мл (по DR5-B) | 24, 48, 72         |

## 2.7 Исследование эффективности трансфекции клеток липоплексами

### 2.7.1 Изучение эффективности трансфекции клеток рGL3-липоплексами

Эффективность трансфекции клеток с помощью рGL3-липоплексов определялась с помощью люциферазного анализа. Для этого клетки в питательной среде (10 % FBS) высевали в 48-луночный планшет (700 тыс клеток на лунку) и инкубировали (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 ЕК/CO<sub>2</sub>, Германия) в течение 12 ч. Дисперсии липоплексов (N/P = 64/1 и 32/1) были приготовлены в питательной среде (0 % FBS), содержащей 0,2 мг плазмиды рGL3. Липоплексы на основе коммерческого агента для трансфекции Липофектамина 2000

были получены в соответствии с рекомендациями производителя и использованы в качестве положительного контроля, в то время как нативную плазмиду pGL3 (0,2 мг) использовали в качестве отрицательного контроля. Полученные суспензии образцов (80 мкл на лунку) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 или 48 ч.

После этого определяли люциферазную активность с помощью набора Luciferase Assay System (Promega, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для этого из лунок удаляли питательную среду, добавляли Glo Lysis буфер и инкубировали в течение 15 мин до полного лизиса клеток. Затем содержимое лунок отбирали, переносили в эппендорфы и центрифугировали в течение 3 мин при 5600 g (Eppendorf Minispin, США) и к супернатанту добавляли люциферазный субстрат (1:1, об). Эффективность трансфекции оценивали по уровню люминесценции с помощью люминометра Promega Glomax 20/20 (США).

## 2.7.2 Изучение эффективности трансфекции клеток миРНК-липоплексами

Эффективность трансфекции клеток с помощью миРНК-липоплексов была изучена ко-трансфекцией с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Для этого клетки в питательной среде (10 % FBS) высевали в 24-луночный планшет (100 тыс клеток на лунку) и инкубировали (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C, Heraeus B5060 ЕК/CO<sub>2</sub>, Германия) в течение 12 ч. Затем к клеткам добавляли суспензии липоплексов (80 мкл на лунку) в питательной среде без сыворотки, содержащей плазмиду UTR-HCV (0,25 мкг) и Липофектамин 2000 (1 мкл), и инкубировали в течение 4 ч. Успешная трансфекция была подтверждена флуоресценцией маркера GFP с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus IX71 (США). После этого к клеткам добавляли суспензии миРНК-липоплексов (80 мкл на лунку; 0,25 мкг миРНК; N/P = 64/1) в питательной среде без сыворотки и инкубировали в течение 24 ч. Липоплексы на основе Липофектамина 2000 и нативную миРНК использовали в качестве положительного и отрицательного контроля, соответственно. По истечению времени инкубации клетки подвергали лизису с использованием буфера для лизиса RLT.

Затем нуклеиновые кислоты удаляли методом твердофазной экстракции с использованием набора Rneasy Mini в соответствии с рекомендациями производителя. Кратко, клеточный лизат разбавляли этанолом (70 %, 350 мкл) и промывали буферами RW1, а затем RPE. Для элюирования миРНК использовали воду, очищенную рибонуклеазами. Полную очистку миРНК от остатков плазмиды UTR-HCV проводили с использованием фермента дезоксирибонуклеазы I.

Последующую обратную транскрипцию очищенной миРНК проводили с использованием набора реагентов ОТ-1 в соответствии с инструкциями производителя к амплификатору Tertsik с программным обеспечением Cys2.5 (ДНК-Технологии, Россия).

Количественная ПЦР была проведена с использованием набора специальных зондов и праймеров в соответствии с руководством по эксплуатации прибора BioRad iQ5 (BioRad, США). Пороговые значения цикла, полученные при ПЦР, были использованы для расчета количества копий гена UTR на 1 мкг общей РНК с использованием следующего уравнения:

$$N = 10^{42,13 - Ct / 3,6304} \cdot 8,3 ;$$

где N – количество копий гена UTR на 1 мкг общей миРНК; Ct – пороговое значение цикла, полученное для тестируемого образца.

## 2.8 Исследование ПЭГилированных липосом в модели *in vivo*

Все исследования проводились в учреждении, аккредитованном Американской ассоциацией по аккредитации ухода за лабораторными животными, в соответствии с Руководящими принципами политики государственной службы здравоохранения в области гуманного ухода за лабораторными животными и их использования, и были одобрены институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию.

Для экспериментов *in vivo* использовали самок мышей линии BALB/c в возрасте 6–8 недель (массой 20–22 г) из Научно-исследовательского центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства «Столбовая» (Россия). Мышей содержали группами (по 10 особей в каждой) в полипропиленовых клетках (320 × 210 × 90 мм) на стандартном гранулированном корме «Лаборатория Снаб» (Россия) со свободным доступом к питьевой воде. Мышей содержали в контролируемых условиях (18–24°C, влажность 30–70 %, световой цикл 12 ч). Перед экспериментами животные были помещены в лабораторию на 14 дней для адаптации, в течение которых проводились ежедневные обследования состояния животных. В группы были включены животные без отклонений по здоровью, при этом их средние показатели массы тела отличались менее чем на 10 % в пределах одной группы. Для исследования было использовано 15 групп мышей (по 6 мышей в каждой):

- 7 групп использовали для введения немодифицированных липосом (без ПЭГ);
- 7 групп использовали для введения ПЭГилированных липоплексов (производное ПЭГ **6**, 6 мол. %, NP = 32/1);
- 1 группа использовалась в качестве контроля (6 мышей, не получавших лечение).

Каждому животному внутривенно вводили дозу 46 мкг (45 мкг пирен-меченных липоплексов, содержащих 1 мкг Vis-меченной миРНК) в 0,25 мл раствора глюкозы. Образцы крови (300 мкл) были взяты из ретроорбитального синуса через 2, 5, 10, 20, 30, 45, и 60 мин после обработки, чтобы получить окончательный минимальный образец сыворотки объемом 50 мкл. Умерщвление животных осуществлялось путем смещения головного мозга с

последующим забором внутренних органов (печени, почек, легких и селезенки). Контрольной группе вводили только раствор глюкозы с последующим забором крови и внутренних органов.

Пробы крови центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g (Eppendorf Minispin, США), отбирали аликвоты супернатантов (50 мкл) и экстрагировали флуоресцентные метки с помощью ацетонитрила (75 мкл). Собранные органы сначала гомогенизировали в физрастворе, затем аликвоты гомогената (300 мкл) центрифугировали (10000 g, 10 мин), а флуоресцентные метки также экстрагировали ацетонитрилом (450 мкл). Концентрацию липоплексов и мРНК в сыворотке крови и гомогенатах органов определяли путем анализа флуоресцентных меток. Количество пирена и Vis измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью флуориметрического детектора Agilent Infinity FLD 1260 (США) с диапазоном  $\lambda_{ex/em}$  200-1200 нм при следующих параметрах:

- подвижная фаза – деионизированная вода/ацетонитрила (1/4, v/v);
- неподвижная фаза – колонка для ВЭЖХ Agilent Eclipse C18 (4,0 мм × 15 см, 5 мкм);
- скорость потока – 1,0 мл/мин;
- объем вводимого образца – 20 мкл.

Результаты ВЭЖХ обрабатывали с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation (США).

## 2.9 Статистическая обработка данных

Все полученные данные были распределены нормально и выражались как среднее или среднее  $\pm$  SEM или  $\pm$  SD. Статистический анализ всех результатов проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Все эксперименты проводились не менее чем с 3 независимыми повторами. Результаты экспериментов были обработаны с помощью программного обеспечения GraphPad Prism Software (США) и приняты как достоверно отличающиеся при вероятности ошибки  $p < 0,05$ .

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Выбор клеточных линий и получение мультиклеточных опухолевых сфероидов

В данной работе для изучения наноносителей с точки зрения их эффективности накопления и цитотоксичности были использованы следующие опухолевые клеточные линии:

- С6 – глиобластома головного мозга крысы;
- HCT116 – колоректальная карцинома человека;
- HeLa – рак шейки матки человека;
- HepG2 – гепатоцеллюлярная карцинома человека;
- М3 – меланома кожи мыши;
- MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека;
- U-87MG – глиобластома головного мозга человека.

В качестве нормальных (нераковых) клеток были использованы линии Bj-5ta (фибробласты крайней плоти человека) и HEK293T (клетки эмбриональной почки человека), а также MSC (мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека).

Исследования были выполнены с использованием как монослойной культуры клеток (2D модель *in vitro*), так и мультиклеточных сфероидов (3D модель *in vitro*), сформированных методом RGD-индуцированной самосборки клеток. При этом опухолевые сфероиды (из раковых клеток) использовали для изучения проникновения и локализации наноносителей в клетках и оценки их цитотоксичности, а сфероиды из нормальных клеток применяли в качестве отрицательного контроля.

Также представлялось интересным сравнить выбранный для получения сфероидов метод RGD-индуцированной самосборки с классическим методом «висячей капли» на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.

Как видно из Рисунка 34, использование обоих методов приводило к формированию мультиклеточных опухолевых сфероидов. Однако сфероиды, полученные с использованием RGD-индуцированной самосборки клеток, в отличие от таковых, сформированных методом “висячей капли”, имели четко выраженную сферическую форму, более плотную упаковку клеток в сфероидах и высокую монодисперсность (средний размер сфероидов составлял  $110 \pm 12$  мкм).

**MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека)**  
**3D модель *in vitro***  
 метод RGD-индуцированной  
 самосборки клеток                      метод “висячей капли”

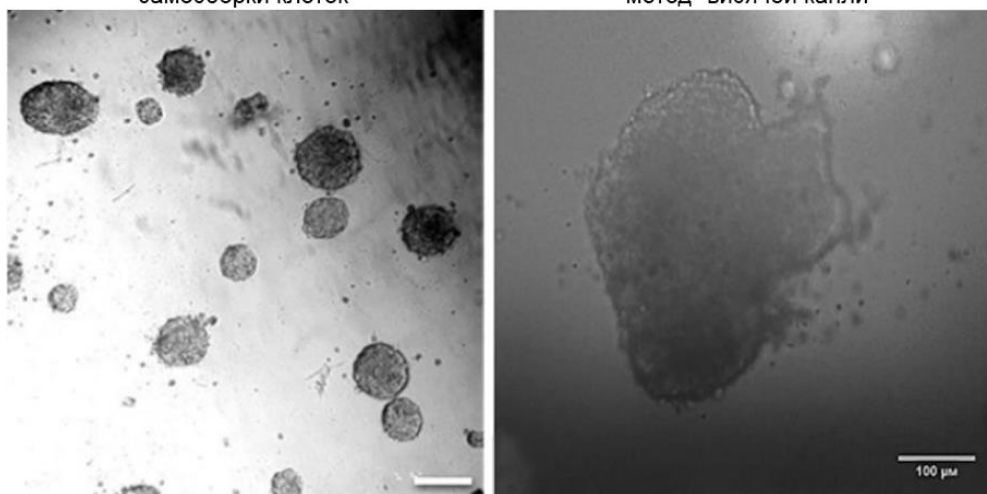


Рисунок 34 – Микрофотографии мультиклеточных сфероидов из клеток MCF-7. Оптическая микроскопия. Шкала – 100 мкм

Сфероиды, полученные методом “висячей капли”, имели рыхлую структуру и средний размер  $340 \pm 58$  мкм. Они были менее устойчивы к суспендированию и другим механическим манипуляциям, а также даже в покое сохраняли форму только в течение 2 дней после их переноса на дно культурального планшета. Сфероиды же, полученные с помощью RGD-пептида, были механически стабильны: их можно было легко суспендировать, переносить из одной лунки в другую и культивировать в течение не менее 10 дней. Кроме того этот метод отличается простотой и универсальностью, и, в отличие от “метода висячей капли” (один сфероид на лунку), позволяет получать в одной лунке планшета несколько десятков сфероидов. Таким образом, все сфероиды в работе были получены с использованием RGD-пептида.

### 3.2 Наноносители на основе липидов

В данной работе были разработаны новые катионные липидные наноносители, представленные в Таблице 10 и модифицированные для придания им тех или иных свойств. Так, ПЭГилирование липосом позволяет продлить их циркулирование в кровотоке, модификация силоксановыми производными – увеличить механическую стабильность наноносителя и обеспечить пролонгированное высвобождение лекарства, а конъюгирование с фолатными лигандами – создать систему таргетной доставки препарата преимущественно в раковые клетки.

Таблица 10 – Наночастицы на основе катионных липопептидов, полученные и исследованные в данной работе

| Тип наночастицы                              | Особенности наночастицы                                              | Инкапсулированное вещество        | Способ доставки                                                             |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| ПЭГилированные «стелс»-липосомы и липоплексы | модификация поверхности новыми производными ПЭГ                      | плазмида pGL3 или модельная миРНК | пассивная направленная доставка генетического материала                     |
| керасомы                                     | модификация поверхности силкоксановыми производными                  | доксорубицин                      | пассивная направленная доставка с пролонгированным высвобождением препарата |
| фолат-конъюгированные липосомы               | модификация поверхности фолатными лигандами (метод пост-модификации) |                                   | активная направленная (таргетная) доставка препарата                        |

### 3.2.1 ПЭГилированные липосомы и липоплексы на основе катионных липопептидов

#### 3.2.1.1 Получение липосом и липоплексов

В работе использовали три катионных липопептида, различающихся количеством положительно заряженных групп в составе полярной головки: дипептид OrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub>, трипептид OrnOrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub> и тетрапептид (Orn)<sub>2</sub>OrnGlu(C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)<sub>2</sub>. На первом этапе необходимо было определить, какой из липопептидов обладает наибольшим потенциалом с точки зрения создания липоплексов с высокой трансфекционной эффективностью. Методом гидратации тонкой липидной пленки из этих липопептидов были получены липосомы и липоплексы (липосомы, загруженные генетическим материалом, в частности плазмидой pGL3 или модельной миРНК).

#### 3.2.1.2 Исследование физико-химических свойств липосом и липоплексов

Морфологию и размер липосом изучали с помощью ТЭМ (Рисунок 35). Было обнаружено, что увеличение размера полярной головки приводило к уменьшению размера частиц. Так, средний диаметр липосом на основе ди-, три- и тетрапептидов составлял  $150 \pm 5$  нм,  $105 \pm 7$  нм и  $60 \pm 5$  нм, соответственно. Кроме того, из Рисунка 35 видно, что полученные наночастицы были липосомоподобными по своей морфологии, что также было подтверждено расчетом критического параметра упаковки.

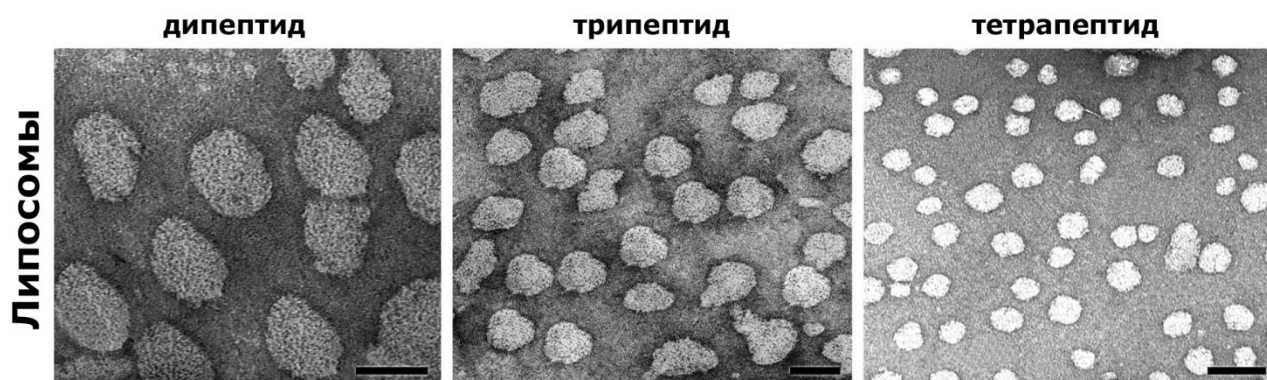


Рисунок 35 – Микрофотографии липосом на основе ди-, три- и тетралипопептидов. ТЭМ.

Шкала – 100 нм

Морфологию липоплексов также изучали с помощью ТЭМ (Рисунок 36). Было установлено, что липоплексы, загруженные миРНК, имели сэндвичеобразную структуру (см. Рисунок 36 А–В), в то время как загруженные плазмидой рGL3 липоплексы представляли собой менее упорядоченные комплексы (см. Рисунок 36 Д–Ж).

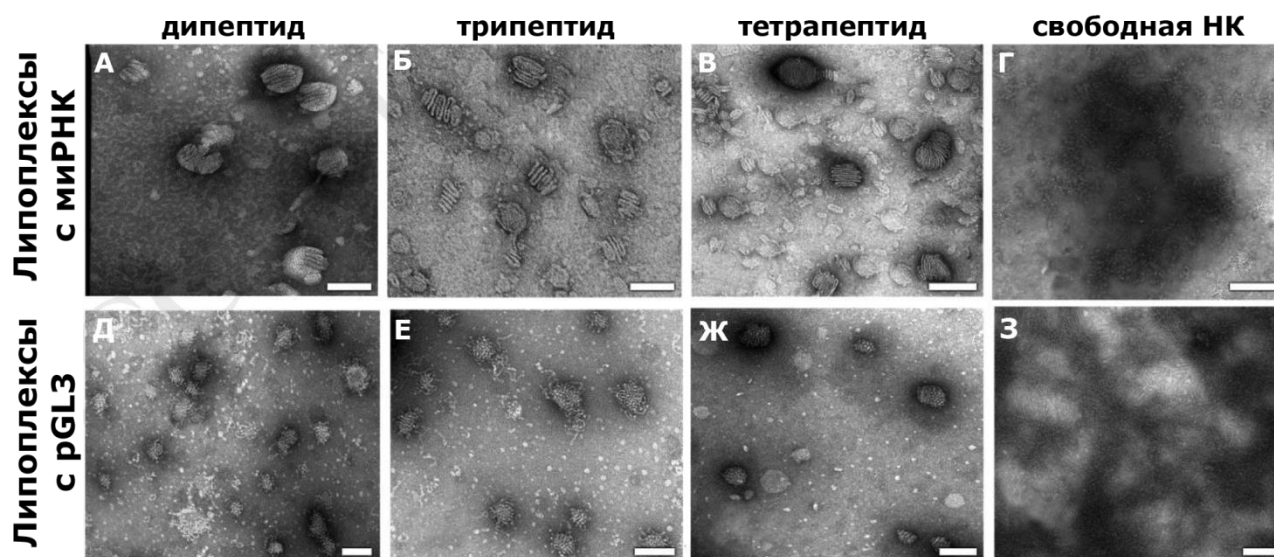


Рисунок 36 – Микрофотографии липоплексов на основе ди-, три- и тетралипопептидов.

Контроль – свободная нуклеиновая кислота (НК). ТЭМ. Шкала – 100 нм

Кроме того, был изучен  $\zeta$ -потенциал липосом и липоплексов, а их средний размер также определяли с использованием метода динамического светорассеивания (Таблица 11). Видно, что полученные результаты хорошо коррелируют с размерами липоплексов на микрофотографиях ТЭМ (см. Рисунок 36). Также стоит отметить, что тип липопептида не оказывал существенного влияния на средний диаметр липоплексов в отличие от типа инкапсулируемой нуклеиновой кислоты. Так, липоплексы, загруженные рGL3, имели меньший диаметр, чем те, что были загружены миРНК. Значения  $\zeta$ -потенциала липосом

были в диапазоне от  $35,24 \pm 1,36$  (образец на основе дипептида) до  $37,98 \pm 0,79$  мВ (образец на основе тетрапептида), тогда как после образования липоплексов (комплексобразование с нуклеиновой кислотой) величины  $\zeta$ -потенциала снижались примерно вдвое.

Таблица 11 – Средний размер и  $\zeta$ -потенциал липосом и липоплексов, загруженных плазмидой pGL3 или миРНК

| Липопептид                                                                                     | Средний диаметр липоплексов, нм |             | $\zeta$ -потенциал липосом, мВ | $\zeta$ -потенциал липоплексов, мВ |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|--------------------------------|------------------------------------|
|                                                                                                | с pGL3                          | с миРНК     |                                |                                    |
| <b>дипептид</b><br>OrnGlu(C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> ) <sub>2</sub>                       | $75 \pm 8$                      | $97 \pm 7$  | $35,24 \pm 1,36$               | $18,54 \pm 0,64$                   |
| <b>трипептид</b><br>OrnOrnGlu(C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> ) <sub>2</sub>                   | $83 \pm 7$                      | $85 \pm 15$ | $36,41 \pm 0,68$               | $19,20 \pm 0,68$                   |
| <b>тетрапептид</b><br>(Orn) <sub>2</sub> OrnGlu(C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> ) <sub>2</sub> | $87 \pm 10$                     | $93 \pm 12$ | $37,98 \pm 0,79$               | $19,52 \pm 0,68$                   |

### 3.2.1.3 Исследование цитотоксичности липосом

Цитотоксичность липосом была оценена с помощью МТТ–теста на модельных клетках рака шейки матки человека (HeLa) и эмбриональной почки человека (HEK293T). Как видно из Таблицы 12, минимальные значения IC<sub>50</sub> наблюдали в случае липосом на основе тетрапептида:  $190,2 \pm 1,75$  мкг/мл (HeLa) и  $331,2 \pm 41,70$  мкг/мл (HEK293T).

Таблица 12 – Значения IC<sub>50</sub> для липосом после 24 ч инкубации с клетками HeLa и HEK293T (2D модель *in vitro*). Результаты МТТ–теста

| Липопептид                                                                                     | Значения IC <sub>50</sub> , мкг/мл |                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
|                                                                                                | HeLa                               | HEK293T           |
| <b>дипептид</b><br>OrnGlu(C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> ) <sub>2</sub>                       | $540,0 \pm 3,71$                   | $375,2 \pm 45,52$ |
| <b>трипептид</b><br>OrnOrnGlu(C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> ) <sub>2</sub>                   | $227,4 \pm 4,11$                   | $347,6 \pm 38,34$ |
| <b>тетрапептид</b><br>(Orn) <sub>2</sub> OrnGlu(C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> ) <sub>2</sub> | $190,2 \pm 1,75$                   | $331,2 \pm 41,70$ |

IC<sub>50</sub> – полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

При этом максимальную цитотоксичность установили для образцов на основе дипептида, в частности  $540,0 \pm 3,71$  мкг/мл (HeLa) и  $375,2 \pm 45,52$  мкг/мл (HEK293T). Таким образом, было показано, что цитотоксичность липопептидов возрастала с увеличением количества катионных аминокислот в полярной головке, что хорошо согласуется с результатами других исследователей [255,256].

### 3.2.1.4 Исследование трансфекции клеток липоплексами

Эффективность трансфекции клеток с помощью липоплексов была изучена методом люциферазного анализа (Рисунок 37). Результаты представлены как уровень относительных световых единиц (RLU) на  $10^5$  клеток. Липофектамин 2000 (Lf) и нативная (свободная) плазмида pGL3 были использованы в качестве контролей. Интересно отметить, что максимальный уровень трансфекции наблюдали в случае липоплексов из трипептида. Таким образом, можно предположить, что на эффективность трансфекции, в первую очередь, влиял липидный состав, а не какой-либо физико-химический параметр липоплексов (диаметр,  $\zeta$ -потенциал, морфология и т.д.), что коррелирует с результатами других исследователей [257].

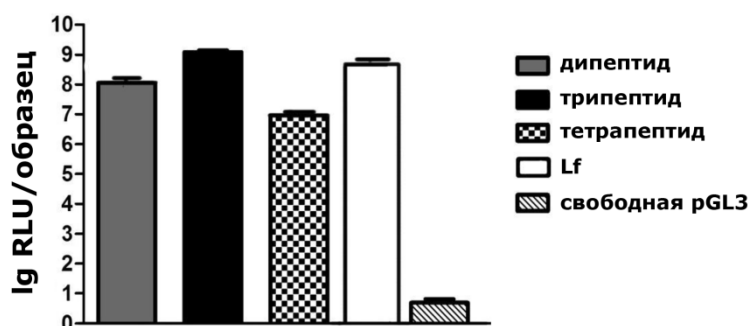


Рисунок 37 – Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т после 24 ч инкубации с pGL3–липоплексами. Контроли: Липофектамин 2000 (Lf); нативная (свободная) pGL3.

Люциферазный анализ

### 3.2.1.5 Исследование накопления липосом и липоплексов в клетках

Накопление и локализацию липосом в клетках НЕК293Т оценивали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Рисунок 38). В случае монослойной культуры клеток (2D модель *in vitro*) максимальное накопление липосом в клетках фиксировали через 30 мин инкубации (см. Рисунок 38 А). При этом из Рисунка 38 Б видно, что накопление липосом в клетках сфероидов происходило значительно медленнее, чем в монослойной культуре. Так, через 30 мин инкубации липосомы в основном адсорбировались на внешней поверхности сфероида, тогда как локализацию их непосредственно внутри сфероидов наблюдали только через 4 ч. Для сравнения уровней накопления липосом во времени (анализ интенсивности флуоресценции), а также их распределения внутри сфероида все микрофотографии подвергали программной обработке (см. Материалы и Методы, 2.5.1) (Рисунок 38 В).

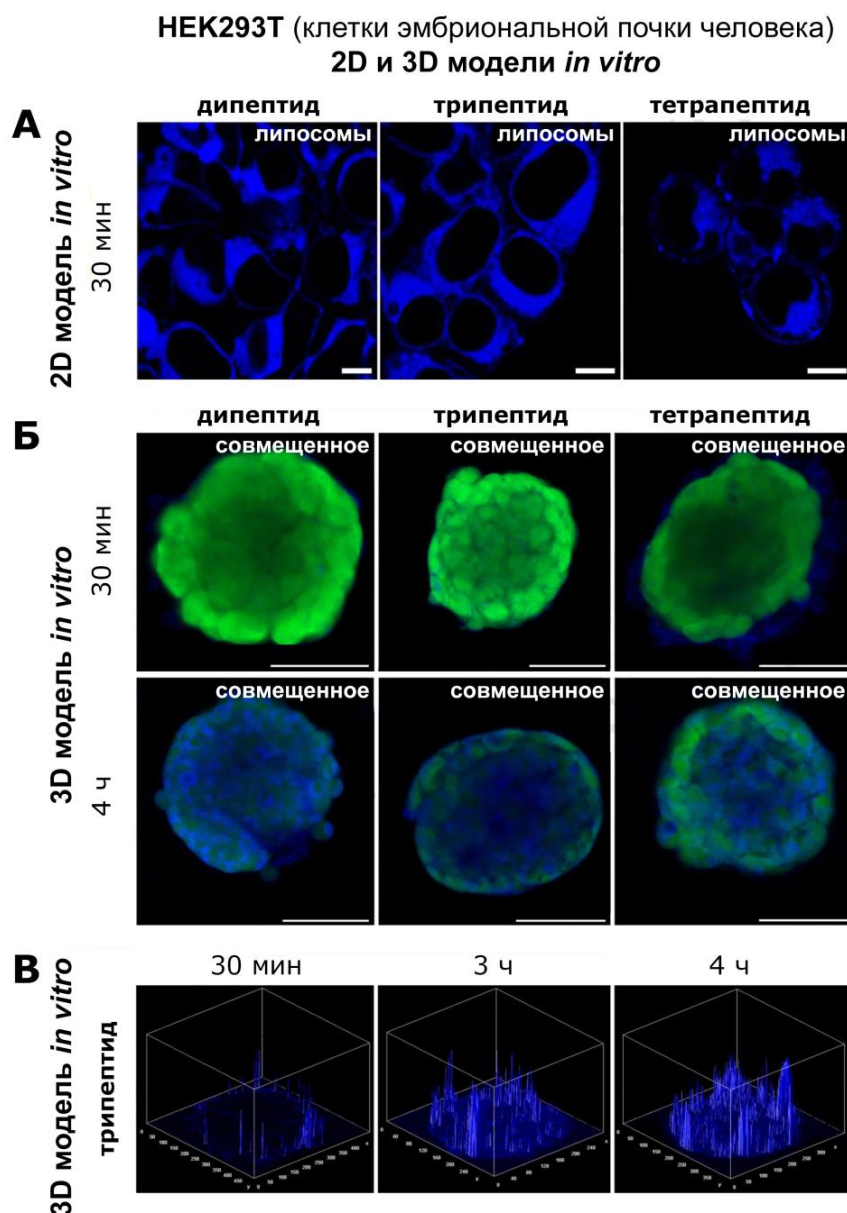


Рисунок 38 – Микрофотографии монослойной культуры (А) и сфероидов (Б) из клеток НЕК293Т после инкубации с липосомами. В – уровни накопления липосом в сфероидах после 30 мин, 3 и 4 ч инкубации. Липосомы (пирен) – синий, клетки сфероидов (Calcein AM) – зеленый. КЛСМ. Шкала – 10 мкм (А) и 50 мкм (Б)

Методом КЛСМ изучали также накопление липоплексов, загруженных модельной миРНК с флуоресцентной Vis-меткой. Показано, что нативная миРНК (контроль) не проникала в клетки даже после 3 ч инкубации, что видно по отсутствию ко-локализации сигналов флуоресцентно-меченных клеточной эндоплазматической сети (ЭПС) и нативной миРНК (Рисунок 39).

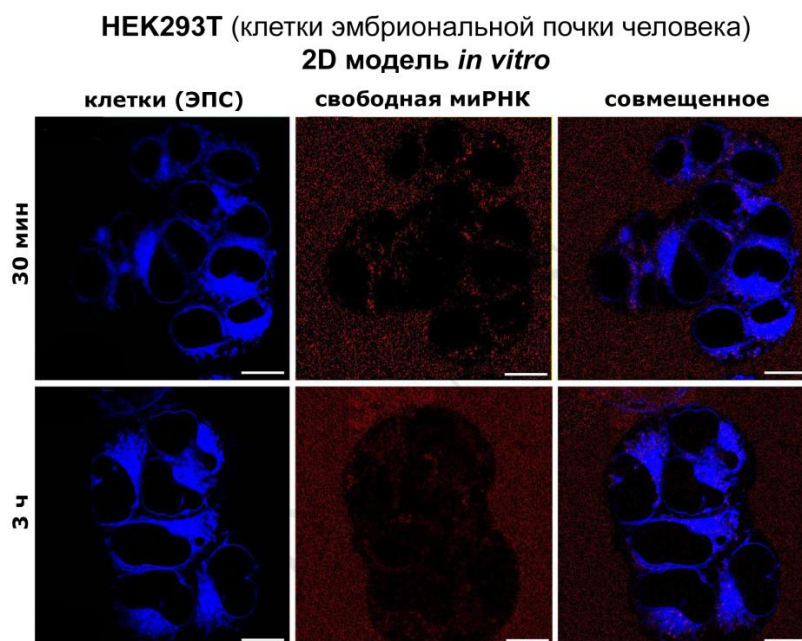


Рисунок 39 – Микрофотографии клеток НЕК293Т после инкубации со свободной миРНК.

ЭПС (ER-tracker) – синий, миРНК (Vic) – красный. КЛСМ. Шкала – 10 мкм

При этом из Рисунка 40 видно, что миРНК в составе липоплексов накапливалась в клетках уже через 30 мин. Кроме того, по ко-локализации сигналов миРНК и липоплексов можно сделать вывод, что миРНК проникала в клетки именно в составе комплекса.

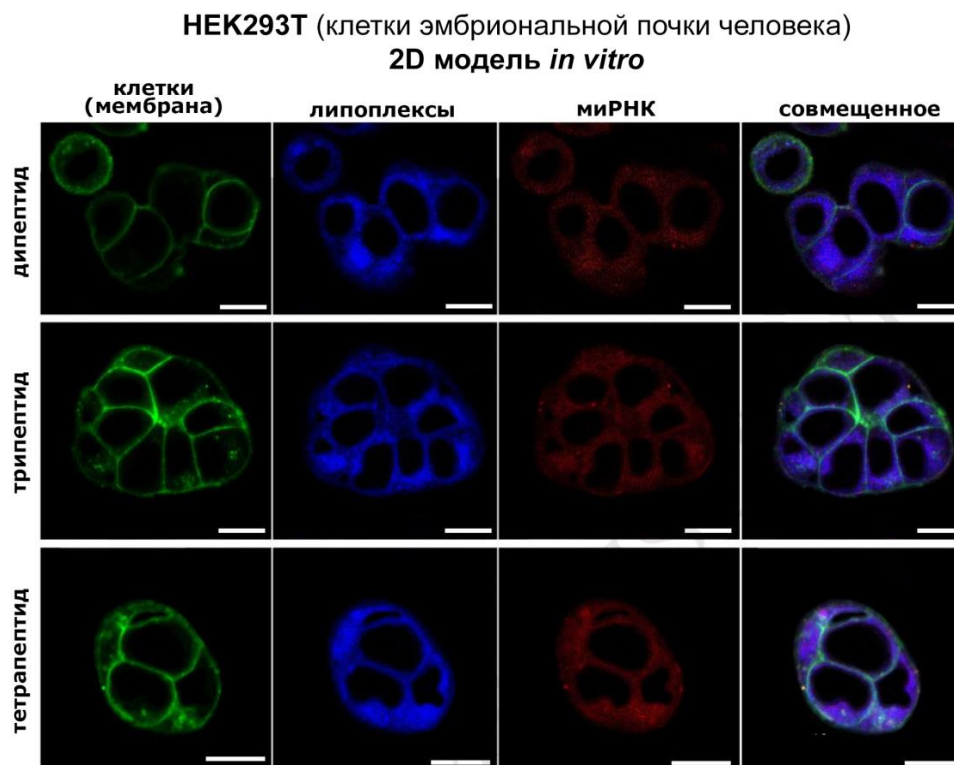


Рисунок 40 – Микрофотографии клеток НЕК293Т после 30 мин инкубации с миРНК–липopleксами. Клеточные мембраны (Neuro-DiO) – зеленый, липopleксы (пирен) – синий, миРНК (Vic) – красный. КЛСМ. Шкала – 10 мкм

Стоит отметить, что разницы в накоплении липосом (см. Рисунок 38) и липоплексов (см. Рисунок 40) не наблюдалось. Таким образом, можно заключить, что загрузка генетического материала в липоплексы не влияла на проникновение наноносителей в клетки.

### 3.2.1.6 Получение ПЭГилированных липосом и липоплексов

Для получения ПЭГилированных липосом и липоплексов в качестве липидной основы нами был выбран липотрипептид по совокупности свойств (низкая цитотоксичность, высокая эффективность трансфекции). В работе было получено три производных ПЭГ, гидрофобные фрагменты которых образованы, соответственно, остатками холестерина (производное **а**), октадециламина (производное **б**) или стеариновой кислоты (производное **в**) (см. Приложение, Рисунок П1). Для формирования липосом использовали следующие концентрации производных ПЭГ: 2, 4, 5, 6, 8, 10 и 15 мол. % (от общего количества липотрипептида), поскольку известно, что введение ПЭГ в количестве от 5 % до 15 % является оптимальным для получения наиболее эффективных систем доставки нуклеиновых кислот [258]. Для получения липоплексов липосомы загружали модельной плазмидой рGL3 или миРНК (соотношение N/P = 32/1 и 64/1). Немодифицированные липосомы (без ПЭГ) использовали в качестве контроля.

### 3.2.1.7 Исследование физико-химических свойств ПЭГилированных липосом и липоплексов

Некоторые физико-химические параметры ПЭГилированных и немодифицированных (без ПЭГ) липосом и липоплексов приведены в Таблице 13. Обнаружено, что введение производных ПЭГ в липосомы приводило к увеличению среднего размера частиц на 10–15 нм во всех образцах. При этом также наблюдали уменьшение среднего диаметра липоплексов по сравнению с диаметром липосом.

Таблица 13 – Средний размер и  $\zeta$ -потенциал ПЭГилированных и немодифицированных липосом и липоплексов на основе липотрипептида

| ПЭГилированные образцы               | Средний диаметр, нм |                    | $\zeta$ -потенциал, мВ |                    |
|--------------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
|                                      | липосомы            | липоплексы с миРНК | липосомы               | липоплексы с миРНК |
| Производное <b>а</b> (6 мол. %)      | 115 ± 9             | 90 ± 7             | 29,91 ± 0,55           | 15,10 ± 0,62       |
| Производное <b>б</b> (6 мол. %)      | 120 ± 10            | 92 ± 9             | 29,47 ± 0,54           | 15,32 ± 0,55       |
| Производное <b>в</b> (6 мол. %)      | 121 ± 8             | 95 ± 12            | 32,36 ± 0,61           | 17,24 ± 0,40       |
| <b>Контроль:</b>                     |                     |                    |                        |                    |
| немодифицированные образцы (без ПЭГ) | 105 ± 7             | 85 ± 15            | 36,41 ± 0,68           | 19,20 ± 0,68       |

Установлено, что введение ПЭГ в структуру липосом приводило к незначительному снижению  $\zeta$ -потенциала, тогда как загрузка миРНК снижала  $\zeta$ -потенциал полученных из липосом липоплексов почти в 2 раза. Это объясняется тем, что ПЭГ является электронейтральной молекулой, которая не должна оказывать существенного влияния на  $\zeta$ -потенциал наноносителя, тогда как нуклеиновые кислоты представляют собой полианионы, способные значительно снизить  $\zeta$ -потенциал при успешном комплексообразовании.

Липосомы и липоплексы были стабильны более 12 месяцев, что подтверждали ежедневным измерением оптической плотности (изменения были в пределах 5 %). Эффективность трансфекции клеток липоплексами также была стабильной в течение года.

Морфологию ПЭГилированных липосом изучали с помощью ТЭМ (Рисунок 41). Видно, что ПЭГилирование не приводило к изменению морфологии наноносителей, но влияло на средний диаметр всех образцов. Отметим, что введение модельной миРНК как в немодифицированные, так и в ПЭГилированные липосомы приводило к образованию липоплексов с характерной «сэндвичеобразной» структурой (см. Рисунок 41 В, Г).

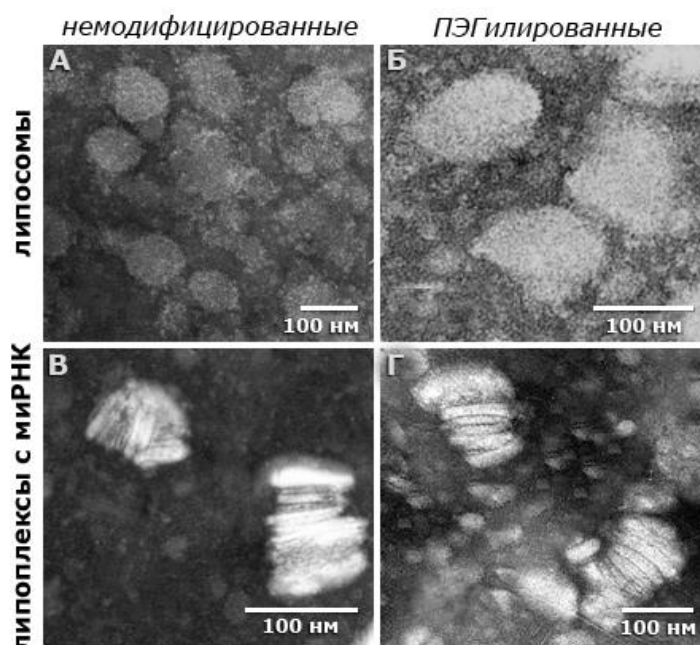


Рисунок 41 – Микрофотографии липосом и миРНК–липopleксов. Производное **б** (6 мол. %, N/P = 32/1). ТЭМ. Шкала – 100 нм

Таким образом, ПЭГилирование липосом и липopleксов привело к незначительному увеличению среднего диаметра и уменьшению положительного заряда частиц, но не влияло на их структуру. При этом комплексообразование с миРНК приводило к образованию липopleксов с характерной «сэндвичеобразной» структурой и вдвое более низким  $\zeta$ -потенциалом по сравнению с липосомами.

## 3.2.1.8 Исследование цитотоксичности ПЭГилированных липосом

Цитотоксичность липосом, содержащих производные ПЭГ **а**, **б** и **в** (2–15 мол. %), изучали с использованием МТТ–теста на клетках НЕК293Т и НерG2 (Таблица 14). В качестве контролей использовали немодифицированные липосомы (без ПЭГ), а также свободные производные ПЭГ **а**, **б** и **в**. Максимальную цитотоксичность проявляли липосомы без ПЭГ ( $IC_{50} 235 \pm 84$  и  $303 \pm 86$  мкг/мл для клеток НЕК293Т и НерG2, соответственно). При этом модификация липосом производными ПЭГ приводила к снижению их токсичности для всех ПЭГилированных образцов. Это можно объяснить тем, что увеличение количества ПЭГ приводило к снижению  $\zeta$ -потенциала липосом, в результате чего их токсичность также снижалась. Кроме того, было установлено, что клетки НЕК293Т были более устойчивы к цитотоксическому действию всех образцов, по сравнению с клетками НерG2.

Таблица 14 – Значения  $IC_{50}$  для ПЭГилированных липосом после 24 ч инкубации с клетками НЕК293Т и НерG2. 2D модель *in vitro*. Результаты МТТ–теста

| Образцы                               |               | IC50, мкг/мл |          |
|---------------------------------------|---------------|--------------|----------|
| ПЭГилированные липосомы               |               | НЕК293Т      | НepG2    |
| 2 мол. %                              | производное а | 354 ± 13     | 319 ± 41 |
|                                       | производное б | 385 ± 65     | 322 ± 56 |
|                                       | производное в | 402 ± 53     | 350 ± 29 |
| 4 мол. %                              | производное а | 361 ± 40     | 338 ± 36 |
|                                       | производное б | 388 ± 58     | 363 ± 41 |
|                                       | производное в | 430 ± 73     | 411 ± 54 |
| 5 мол. %                              | производное а | 367 ± 51     | 332 ± 64 |
|                                       | производное б | 391 ± 30     | 368 ± 80 |
|                                       | производное в | 421 ± 29     | 390 ± 71 |
| 6 мол. %                              | производное а | 345 ± 21     | 328 ± 35 |
|                                       | производное б | 396 ± 82     | 377 ± 17 |
|                                       | производное в | 418 ± 44     | 396 ± 27 |
| 8 мол. %                              | производное а | 370 ± 43     | 341 ± 24 |
|                                       | производное б | 405 ± 40     | 397 ± 62 |
|                                       | производное в | 428 ± 63     | 406 ± 18 |
| 10 мол. %                             | производное а | 398 ± 53     | 372 ± 46 |
|                                       | производное б | 450 ± 42     | 401 ± 32 |
|                                       | производное в | 444 ± 61     | 410 ± 29 |
| 15 мол. %                             | производное а | 448 ± 72     | 417 ± 34 |
|                                       | производное б | 503 ± 63     | 424 ± 30 |
|                                       | производное в | 511 ± 63     | 496 ± 58 |
| Контроли:                             |               |              |          |
| немодифицированные липосомы (без ПЭГ) |               | 235 ± 84     | 303 ± 86 |
| свободное производное а               |               | > 1000       |          |
| свободное производное б               |               |              |          |
| свободное производное в               |               |              |          |

$IC_{50}$  – полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Стоит отметить, что даже немодифицированные липосомы (с минимальными значениями IC<sub>50</sub>) проявляли умеренную токсичность для обеих клеточных линий. Таким образом, принимая во внимание средние показатели цитотоксичности, ПЭГилированные липосомы можно считать безопасными для клеток в определенном диапазоне концентраций.

### 3.2.1.9 Исследование трансфекции клеток ПЭГилированными липоплексами

Эффективность трансфекции клеток ПЭГилированными pGL3–липopleксами оценивали с помощью люциферазного теста (Рисунок 42). Результаты представлены как уровень RLU на 10<sup>5</sup> клеток.

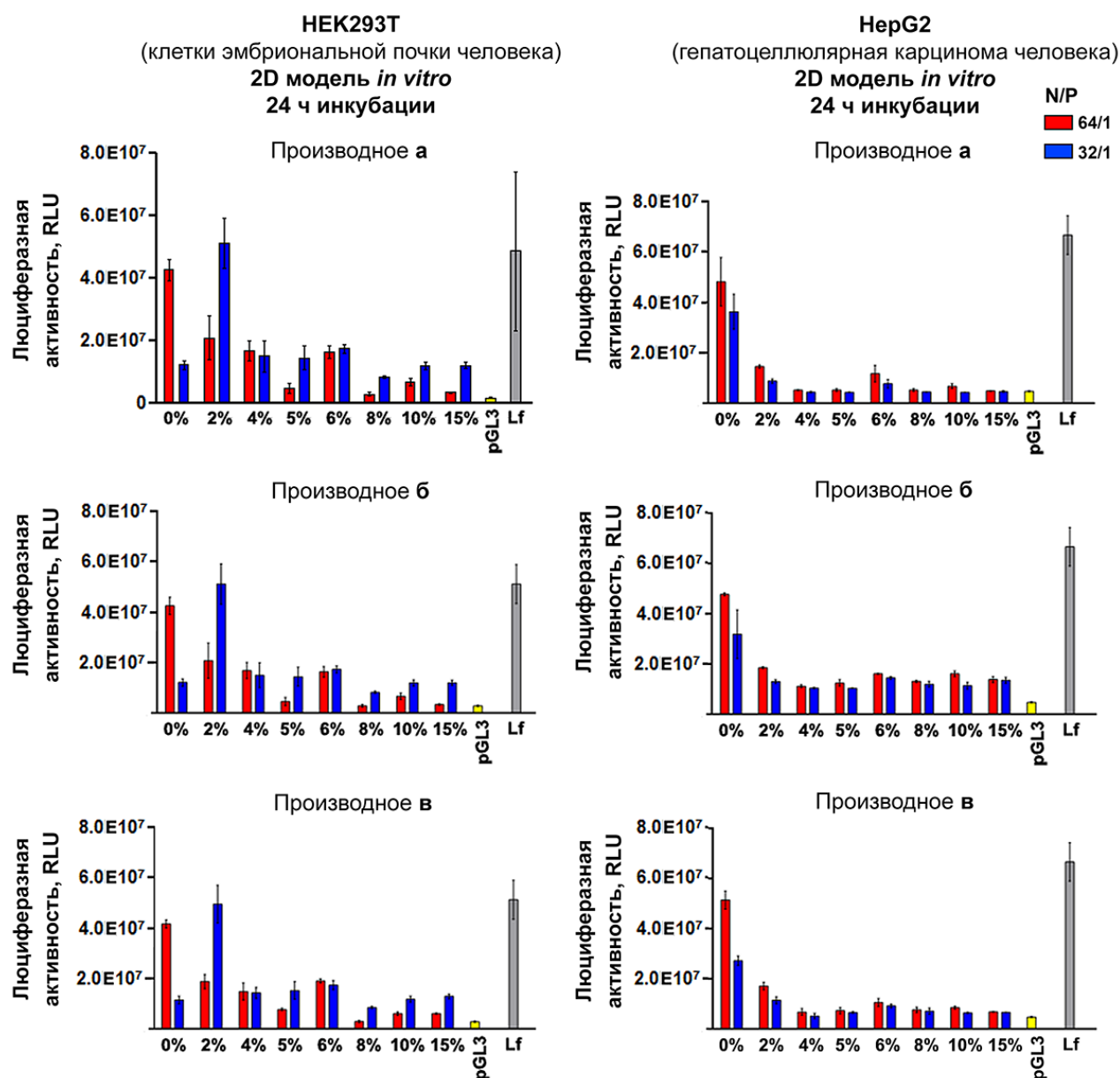


Рисунок 42 – Эффективность трансфекции клеток HEK293T и НерG2 ПЭГилированными pGL3–липopleксами. Контроли: немодифицированные липосомы (без ПЭГ); Липофектамин 2000 (Lf); нативная плаزمида pGL3. Люциферазный анализ

Как видно из Рисунка 42, для клеток НЕК293Т результаты для всех трех производных ПЭГ были сходными, а максимальную эффективность трансфекции наблюдали при введении 2–6 мол. % ПЭГ (средний диапазон для производных **а**, **б**, **в** и обеих клеточных линий). Следует отметить, что для обеих клеточных линий увеличение содержания ПЭГ > 6 мол. % либо не оказывало существенного влияния на эффективность трансфекции, либо приводило к ее снижению. Известно, что клетки НерG2 являются плохо трансфицируемой линией, тогда как клетки НЕК293Т, напротив, считаются хорошо трансфицируемой линией [259]. Таким образом, как и ожидалось, максимальную эффективность трансфекции наблюдали в случае клеток НЕК293Т для всех производных ПЭГ (2 мол. %, N/P = 32/1). Что касается плохо трансфицируемых клеток НерG2, эффективность трансфекции с использованием производного **б** была выше, чем в случае производных **а** и **в**. Таким образом, производное ПЭГ **б** выбрали в качестве наиболее перспективного образца для дальнейшего изучения.

На Рисунке 43 видно, что через 48 ч инкубации эффективность трансфекции некоторых образцов увеличилась почти в два раза по сравнению с результатами, полученными после 24 ч (см. Рисунок 42). Так, через 48 ч эффективность трансфекции клеток ПЭГилированными липоплексами превысила уровень трансфекции с использованием немодифицированных липоплексов, а также Липофектамина 2000 (положительный контроль) для обеих клеточных линий. Стоит особо отметить, что за счет увеличения времени инкубации с 24 до 48 ч удалось увеличить эффективность трансфекции даже для плохо трансфицируемой клеточной линии НерG2. Таким образом, после 48 ч максимальные уровни трансфекции для обеих клеточных линий были получены для образцов с производным ПЭГ **б** (4–6 мол. %, N/P = 32/1) – эти параметры были выбраны как оптимальные для следующих экспериментов.

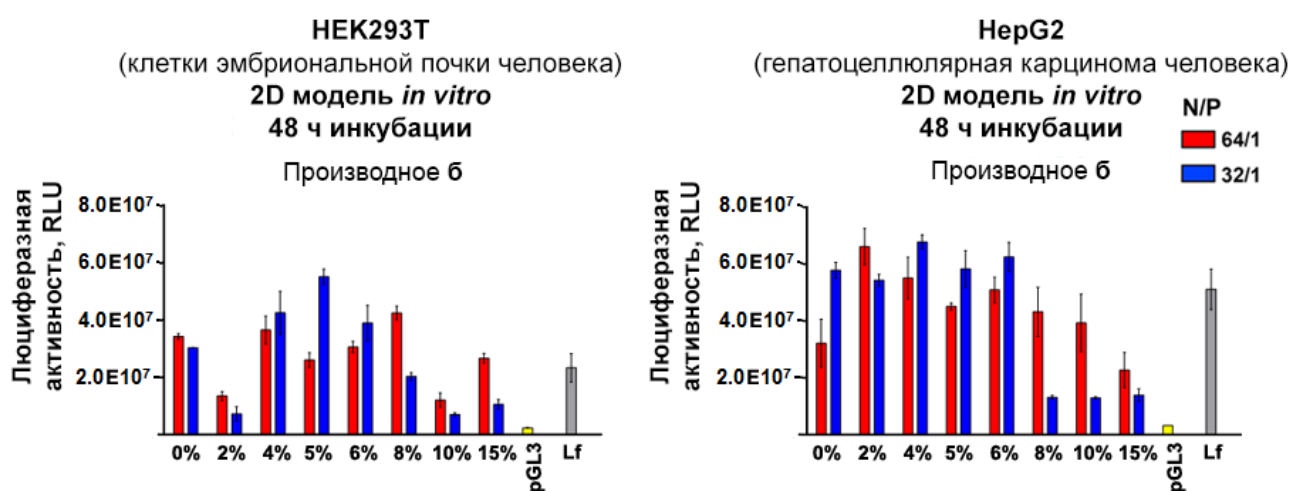


Рисунок 43 – Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т и НерG2 ПЭГилированными pGL3–липopleксами (производное ПЭГ **б**). Контроли: немодифицированные липосомы (без ПЭГ); Липофектамин 2000 (Lf); нативная плазмида pGL3. Люциферазный анализ

Предполагалось, что предложенная система доставки должна быть универсальной, то есть способной эффективно инкапсулировать и переносить как ДНК, так и РНК. Таким образом, представлялось интересным оценить также трансфекционную активность миРНК–липоплексов, полученных из выбранного образца (производное ПЭГ **б**, N/P = 32/1). Эффективность трансфекции клеток с помощью миРНК определяли путем измерения количества подавленных копий гена UTR (Таблица 15). Видно, что увеличение количества ПЭГ в составе липоплексов приводило к снижению эффективности трансфекции по сравнению с немодифицированными образцами. Вероятно, это связано с тем, что ПЭГилированным липоплексам требуется больше времени для накопления в клетках и высвобождения миРНК, чем немодифицированным (без ПЭГ). Схожие результаты наблюдались также в экспериментах по трансфекции клеток рGL3–липоплексами, в которых эффективность трансфекции ПЭГилированными образцами существенно возросла после 48 ч инкубации (см. Рисунок 43) по сравнению с таковой после инкубации в течение 24 ч (см. Рисунок 42).

Таблица 15 – Число подавленных копий гена UTR на 1 мкг общей миРНК после 24 ч инкубации клеток НЕК293Т и НерG2 с миРНК–липоплексами (производное ПЭГ **б**, N/P = 32/1). 2D модель *in vitro*. Ко-трансфекция с последующим ПЦР–анализом

| Образцы липоплексов с миРНК    | Число копий гена UTR в клетках |                |
|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
|                                | НерG2                          | НЕК293Т        |
| немодифицированные (без ПЭГ)   | 192 281 ± 85                   | 202 475 ± 87   |
| 2 мол. % производное <b>б</b>  | 296 703 ± 94                   | 541 277 ± 48   |
| 6 мол. % производное <b>б</b>  | 806 245 ± 74                   | 840 028 ± 89   |
| 10 мол. % производное <b>б</b> | 954 528 ± 55                   | 879 530 ± 36   |
| 15 мол. % производное <b>б</b> | 1 555 825 ± 39                 | 1 357 517 ± 24 |
| <b>Контроли:</b>               |                                |                |
| Липофектамин 2000              | 85 813 ± 61                    | 316 822 ± 90   |
| свободная миРНК                | 7 251 471 ± 97                 | 972 287 ± 60   |

Таким образом, было показано, что вид производного ПЭГ (**а**, **б** или **в**) не оказывал существенного влияния на эффективность трансфекции, тогда как общий % введения ПЭГ в состав наноносителя значительно сказывался на эффективности трансфекции клеток как миРНК–липоплексами, так и рGL3–липоплексами. Принимая во внимание полученные результаты, липоплексы, содержащие 4–6 мол. % ПЭГ с соотношением N/P = 32/1 были выбраны как наиболее перспективные с точки зрения создания систем доставки нуклеиновых кислот.

### 3.2.1.10 Исследование накопления ПЭГилированных липосом в клетках

Количественная оценка накопления ПЭГилированных липосом в клетках НЕК293Т и НерG2 проведена с помощью проточной цитофлуориметрии и флуориметрии (Рисунок 44). Видно, что вне зависимости от модели (2D или 3D) и типа клеток, поглощение клетками немодифицированных липосом (без ПЭГ) происходило наиболее интенсивно по сравнению с другими образцами. Так, их максимальные уровни накопления были достигнуты после 1 ч инкубации в случае монослойной культуры (83 % и 87 % для клеток НЕК293Т и НерG2) и через 4 ч в случае сфероидов (77 % и 73 %, соответственно).

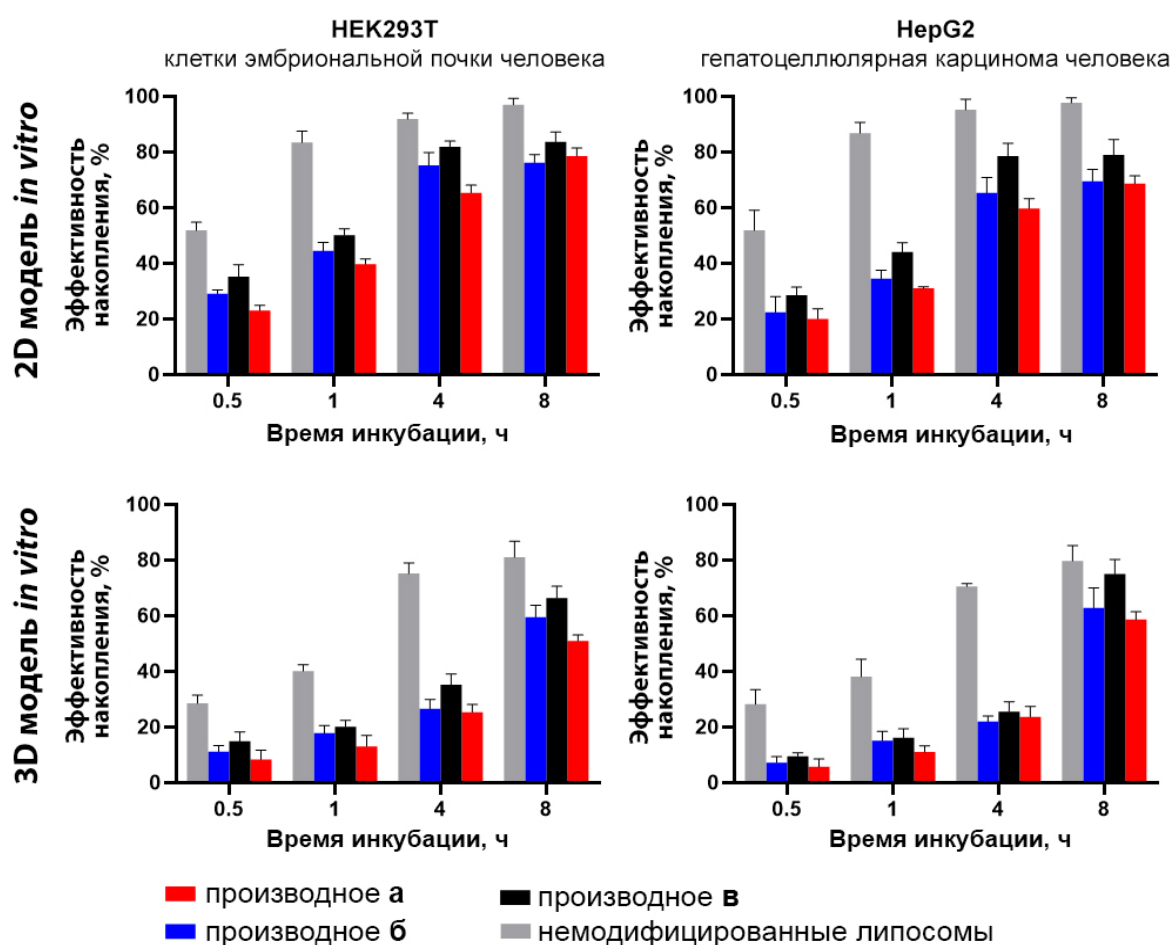


Рисунок 44 – Эффективность накопления ПЭГилированных (6 мол. %, N/P = 32/1) липосом в клетках НЕК293Т и НерG2. Контроль – немодифицированные липосомы (без ПЭГ).

Проточная цитофлуориметрия (2D модель *in vitro*) и флуориметрия (3D модель *in vitro*)

При этом накопление ПЭГилированных липосом происходило примерно одинаково (вне зависимости от производного ПЭГ) в течение всего эксперимента и достигало максимального уровня (62, 73, 80 % для клеток НЕК293Т и 58, 63, 79 % для клеток НерG2 для производных а, б и в, соответственно) после 4 ч инкубации с монослойной культурой клеток. В случае сфероидов поглощение всех образцов происходило значительно медленнее,

и максимальные уровни ПЭГилированных после 8 ч инкубации составляли 56, 60, 68 % для клеток НЕК293Т и 58, 63, 74 % для клеток НерG2 (для производных **а**, **б** и **в**, соответственно).

Качественную оценку накопления и локализации липосом в клетках НЕК293Т осуществляли с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием производного ПЭГ **б** (Рисунок 45). Обнаружено, что введение ПЭГ **б** в структуру липосом снижало эффективность их проникновения в клетки по сравнению с таковой в случае немодифицированных липосом (без ПЭГ), что соотносится с результатами проточной цитофлуориметрии и флуориметрии (см. Рисунок 44).

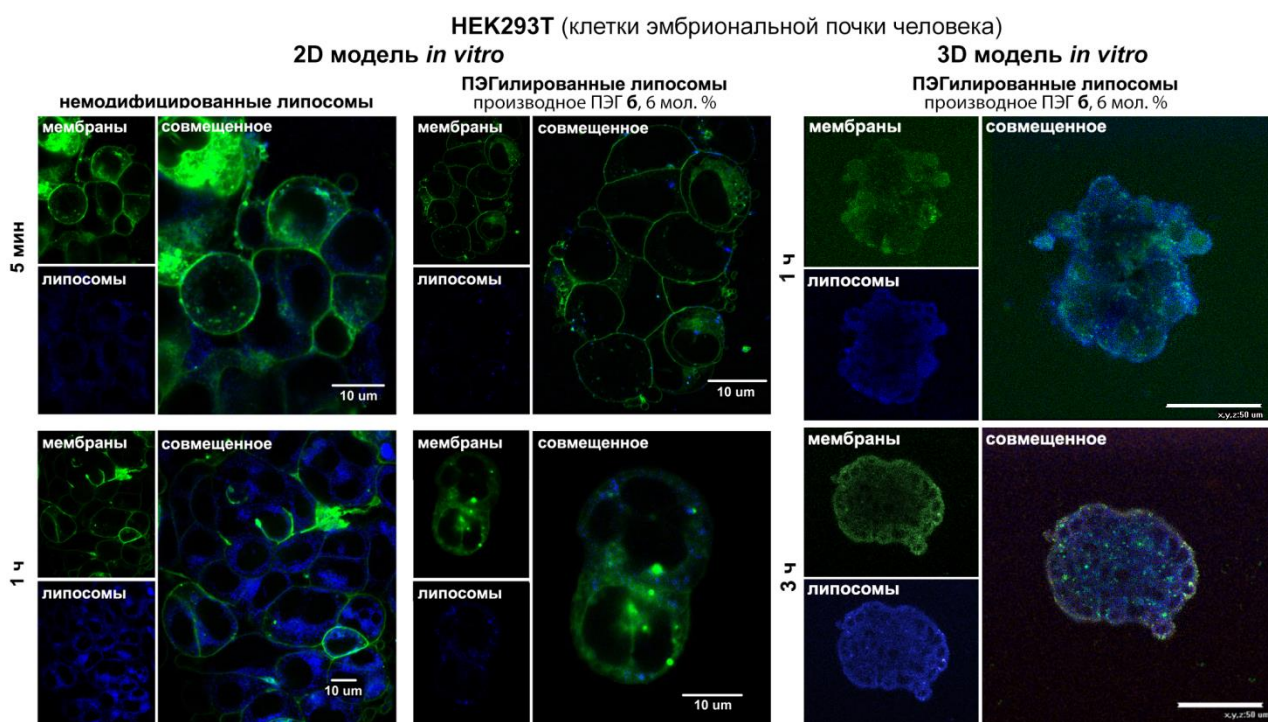


Рисунок 45 – Микрофотографии монослойной культуры и сфероидов из клеток НЕК293Т после инкубации с немодифицированными (без ПЭГ) и ПЭГилированными липосомами. Липосомы (пирен) – синий, клеточные мембраны (Neuro-DiO) – зеленый. КЛСМ. Шкала – 10 мкм (2D модель *in vitro*) и 50 мкм (3D модель *in vitro*)

Так, в случае 2D модели *in vitro* немодифицированные липосомы были локализованы во внутриклеточном пространстве уже после 5 мин инкубации, тогда как количество интернализированных клетками ПЭГилированных липосом было ниже даже после инкубации в течение 1 ч. Такую разницу можно объяснить различиями в физико-химических свойствах немодифицированных и ПЭГилированных липосом. Так, можно предположить, что благодаря амфифильной природе катионных липидов, меньшие по размеру немодифицированные липосомы, могут высвобождать свое содержимое внутри клеток после

слияния с отрицательно заряженной клеточной мембраной по механизму неселективного макропиноцитоза, тогда как ПЭГилированные липосомы (из-за своего большего размера и более низкого  $\zeta$ -потенциала) проникают в клетки путем эндоцитоза, который, как известно, является более медленным, чем макропиноцитоз [260].

В случае 3D модели *in vitro* ПЭГилированные липосомы адсорбировались на внешней поверхности сфероидов после 1 ч инкубации, а после 3 ч наблюдались уже непосредственно во внутреннем объеме сфероидов. Приведенные результаты коррелируют с данными, полученными в экспериментах по накоплению немодифицированных липосом разного липидного состава (см. Рисунок 38).

Таким образом, можно заключить, что накопление всех ПЭГилированных липосом в клетках занимало в 2–4 раза больше времени по сравнению с немодифицированными образцами (без ПЭГ). Следует также отметить, что накопление ПЭГилированных липосом в клетках монослойной культуры и в сфероидов НерG2 происходило менее интенсивно, чем в НЕК293Т, что хорошо согласуется с результатами экспериментов по эффективности трансфекции (см. Рисунки 42 и 43, а также Таблицу 15). Кроме того, эффективность накопления всех липосом (как ПЭГилированных, так и немодифицированных ПЭГ) снижалась в два и более раз в случае 3D модели *in vitro* по сравнению с монослойной культурой клеток. Это можно объяснить более сложной многослойной и объемной структурой сфероидов, затрудняющей и замедляющей попадание образцов в клетки.

### 3.2.1.11 Исследование ПЭГилированных липоплексов в модели *in vivo*

Для данного эксперимента были выбраны ПЭГилированные миРНК–липopleксы (производное ПЭГ **б**, 6 мол. %, N/P = 32/1) на основе анализа результатов по эффективности трансфекции и цитотоксичности. Биораспределение липоплексов изучали на мышах (*in vivo*) с помощью ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией (Таблица 16). Для этого самки мышей BALB/c были разделены на 15 групп: 7 групп получили немодифицированные липоплексы (0 мол. % ПЭГ), 7 группам вводили ПЭГилированные липоплексы (производное **б**, 6 мол. %, N/P = 32/1), и 1 группу использовали в качестве необработанного контроля. Каждому животному внутривенно вводили дозу меченных пиреном липоплексов, содержащих Vis-меченную миРНК в растворе глюкозы. Максимальная концентрация липоплекса в крови наблюдалась через 2 мин после внутривенного введения. Было обнаружено, что период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) ПЭГилированных липоплексов был в два раза выше (9,71 мин), чем у немодифицированных липоплексов (4,15 мин).

Таблица 16 – Фармакокинетические параметры ПЭГилированных и немодифицированных миРНК–липоплексов

| Образец                                                                  | $C_{\max}$ | $T_{\max}$ | $t_{1/2}$ | AUC(T) | AUMC(T)  |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|------------|-----------|--------|----------|
| немодифицированные липоплексы                                            | 42,87      | 2,00       | 4,15      | 554,84 | 5964,90  |
| ПЭГилированные липоплексы<br>(производное <b>б</b> , 6 мол. %, N/P 32/1) | 63,14      | 2,00       | 9,71      | 685,48 | 71589,98 |

Статистика рассчитана на основе 6 результатов в каждой группе.

$C_{\max}$  – максимальная достигнутая концентрация препарата в плазме крови после введения.

$T_{\max}$  – время, необходимое для достижения  $C_{\max}$ .

$t_{1/2}$  – период полувыведения, т.е. время, необходимое для уменьшения вдвое концентрации препарата в крови.

AUC – интеграл кривой зависимости концентрации от времени (после однократного введения или в стационарном состоянии).

AUMC – площадь под кривой первого момента.

Распределение липоплексов изучали в иммунных органах (тимус и селезенка), неиммунных органах (легкие, головной мозг и мышцы бедра), а также в органах выведения (почки и печень). Как видно из Рисунка 46, липоплексы не были обнаружены в жизненно важных органах (мозг, тимус, мышцы), что свидетельствовало об отсутствии их токсического воздействия на центральную нервную, а также иммунную и двигательную системы.

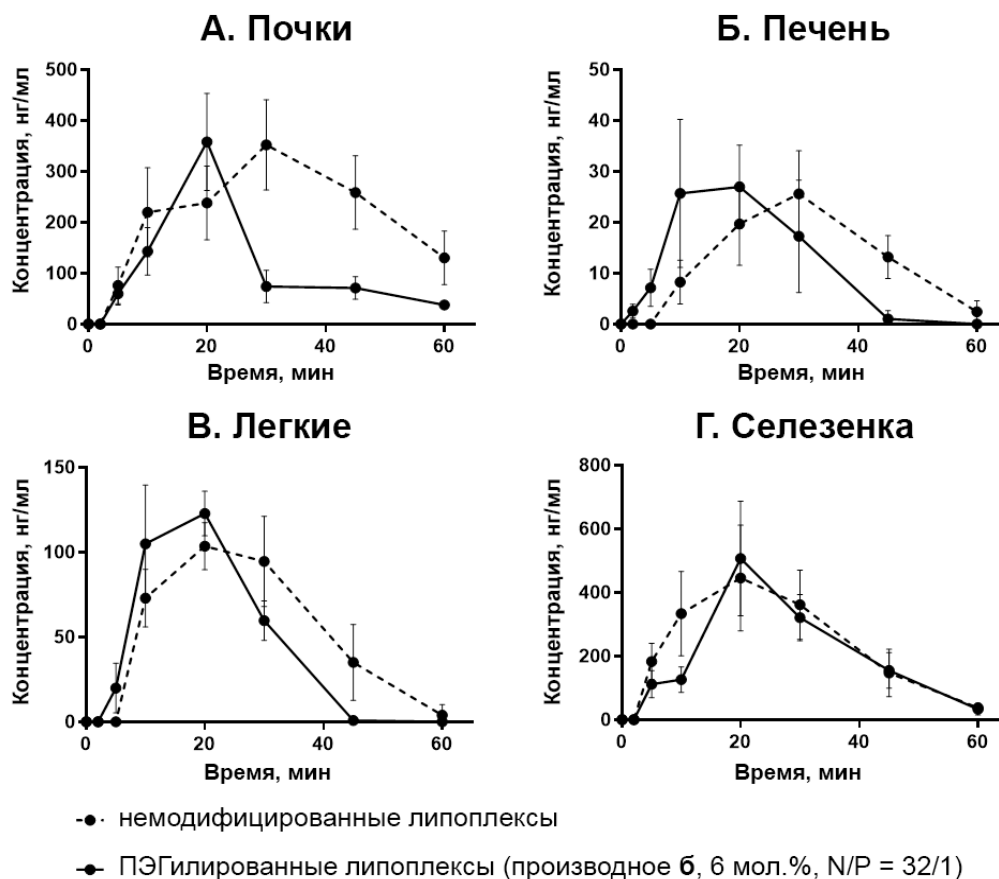


Рисунок 46 – Кинетика накопления миРНК–липоплексов в почках (А), печени (Б), легких (В) и селезенке (Г) мыши

Максимальную разницу между кривыми концентрации для немодифицированных (без ПЭГ) и ПЭГилированных липоплексов наблюдали в почках: время достижения максимальной концентрации ( $T_{\max}$ ) составляло 20 и 30 мин для ПЭГилированных и немодифицированных липоплексов, соответственно (Рисунок 46 А). Стоит отметить, что форма фармакокинетической кривой зависела от типа наноносителя. Так, немодифицированные липоплексы обладали более плавными профилями накопления и выведения, тогда как для ПЭГилированных носителей обнаружили резкое увеличение и снижение уровней накопления. Это различие можно объяснить различными путями выведения немодифицированных и ПЭГилированных липоплексов из организма.

Из Рисунка 46 А видно, что ПЭГилированные липоплексы практически сразу фильтровались и немедленно удалялись почками, что хорошо согласуется с результатами, полученными ранее [261]. Кроме того, можно сделать вывод, что ПЭГилированные липоплексы имели тенденцию накапливаться в печени (Рисунок 46 Б) быстрее и в более высоких концентрациях, чем немодифицированные. Отметим также, что ПЭГилирование приводило к небольшому увеличению максимальной концентрации липоплексов в легких и селезенке (Рисунок 46 В, Г). Усиленное накопление ПЭГилированных липоплексов в этих органах иммунной системы может указывать на потенциальное повышение их иммуногенности.

### *Заключение*

Таким образом, были разработаны катионные липоплексы, сформированные на основе трех катионных липопептидов, различающихся количеством положительно заряженных групп (2, 3 или 4) в составе полярной головки. Изучена взаимосвязь между структурой липопептида и размером полученных на его основе липосом/липоплексов, их морфологией, цитотоксичностью, трансфекционной активностью и эффективностью накопления в клетках. Липосомы на основе липотрипептида были выбраны для дальнейшей модификации (ПЭГилирования), исходя из полученных результатов (низкая цитотоксичность, высокая эффективность трансфекции).

ПЭГилирование липосом проводили с использованием трех новых производных ПЭГ, различающихся структурой гидрофобного фрагмента. Для формирования липоплексов проводили комплексообразование с модельной плазмидой ДНК рGL3 или миРНК.

Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т или НерG2 изучали с помощью люциферазного теста (для рGL3–липоплексов) или методом ко-трансфекции с последующим ПЦР-анализом (для миРНК–липоплексов). Установлено, что предложенные липосомальные носители способны эффективно инкапсулировать как миРНК, так и ДНК, а также успешно

доставлять их в клетки HEK293T и HepG2, различающиеся восприимчивостью к трансфекции. За счет увеличения времени инкубации с 24 до 48 ч удалось увеличить эффективность трансфекции даже для плохо трансфицируемой клеточной линии HepG2. Было показано, что липоплексы с производным ПЭГ **6** (6 мол. %, N/P 32/1) являются перспективными наноносителями для трансфекции клеток.

Накопление и локализация липосом/липоплексов исследована на клетках HEK293T и HepG2 как в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*), так и в мультиклеточных сфероидсах (3D модель *in vitro*). Как и ожидалось, в сфероидсах накопление всех наноносителей проходило медленнее и занимало в два раза больше времени, чем в случае монослойной культуры. При этом поглощение клетками ПЭГилированных образцов происходило в 2–4 раза медленнее, чем немодифицированных (без ПЭГ).

Исследование биораспределения в модели *in vivo* показало, что ПЭГилированные миРНК-липлексы выводились из кровотока в два раза медленнее, чем немодифицированные, что хорошо согласуется с результатами по накоплению образцов в 3D модели *in vitro*.

Таким образом, были разработаны новые катионные ПЭГилированные липоплексы для доставки и пролонгированного высвобождения генетического материала (ДНК, РНК), которые были изучены как в модели *in vitro*, так и в модели *in vivo*.

### 3.2.2 Керасомы

#### 3.2.2.1 Получение керасом

Керасомы получали из амфифильных керасом-образующих липоаминокислот (CFLA) (Рисунок 47). Были получены так называемые «чистые» керасомы, которые содержали только CFLA (100 мол. %), и «смешанные» керасомы, содержащие помимо CFLA разрыхляющий липид DPPC (1:1, масс).

Для формирования чистых и смешанных керасом предварительно синтезировали нейтральные **(1)** и катионные **(2)** CFLA (см. Приложение, Рисунок П2) [262]. Таким образом, всего было получено четыре образца, а именно:

- чистые нейтральные керасомы **(1)** (CFLA 100%, масс);
- чистые катионные керасомы **(2)** (CFLA 100%, масс);
- смешанные нейтральные керасомы **(1) + DPPC** (1:1, масс.);
- смешанные катионные керасомы **(2) + DPPC** (1:1, масс).

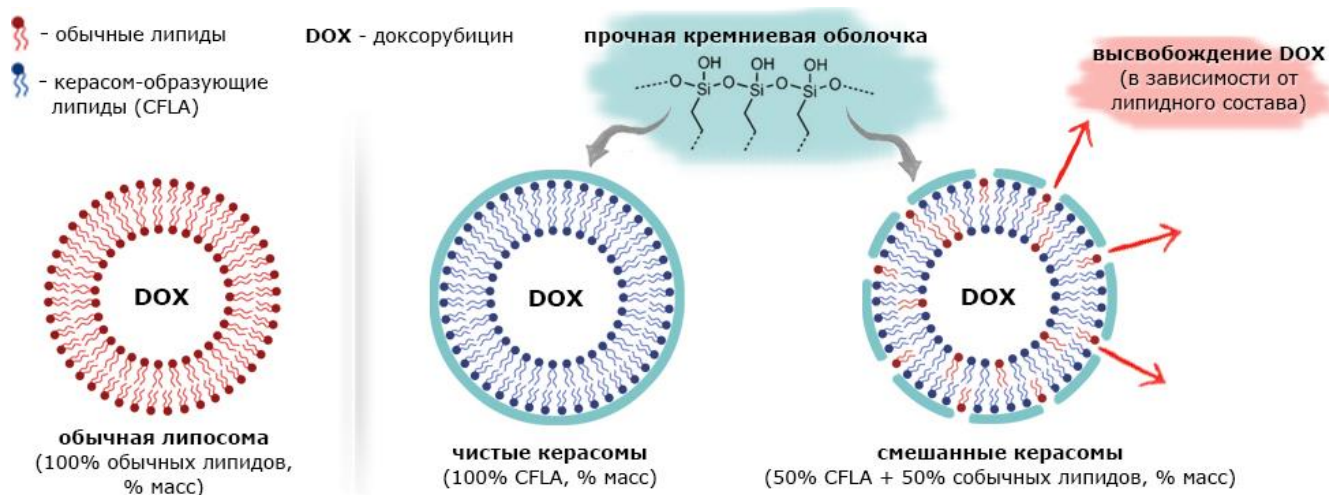


Рисунок 47 – Схематичное изображение обычных липосом, чистых и смешанных керасом

Известно, что CFLA должны содержать четыре основных блока: кремний-содержащий фрагмент, линкер, а также гидрофильный и гидрофобный домены. Нами была выбрана комбинация блоков, обеспечивающая формирование наиболее устойчивых CFLA. Особое внимание было уделено выбору линкера (остаток янтарного ангидрида), поскольку амидные связи в его структуре обеспечивают дополнительную стабилизацию липидов [263,264]. Гидрофильный домен представлен *L*-аспарагиновой кислотой, которая позволяет образовывать более упорядоченный и стабильный бислой, а гидрофобный домен – дециловым спиртом, который обеспечил получение керасом маленького диаметра, но с большим полезным внутренним объемом. Для синтеза катионных CFLA в их гидрофильный домен был также дополнительно введен остаток *L*-орнитина. В качестве кремниевого компонента был выбран (3-аминопропил)триэтоксисилан, поскольку экранирование силоксанового остатка этильными заместителями предотвращает его преждевременную полимеризацию при синтезе и хранении CFLA. Следует также отметить, что присоединение кремниевого фрагмента к CFLA осуществляли на последнем этапе синтеза, что позволило предотвратить преждевременную полимеризацию силоксана. Предложенная схема поэтапного наращивания структуры CFLA позволяет легко заменять структурные блоки, получая CFLA разного типа и, следовательно, может обеспечить оптимизацию процесса.

Известно, что получение керасом следует проводить в присутствии кислоты или основания [265,266]. В данной работе для получения керасом использовали два золь-гель метода (см. Приложение, Рисунок П3). Первый подход основан на классическом методе гидратации тонкой липидной пленки. В этом случае модельный лекарственный препарат доксорубицин вводили в 5 % растворе уксусной кислоты. Таким образом, полимеризация силоксана, образование бислоя и загрузка керасом DOX происходили одновременно. Однако следует отметить, что этот метод не может быть использован для инкапсулирования

различных рН-чувствительных биоактивных молекул, таких как пептиды, белки, ДНК и пр. Именно поэтому нами был разработан второй подход к получению керасом, позволяющий преодолеть эти ограничения. Для этого на первой стадии была проведена полимеризация силоксановой сети в 10 % растворе уксусной кислоты, а на втором этапе – непосредственно загрузка DOX и формирование керасом в нейтральной среде. Таким образом, второй подход может быть предложен для инкапсулирования любых рН-чувствительных биомолекул при нейтральном рН, что очень важно для сохранения биоактивности этих соединений. Загрузка DOX составила 40 % масс., а эффективность инкапсулирования DOX – 91-92 % для всех образцов.

### 3.2.2.2 Исследование физико-химических свойств керасом

Некоторые физико-химические параметры керасом приведены в Таблице 17. Видно, что использование катионных CFLA позволило увеличить  $\zeta$ -потенциал чистых керасом в 4 раза, а именно с  $11,1 \pm 0,9$  мВ для образца **(1)** до  $40,0 \pm 2,7$  мВ для образца **(2)**; а смешанных керасом – почти в 6 раз с  $4,3 \pm 0,5$  мВ для образца **(1)+DPPC** до  $23,2 \pm 1,4$  мВ для образца **(2)+DPPC**. Введение DPPC в состав смешанных керасом приводило к увеличению их диаметра примерно в 1,5 раза, в частности с 150 нм и 186 нм для образцов **(1)** и **(2)** до 231 нм и 247 нм для образцов **(1)+DPPC** и **(2)+DPPC**, соответственно. При этом  $\zeta$ -потенциалы смешанных керасом были в 2 раза меньше, чем соответствующие величины для образцов чистых керасом.

Таблица 17 – Физико-химические параметры керасом

| Образцы керасом                                | Средний диаметр, нм | PDI  | $\zeta$ -потенциал, мВ |
|------------------------------------------------|---------------------|------|------------------------|
| чистые нейтральные керасомы <b>(1)</b>         | 150                 | 0,08 | $11,1 \pm 0,9$         |
| чистые катионные керасомы <b>(2)</b>           | 186                 | 0,09 | $40,0 \pm 2,7$         |
| смешанные нейтральные керасомы <b>(1)+DPPC</b> | 231                 | 0,13 | $4,3 \pm 0,5$          |
| смешанные катионные керасомы <b>(2)+DPPC</b>   | 247                 | 0,11 | $23,2 \pm 1,4$         |

Морфологию образцов **(1)** и **(1)+DPPC**, заметно различающихся по среднему диаметру (150 и 231 нм, соответственно), изучали методом ТЭМ (Рисунок 48). В случае чистых нейтральных керасом **(1)** наблюдали везикулы сферической формы с размерами в диапазоне 90-150 нм. В случае образца **(1)+DPPC** керасомы также имели сферическую форму и средний диаметр в диапазоне 180-330 нм. Размеры частиц, полученные по изображениям ТЭМ, хорошо согласуются с данными DLS (см. Таблицу 17).

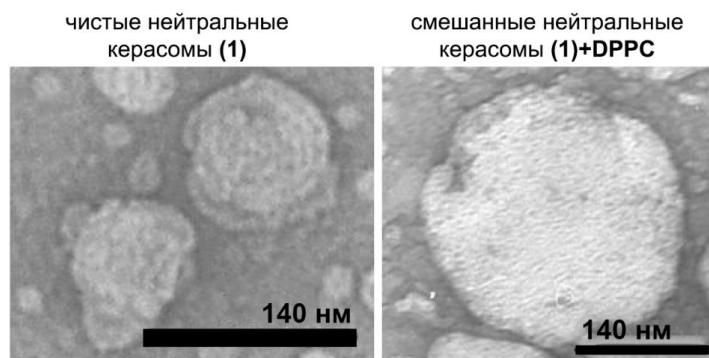


Рисунок 48 – Микрофотографии керасом. ТЭМ. Шкала – 140 нм

Известно, что основной недостаток обычных липосом связан с их низкой стабильностью, в частности, с образованием в суспензии крупных агрегатов, которые быстро выпадают в осадок. В связи с этим повышение стабильности наноносителей было одной из задач данной работы. Стабильность чистых и смешанных керасом, загруженных DOX, изучали в течение 4 месяцев. Обнаружено, что чистые нейтральные (1) и чистые катионные (2) керасомы были стабильны не менее 120 дней, в то время как смешанные нейтральные (1)+DPPC и смешанные катионные (2)+DPPC керасомы сохраняли стабильность только в течение 30 и 40 дней, соответственно. Это можно объяснить достаточно низким поверхностным зарядом смешанных керасом и, как следствие, их более быстрой агрегацией. Тем не менее, следует отметить, что стабильность даже смешанных керасом была в два раза выше, чем обычных липосом (DPPC, 100 мол. %), использованных как контроль (14 дней).

Эффективность высвобождения DOX из керасом была изучена спектрофотометрически (Рисунок 49). Принимая во внимание устойчивость полисилоксановой сети, предполагалось, что керасомы механически будут более стабильными, и, следовательно, высвобождение лекарственного препарата будет происходить медленнее, чем из обычных липосом на основе DPPC (контроль).

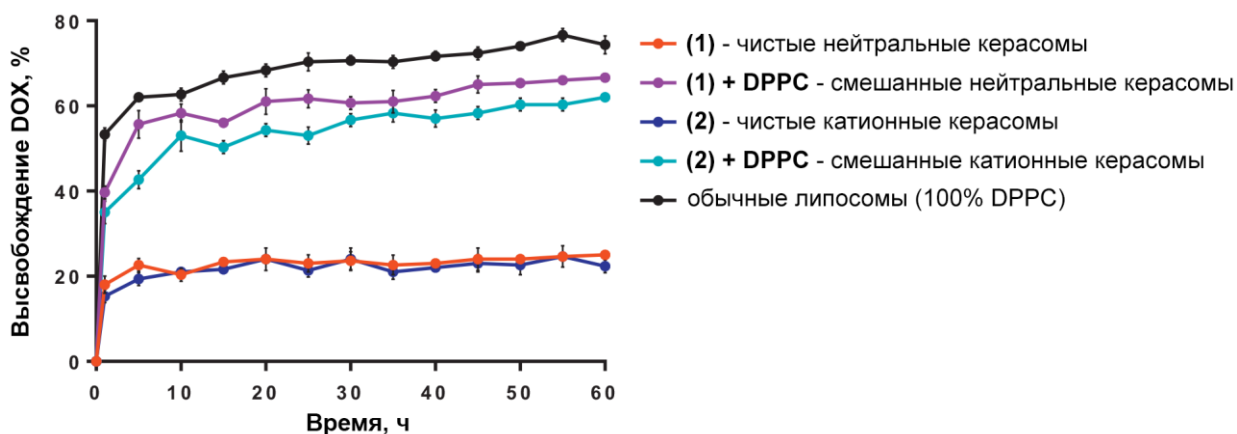


Рисунок 49 – Профили высвобождения доксорубидина из керасом. Контроль – обычные липосомы из DPPC (100 % масс). Диализ *in vitro*

Из Рисунка 49 видно, что существенной разницы в профилях высвобождения DOX из смешанных керасом и обычных липосом не наблюдали. Так, максимальный уровень высвобождения DOX составил 77 % для обычных липосом, тогда как для смешанных керасом соответствующие величины составили 64 % для образца (1)+DPPC и 60 % для образца (2)+DPPC. При этом для чистых керасом (1) и (2) высвобождение DOX составило только 27 и 25 %, соответственно. Очень быстрое высвобождение препарата («эффект взрыва») из всех образцов в первые 10 ч можно объяснить вымыванием DOX, адсорбированного на поверхности керасом. Кроме того, различие между профилями высвобождения DOX из смешанных и чистых керасом можно объяснить довольно быстрой деградацией DPPC в составе смешанных керасом, что приводило к образованию пор, через которые и происходило высвобождение препарата. В то же время плотная силиконовая сеть на поверхности чистых керасом предотвращала преждевременное высвобождение DOX, обеспечивая пролонгированный эффект.

Таким образом, можно предположить, что варьируя соотношение CFLA и DPPC, можно получать керасомы с различными физико-химическими свойствами (диаметр,  $\zeta$ -потенциал, стабильность) и, следовательно, обеспечивать требуемую эффективность высвобождения препарата.

### 3.2.2.3 Исследование накопления керасом в клетках

В качестве модельных клеток была выбрана линия аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). Количественную оценку эффективности накопления керасом в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*) проводили с помощью проточной цитофлуориметрии (Рисунок 50).

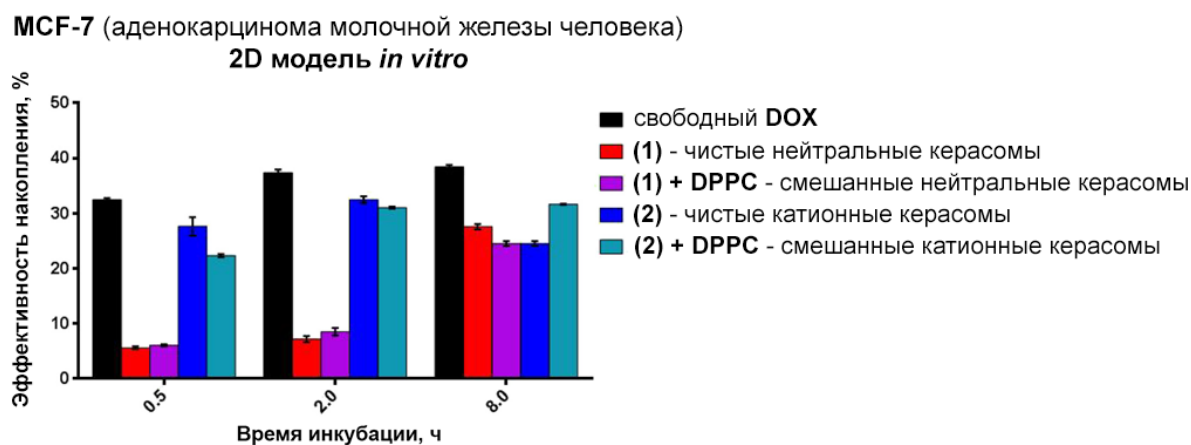


Рисунок 50 – Эффективность накопления керасом в клетках MCF-7. Контроль – свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Видно, что все образцы керасом накапливались в клетках медленнее, чем свободный DOX, максимальный уровень накопления которого наблюдали уже через 1 ч (38 %), после чего его концентрация практически не возрастала. При этом, как чистые (2), так и смешанные (2)+DPPC катионные керасомы накапливались в клетках эффективнее, чем нейтральные керасомы (1) и (1)+DPPC. Так, после 0,5 ч инкубации накопление в клетках катионных керасом составляло 28 и 23 % (для образцов (2) и (2)+DPPC, соответственно), в то время как в случае нейтральных керасом – только 4 и 5 % (для образцов (1) и (1)+DPPC). После 2 ч количество катионных керасом (2) и (2)+DPPC составило 32 и 30 %, а нейтральных керасом (1) и (1)+DPPC – 6 и 7 %, соответственно. Однако после 8 ч уровни накопления для всех четырех образцов были практически одинаковыми (26–33 %). Стоит отметить, что введение DPPC как в катионные, так и в нейтральные керасомы практически не влияло на эффективность их накопления в клетках.

Качественная оценка накопления и локализации керасом как в монослойной культуре, так и в сфероиде из клеток MCF-7 была проведена методом КЛСМ (Таблица 18, Рисунок 51). В случае монослойной культуры катионным керасомам (образцы (2) и (2)+DPPC, соответственно) потребовалось около 30 мин, чтобы проникнуть в клетки и локализоваться в основном в цитоплазме и, вероятно, в эндоплазматической сети. При этом нейтральные керасомы (1) и (1)+DPPC после 1 ч инкубации наблюдали преимущественно в цитоплазме.

В случае сфероидов проникновение керасом во все клетки, в том числе и в центр сфероидов, проходило значительно медленнее: катионные керасомы наблюдали в центре сфероида через 1,5 и 2 ч инкубации, тогда как нейтральные – через 3,5 и 4 ч, соответственно.

Таблица 18 – Накопление керасом в монослойной культуре (2D модель *in vitro*) и сфероиде (3D модель *in vitro*) из клеток MCF-7. Результаты анализа конфокальных микрофотографий

| Образцы керасом                         | Время накопления керасом в клетках, ч |                           |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
|                                         | 2D модель <i>in vitro</i>             | 3D модель <i>in vitro</i> |
| чистые нейтральные керасомы (1)         | 1,0                                   | 4,0                       |
| чистые катионные керасомы (2)           | 0,5                                   | 1,5                       |
| смешанные нейтральные керасомы (1)+DPPC | 1,0                                   | 3,5                       |
| смешанные катионные керасомы (2)+DPPC   | 0,5                                   | 2,0                       |

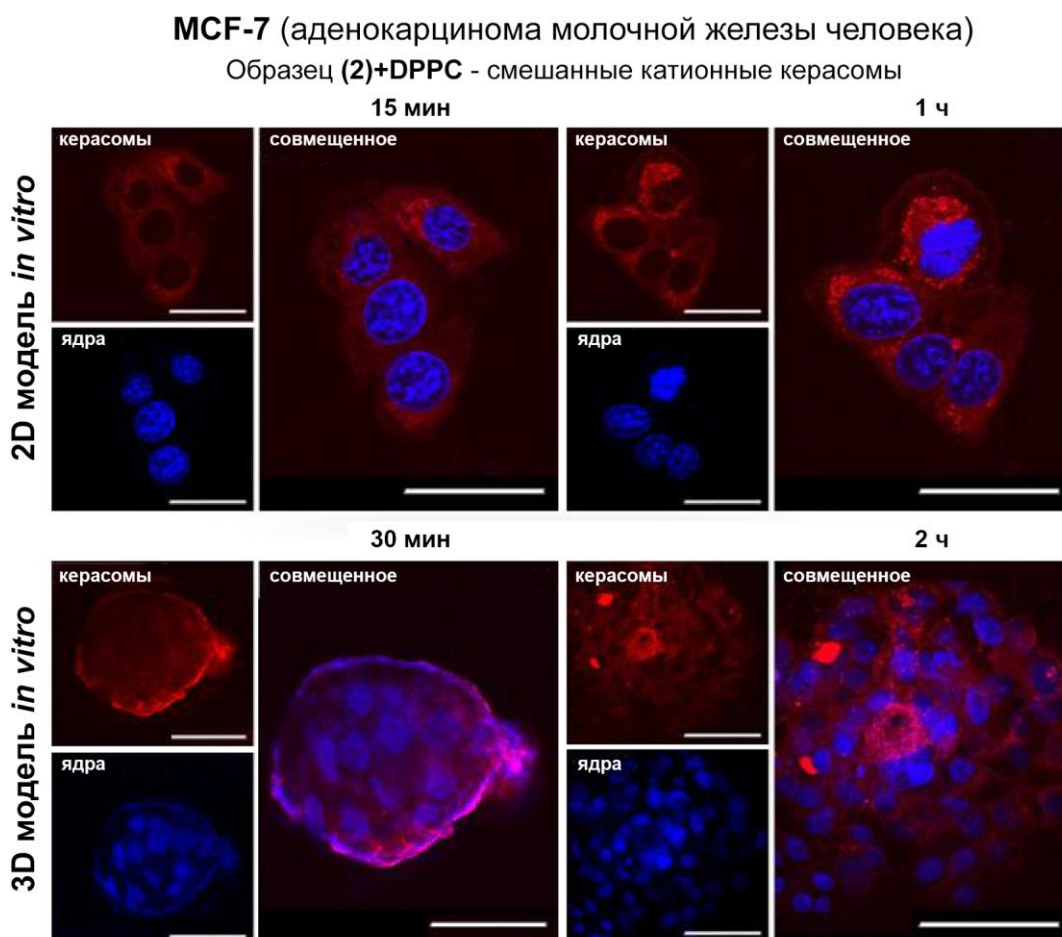


Рисунок 51 – Микрофотографии монослойной культуры и сфероидов из клеток MCF-7 после инкубации с керасомами. Керасомы (DOX) – красный, ядра клеток (Hoechst 33258) – синий.

КЛСМ. Шкала – 50 мкм

Таким образом, как в 2D, так и в 3D модели *in vitro* накопление катионных керасом **(2)** и **(2)+DPPC** происходило в 2–5 раз быстрее по сравнению с нейтральными образцами **(1)** и **(1)+DPPC**. Вероятно, высокий  $\zeta$ -потенциал катионных образцов облегчает их взаимодействие с отрицательно-заряженными клеточными мембранами, облегчая их проникновение в клетки. При этом в 3D модели *in vitro* накопление всех образцов ожидаемо снижалось (по сравнению с 2D моделью), что может объясняться более длительным проникновением наноносителей в многослойную объемную конструкцию сфероидов.

#### 3.2.2.4 Исследование цитотоксичности керасом

Цитотоксичность керасом, загруженных DOX, оценивали *in vitro* с помощью МТТ–теста (Таблица 19, Рисунок 52). В качестве контроля использовали свободный DOX, а также пустые (без DOX) керасомы **(2)+DPPC**, поскольку именно для этого образца наблюдали максимальную эффективность накопления в клетках и высвобождения препарата по сравнению с другими образцами.

Таблица 19 – Значения IC<sub>50</sub> для керасом после 24, 48 и 72 ч инкубации с клетками MCF-7. 2D модель *in vitro*. Результаты МТТ–теста

| Образцы керасом, загруженные DOX        | Значения IC <sub>50</sub> , мкМ |           |           |
|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|
|                                         | Время инкубации                 |           |           |
|                                         | 24 ч                            | 48 ч      | 72 ч      |
| чистые нейтральные керасомы (1)         | > 10,0                          |           | 9,8 ± 2,3 |
| чистые катионные керасомы (2)           |                                 |           | 5,1 ± 1,4 |
| смешанные нейтральные керасомы (1)+DPPC | > 10,0                          | 6,3 ± 1,6 | 2,7 ± 0,8 |
| смешанные катионные керасомы (2)+DPPC   | 6,7 ± 1,9                       | 1,1 ± 0,2 | 0,4 ± 0,1 |
| <b>Контроли:</b>                        |                                 |           |           |
| пустые керасомы (2)+DPPC (без DOX)      | > 10,0                          |           |           |
| свободный DOX                           | 1,0 ± 0,5                       | 0,7 ± 0,2 | 0,3 ± 0,1 |

IC<sub>50</sub> – полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

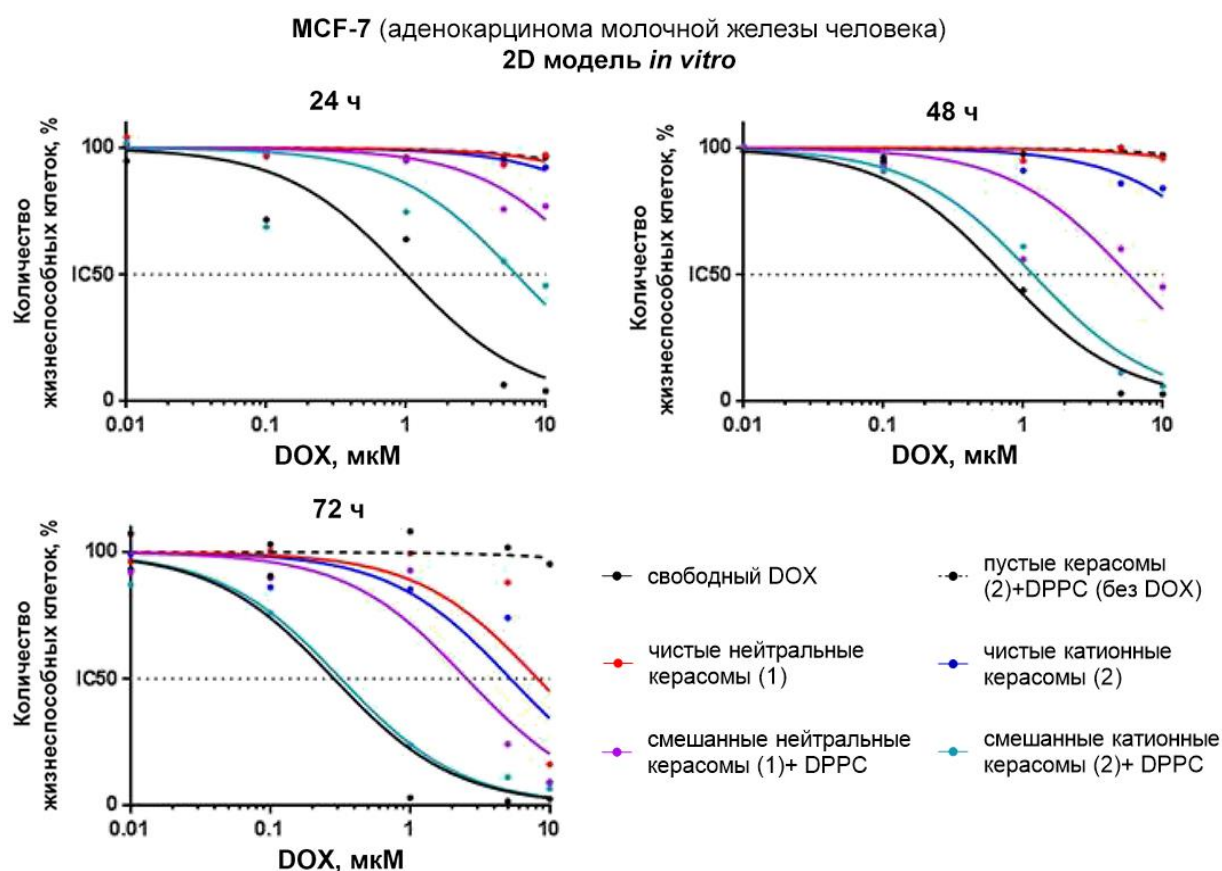


Рисунок 52 – Цитотоксичность керасом для клеток MCF-7. Контроли: свободный DOX; пустые керасомы (без DOX); необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток).

Результаты МТТ–теста

Было показано, что пустые керасомы не проявляли цитотоксичности даже в течение 72 ч ( $IC_{50} > 10,0$  мкМ). При этом, для керасом, загруженных DOX, значения  $IC_{50}$  существенно различались: цитотоксичность смешанных керасом проявлялась быстрее и была выше, чем у чистых керасом. Так, величина  $IC_{50}$  составляла  $6,7 \pm 1,9$  мкМ для смешанных катионных керасом (2)+DPPC уже через 24 ч инкубации с клетками, тогда как в случае смешанных

нейтральных керасом **(1)+DPPC** она составляла  $6,3 \pm 1,6$  мкМ только через 48 ч. Такой результат можно объяснить более эффективным накоплением катионных керасом в клетках по сравнению с накоплением нейтральных образцов (см. Рисунок 50). При этом чистые керасомы **(1)** и **(2)** вызывали гибель клеток только после 72 ч инкубации ( $IC_{50} 9,8 \pm 2,3$  мкМ и  $5,1 \pm 1,4$  мкМ, соответственно), что может быть связано с более быстрым высвобождением DOX из смешанных керасом, чем из нейтральных (см. Рисунок 49). Стоит отметить, что свободный DOX проявлял большую цитотоксичность по сравнению со всеми образцами керасом во всех временных точках ( $IC_{50} 1,0 \pm 0,5$  мкМ,  $0,7 \pm 0,2$  мкМ и  $0,3 \pm 0,1$  мкМ после 24, 48 и 72 ч, соответственно). Подобные результаты могут объясняться более быстрым накоплением низкомолекулярного DOX в клетках по сравнению с керасомами, которым требовалось больше времени для проникновения в клетки и оказания токсического действия. Тем не менее, среди керасом наибольший цитотоксический эффект, сопоставимый со свободным DOX, проявлял образец смешанных катионных керасом **(2)+DPPC** ( $IC_{50} 0,4 \pm 0,1$  мкМ после 72 ч инкубации), что, вероятно, связано с их более быстрым накоплением в клетках (за счет высокого  $\zeta$ -потенциала) и быстрым высвобождением препарата по сравнению с другими керасомами.

Таким образом, можно сделать вывод, что цитотоксичность керасом, загруженных DOX, в первую очередь связана с составом носителя (катионные или нейтральные, смешанные или чистые), напрямую влияющим на такие свойства как эффективность накопления в клетках и профили высвобождения DOX.

### Заключение

Получены чистые (100% CFLA) катионные и нейтральные керасомы, а также смешанные (CFLA/DPPC, 1:1, масс) катионные и нейтральные керасомы, загруженные DOX. Изучены физико-химические свойства (морфология, средний диаметр,  $\zeta$ -потенциал, стабильность и др.) свойства керасом. Показано, что стабильность керасом в 2–9 раз (в зависимости от состава) превышает стабильность обычных липосом. За счет стабильной полисилоксановой сети высвобождение DOX из чистых керасом происходило в 3 раза медленнее, чем из обычных липосом. Таким образом, продемонстрирована возможность получения наноносителей с требуемыми параметрами (стабильность, эффективность высвобождения препарата и пр.) за счет варьирования их химического состава.

Влияние липидного состава керасом на эффективность их накопления и цитотоксичность было изучено *in vitro* с использованием клеток MCF-7. Показано, что как в 2D, так и в 3D модели накопление катионных керасом происходило в 2–5 раз быстрее по сравнению с нейтральными. При этом в 3D модели накопление всех образцов ожидаемо

снижалось (по сравнению с 2D моделью). Наибольшей цитотоксичностью, сопоставимой со свободным препаратом, обладали смешанные катионные керасомы, загруженные DOX.

Таким образом, благодаря высокой стабильности (более 120 дней) чистые керасомы могут быть перспективны в качестве систем пассивной доставки с пролонгированным высвобождением препарата.

### 3.2.3 Фолат-конъюгированные катионные липосомы

#### 3.2.3.1 Получение фолат-конъюгированных липосом

В качестве системы с активной направленной (таргетной) доставкой в данной работе предложены катионные фолат-конъюгированные липосомы (**FLp**), загруженные DOX. Для получения FLp фолат-конъюгированные липиды в количестве 5 % масс. были встроены в липидную основу (95 % масс), поскольку известно, что лиганды не должны располагаться на близком расстоянии друг от друга для предотвращения стерических затруднений при контакте с клеточными рецепторами [267].

В данной работе **FLp** получали с использованием двух подходов (Рисунок 53). Первый (см. Рисунок 53 А) представляет собой классическую методику гидратации тонкой липидной пленки, состоящей из смеси обычных (без лигандов) и фолат-конъюгированных липидов (95/5, % масс). Однако при этом часть лигандов попадает во внутреннюю полость липосомы, уменьшая ее полезный внутренний объем, необходимый для инкапсулирования препаратов. Второй подход – метод пост-модификации, основанный на реакциях «click»-химии (см. Рисунок 53 Б), в котором на первом этапе получают универсальные «базовые» липосомы, загруженные препаратом, а затем модифицируют их поверхность лигандами.

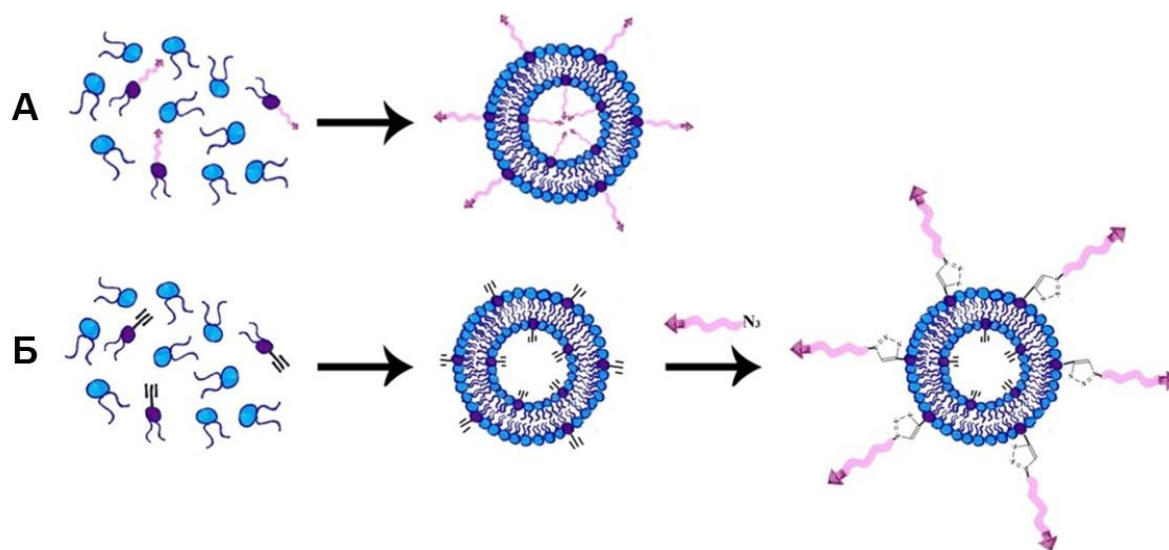


Рисунок 53 – Подходы к формированию фолат-конъюгированных липосом: А – метод гидратации тонкой липидной пленки, Б – метод пост-модификации

Для получения FLp методом гидратации тонкой липидной пленки (**FLp-ТП**) были синтезированы катионные липиды без лигандов – катионный липодипептид (**(1)**) и смесь поликатионного амфифила (**(2)**) с фосфолипидом диолеилфосфатидилэтаноламином (DOPE; 1:2, % масс), а также два фолат-конъюгированных липида – производное (**(3)**) на основе глицерина и фолиевой кислоты; производное (**(4)**) на основе липодипептида (**(1)**), ПЭГ и фолиевой кислоты (см. Приложение, Рисунок П4).

Для получения липосом методом пост-модификации (**FLp-ПМ**) в липопептид (**(1)**) был введен линкерный участок с активными группами, содержащими концевую тройную связь. На основе этого липопептида были получены «базовые» липосомы, поверхность которых затем модифицировали аналогом фолат-конъюгированного липида (**(4)**), содержащим дополнительные азидопропильные фрагменты (см. Приложение, Рисунок П5).

Таким образом, было получено четыре образца липосом, загруженных DOX: три образца **FLp-ТП** получены методом гидратации тонкой липидной пленки и один образец **FLp-ПМ** был получен методом пост-модификации. Все полученные FLp были загружены DOX (40 % масс.), эффективность загрузки составила 91–95 % для всех образцов.

### 3.2.3.2 Исследование физико-химических свойств фолат-конъюгированных липосом

Физико-химические параметры FLp представлены в Таблице 20. Липосомы без лигандов (**Lp**), сформированные из DOPE (100 % масс.), использовали в качестве контроля.

Таблица 20 – Физико-химические параметры фолат-конъюгированных липосом

| Образцы                                   | Липидный состав, % масс.                     | Средний диаметр, нм | PDI  | ζ-потенциал, мВ |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|------|-----------------|
| <b>FLp-ТП</b><br>(метод тонкой пленки)    | <b>(1) + (3)</b><br>95,0 : 5,0               | 254                 | 0,15 | 47 ± 11         |
|                                           | <b>(2) + DOPE + (3)</b><br>32,6 : 62,4 : 5,0 | 238                 | 0,10 | 16 ± 5          |
|                                           | <b>(2) + DOPE + (4)</b><br>32,6 : 62,4 : 5,0 | 270                 | 0,10 | 28 ± 8          |
| <b>FLp-ПМ</b><br>(метод пост-модификации) | <b>(1) + (4)</b><br>95,0 : 5,0               | 135                 | 0,04 | 51 ± 10         |
| <b>Контроль:</b>                          |                                              |                     |      |                 |
| <b>Lp</b><br>липосомы без лигандов        | <b>DOPE</b><br>100,0                         | 95                  | 0,09 | 58 ± 6          |

(1) и (2) - липиды без фолатных лигандов, (3) и (4) - фолат-конъюгированные липиды.

Показано, что средний диаметр FLp напрямую зависел от метода их получения. Так, в случае метода тонкой пленки средние диаметры **FLp-ТП** составляли 238 ± 24, 254 ± 38 и 270 ± 27 нм для образцов **(2)+DOPE+(3)**, **(1)+(3)** и **(2)+DOPE+(4)**, соответственно. При этом в случае метода пост-модификации средний диаметр **FLp-ПМ (1)+(4)** был почти вдвое

меньше ( $135 \pm 5$  нм). Подобную разницу можно объяснить попаданием части лигандов и спейсерных фрагментов во внутреннюю полость **FLp-ТП**, что закономерно приводило к увеличению их диаметра. В то же время, на  $\zeta$ -потенциал влиял не столько метод получения липосом, сколько их липидный состав. Так, максимальные  $\zeta$ -потенциалы наблюдали для липидной основы **(1)**, а именно  $47 \pm 11$  мВ для образца **FLp-ТП (1)+(3)** и  $51 \pm 10$  мВ для образца **FLp-ПМ (1)+(4)**. Все липосомы были стабильны в течение минимум 3 недель, в течение которых высвобождение DOX составляло менее 5 %.

### 3.2.3.3 Исследование цитотоксичности фолат-конъюгированных липосом для выбора наиболее перспективного образца

Цитотоксичность FLp сравнивали на клетках рака шейки матки человека (HeLa), характеризующихся гиперэкспрессией фолатных рецепторов (ФР) [170]. Результаты МТТ-теста в монослойной культуре клеток представлены на Рисунке 54 и в Таблице 21. Показано, что пустые FLp (без DOX) на основе липидов **(1)** (образцы **FLp-ТП (1)+(3)** и **FLp-ПМ (1)+(4)**) были не цитотоксичны для клеток даже после 48 ч инкубации ( $IC_{50} > 100$  мкМ). При этом пустые липосомы на основе липидов **(2)** (образцы **FLp-ТП (2)+(3)** и **(2)+(4)**), проявляли некоторую токсичность через 48 ч ( $IC_{50}$   $75,6 \pm 8,5$  мкМ и  $92,4 \pm 11,0$  мкМ, соответственно).

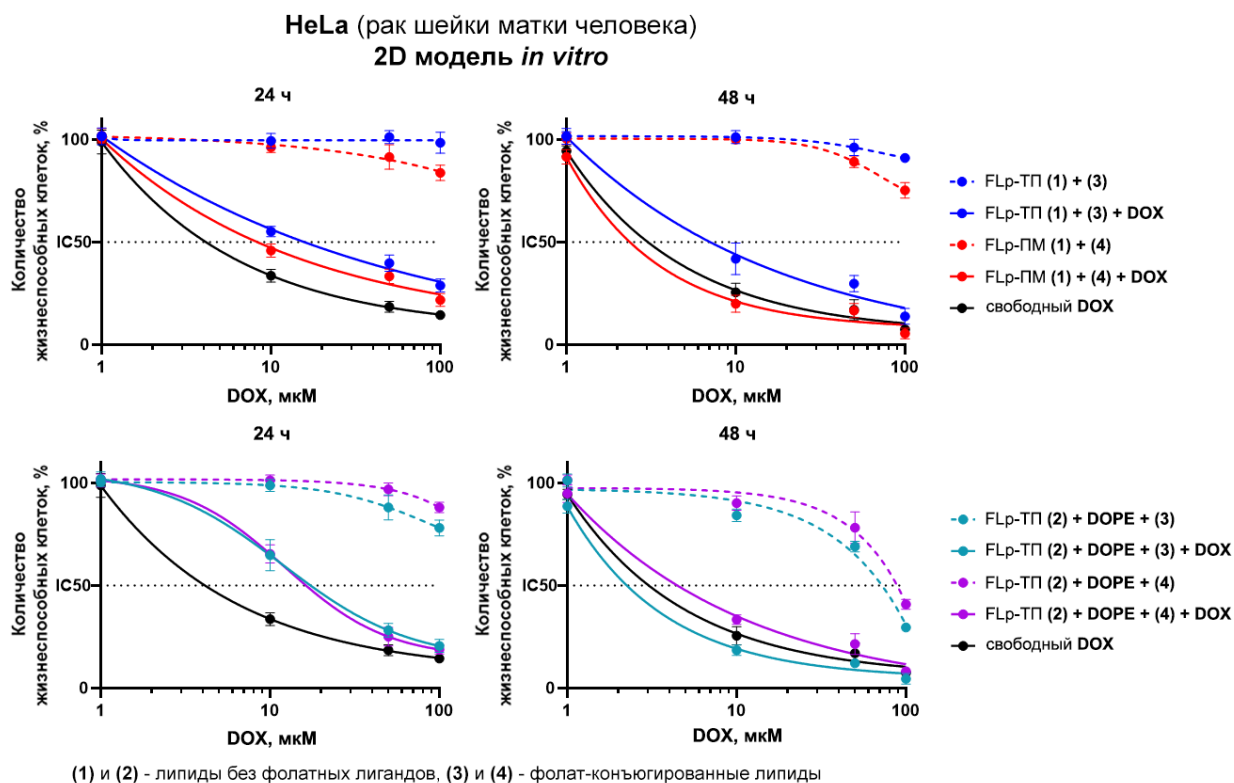


Рисунок 54 – Цитотоксичность фолат-конъюгированных липосом для клеток HeLa.

Контроли: свободный DOX; пустые липосомы (без DOX); необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ-теста

Таблица 21 – Значения IC<sub>50</sub> для фолат-конъюгированных липосом после 24 и 48 ч инкубации с клетками HeLa. 2D модель *in vitro*. Результаты МТТ–теста

| Образец                            |                                       |                  | Значения IC50, мкМ |             |
|------------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------------------|-------------|
|                                    |                                       |                  | Время инкубации    |             |
|                                    |                                       |                  | 24 ч               | 48 ч        |
| FLp-ТП<br>(метод тонкой пленки)    | (1) + (3)<br>95,0 : 5,0               | с DOX            | 10,8 ± 2,0         | 7,9 ± 1,2   |
|                                    |                                       | пустые (без DOX) | >100,0             |             |
|                                    | (2) + DOPE + (3)<br>32,6 : 62,4 : 5,0 | с DOX            | 11,0 ± 2,6         | 1,4 ± 0,2   |
|                                    |                                       | пустые (без DOX) | >100,0             | 75,6 ± 8,5  |
|                                    | (2) + DOPE + (4)<br>32,6 : 62,4 : 5,0 | с DOX            | 10,6 ± 1,9         | 3,8 ± 0,4   |
|                                    |                                       | пустые (без DOX) | >100,0             | 92,4 ± 11,0 |
| FLp-ПМ<br>(метод пост-модификации) | (1) + (4)<br>95,0 : 5,0               | с DOX            | 8,4 ± 1,5          | 1,4 ± 0,3   |
|                                    |                                       | пустые (без DOX) | >100,0             |             |
| Контроль:                          |                                       |                  |                    |             |
| свободный DOX                      |                                       |                  | 4,2 ± 0,9          | 2,1 ± 0,6   |

IC<sub>50</sub> - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

(1) и (2) - липиды без фолатных лигандов, (3) и (4) - фолат-конъюгированные липиды.

Все FLp, загруженные DOX, проявляли цитотоксический эффект, сопоставимый с действием свободного DOX (контроль) уже в первые 24 ч. Так, максимальные значения IC<sub>50</sub> были установлены для образца **FLp-ПМ (1)+(4)+DOX**: IC<sub>50</sub> составили 8,4 ± 1,5 и 1,4 ± 0,3 мкМ после 24 и 48 ч инкубации, соответственно.

Образцы с липидной основой (2) исключили из дальнейших экспериментов по причине их токсичности даже до загрузки DOX. Для дальнейших исследований был выбран образец FLp-ПМ (1)+(4), поскольку он не проявлял цитотоксичности до загрузки DOX, а также имел минимальный средний диаметр и максимальный ζ-потенциал. Для последующего изучения эффективности накопления и цитотоксичности FLp в зависимости от количества ФР были выбраны четыре клеточные линии: две линии с оверэкспрессией ФР – клетки глиомы мозга крысы (C6) и аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), а также две линии с низким уровнем экспрессии ФР – клетки глиомы мозга человека (U-87MG) и мезенхимальные стромальные клетки человека (MSC) [178].

#### 3.2.3.4 Исследование накопления фолат-конъюгированных липосом в клетках

Качественный анализ накопления и локализации **FLp-ПМ (1)+(4)** (здесь и далее просто **FLp-ПМ**) проводили с помощью КЛСМ (Таблица 22). В качестве контроля использовали обычные липосомы **Lp** (без лигандов). Было показано, что в случае 2D модели *in vitro* с высокой экспрессией ФР (линии C6 и MCF-7) накопление **FLp-ПМ** проходило быстрее, и образцы липосом наблюдались внутри клеток уже через 15 мин. При этом обычные липосомы **Lp** (без лигандов) после 15 мин инкубации были локализованы преимущественно

в клеточных мембранах. В случае клеток с низкой экспрессией ФР (линии U-87MG и MSC) накопление и локализация **FLp-ПМ** и **Lp** были примерно одинаковыми, и после 30 мин инкубации оба образца наблюдались в мембранах клеток.

В случае сфероидов (3D модель *in vitro*) накопление всех образцов, ожидаемо, замедлялось, причем разница в интернализации **FLp-ПМ** и **Lp** была гораздо более выраженной, чем в монослойной культуре. Так, **FLp-ПМ** локализовались во внутреннем объеме сфероидов из клеток с высокой экспрессией ФР (линии MCF-7 и C6) уже через 1,5 и 1,0 ч; тогда как **Lp** – только через 3,0 и 2,5 ч, соответственно.

Таблица 22 – Локализация и накопление липосом в клетках. 2D и 3D модель *in vitro*. Результаты анализа конфокальных микрофотографий

| Клетки                           |               | Локализация и накопление липосом в клетках, ч  |                                       |                                                      |                                            |
|----------------------------------|---------------|------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                                  |               | 2D модель <i>in vitro</i>                      |                                       | 3D модель <i>in vitro</i>                            |                                            |
|                                  |               | <b>FLp-ПМ</b>                                  | <b>Lp</b><br>липосомы<br>без лигандов | <b>FLp-ПМ</b>                                        | <b>Lp</b><br>липосомы без<br>лигандов      |
| Высокий уровень<br>экспрессии ФР | <b>MCF-7</b>  | 0,25<br>весь объем<br>(включая<br>ядра клеток) | 0,25<br>клеточные<br>мембраны         | 1,50<br>весь объем сфероида<br>(включая ядра клеток) | 3,00<br>весь объем<br>сфероида             |
|                                  | <b>C6</b>     |                                                |                                       | 1,00<br>весь объем сфероида<br>(включая ядра клеток) | 2,50<br>весь объем<br>сфероида             |
| Низкий уровень<br>экспрессии ФР  | <b>U-87MG</b> | 0,50<br>клеточные мембраны                     |                                       | 1,50<br>весь объем сфероида                          | 3,00<br>внешняя<br>поверхность<br>сфероида |
|                                  | <b>MSC</b>    |                                                |                                       |                                                      |                                            |

Так, на Рисунке 55 видно, что для клеток MCF-7 (с высокой экспрессией ФР) интенсивность флуоресценции через 15 мин инкубации была примерно одинаковой для обоих образцов (**FLp-ПМ** и **Lp**), тогда как после 1 ч для **FLp-ПМ** наблюдали гораздо более яркий сигнал, чем для **Lp**. Кроме того, после 1 ч **FLp-ПМ** были равномерно распределены по всему объему клетки, включая ядра, тогда как **Lp** были локализованы главным образом во внутриклеточных мембранах (вероятно, в ядерной мембране и мембране ЭПС). Таким образом, можно предположить, что модификация поверхности липосом фолиевой кислотой привела не только к их более эффективному накоплению в клетках MCF-7, но и к различию в локализации. Стоит отметить, что для клеток U-87MG (с низкой экспрессией ФР) не было выявлено большой разницы в эффективности накопления, интенсивности флуоресценции, а также во внутриклеточной локализации образцов **Lp** и **FLp-ПМ**.

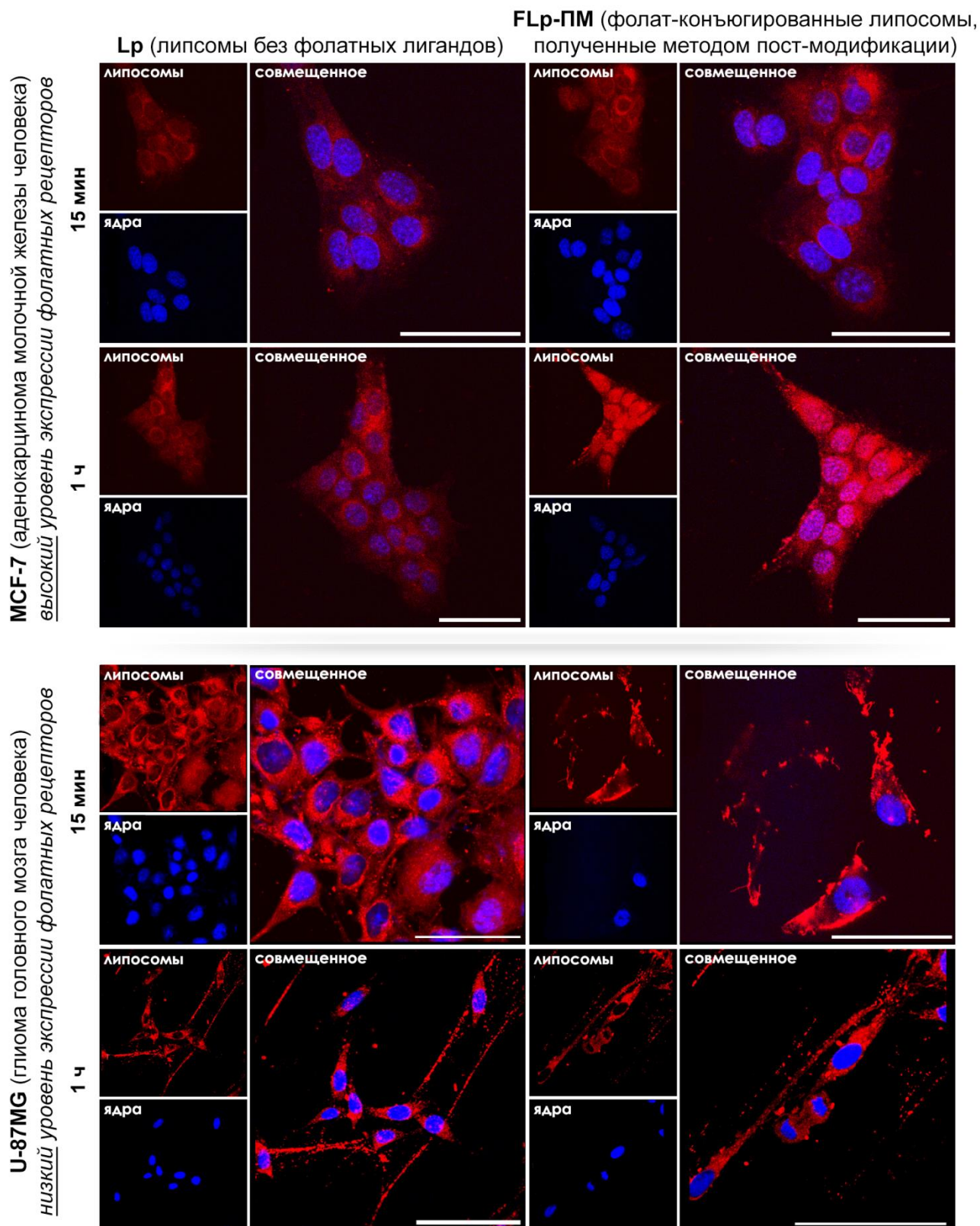
2D модель *in vitro*

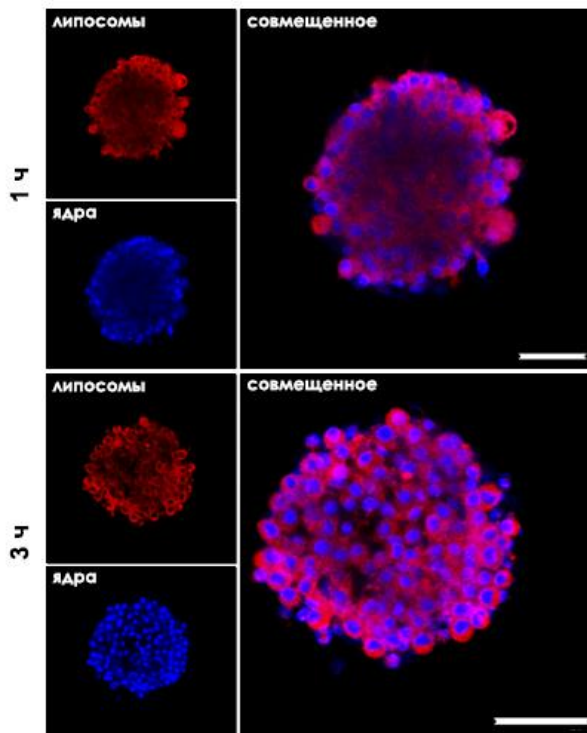
Рисунок 55 – Микрофотографии клеток MCF-7 и U-87MG после инкубации с фолат-конъюгированными и обычными (без лиганда) липосомами. Липосомы (DOX) – красный, ядра клеток (Hoechst 33258) – синий. КЛСМ. Шкала – 50 мкм

### 3D модель *in vitro*

**FLp-ПМ** (фолат-конъюгированные липосомы, полученные методом пост-модификации)

**Lp** (липсомы без фолатных лигандов)

**MCF-7** (аденокарцинома молочной железы человека) высокий уровень экспрессии фолатных рецепторов



**U-87MG** (глиома головного мозга человека)

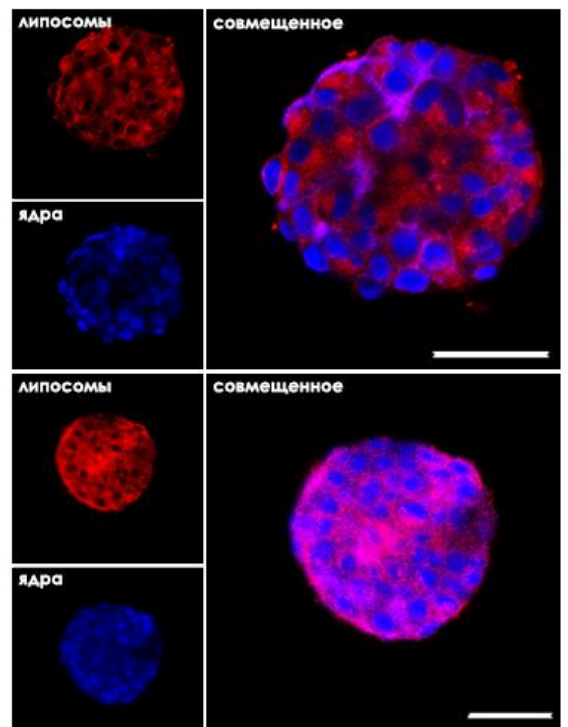
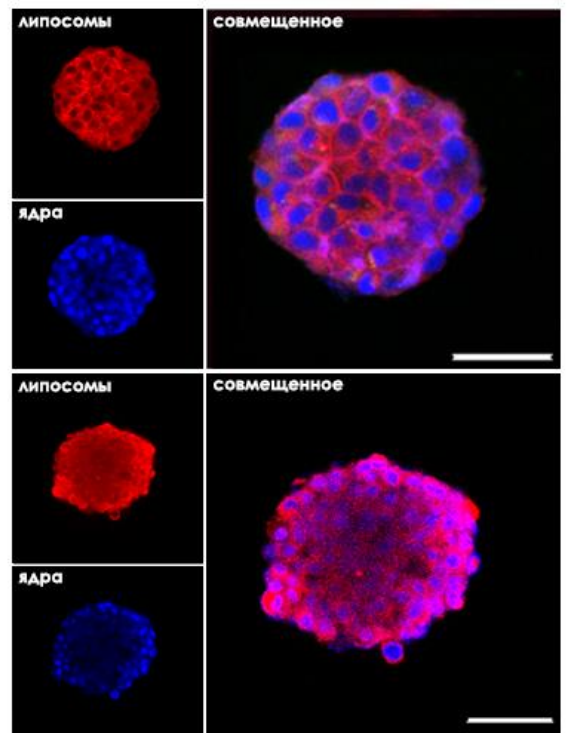
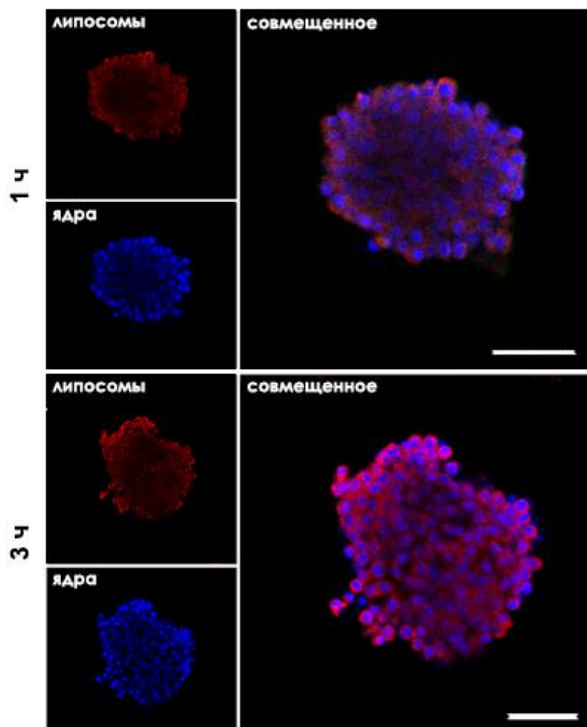


Рисунок 56 – Микрофотографии сфероидов из клеток MCF-7 и U-87MG после инкубации с фолат-конъюгированными и обычными (без лиганда) липосомами. Липосомы (DOX) – красный, ядра клеток (Hoechst 33258) – синий. КЛСМ. Шкала – 50 мкм

Из Рисунка 56 видно, что в случае 3D модели *in vitro* оба типа липосом (**Lp** и **FLp-ПМ**) были локализованы на внешней поверхности сфероидов через 1 ч инкубации. Однако, в случае сфероидов из клеток MCF-7 (с высокой экспрессией ФР) интенсивность флуоресценции **FLp-ПМ** была выше по сравнению с **Lp**, тогда как в сфероидах из клеток U-87MG (с низкой экспрессией ФР) разница в накоплении этих образцов была менее заметна. Кроме того, в сфероидах из клеток MCF-7 различалась и локализация образцов. Так, через 1 ч инкубации **FLp-ПМ** наблюдали во всем внутреннем объеме сфероида (кроме ядер клеток), а через 3 ч – и в ядрах. При этом **Lp** после 1 ч инкубации были локализованы преимущественно на периферии сфероида, а через 3 ч накапливались в его внутреннем объеме, но не проникали в ядра клеток. Полученные результаты хорошо коррелируют с теми, что были получены для монослойной культуры клеток (см. Рисунок 55). Увеличение времени накопления липосом в случае сфероидов, можно объяснить более плотной упаковкой клеток, чем в монослое, а также большим количеством межклеточных взаимодействий, чем в 2D модели *in vitro*.

Количественная оценка накопления **FLp-ПМ** и **Lp** в клетках и сфероидах была выполнена с использованием проточной цитофлуориметрии (2D модель *in vitro*) и флуориметрии (3D модель *in vitro*), соответственно. Свободный DOX использовали в качестве контроля.

Показано, что при инкубации образцов с монослойной культурой клеток (2D модель *in vitro*) при 37°C (физиологически оптимальные условия) эффективность их накопления зависела от клеточной линии (Рисунок 57). Так, в клетках C6 и MCF-7 (с высокой экспрессией ФР) накопление фолат-конъюгированных липосом (**FLp-ПМ**) проходило значительно эффективнее, чем липосом без лиганда (**Lp**). В частности, в клетках C6 уровни накопления **FLp-ПМ** были выше в 4,5; 3,6; 1,8 и 1,2 раза по сравнению с **Lp** после 30 мин, 1, 2 и 5 ч инкубации, соответственно. В клетках MCF-7 накопление **FLp-ПМ** также было более эффективным, чем **Lp** в 1,5; 1,3; 1,6 и 1,2 раза после 30 мин, 1, 2 и 5 ч инкубации. С другой стороны, в клетках U-87MG и MSC (с низким уровнем экспрессии ФР) накопление **Lp** и **FLp-ПМ** было примерно одинаковым. Стоит также отметить, что накопление свободного **DOX** превосходило накопление всех образцов липосом для всех клеточных линий и во всех временных точках, однако, после 5 ч инкубации их уровни накопления (**Lp**, **FLp-ПМ** и свободного **DOX**) были почти одинаковыми. Более быстрое накопление свободного **DOX** в клетках можно объяснить небольшими размерами молекул **DOX** по сравнению с диаметром липосом, которым, как предполагается, требовалось больше времени для интернализации в клетки.

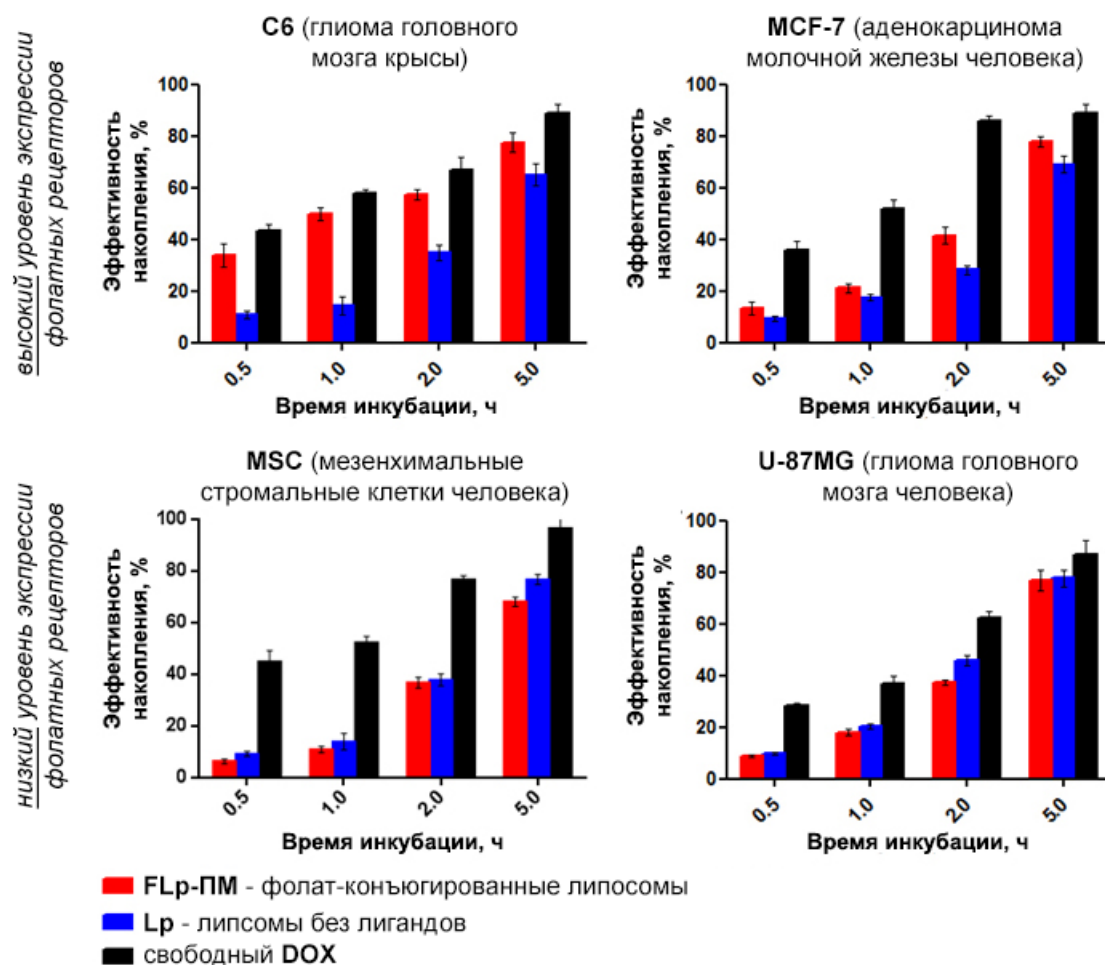
2D модель *in vitro*, 37°C

Рисунок 57 – Эффективность накопления фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом в клетках при 37°C. Контроль: свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Результаты, полученные при инкубации **Lp** и **FLp-PM** со сфероидами при 37°C (Рисунок 58), хорошо соотносятся с результатами проточной цитофлуориметрии для монослойных культур клеток (см. Рисунок 57). Так, в случае сфероидов из клеток MCF-7 и C6 (с высокой экспрессией ФР) **FLp-PM** накапливались в среднем в 1,7–2,1 раза быстрее по сравнению с **Lp**, что особенно заметно после 4 ч инкубации. При этом сфероиды из клеток U-87MG и MSC (с низким уровнем экспрессии ФР) поглощали **Lp** и **FLp-PM** с примерно одинаковой интенсивностью во всех временных точках. В случае сфероидов, как и в монослойной культуре, эффективность накопления свободного **DOX** существенно превосходила таковую для обоих образцов липосом на ранних этапах инкубации (30 мин и 2 ч). Кроме того, стоит отметить, что процесс накопления липосом в сфероидах занимал значительно больше времени, чем в случае монослойной культуры, что коррелирует с результатами конфокальной микроскопии (см. Рисунки 55 и 56), где также была видна существенная разница в эффективности проникновения частиц в клетки 2D и 3D моделей *in vitro*.

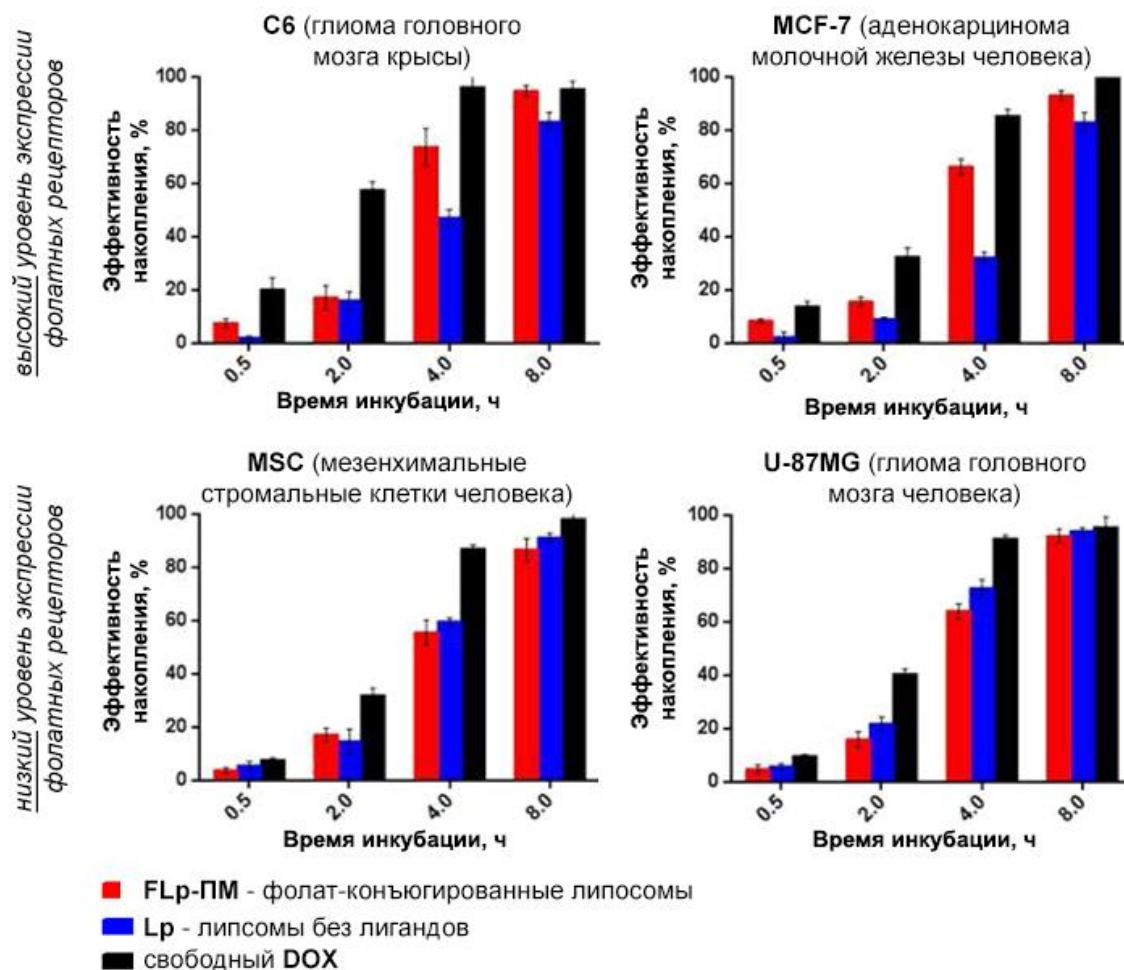
3D модель *in vitro*, 37°C

Рисунок 58 – Эффективность накопления фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом в сфероиде при 37°C. Контроль: свободный DOX. Флуориметрия

Кроме того, представлялось интересным сравнить эффективность накопления фолат-конъюгированных липосом (FLp-PM) и липосом без лиганда (Lp) в условиях заблокированного эндоцитоза. Известно, что отклонение от оптимальных физиологических условий (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C и пр.) угнетает жизнедеятельность клеток. В частности, при снижении температуры до 4°C происходит нарушение метаболизма, и клетка теряет возможность захватывать частицы путем обычного эндоцитоза, а значит, в подобных условиях крупные частицы могут попасть в нее исключительно рецептор-опосредованным путем [268]. Таким образом, накопление липосом было также изучено при 4°C в 2D модели *in vitro*. Из Рисунка 59 видно, что уровни накопления всех образцов (Lp, FLp-PM и свободного DOX), существенно снижались при 4°C по сравнению с результатами, полученными для монослойных культур клеток при 37°C (см. Рисунок 57).

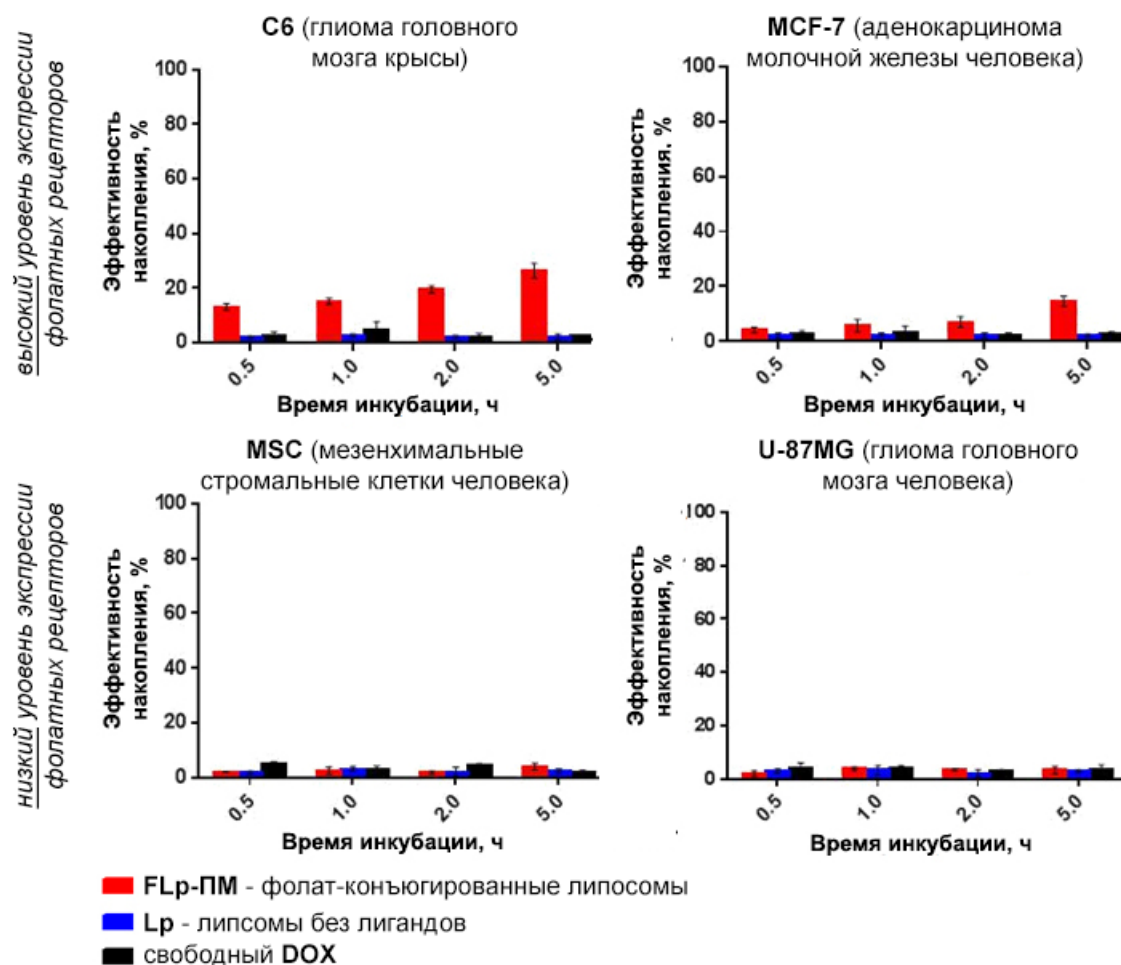
2D модель *in vitro*, 4°C

Рисунок 59 – Эффективность накопления фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом в клетках при 4°C. Контроль: свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Видно, что при 4°C в клетках MSC и U-87MG (с низкой экспрессией ФР) образцы практически не накапливались даже через 5 ч инкубации (уровни накопления были < 5 % для **FLp-PM** и **Lp**, и < 10 % для **DOX**). В то же время в клетках С6 и MCF-7 (с высокой экспрессией ФР) происходил более активный захват **FLp-PM** по сравнению с **Lp** и свободным **DOX**. Так, уровни накопления **FLp-PM** составляли 13, 16, 20 и 25 % для клеток С6; и 4, 6, 7, 18 % для клеток MCF-7 после 30 мин, 1, 2 и 5 ч инкубации, соответственно. Можно предположить, что более высокие уровни накопления **FLp-PM** связаны с их проникновением в клетку по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза. Кроме того, слабое поглощение **FLp-PM** клетками MSC и U-87MG можно объяснить низким уровнем экспрессии ФР на их поверхности, что приводило к снижению эффективности проникновения в них **FLp-PM** даже по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Таким образом, было показано, что эффективность накопления фолат-конъюгированных липосом напрямую связана с типом клеточной линии (а именно, с числом фолатных

рецепторов, характерным для данного вида клеток). Так, было показано, что FLp способны накапливаться в клетках с высокой экспрессией ФР (С6 и MCF-7) в больших количествах по сравнению с липосомами без лигандов, тогда как в клетках с низкой экспрессией ФР (MSC и U-87MG) существенной разницы в накоплении липосом с лигандами и без не наблюдалось. Кроме того, была продемонстрирована способность FLp накапливаться в клетках с высокой экспрессией ФР даже в условиях заблокированного эндоцитоза (при 4°C), при которых поглощение клетками других образцов (липосом без лиганда и свободного DOX) практически не происходило.

### 3.2.3.5 Исследование цитотоксичности фолат-конъюгированных липосом

Цитотоксичность образцов Lp и FLp-ПМ, загруженных DOX (здесь и далее **Lp+DOX** и **FLp-ПМ+DOX**, соответственно), изучали методом МТТ–теста при 37°C и 4°C. Свободный DOX и пустые (без DOX) FLp-ПМ использовали в качестве контролей. Результаты МТТ теста в 2D модели *in vitro* при 37°C представлены в Таблице 23 и на Рисунке 60.

Таблица 23 – Значения IC<sub>50</sub> для фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом после 24, 48 и 72 ч инкубации с клетками С6, MCF-7, MSC и U-87MG при 37°C. 2D модель *in vitro*. Результаты МТТ–теста

| Образцы                 | Значения IC50, мкМ              |      |      |      |      |      |                                |      |     |      |      |      |
|-------------------------|---------------------------------|------|------|------|------|------|--------------------------------|------|-----|------|------|------|
|                         | Клетки                          |      |      |      |      |      |                                |      |     |      |      |      |
|                         | с высоким уровнем экспрессии ФР |      |      |      |      |      | с низким уровнем экспрессии ФР |      |     |      |      |      |
|                         | MCF-7                           |      |      | C6   |      |      | U-87MG                         |      |     | MSC  |      |      |
|                         | Время инкубации, ч              |      |      |      |      |      |                                |      |     |      |      |      |
|                         | 24                              | 48   | 72   | 24   | 48   | 72   | 24                             | 48   | 72  | 24   | 48   | 72   |
| Lp + DOX                | 15,6                            | 4,2  | 3,2  | 25,7 | 10,6 | 5,5  | 12,9                           | 9,4  | 6,2 | 17,0 | 8,0  | 5,4  |
|                         | ±                               | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    | ±                              | ±    | ±   | ±    | ±    | ±    |
|                         | 3,1                             | 0,8  | 0,8  | 4,4  | 1,7  | 1,1  | 2,0                            | 1,5  | 1,3 | 2,8  | 1,6  | 1,4  |
| FLp-ПМ + DOX            | 6,3                             | <1,1 | <1,4 | 15,5 | 2,1  | <1,3 | 16,0                           | 10,0 | 8,3 | 20,1 | 10,2 | 7,4  |
|                         | ±                               | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    | ±                              | ±    | ±   | ±    | ±    | ±    |
|                         | 1,5                             | 0,1  | 0,2  | 2,6  | 0,3  | 0,1  | 3,1                            | 2,2  | 1,4 | 4,0  | 1,2  | 0,7  |
| Контроли:               |                                 |      |      |      |      |      |                                |      |     |      |      |      |
| пустые FLp-ПМ (без DOX) | > 100,0                         |      |      |      |      |      |                                |      |     |      |      |      |
| свободный DOX           | 4,3                             | <1,0 | <1,0 | 14,5 | 10,6 | 3,4  | 15,6                           | 11,8 | 8,0 | 9,1  | 4,1  | <1,0 |
|                         | ±                               | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    | ±                              | ±    | ±   | ±    | ±    | ±    |
|                         | 0,8                             | 0,3  | 0,1  | 2,9  | 1,6  | 0,6  | 2,3                            | 1,7  | 2,0 | 2,0  | 0,8  | 0,1  |

IC<sub>50</sub> - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

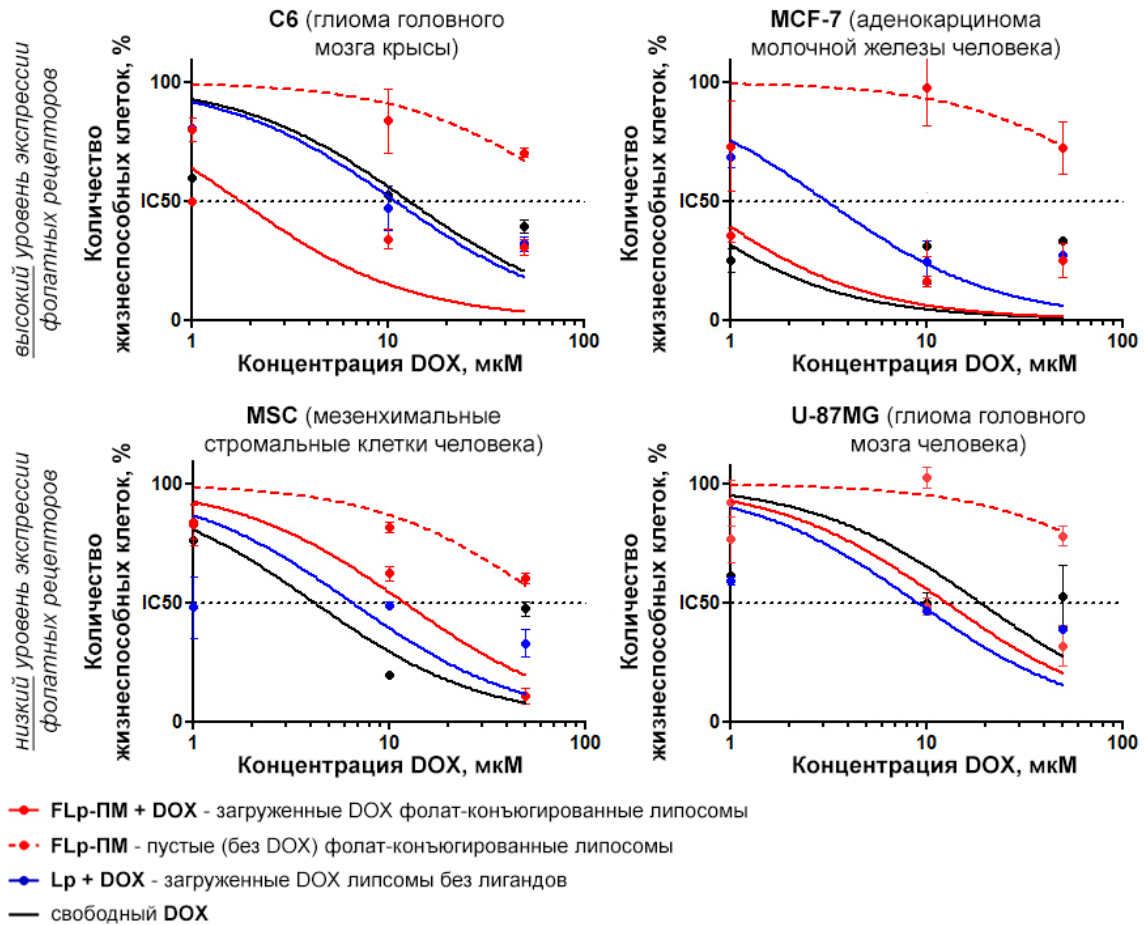
2D модель *in vitro*, 37°C

Рисунок 60 – Цитотоксичность фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом после 48 ч инкубации с клетками при 37°C. Контроли: свободный DOX; пустые липосомы (без DOX); необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Видно, что оба загруженных DOX образца липосом ингибировали рост всех четырех клеточных линий уже через 24 ч инкубации, а значения IC<sub>50</sub> для них были сопоставимы с IC<sub>50</sub> для свободного DOX. При этом пустые FLp-PM не проявляли цитотоксичности даже через 72 ч при всех исследованных концентрациях DOX (IC<sub>50</sub> > 100,0 мкМ). Как и ожидалось, цитотоксичность Lp+DOX была практически одинаковой для всех клеток, тогда как токсичность FLp-PM+DOX зависела от линии клеток. Так, в случае клеток C6 и MCF-7 (с высокой экспрессией ФР) цитотоксичность FLp-PM+DOX была в 2 и более раз выше, чем у липосом без лиганда Lp. Например, после 48 ч инкубации для клеток MCF-7 значения IC<sub>50</sub> составили  $<1,1 \pm 0,1$  мкМ и  $4,2 \pm 0,8$  мкМ; а для клеток C6 –  $2,1 \pm 0,3$  мкМ и  $10,6 \pm 1,7$  мкМ для FLp-PM+DOX и Lp+DOX, соответственно. При этом для клеток MSC и U-87MG (с низкой экспрессией ФР) цитотоксичность FLp-PM+DOX и Lp+DOX практически не различались: так, после 48 ч их IC<sub>50</sub> составили  $10,0 \pm 2,2$  мкМ и  $9,4 \pm 1,5$  мкМ для клеток U-87MG;  $10,2 \pm 1,2$  мкМ и  $8,0 \pm 1,6$  мкМ для клеток MSC, соответственно.

Результаты МТТ–теста на сфероиде при 37°C показали аналогичную зависимость токсичности **FLp-ПМ+DOX** от типа клеток (Таблица 24, Рисунок 61). В первую очередь стоит отметить, что в случае сфероидов для ингибирования роста клеток требовались значительно большие количества липосомальных суспензий по сравнению с таковыми для монослойных культур клеток (см. Таблицу 23). Это хорошо соотносится с результатами по накоплению липосом в 2D (см. Рисунок 57) и 3D (см. Рисунок 58) моделях *in vitro*, согласно которым образцам требуется значительно больше времени для проникновения (и, следовательно, оказания цитотоксического воздействия) в сложную многослойную конструкцию сфероида по сравнению с монослойной культурой клеток. Кроме того, также как и в 2D модели *in vitro*, в случае сфероидов пустые (без DOX) **FLp-ПМ** ожидаемо не проявляли цитотоксичности в течение 72 ч ( $IC_{50} > 100,0$  мкМ).

### 3D модель *in vitro*, 37°C

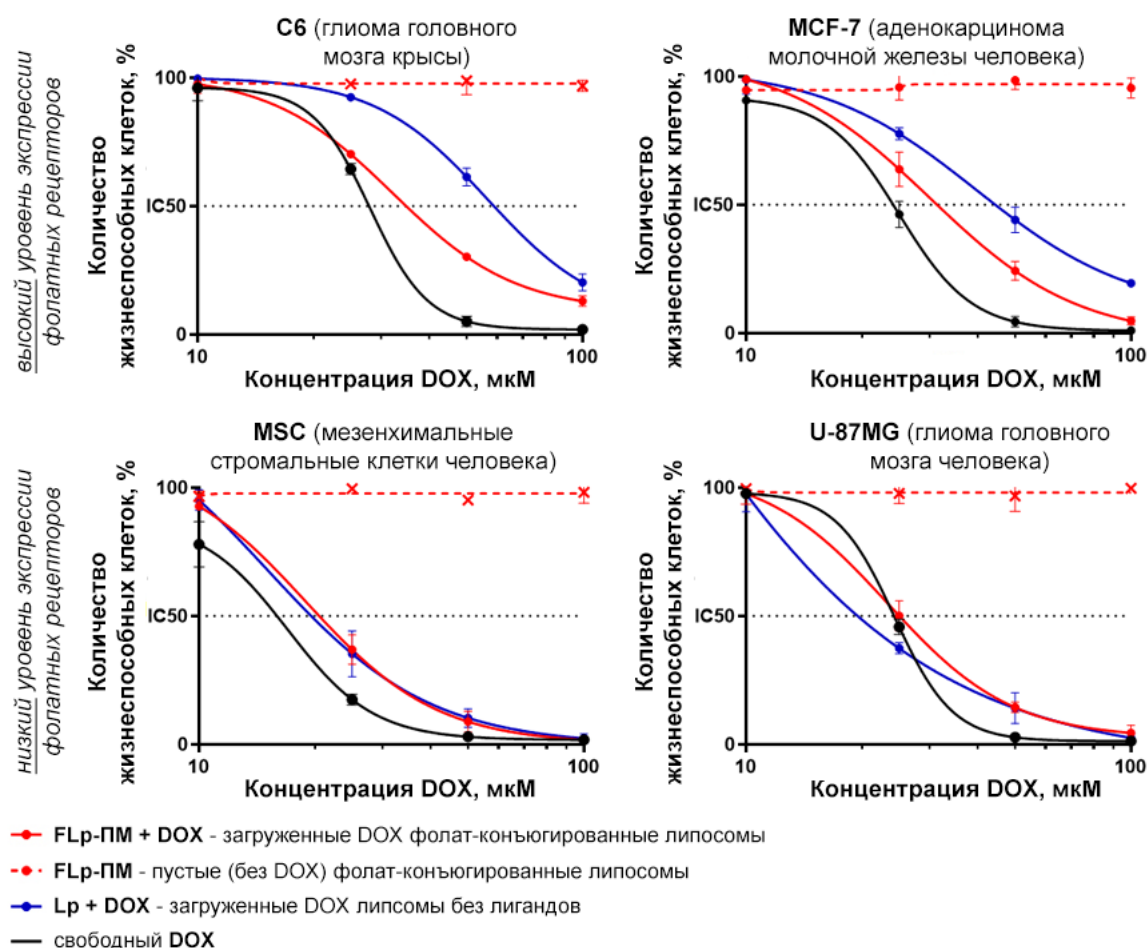


Рисунок 61 – Цитотоксичность фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом после 48 ч инкубации со сфероидом при 37°C. Контроли: свободный DOX; пустые липосомы (без DOX), необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Таблица 24 – Значения IC50 для фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом после 24, 48 и 72 ч инкубации со сфероидом из клеток C6, MCF-7, MSC и U-87MG при 37°C. 3D модель *in vitro*. Результаты MTT–теста

| Образцы                       | Значения IC50, мкМ                                |      |      |      |      |      |                                                  |      |      |      |      |      |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|------|------|------|------|------|--------------------------------------------------|------|------|------|------|------|
|                               | Клетки                                            |      |      |      |      |      |                                                  |      |      |      |      |      |
|                               | Высокий уровень экспрессии<br>фолатных рецепторов |      |      |      |      |      | Низкий уровень экспрессии<br>фолатных рецепторов |      |      |      |      |      |
|                               | MCF-7                                             |      |      | C6   |      |      | U-87MG                                           |      |      | MSC  |      |      |
|                               | Время инкубации, ч                                |      |      |      |      |      |                                                  |      |      |      |      |      |
|                               | 24                                                | 48   | 72   | 24   | 48   | 72   | 24                                               | 48   | 72   | 24   | 48   | 72   |
| Lp + DOX                      | 73,8                                              | 48,0 | 24,2 | 80,6 | 60,1 | 23,8 | 24,5                                             | 19,5 | 22,0 | 30,4 | 19,6 | 22,2 |
|                               | ±                                                 | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    | ±                                                | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    |
|                               | 13,4                                              | 9,7  | 5,2  | 19,1 | 10,8 | 6,8  | 5,4                                              | 3,7  | 3,9  | 8,7  | 2,6  | 4,4  |
| FLp-ПМ +<br>DOX               | 46,4                                              | 30,2 | 23,5 | 50,5 | 33,1 | 17,2 | 35,1                                             | 26,1 | 19,3 | 28,6 | 20,0 | 17,0 |
|                               | ±                                                 | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    | ±                                                | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    |
|                               | 9,2                                               | 7,7  | 1,9  | 15,4 | 10,1 | 3,0  | 7,5                                              | 3,3  | 2,9  | 5,2  | 2,8  | 3,5  |
| Контроли:                     |                                                   |      |      |      |      |      |                                                  |      |      |      |      |      |
| пустые<br>FLp-ПМ<br>(без DOX) | >100,0                                            |      |      |      |      |      |                                                  |      |      |      |      |      |
| свободный<br>DOX              | 34,8                                              | 23,3 | 20,4 | 41,1 | 25,9 | 10,7 | 24,4                                             | 25,2 | 12,0 | 21,1 | 15,4 | 10,1 |
|                               | ±                                                 | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    | ±                                                | ±    | ±    | ±    | ±    | ±    |
|                               | 5,8                                               | 4,1  | 2,5  | 8,0  | 3,6  | 1,7  | 3,5                                              | 2,8  | 0,9  | 3,0  | 2,2  | 0,6  |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Как видно из Таблицы 24, для клеток MCF-7 и C6 (с высокой экспрессией ФР) показатели IC50 для образцов **FLp-ПМ+DOX** были в 1,5 раза выше, чем для образцов **Lp+DOX** после 24 и 48 ч инкубации. Так, для сфероидов из клеток MCF-7 значения IC50 составили, соответственно,  $46,4 \pm 9,2$  мкМ против  $73,8 \pm 13,4$  мкМ (24 ч) и  $30,2 \pm 7,7$  против  $48,0 \pm 9,7$  мкМ (48 ч) для **FLp-ПМ+DOX** и **Lp+DOX**, соответственно. Аналогичную тенденцию наблюдали и для сфероидов из клеток C6:  $50,5 \pm 15,4$  мкМ против  $80,6 \pm 19,1$  мкМ (24 ч) и  $33,1 \pm 10,1$  мкМ против  $60,1 \pm 10,8$  мкМ (48 ч), для **FLp-ПМ+DOX** и **Lp+DOX**, соответственно. Что касается сфероидов из клеток U-87MG и MSC (с низким уровнем экспрессии ФР), то разница в значениях IC50 для **FLp-ПМ+DOX** и **Lp+DOX** была незначительной.

Как видно из Рисунка 59, **FLp-ПМ**, в отличие от **Lp** и свободного **DOX**, накапливались в клетках C6 и MCF-7 (с высокой экспрессией ФР) даже в условиях заблокированного эндоцитоза (при 4°C). Можно предположить, что в этих условиях под действием **FLp-ПМ+DOX** гибель клеток будет происходить эффективнее по сравнению с **Lp+DOX** и свободным **DOX** (контроль). Таким образом, цитотоксичность образцов была изучена также при 4°C (Таблица 25, Рисунок 62). Видно, что в случае заблокированного эндоцитоза **Lp+DOX** не проявляли цитотоксичности даже через 72 ч инкубации ( $IC_{50} > 50,0$  мкМ). При этом свободный **DOX**,

который при 37°C эффективно вызывал гибель клеток уже через 24 ч инкубации (см. Таблицу 23), при 4°C оказывал цитотоксическое воздействие и достигал IC50 только через 72 ч. Так, значения IC50 свободного **DOX** после 72 ч инкубации составляли  $43,2 \pm 6,7$  мкМ;  $50,8 \pm 9,0$  мкМ;  $41,4 \pm 6,5$  мкМ и  $46,7 \pm 5,2$  мкМ для клеток MCF-7, C6, U-87MG и MSC, соответственно. Таким образом, результаты полученные для образцов **Lp+DOX** и свободного **DOX** в данном эксперименте хорошо соотносятся с результатами по их накоплению в клетках при низких температурах (см. Рисунок 59). При этом **FLp-ПМ+DOX** проявляли достаточно высокую токсичность по сравнению с другими образцами уже через 48 ч: значения IC50 в этой временной точке составляли  $31,1 \pm 8,8$  мкМ;  $28,6 \pm 7,5$  мкМ;  $47,0 \pm 9,7$  мкМ и  $42,5 \pm 7,2$  мкМ для линий MCF-7, C6, U-87MG и MSC, соответственно. После 72 ч инкубации токсичность **FLp-ПМ+DOX** возрастала в 2 и более раз: IC50 составили  $13,2 \pm 3,0$  мкМ;  $10,6 \pm 2,3$  мкМ;  $11,3 \pm 1,4$  мкМ и  $10,7 \pm 1,0$  мкМ для линий MCF-7, C6, U-87MG и MSC, соответственно.

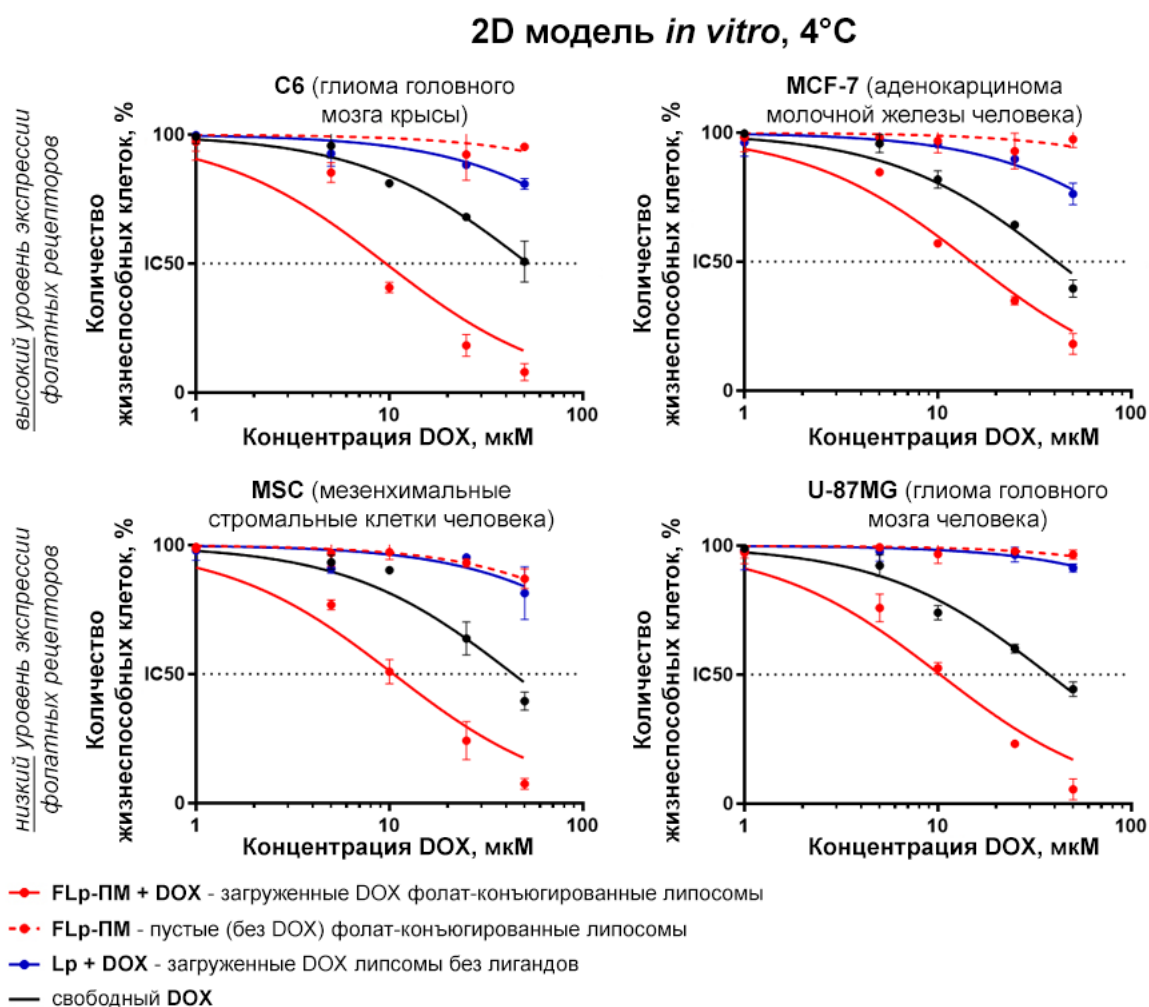


Рисунок 62 – Цитотоксичность фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом после 72 ч инкубации с клетками при 4°C. Контроли: свободный DOX; пустые липосомы (без DOX); необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Таблица 25 – Значения IC50 для фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом после 24, 48 и 72 ч инкубации с клетками C6, MCF-7, MSC и U-87MG при 4°C. 2D модель *in vitro*. Результаты МТТ–теста

| Образцы                       | Значения IC50, мкМ                                |                  |                  |                  |                  |                  |                                                  |                  |                  |           |                  |                  |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------|------------------|------------------|-----------|------------------|------------------|
|                               | Клетки                                            |                  |                  |                  |                  |                  |                                                  |                  |                  |           |                  |                  |
|                               | Высокий уровень экспрессии<br>фолатных рецепторов |                  |                  |                  |                  |                  | Низкий уровень экспрессии<br>фолатных рецепторов |                  |                  |           |                  |                  |
|                               | MCF-7                                             |                  |                  | C6               |                  |                  | U-87MG                                           |                  |                  | MSC       |                  |                  |
|                               | Время инкубации, ч                                |                  |                  |                  |                  |                  |                                                  |                  |                  |           |                  |                  |
|                               | 24                                                | 48               | 72               | 24               | 48               | 72               | 24                                               | 48               | 72               | 24        | 48               | 72               |
| Lp + DOX                      | >50,0                                             |                  |                  |                  |                  |                  |                                                  |                  |                  |           |                  |                  |
| FLp-ПМ + DOX                  | 49,4<br>±<br>7,8                                  | 31,1<br>±<br>8,8 | 13,2<br>±<br>3,0 | 44,5<br>±<br>9,0 | 28,6<br>±<br>7,5 | 10,6<br>±<br>2,3 | >50,<br>0                                        | 47,0<br>±<br>9,7 | 11,3<br>±<br>1,4 | >50,<br>0 | 42,5<br>±<br>7,2 | 10,7<br>±<br>1,0 |
| Контроли:                     |                                                   |                  |                  |                  |                  |                  |                                                  |                  |                  |           |                  |                  |
| пустые<br>FLp-ПМ<br>(без DOX) | >50,0                                             |                  |                  |                  |                  |                  |                                                  |                  |                  |           |                  |                  |
| свободный<br>DOX              | >50,0                                             |                  | 43,2<br>±<br>6,7 | >50,0            |                  | 50,8<br>±<br>9,0 | >50,0                                            |                  | 41,4<br>±<br>6,5 | >50,0     |                  | 46,7<br>±<br>5,2 |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Проявление цитотоксического эффекта **FLp-ПМ+DOX** для клеток U-87MG и MSC, для которых наблюдалось низкое накопление **FLp-ПМ** (см. Рисунок 59), можно объяснить увеличенным временем инкубации при проведении МТТ–теста. Так, клетки инкубировали с образцами вплоть до 72 ч, тогда как при проведении проточной цитофлуориметрии максимальное время инкубации составляло 5 ч. Вероятно, 72 ч достаточно для накопления **FLp-ПМ+DOX** в количестве, необходимом для гибели всех типов клеток даже при 4°C.

Таким образом, было показано, что фолат-конъюгированные липосомы способны ингибировать рост клеток даже в условиях заблокированного эндоцитоза, а их цитотоксичность напрямую зависит от числа фолатных рецепторов на поверхности клеток.

### Заключение

Получено четыре типа фолат-конъюгированных липосом, три из которых были сформированы методом гидратации тонкой липидной пленки (**FLp-ТП**) и один – методом постмодификации (**FLp-ПМ**). Изучены физико-химические свойства липосом (средний размер, ζ-потенциал и др.) в зависимости от метода их получения и липидного состава. Показано, что средний размер образцов **FLp-ПМ** был вдвое меньше, чем размер образцов **FLp-ТП**. Кроме того, установлено, что ζ-потенциал липосом зависел от выбора липидного состава, в частности, максимальный ζ-потенциал имели липосомы с липидной основой (1). Принимая во внимание

физико-химические параметры, а также результаты МТТ–теста на монослойной культуре клеток рака шейки матки HeLa, образец **FLp-ПМ**, полученный методом пост-модификации на основе соединений **(1)+(4)**, был выбран для дальнейших экспериментов *in vitro*.

Для изучения эффективности накопления и цитотоксичности фолат-конъюгированных липосом, загруженных доксорубицином, были выбраны клетки, различающиеся уровнем экспрессии фолатных рецепторов, в частности линии MCF-7 и C6 (с высокой экспрессией ФР) и линии U-87MG и MSC (с низкой экспрессией ФР). Показано, что в клетках U-87MG и MSC эффективность накопления и цитотоксичность **Lp** (липосомы без лиганда) и **FLp-ПМ** были практически одинаковы, тогда как для клеток MCF-7 и C6 (с высокой экспрессией ФР) накопление и цитотоксичность были значительно выше для **FLp-ПМ**, чем для **Lp**. Эффективность фолат-конъюгированных липосом как наноносителей для таргетной доставки противораковых лекарств была также продемонстрирована в 2D модели *in vitro* в условиях заблокированного эндоцитоза при 4°C (МТТ-тест, проточная цитофлуориметрия).

Также следует отметить, что метод пост-модификации перспективен для создания многофункциональных наноносителей, имеющих на поверхности различные биомолекулы (белки–лиганды, облегчающие проникновение в клетки пептиды, флуоресцентные метки и др).

### 3.3 Наноносители на основе полимеров

В данной работе получены и изучены наноносители на основе биodeградируемых полимеров, загруженные противоопухолевыми препаратами (Таблица 26).

Таблица 26 – Наноносители на основе полимеров, полученные и исследованные в данной работе

| Тип наноносителя                                                                                       | Особенности наноносителя                       | Загруженный препарат | Способ доставки                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Полиэлектролитные наноконтейнеры (с гидрофобным ядром) на основе природных полисахаридов               | модификация поверхности ПЭГ или поли-L-лизином | тимохинон            | пассивная направленная доставка липофильных препаратов                                                  |
| Полиэлектролитные мультислойные капсулы на основе природных полисахаридов и синтетических полипептидов | модификация поверхности лигандом DR5-B         | доксорубицин         | активная направленная (таргетная) доставка с преодолением терапевтической резистентности раковых клеток |

### 3.3.1 Полиэлектrolитные биodeградируемые наноконтейнеры на основе природных полисахаридов

#### 3.3.1.1 Получение и модификация наноконтейнеров

Для получения полиэлектролитных наноконтейнеров, загруженных липофильными препаратами, был использован метод эмульсификации с применением низкочастотного ультразвука (см. Приложение, Рисунок П6). Для этого в раствор смеси противоположно заряженных полиэлектролитов, формирующих оболочку ПН, добавляли масляную фазу с растворенным в ней липофильным препаратом и подвергали систему ультразвуковому воздействию.

Для формирования оболочки ПН использовали природные полисахариды, в частности хитозан или ДЭАЭ-декстран (поликатионы) и ксантановую камедь (полианион). Таким образом, были получены ПН со структурой масляное ядро/полиэлектролитная оболочка, а именно хитозан/ксантановая камедь или ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь (см. Приложение, Рисунок П7). Для предотвращения преждевременного взаимодействия между противоположно заряженными полиэлектролитами рН обоих исходных растворов полисахаридов снижали до 2. При таком рН ксантановая камедь находится в недиссоциированном состоянии, что препятствует ее реакции с поликатионами.

Для загрузки в ПН использовали тимохинон, растворенный в соевом масле (соотношение масло/вода – 1/500, 1/200, 1/100 или 1/50, v/v). Известно, что TQ обладает как противовоспалительным, так и противоопухолевым действием за счет ингибирования метастазирования и ангиогенеза опухоли [269,270], однако он нестабилен и быстро разлагается на свету [271,272], что затрудняет его применение в свободном виде. Для изучения накопления ПН в клетках их загружали красителем Nile Red. Поскольку инкапсулируемые вещества (TQ и NileRed) являются липофильными, эффективность загрузки составляла 100 % при всех исследованных соотношениях масло/вода.

Поверхность некоторых образцов ПН была модифицирована путем электростатической адсорбции ПЭГ или поли-L-лизина для придания наноносителям новых свойств. Предполагалось, что модификация ПН с помощью ПЛ (образец ПН-ПЛ) позволит добиться высокого  $\xi$ -потенциала, что, в свою очередь, ускорит проникновение таких носителей в клетки, а модификация ПЭГ (образец ПН-ПЭГ) – увеличит их стабильность.

Таким образом, была получена серия немодифицированных ПН, а также ПН-ПЛ и ПН-ПЭГ разного состава (ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь или хитозан/ксантановая камедь) и с разным соотношением фаз масло/вода.

## 3.3.1.2 Исследование физико-химических свойств полимерных наноконтейнеров

Некоторые физико-химические параметры образцов представлены в Таблице 27. Было показано, что средний диаметр ПН определялся соотношением масло/вода. Так, в случае ПН на основе ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь средний диаметр немодифицированных ПН составлял  $350 \pm 51$  нм (соотношение масло/вода – 1/500, v/v);  $760 \pm 42$  нм (1/200);  $1270 \pm 50$  (1/100) и  $2680 \pm 35$  нм (1/50). При этом состав полиэлектrolитной оболочки (ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь или хитозан/ксантановая камедь) влиял на средний диаметр ПН в гораздо меньшей степени. Модификация ПЭГ приводила к увеличению их среднего диаметра: например, диаметр немодифицированных ПН составлял  $350 \pm 51$  нм, а ПН-ПЭГ –  $420 \pm 58$  нм (ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь; 1/500, v/v); тогда как модификация ПЛ не вызывала значительных изменений в их диаметре ( $350 \pm 51$  нм для немодифицированных ПН против  $360 \pm 64$  нм для ПН-ПЛ).

Кроме того, видно, что немодифицированные ПН имели отрицательный  $\zeta$ -потенциал в диапазоне от  $-37,4 \pm 3,5$  до  $-43,2 \pm 2,5$  (ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь) и от  $-49,3 \pm 4,1$  до  $-55,8 \pm 4,2$  (хитозан/ксантановая камедь). При этом модификация их поверхности ПЛ позволила повысить их  $\zeta$ -потенциал до  $+25,5 \pm 5,1$  мВ или  $+20,1 \pm 2,4$  мВ для ПН-ПЛ состава ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь и состава хитозан/ксантановая камедь, соответственно.

Таблица 27 – Физико-химические параметры полиэлектrolитных наноконтейнеров

| Состав ПН                          | Соотношение масло/вода, (v/v) | Модификация поверхности (полимер) | Средний диаметр, нм | $\zeta$ -потенциал, мВ |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------|------------------------|
| ДЭАЭ-декстран / ксантановая камедь | 1/50                          | -                                 | $2680 \pm 35$       | $-37,4 \pm 3,5$        |
|                                    | 1/100                         | -                                 | $1270 \pm 50$       | $-41,7 \pm 3,8$        |
|                                    | 1/200                         | -                                 | $760 \pm 42$        | $-43,2 \pm 2,5$        |
|                                    | 1/500                         | -                                 | $350 \pm 51$        | $-40,2 \pm 6,9$        |
|                                    |                               | ПЛ                                | $360 \pm 64$        | $+25,5 \pm 5,1$        |
|                                    |                               | ПЭГ                               | $420 \pm 58$        | $-16,1 \pm 3,5$        |
| хитозан / ксантановая камедь       | 1/50                          | -                                 | $2130 \pm 150$      | $-52,0 \pm 6,0$        |
|                                    | 1/100                         | -                                 | $1471 \pm 129$      | $-49,3 \pm 4,1$        |
|                                    | 1/200                         | -                                 | $824 \pm 97$        | $-53,9 \pm 5,6$        |
|                                    | 1/500                         | -                                 | $512 \pm 80$        | $-55,8 \pm 4,2$        |
|                                    |                               | ПЛ                                | $520 \pm 82$        | $+20,1 \pm 2,4$        |
|                                    |                               | ПЭГ                               | $589 \pm 73$        | $-28,5 \pm 3,0$        |

Все образцы были стабильны в течение 6 месяцев, что можно объяснить наличием на их поверхности заряда, препятствующего самопроизвольной агрегации ПН.

Морфологию образцов изучали с помощью СЭМ. На Рисунке 63 представлены микрофотографии немодифицированных ПН состава хитозан/ксантановая камедь со средним

размером  $512 \pm 80$  нм (1/500, v/v) и  $2130 \pm 150$  нм (1/50, v/v). Видно, что ПН имели сферическую форму, при этом их средний размер хорошо коррелировал с результатами DLS (см. Таблицу 27).



Рисунок 63 – Микрофотографии полиэлектролитных наноконтейнеров. СЭМ.

Шкала – 10 мкм (А, Б) и 2 мкм (В)

Кинетику высвобождения ТQ из ПН с оболочкой ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь (1:50, v/v) изучали с помощью диализа (см. Приложение, Рисунок П8). Было показано, что через 24 ч из немодифицированных ПН высвобождалось 33 % ТQ, тогда как из образца ПН-ПЛ – 29 %, а из ПН-ПЭГ – 28 %. Следовательно, можно заключить, что модификация поверхности ПН данными полимерами практически не влияла на эффективность высвобождения ТQ.

Таким образом, физико-химические параметры ПН (средний диаметр,  $\zeta$ -потенциал) можно варьировать, меняя соотношение масло/вода или адсорбируя на их поверхности различные полимеры.

### 3.3.1.3 Исследование накопления полимерных наноконтейнеров в клетках

В качестве модельных клеток были выбраны линии аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и меланомы кожи мыши (М3). Локализацию и накопление ПН в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*) и сфероидах (3D модель *in vitro*) изучали с помощью КЛСМ.

На первом этапе для изучения влияния размера немодифицированных ПН на их накопление в клетках были выбраны образцы с оболочкой хитозан/ксантановая камедь диаметром  $2130 \pm 150$  нм (масло/вода – 1:50, v/v) и  $512 \pm 80$  нм (1:500, v/v). Из Рисунка 64 видно, что ПН начинали адсорбироваться на поверхности клеток уже после 5 мин инкубации, а после 30 мин уровни интенсивности флуоресценции обоих образцов достигали максимума. При этом после 30 мин инкубации ПН меньшего размера ( $512 \pm 80$  нм) имели более яркую флуоресценцию, чем ПН со средним диаметром  $2130 \pm 150$  нм. Это позволяет предположить,

что мелкие ПН накапливались в клетках быстрее и в большем количестве, чем более крупные ПН. Также стоит отметить, что даже после 2 ч инкубации оба образца были локализованы на/в мембране клеток, но не проникали во внутриклеточное пространство.

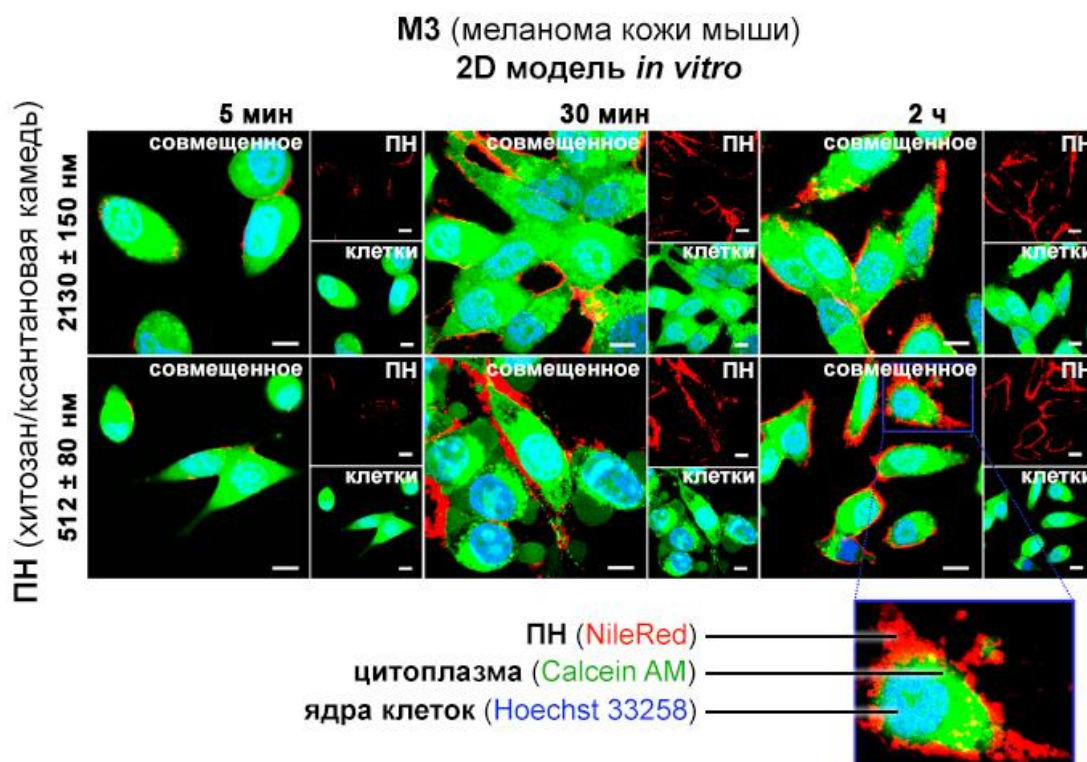


Рисунок 64 – Микрофотографии клеток M3 после инкубации с немодифицированными полиэлектролитными наноконтейнерами. КЛСМ. Шкала – 10 мкм

Аналогичный эксперимент проводили со сфероидом из клеток M3 (3D модель *in vitro*), а далее для определения уровней накопления полученные микрофотографии срезов сфероидов программной обработке (Рисунок 65). Стоит отметить, что для сфероидов разница в накоплении немодифицированных ПН разного диаметра была более явной, чем для монослойной культуры клеток (см. Рисунок 64). На Рисунке 65А высота красных сигналов соответствует количественному накоплению ПН, а их расположение отображает локализацию ПН во внутреннем пространстве сфероида. Видно, что после 1 ч инкубации ПН меньшего диаметра ( $512 \pm 80$  нм) накапливались в большем количестве, чем ПН с диаметром  $2130 \pm 150$  нм и уже были локализованы во внутреннем объеме сфероидов. При этом более крупные ПН к этому времени по-прежнему оставались адсорбированными на внешней поверхности сфероидов. После 4 ч инкубации уровни накопления обоих образцов увеличивались, причем ПН диаметром  $512 \pm 80$  нм были максимально сконцентрированы в центре сфероида, а ПН диаметром  $2130 \pm 150$  нм только начали смещаться к центру. Так, на микрофотографии

поперечного среза сфероиды (Рисунок 65Б,В) четко виден сигнал ПН диаметром  $512 \pm 80$  нм, равномерно распределенный в центре среза.

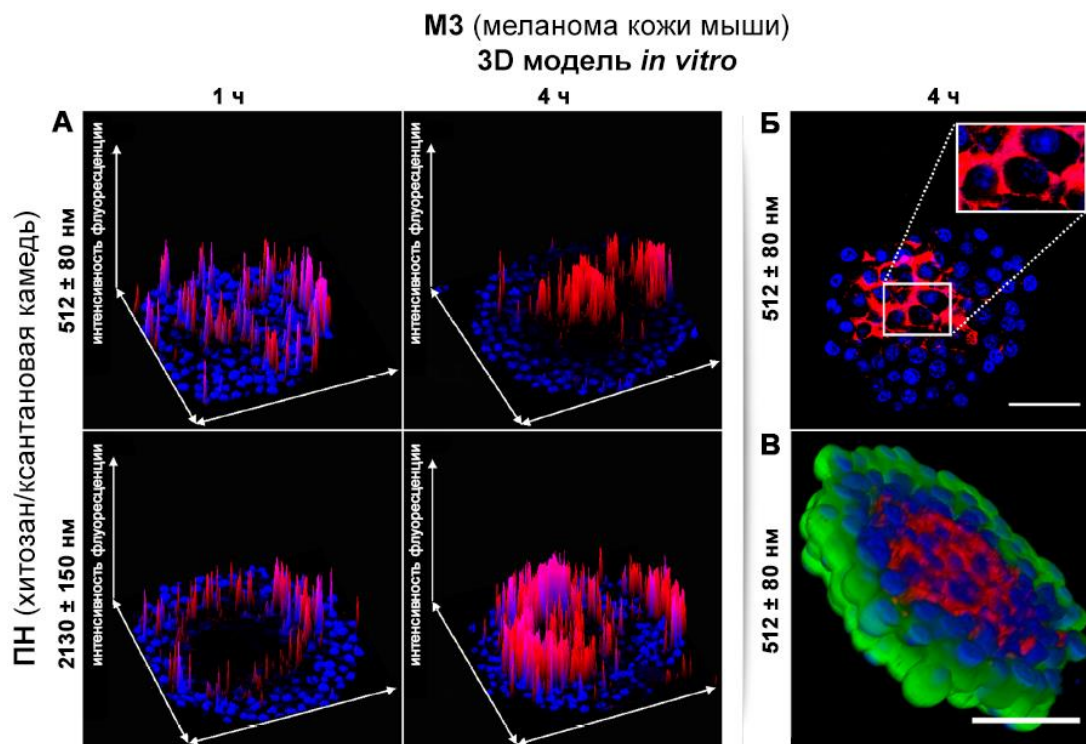


Рисунок 65 – Накопление немодифицированных полиэлектролитных наноконтейнеров в сфероиды из клеток М3. А – распределение и уровни накопления ПН; Б – поперечный срез сфероиды; В – объемный срез сфероиды. ПН (Nile Red) – красный; ядра клеток (Hoechst 33258) – синий; цитоплазма (Calcein AM) – зеленый. КЛСМ. Шкала – 50 мкм

Поскольку ПН рассматриваются как потенциальные носители для доставки лекарств, для дальнейших экспериментов был выбран образец диаметром  $512 \pm 80$  нм, показавший максимальную эффективность накопления. Для формирования полимерной оболочки ПН была выбрана смесь ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь, поскольку в отличие от хитозана, ДЭАЭ-декстран имеет фармакологическую статью, разрешающую его администрирование в кровь.

Таким образом, немодифицированные ПН состава ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь (масло/вода – 1/500, v/v) и их модифицированные аналоги ПН-ПЛ и ПН-ПЭГ также были изучены с помощью КЛСМ. Из Рисунка 66 видно, что немодифицированные ПН и ПН-ПЛ наблюдали на плазматической мембране клеток уже через 15 мин инкубации, тогда как ПН-ПЭГ также локализовались на внешней поверхности клеток, но обладали гораздо менее яркой флуоресценцией. Это можно объяснить некоторым экранированием поверхности ПН молекулами ПЭГ, затрудняющими контакт ПН-ПЭГ с клетками.

При этом после 1 ч инкубации уровни накопления всех ПН увеличивались, причем, судя по интенсивности флуоресценции, ПН-ПЛ накапливались в большем количестве по сравнению

с другими образцами и распределялись в основном на периферии клеток (возможно, на внутренней поверхности плазматической мембраны). Это может быть связано с высоким  $\zeta$ -потенциалом **ПН-ПЛ**, который, как известно, с одной стороны, облегчает контакт с отрицательно заряженной клеточной мембраной, а с другой – затрудняет последующее отделение от нее и дальнейшее проникновение в клетку. Стоит также отметить, что в отличие от клеток МЗ (см. Рисунок 64), немодифицированные **ПН** проникали внутрь клеток МСF-7 только после 1 ч инкубации, что, вероятно, можно объяснить специфическими особенностями этих двух клеточных линий.

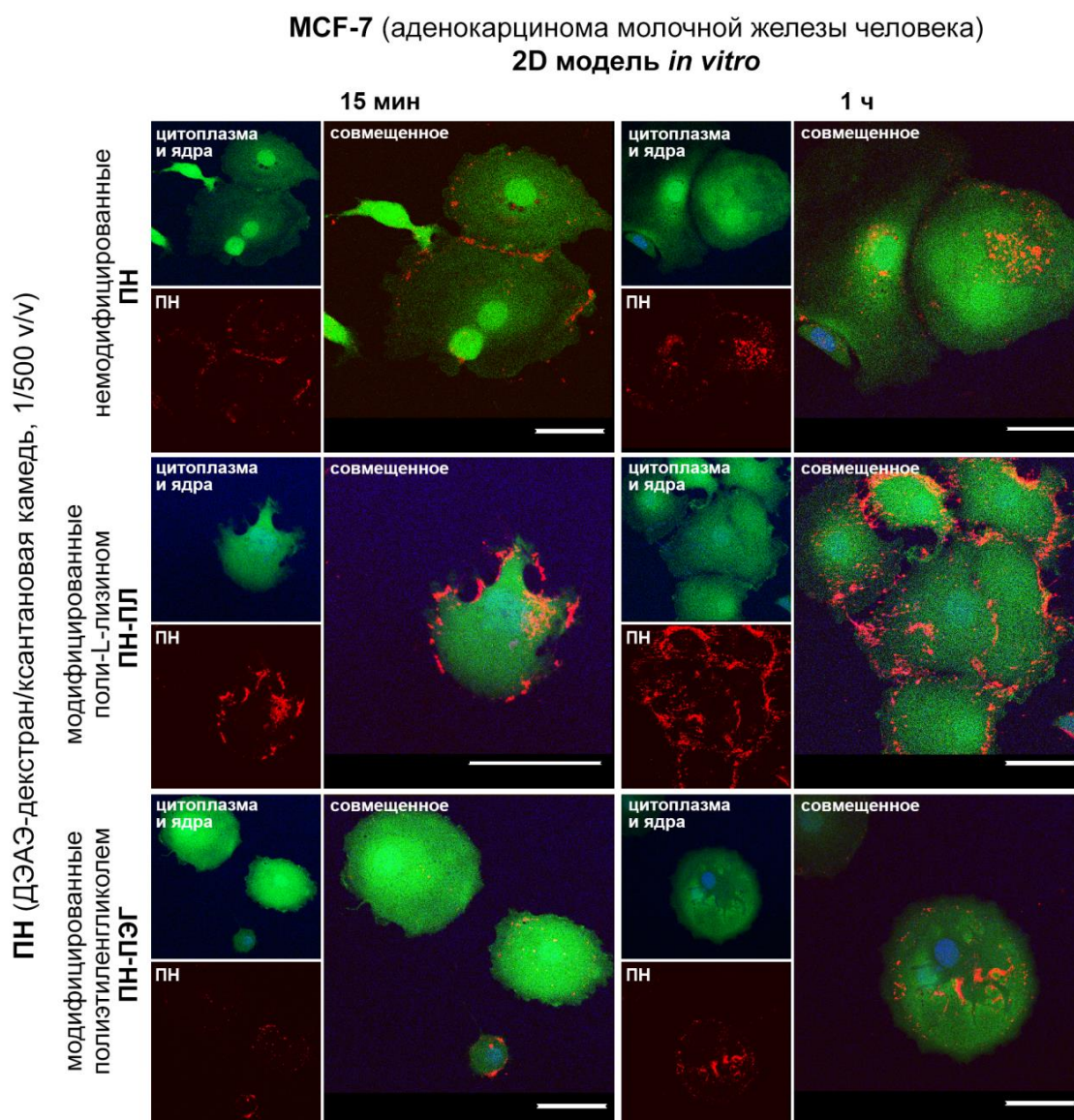


Рисунок 66 – Микрофотографии клеток МСF-7 после инкубации с немодифицированными и модифицированными полиэлектролитными наноконтейнерами. ПН (Nile Red) – красный; ядра клеток (Hoechst 33258) – синий; цитоплазма (Calcein AM) – зеленый. КЛСМ. Шкала – 10 мкм

В случае сфероидов (Рисунок 67) была отмечена схожая тенденция: все образцы ПН адсорбировались на внешней поверхности сфероида в течение 1 ч, а затем постепенно проникали в его внутренний объем. При этом образец **ПН-ПЭГ** наблюдали в центре сфероидов только после в 4 ч, в отличие от немодифицированных **ПН** (2,5 ч) и **ПН-ПЛ** (1,5 ч).

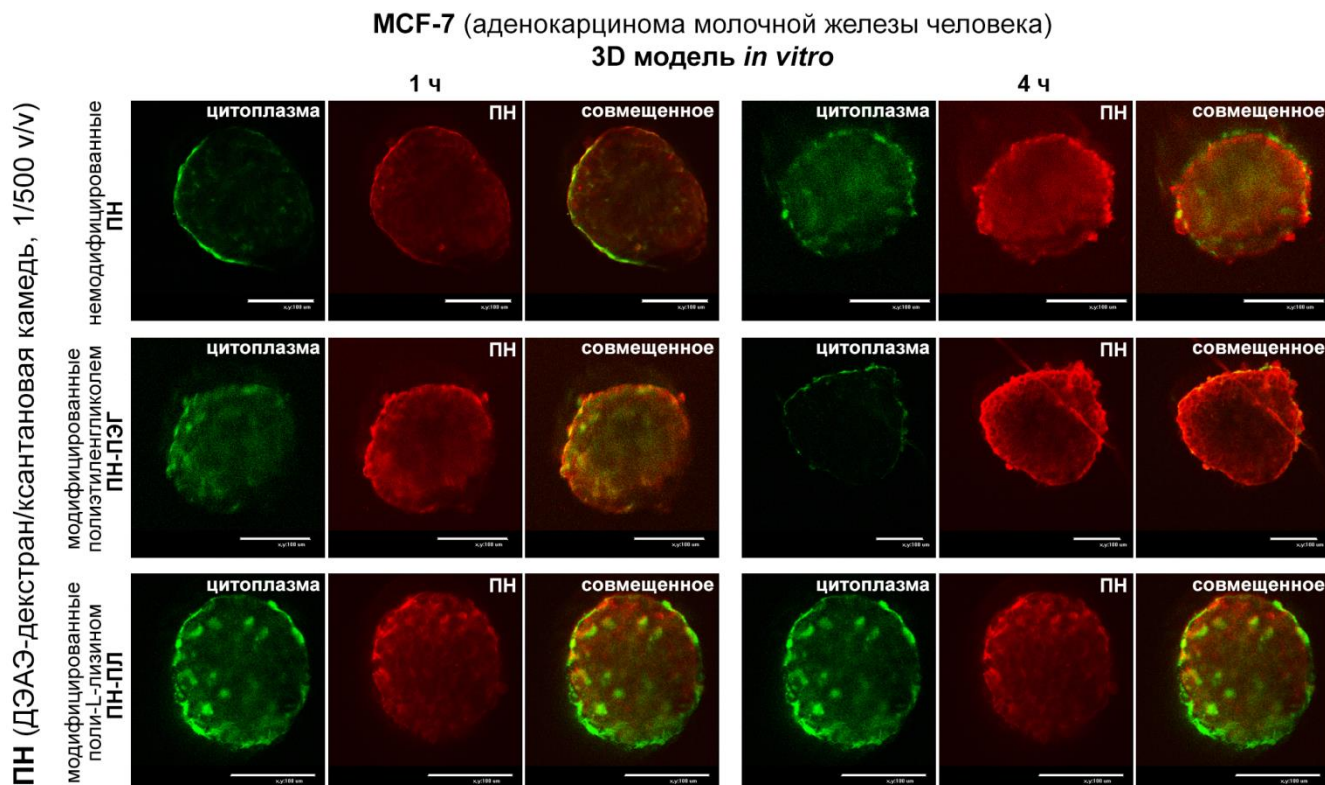


Рисунок 67 – Микрофотографии сфероидов из клеток MCF-7 после инкубации с немодифицированными и модифицированными полиэлектролитными наноконтейнерами. ПН (Nile Red) – красный; ядра клеток (Hoechst 33258) – синий; цитоплазма (Calcein AM) – зеленый. КЛСМ. Шкала – 100 мкм

Для количественной оценки накопления ПН в клетках MCF-7 использовали проточную цитофлуориметрию (в случае монослойной культуры клеток) или флуориметрию (в случае сфероидов) (Рисунок 68). Видно, что в 2D модели *in vitro* через 30 мин клетки поглощали 15 % (**ПН-ПЭГ**), 23 % (немодифицированные **ПН**) и 68 % (**ПН-ПЛ**), причем во всех временных точках эффективность накопления **ПН-ПЛ** была выше уровней накопления других образцов. Это можно объяснить их достаточно высоким положительным  $\zeta$ -потенциалом ( $+25,5 \pm 5,1$  мВ). Так, максимальное накопление **ПН-ПЛ** наблюдали уже через 1 ч инкубации с клетками, тогда как уровни накопления немодифицированных **ПН** и **ПН-ПЭГ** увеличивались на протяжении 4 ч. При этом поглощение клетками образца **ПН-ПЭГ** происходило медленнее всего, что особенно заметно через 4 ч. К этому времени уровни накопления **ПН-ПЛ** и немодифицированных ПН составляли 97 и 95 %, соответственно, а **ПН-ПЭГ** – только 62 %.

Аналогичные результаты были получены и в случае 3D модели *in vitro*: **ПН-ПЛ** также накапливались эффективнее остальных образцов, а их максимальное накопление (95 %) наблюдали через 2 ч. Стоит отметить, что в случае сфероидов накопление всех образцов происходило менее эффективно, чем в монослойной культуре клеток, что хорошо соотносится с результатами накопления других типов наноносителей (например, ПЭГилированных и фолат-конъюгированных липосом). Так, через 30 мин накопление **ПН-ПЛ** составляло 31 %, немодифицированных **ПН** – 13 %, а **ПН-ПЭГ** – всего 4 %.

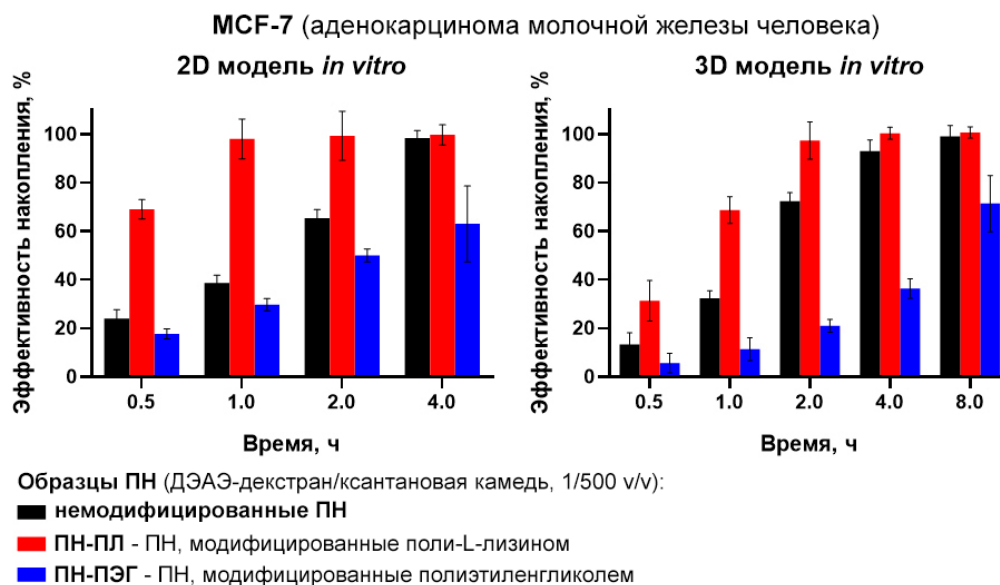


Рисунок 68 – Эффективность накопления немодифицированных и модифицированных полиэлектролитных наноконтейнеров в клетках MCF-7. Проточная цитофлуориметрия (2D модель *in vitro*) и флуориметрия (3D модель *in vitro*)

Таким образом, было показано, что ПН разного состава и с разным соотношением масло/вода способны проникать в клетки M3 и MCF-7, однако образцы меньшего диаметра ( $512 \pm 80$  нм) накапливаются более эффективно, чем более крупные ПН ( $2130 \pm 150$  нм). При этом модификация поверхности ПН адсорбцией полимеров также влияет на их захват клетками: так, образцы ПН-ПЛ накапливаются в клетках наиболее интенсивно, тогда как ПН-ПЭГ – наименее.

#### 3.3.1.4 Исследование цитотоксичности полимерных наноконтейнеров

При исследовании цитотоксичности методом МТТ-теста (Таблица 28, Рисунок 69) в качестве контроля использовали образцы, не загруженные тимохиноном. Анализ их цитотоксичности показал, что пустые немодифицированные **ПН** и **ПН-ПЭГ** не проявляли цитотоксичности даже после 72 ч инкубации с клетками MCF-7 ( $IC_{50} > 0,50$  мг/мл). При этом пустые **ПН-ПЛ** были умеренно цитотоксичны: их значения  $IC_{50}$  составляли  $0,48 \pm 0,07$  мг/мл после 48 ч инкубации и  $0,37 \pm 0,04$  мг/мл после 72 ч. Вероятно, это можно объяснить

достаточно высоким  $\zeta$ -потенциалом данного образца. В случае TQ-загруженных наноносителей максимальную цитотоксичность выявили у образца **ПН-ПЛ+TQ**: его значения IC50 составляли  $0,07 \pm 0,01$ ;  $0,02 \pm 0,01$  и  $<0,02$  мг/мл через 24, 48 и 72 ч соответственно. При этом немодифицированные **ПН+TQ** были менее токсичны, чем **ПН-ПЛ+TQ**, однако вызывали гибель 50 % клеток уже в первые сутки: их значения IC50 составляли  $0,48 \pm 0,09$ ;  $0,41 \pm 0,10$  и  $0,19 \pm 0,05$  мг/мл через 24, 48 и 72 ч инкубации, соответственно. Что касается образца **ПН-ПЭГ+TQ**, то он вызывал гибель клеток только спустя 72 ч при высоких концентрациях препарата ( $0,27 \pm 0,04$  мг/мл). Эти результаты хорошо коррелируют с эффективностью накопления немодифицированных **ПН**, **ПН-ПЛ** и **ПН-ПЭГ** в клетках (см. Рисунок 68).

Таблица 28 – Значения IC50 для немодифицированных и модифицированных полиэлектролитных наноконтейнеров после инкубации с клетками MCF-7. 2D модель *in vitro*. Результаты МТТ–теста

| Образцы               |                 | IC50, мг/мл     |                 |                 |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                       |                 | 24 ч            | 48 ч            | 72 ч            |
| немодифицированные ПН | + TQ            | $0,48 \pm 0,09$ | $0,41 \pm 0,10$ | $0,19 \pm 0,05$ |
|                       | пустые (без TQ) | $> 0,50$        |                 |                 |
| ПН-ПЛ                 | + TQ            | $0,07 \pm 0,01$ | $0,02 \pm 0,01$ | $< 0,02$        |
|                       | пустые (без TQ) | $> 0,50$        | $0,48 \pm 0,07$ | $0,37 \pm 0,04$ |
| ПН-ПЭГ                | + TQ            | $> 0,50$        |                 | $0,27 \pm 0,04$ |
|                       | пустые (без TQ) | $> 0,50$        |                 |                 |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

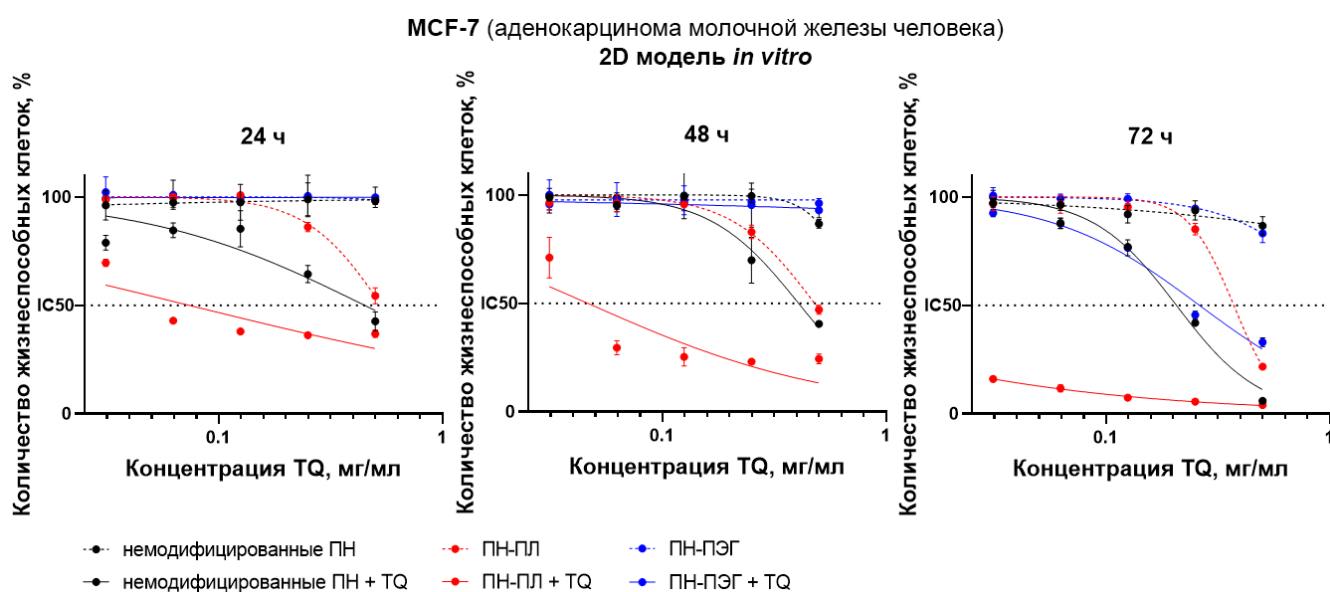


Рисунок 69 – Цитотоксичность немодифицированных и модифицированных полиэлектролитных наноконтейнеров для клеток MCF-7. Контроли: пустые ПН (без TQ); необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Таким образом, был продемонстрирован цитотоксический эффект TQ-загруженных ПН всех типов, однако, наиболее ярко выражен он был в случае образца **ПН-ПЛ+TQ**, а наименее – у **ПН-ПЭГ+TQ**. Полученные результаты могут быть напрямую связаны с различной эффективностью накопления этих образцов в клетках.

### *Заключение*

Методом эмульгирования с применением низкочастотного ультразвука получены полимерные наноконтейнеры со структурой ядро/оболочка для доставки противораковых липофильных лекарств. Ядро представляет собой гидрофобную фазу (масло), в которую загружен водонерастворимый тимохинон, а оболочка сформирована из противоположно заряженных полиэлектролитов (хитозан/ксантановая камедь или ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь). Поверхность наноконтейнеров модифицирована путем электростатической адсорбции ПЭГ (ПН-ПЭГ) или поли-L-лизина (ПН-ПЛ) для придания наноносителям новых физико-химических свойств.

Показано, что изменение соотношения масло/вода позволяло варьировать средний диаметр наноконтейнеров, а модификация поверхности адсорбцией ПЭГ или ПЛ – их заряд ( $\zeta$ -потенциал). Установлено, что накопление наноконтейнеров в клетках монослойной культуры (2D модель *in vitro*) и сфероидах (3D модель *in vitro*) зависело от размера и заряда поверхности. Так, наноконтейнеры меньшего диаметра ( $512 \pm 80$  нм) накапливались в клетках быстрее, чем более крупные ПН ( $2130 \pm 150$  нм). Обнаружено, что модификация поверхности ПН молекулами ПЛ позволила увеличить эффективность их накопления в клетках МЗ и MCF-7, а также повысить их цитотоксичность (IC<sub>50</sub> 0,07 мг/мл, 24 ч) в сравнении с другими образцами.

Таким образом, разработанные полисахаридные ПН перспективны для доставки различных липофильных препаратов, в том числе противораковых.

## **3.3.2 Полиэлектролитные капсулы, модифицированные лигандом DR5-B**

### **3.3.2.1 Получение и характеристика полиэлектролитных капсул**

Полиэлектролитные мультислойные капсулы (ПМК) на основе DS (полианион) и PArg (поликатион) были получены методом послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (layer-by-layer). Для этого на поверхности субмикронных сферических частиц ватерита CaCO<sub>3</sub> послойно формировали оболочку из трех бислоев – (PArg/DS)<sub>3</sub> (см. Рисунок 13). Первый (внутренний) слой представлял собой PArg, а последний (внешний) – DS.

Таким образом, поверхностный заряд ПМК был отрицательным и составлял  $-42 \pm 5$  мВ. Оценка размера капсул методом DLS показала, что ПМК имели средний диаметр  $500 \pm 65$  нм

(образец **ПМК<sub>500</sub>**). Для уменьшения размера капсул **ПМК<sub>500</sub>** подвергали термоиндуцированному сжатию (90°C, 1 ч), посредством чего получали термосжатые капсулы со средним размером  $320 \pm 80$  нм (образец **ПМК<sub>300</sub>**). На Рисунке 70 показаны микрофотографии, на которых можно наглядно увидеть изменения размера и морфологии ПМК после термообработки.

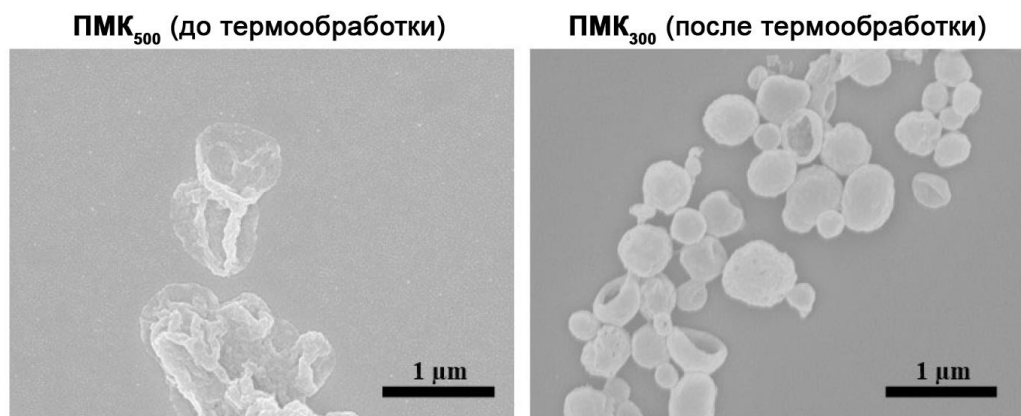


Рисунок 70 – Микрофотографии полиэлектролитных капсул. СЭМ. Шкала – 1 мкм

Затем **ПМК<sub>500</sub>** и **ПМК<sub>300</sub>** модифицировали путем адсорбции на их поверхности лиганда, который селективно связывается с «рецептором смерти» DR5 опухолевых клеток, индуцируя их апоптоз. Лиганд представляет собой рекомбинантный белок DR5-B, который является аналогом цитокина TRAIL. Таким образом, получали образцы модифицированных капсул **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5B**, соответственно. Кроме того, проводили оптимизацию процесса адсорбции лиганда DR5-B на поверхность ПМК, что позволило увеличить количество адсорбированного лиганда в общей сложности с 12 до 81 %. Было показано, что модификация поверхности ПМК с помощью DR5-B приводила к изменению  $\zeta$ -потенциала с отрицательного на положительный, а именно с  $-42 \pm 5$  (**ПМК<sub>500</sub>**) до  $+29 \pm 5$  мВ (**ПМК<sub>500</sub>-DR5-B**).

Для изучения синергетического цитотоксического действия белка DR5-B и доксорубина, капсулы загружали DOX в субтоксичной концентрации (получены образцы **ПМК<sub>500</sub>+DOX**, **ПМК<sub>300</sub>+DOX**, **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B+DOX** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5B+DOX**). Обнаружено, что эффективность инкапсулирования DOX составляла  $85 \pm 7$  %, что соответствует 0,002 мкг DOX на одну капсулу. Целью создания такой комбинированной системы доставки (**ПМК<sub>500</sub>-DR5-B+DOX** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5B+DOX**) является одновременная активация различных путей, вызывающих гибель клеток, что приводит к синергетическому усилению противоопухолевого эффекта [273,274].

Все образцы ПМК сохраняли свою агрегационную стабильность при хранении в виде водной суспензии не менее 30 дней, что было подтверждено измерением их  $\zeta$ -потенциала. Так,

например,  $\zeta$ -потенциал **ПМК<sub>300</sub>** составлял  $-47 \pm 6$  (0 дней) и  $-42 \pm 8$  мВ (30 дней). При этом количество высвобождающегося при хранении DR5-B было близко к нулю, что позволяет считать комплекс DR5-B с полиэлектролитной оболочкой ПМК достаточно стабильным.

Профили высвобождения DOX из образцов **ПМК<sub>500</sub>** и **ПМК<sub>300</sub>** представлены на Рисунке 71. Видно, что высвобождение DOX из **ПМК<sub>500</sub>** было значительно выше, чем из термостатных **ПМК<sub>300</sub>**. Так, через 72 ч из **ПМК<sub>500</sub>** высвобождалось 20 % DOX, а из **ПМК<sub>300</sub>** – только 6 %.

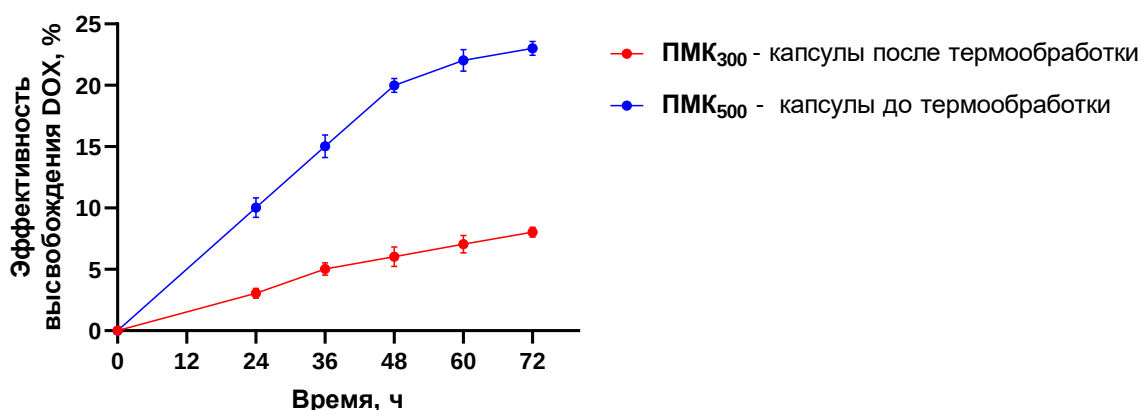


Рисунок 71 – Профили высвобождения доксорубина из полиэлектролитных капсул.

#### Диализ *in vitro*

Таким образом, термообработка ПМК позволила не только уменьшить средний размер капсул с 500 до 300 нм, но и пролонгировать высвобождение из них DOX за счет сжатия и упорядочивания макромолекул полимерной оболочки.

#### 3.3.2.2 Исследование накопления полиэлектролитных капсул в клетках

Накопление и локализацию ПМК в 2D и 3D моделях *in vitro* изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, проточной цитофлуориметрии и флуориметрии. В работе использовали линию клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (резистентные к DR5-B); рака толстой кишки человека HCT116 (не резистентные к DR5-B); а также линию фибробластов крайней плоти человека Bj-5ta (нормальные клетки).

Качественный анализ накопления капсул разного диаметра (образцы **ПМК<sub>500</sub>** и **ПМК<sub>300</sub>**) в клетках MCF-7 проводили методом КЛСМ (Рисунок 72). Видно, что в случае 2D модели *in vitro* оба образца капсул накапливались в клетках уже после 15 мин инкубации, а после 1 ч интенсивность их сигналов флуоресценции усиливалась, что указывало на увеличение количества ПМК в клетках. При этом оба типа капсул локализовались во внутриклеточном пространстве, но не в ядрах клеток, причем **ПМК<sub>500</sub>** формировали довольно крупные агрегаты,

тогда как распределение ПМК<sub>300</sub> в клетках было более равномерным. В случае 3D модели *in vitro* (сфероиды) наблюдали аналогичные результаты.

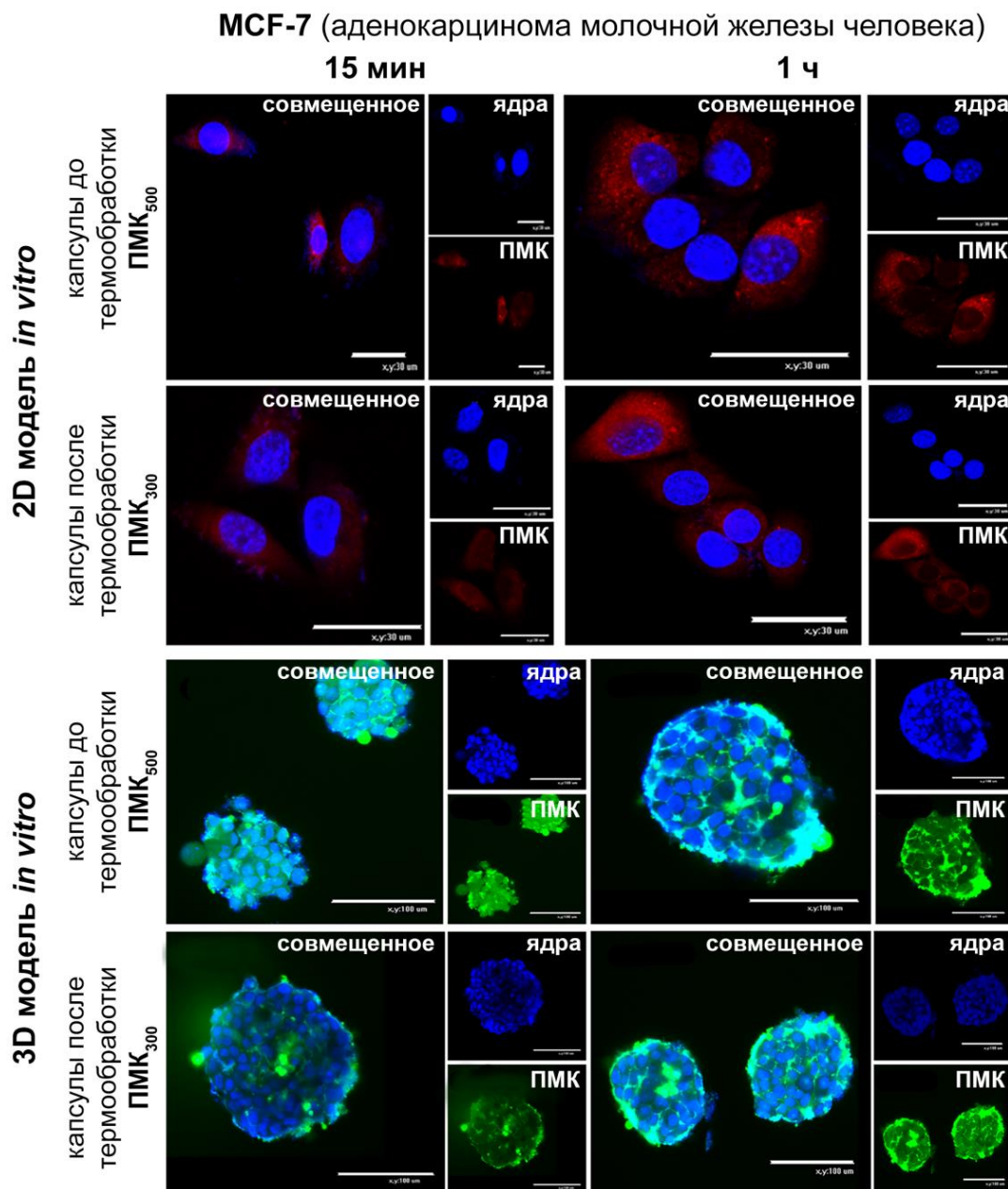


Рисунок 72 – Микрофотографии клеток MCF-7 после инкубации с немодифицированными полиэлектролитными капсулами (без лиганда). ПМК (R6G родамин, 2D модель *in vitro*) – красный; ПМК (FITC, 3D модель *in vitro*) – зеленый; ядра клеток (Hoechst 33258) – синий.

КЛСМ. Шкала – 30 мкм (верхняя панель) и 100 мкм (нижняя панель)

Результаты по накоплению ПМК после их модификации белком DR5-B в клетках монослойной культуры MCF-7 представлены на Рисунке 73. Свободный DR5-B использовали в качестве контроля. Стоит отметить, что образцы ПМК<sub>500</sub>-DR5B и ПМК<sub>300</sub>-DR5B накапливались в клетках быстрее, чем свободный белок DR5-B. Кроме того, образец ПМК<sub>300</sub>-

**DR5-B** накапливался в клетках более эффективно, чем образец **ПМК<sub>500</sub>-DR5B**, как после 15 мин, так и после 1 ч инкубации, что хорошо соотносится с результатами накопления капсул без лиганда (см. Рисунок 72).

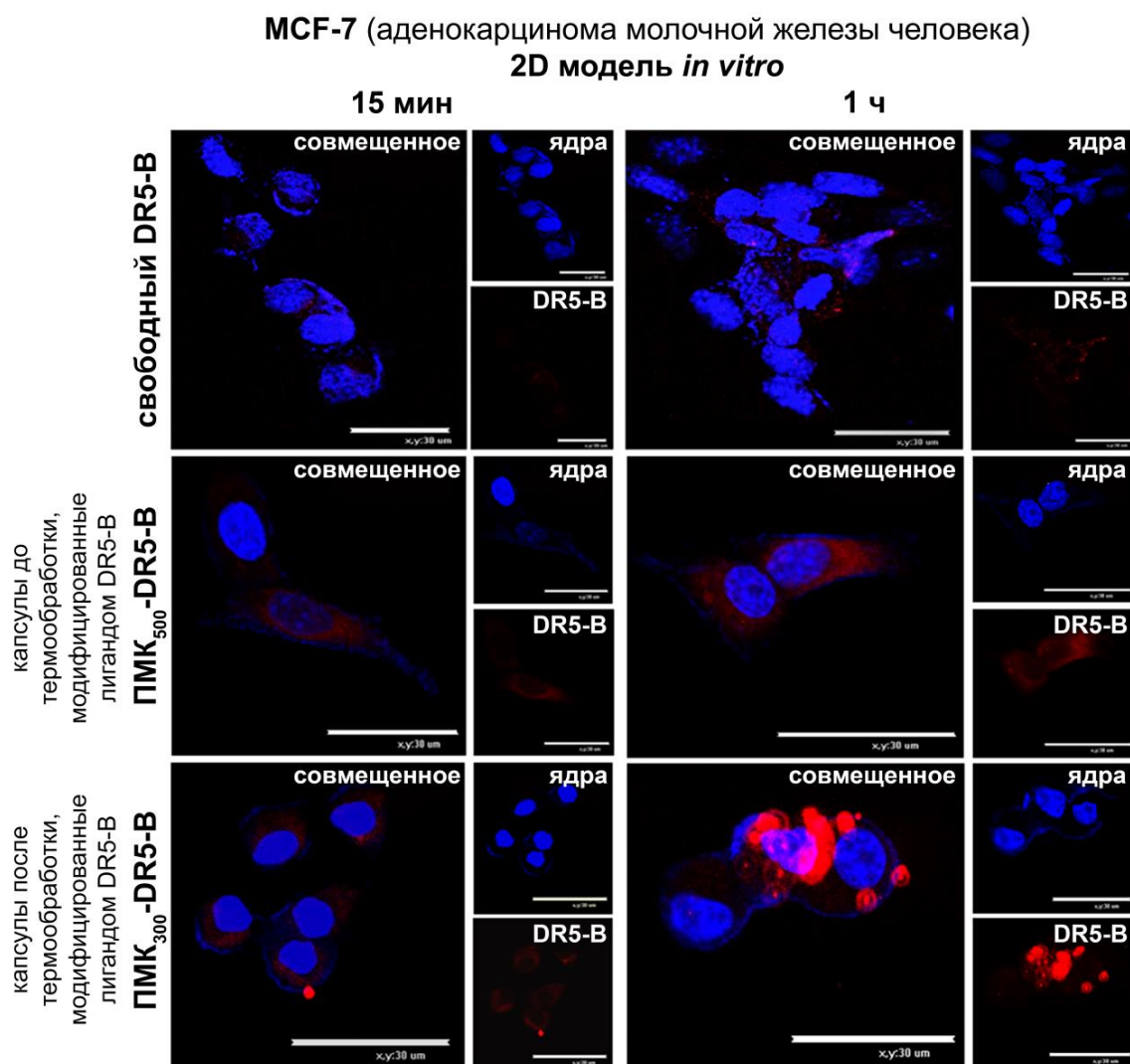


Рисунок 73 – Микрофотографии клеток MCF-7 после инкубации с DR5-B-модифицированными полиэлектролитными капсулами и свободным DR5-B. DR5-B (Cy3) – красный; ядра клеток (Hoechst 33258) – синий. КЛСМ. Шкала – 30 мкм

Количественную оценку эффективности накопления капсул, загруженных DOX, в клетках MCF-7 проводили с использованием проточной цитофлуориметрии (для 2D модели *in vitro*) и флуориметрии (для 3D модели *in vitro*). Сначала изучали уровни накопления (уровни флуоресценции) для капсул разного размера (**ПМК<sub>500</sub>** и **ПМК<sub>300</sub>**) в 2D модели *in vitro* (Рисунок 74). Свободный **DOX** использовали в качестве контроля. Максимальные уровни его накопления во всех временных точках можно объяснить более быстрым проникновением низкомолекулярного препарата в клетки по сравнению с ПМК. Эффективность накопления **ПМК<sub>300</sub>** была выше, чем **ПМК<sub>500</sub>** во всех временных точках. Так, уже через 5 мин инкубации в

клетках обнаружили **ПМК<sub>300</sub>** в 3,5 раза больше, чем **ПМК<sub>500</sub>** (39 % и 11 %, соответственно), а через 30 мин соответствующие значения были 52 % (**ПМК<sub>300</sub>**) и 32 % (**ПМК<sub>500</sub>**). Через 1 ч уровни накопления обоих образцов ПМК практически сравнялись и достигли 91 и 95 % (для **ПМК<sub>300</sub>** и **ПМК<sub>500</sub>**, соответственно). Это может указывать на то, что 1 часа инкубации было достаточно для достижения максимального накопления ПМК в клетках. Отметим, что после 5 мин инкубации уровни накопления свободного **DOX** и **ПМК<sub>300</sub>** были одинаковы и составляли 40 %. Однако через 30 мин интенсивность флуоресценции свободного **DOX** резко увеличилась до 83 %. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными с помощью конфокальной микроскопии (см. Рисунок 72).

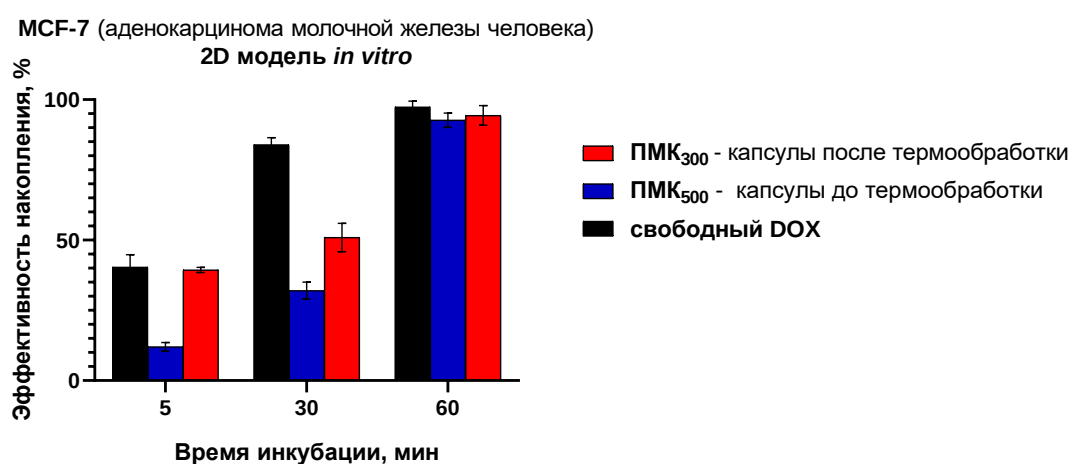


Рисунок 74 – Эффективность накопления немодифицированных полиэлектролитных капсул (без лиганда) в клетках MCF-7. Контроль – свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Результаты по накоплению капсул, модифицированных лигандом DR5-B и/или загруженных DOX представлены на Рисунке 75. Поскольку согласно результатам конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии (см. Рисунки 73 и 74), **ПМК<sub>300</sub>** накапливались в клетках эффективнее, чем **ПМК<sub>500</sub>**, именно они были выбраны для следующих экспериментов. Свободный белок **DR5-B** и свободный **DOX** использовали в качестве контролей. Как видно из Рисунка 75, уже через 5 мин инкубации эффективность накопления модифицированных капсул (образцы **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX**) была 70 % и 71 %, соответственно. Отметим, что уровни накопления этих двух образцов были практически одинаковы и в других временных точках: 84 % и 81 % (через 30 мин); 96 % и 93 % (через 1 ч). При этом накопление клетками капсул, не модифицированных DR5-B (образец **ПМК<sub>300</sub>+DOX**) происходило значительно медленнее. Так, уровни его накопления составили 39 %, 54 % и 92 % через 5, 30 и 60 мин, соответственно. Стоит также отметить, что после 60 мин инкубации уровни накопления всех образцов практически не отличались (92–96 %).

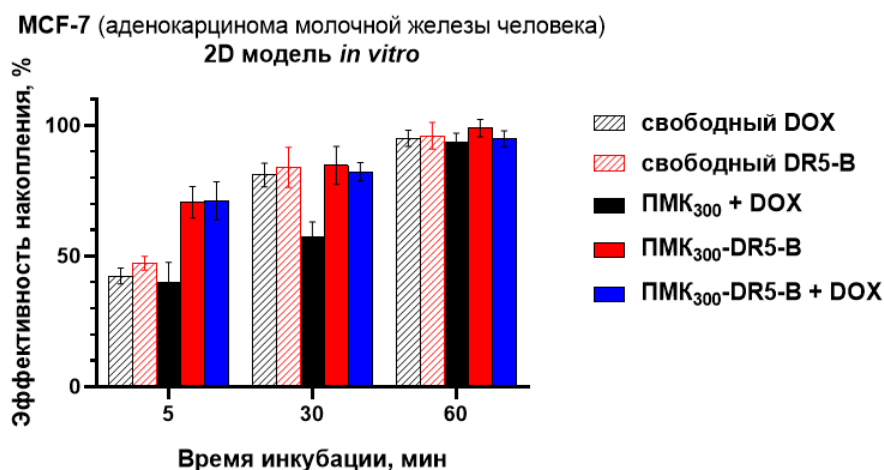


Рисунок 75 – Эффективность накопления капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B в клетках MCF-7. Контроли: свободный DOX; свободный DR5-B.

#### Проточная цитофлуориметрия

В случае сфероидов сохранялась та же тенденция накопления, однако интенсивность флуоресценции всех образцов была значительно ниже, что можно объяснить диффузионными затруднениями при проникновении капсул в мультиклеточную структуру сфероида (Рисунок 76). Как и ожидалось, свободный **DOX** проникал в сфероиды более эффективно, чем капсулы: уровни его накопления были 8, 24 и 37 % через 1, 3 и 7 ч, соответственно. С другой стороны, уровни накопления клетками свободного **DR5-B**, а также модифицированных белком капсул **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX** практически не отличались и составляли 3, 4 и 5 % (через 1 ч); 16, 15 и 16 % (через 3 ч); 33, 36 и 34 % (через 7 ч), соответственно. Уровень накопления немодифицированных капсул (образец **ПМК<sub>300</sub>+DOX**) после 1 ч инкубации был примерно таким же, как и накопление других образцов (4 %), но со временем скорость его интернализации снизилась: уровни накопления составили всего 10 % и 19 % через 3 и 7 ч.

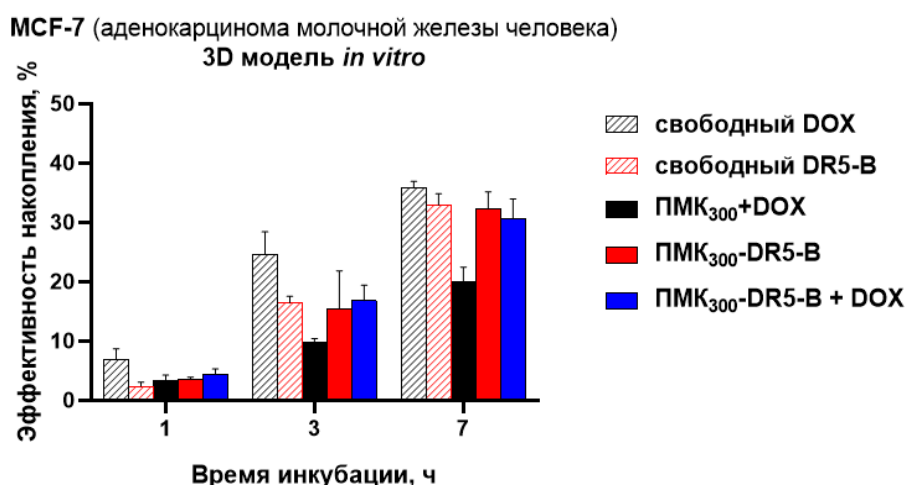


Рисунок 76 – Эффективность накопления капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B в клетках MCF-7. Контроли: свободный DOX; свободный DR5-B. Флуориметрия

Таким образом, показано, что капсулы, модифицированные лигандом DR5-B, эффективнее накапливались в клетках MCF-7 по сравнению с немодифицированными образцами (без лиганда) как в 2D, так и в 3D моделях *in vitro*.

### 3.3.2.3 Исследование цитотоксичности полиэлектролитных капсул

Для оценки цитотоксичности ПМК, модифицированных DR5-B, были выбраны две линии: клетки колоректальной карциномы человека HCT116 (чувствительны к DR5-B-терапии) и аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 (резистентны к DR5-B-терапии). На первом этапе проводилось сравнение цитотоксичности капсул разного размера, поэтому использовали два образца модифицированных капсул, а именно **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B**. Капсулы без лиганда DR5-B (образцы **ПМК<sub>300</sub>** и **ПМК<sub>500</sub>**), а также свободный белок **DR5-B** использовали в качестве контролей.

В случае линии HCT116, свободный белок **DR5-B** демонстрировал максимальные уровни цитотоксичности как в 2D, так и в 3D модели (Рисунок 77, Таблица 29). При этом его значения IC<sub>50</sub> составляли  $31,4 \pm 2,6$ ;  $27,0 \pm 3,2$  и  $10,1 \pm 0,7$  нг/мл (для 2D модели *in vitro*);  $39,7 \pm 4,0$ ;  $33,5 \pm 2,4$  и  $28,5 \pm 5,1$  нг/мл (для 3D модели *in vitro*) через 24, 48 и 72 ч инкубации, соответственно. Немодифицированные **ПМК<sub>300</sub>** и **ПМК<sub>500</sub>** (без DR5-B) ожидаемо не вызывали гибели клеток (IC<sub>50</sub> > 1000,0 нг/мл) даже после 72 ч инкубации в 2D и 3D моделях *in vitro*.

Что касается капсул, модифицированных DR5-B, то образец **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** проявлял более высокую цитотоксичность по сравнению с **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B**. Так, в случае 2D модели *in vitro* их значения IC<sub>50</sub> составляли  $72,4 \pm 8,3$  и  $519,8 \pm 38,5$  нг/мл после 24 ч;  $42,1 \pm 3,8$  и  $111,7 \pm 10,9$  нг/мл после 48 ч;  $10,7 \pm 3,4$  и  $24,2 \pm 3,1$  нг/мл после 72 ч инкубации, для образцов **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B**, соответственно. Однако особенно заметная разница в их цитотоксичности проявилась в случае 3D модели *in vitro*, в которой более крупные капсулы **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B** не вызывали гибели клеток в первые 48 ч инкубации (IC<sub>50</sub> > 1000,0 нг/мл), тогда как образец **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B** достигал поллиунгибирующей концентрации уже после 24 ч (IC<sub>50</sub>  $96,0 \pm 7,7$  нг/мл). Этот результат можно объяснить более высокой эффективностью накопления **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B**, чем **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B** в клетках и сфероиде (см. Рисунок 73 и 74). При этом после 72 ч инкубации со сфероидом цитотоксичность **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** оказалась даже выше, чем у свободного **DR5-B** (величины IC<sub>50</sub> были  $19,3 \pm 1,6$  и  $28,5 \pm 5,1$  нг/мл для образцов **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** и **DR5-B**, соответственно). Подобные результаты в очередной раз подчеркивают необходимость использования 3D моделей *in vitro* для тестирования новых систем доставки, как систем позволяющих получать более релевантные результаты исследований по сравнению с 2D моделью *in vitro*.

## НСТ116 (колоректальная карцинома человека)

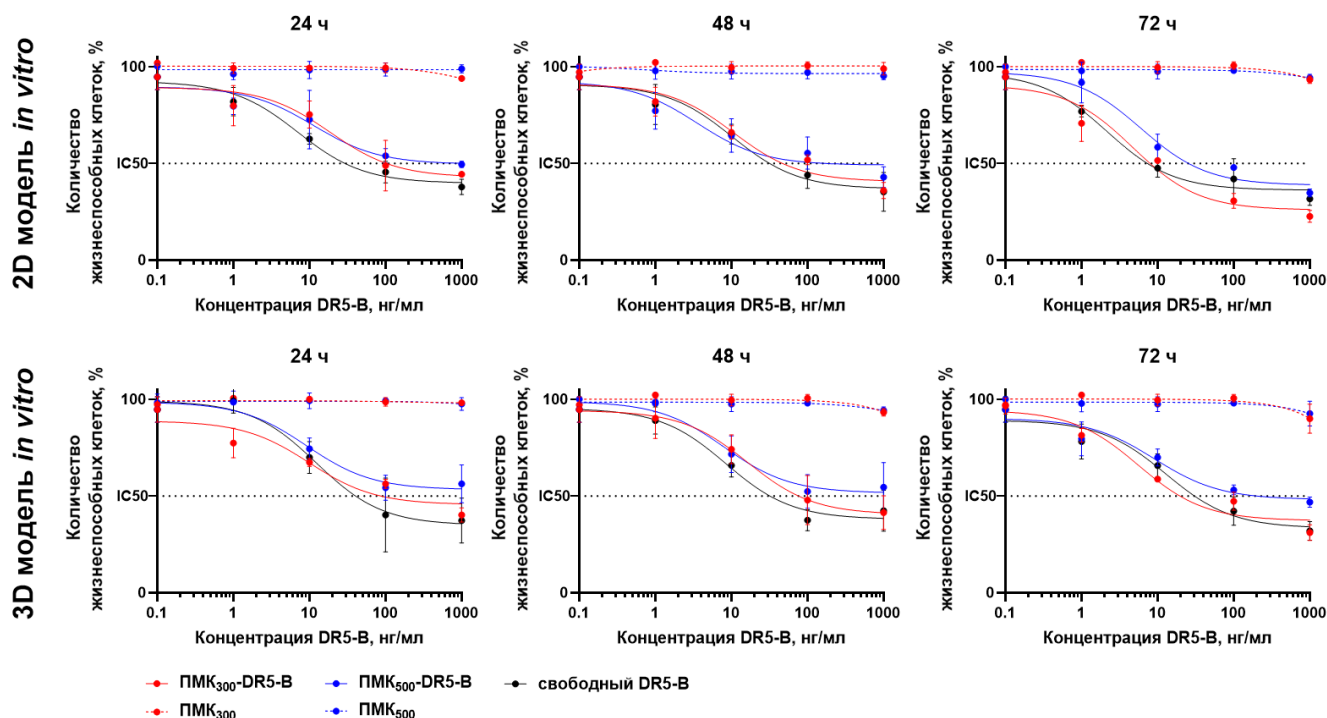


Рисунок 77 – Цитотоксичность капсул, модифицированных белком DR5-B, для клеток НСТ116.

Контроли: немодифицированные ПМК<sub>300</sub> и ПМК<sub>500</sub>; необработанные клетки (100 %

жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Таблица 29 – Значения IC<sub>50</sub> для капсул, модифицированных белком DR5-B, для клеток НСТ116. Результаты МТТ–теста

| Образцы         | Значения IC50, нг/мл      |              |            |                           |            |              |
|-----------------|---------------------------|--------------|------------|---------------------------|------------|--------------|
|                 | 2D модель <i>in vitro</i> |              |            | 3D модель <i>in vitro</i> |            |              |
|                 | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч       | 24 ч                      | 48 ч       | 72 ч         |
| ПМК300-DR5-B    | 72,4 ± 8,3                | 42,1 ± 3,8   | 10,7 ± 3,4 | 96,0 ± 7,7                | 77,9 ± 5,2 | 19,3 ± 1,6   |
| ПМК500-DR5-B    | 519,8 ± 38,5              | 111,7 ± 10,9 | 24,2 ± 3,1 | >1000,0                   |            | 109,5 ± 18,2 |
| Контроли:       |                           |              |            |                           |            |              |
| ПМК300          | >1000,0                   |              |            |                           |            |              |
| ПМК500          |                           |              |            |                           |            |              |
| свободный DR5-B | 31,4 ± 2,6                | 27,0 ± 3,2   | 10,1 ± 0,7 | 39,7 ± 4,0                | 33,5 ± 2,4 | 28,5 ± 5,1   |

IC<sub>50</sub> - полунгибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

В случае клеток MCF-7 наблюдали аналогичную тенденцию, что и для клеток НСТ116, как в 2D, так и в 3D модели *in vitro* (Рисунок 78, Таблица 30). Однако в случае клеток НСТ116 значения IC<sub>50</sub> для всех образцов с DR5-B (свободный DR5-B, ПМК<sub>300</sub>-DR5-B и ПМК<sub>500</sub>-DR5-B) были значительно ниже, чем для клеток MCF-7, что подтверждает наличие у клеток линии MCF-7 резистентности к действию DR5-B. Так, в 2D модели *in vitro* значения IC<sub>50</sub> были выявлены только после 72 ч инкубации для образцов DR5-B и ПМК<sub>300</sub>-DR5-B (627,4 ± 43,9 и

980,1 ± 61,0 нг/мл, соответственно). При этом в случае 3D модели *in vitro* ни один из образцов не вызывал гибели клеток даже после 72 ч во всем исследованном диапазоне концентраций ( $IC_{50} > 1000,0$  нг/мл).

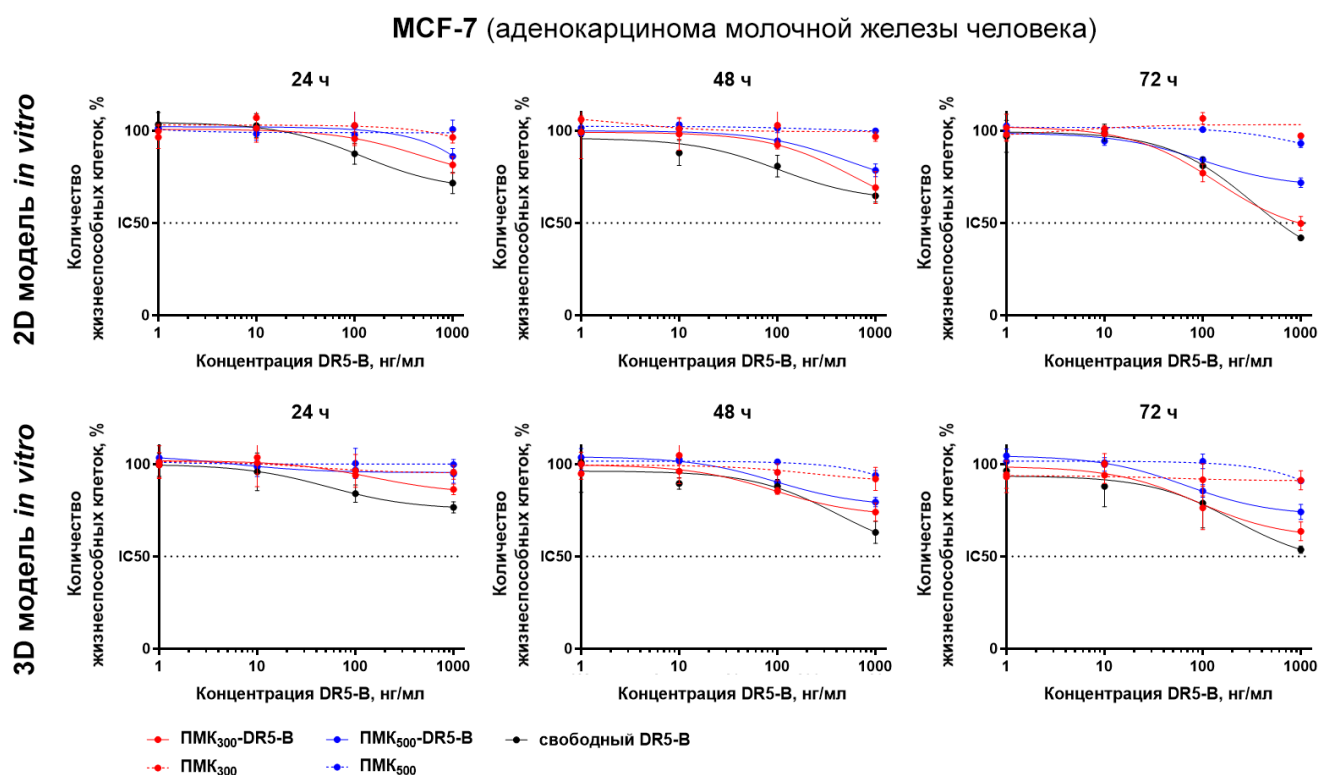


Рисунок 78 – Цитотоксичность капсул, модифицированных белком DR5-B, для клеток MCF-7.

Контроли: немодифицированные ПМК<sub>300</sub> и ПМК<sub>500</sub>; необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Таблица 30 – Значения  $IC_{50}$  для капсул, модифицированных белком DR5-B, для клеток MCF-7. Результаты МТТ–теста

| Образцы         | Значения IC50, нг/мл      |      |              |                           |      |      |
|-----------------|---------------------------|------|--------------|---------------------------|------|------|
|                 | 2D модель <i>in vitro</i> |      |              | 3D модель <i>in vitro</i> |      |      |
|                 | 24 ч                      | 48 ч | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч | 72 ч |
| ПМК300-DR5-B    | >1000,0                   |      |              | >1000,0                   |      |      |
| ПМК500-DR5-B    | >1000,0                   |      | 980,1 ± 61,0 |                           |      |      |
| Контроли:       |                           |      |              |                           |      |      |
| ПМК300          | >1000,0                   |      |              |                           |      |      |
| ПМК500          |                           |      |              |                           |      |      |
| свободный DR5-B | >1000,0                   |      | 627,4 ± 43,9 | >1000,0                   |      |      |

$IC_{50}$  - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Таким образом, в случае чувствительных к DR5-B-терапии клеток НСТ116 модификация капсул лигандом DR5-B не только приводила к увеличению эффективности их накопления в опухолевых клетках, но и ожидаемо усиливала цитотоксический эффект. Однако в случае

клеток MCF-7, резистентных к DR5-B-терапии, как свободный белок DR5-B, так и модифицированные им капсулы практически не вызывали гибель клеток даже в 2D модели *in vitro*. Следовательно, требовалось решить задачу по преодолению резистентности клеток к терапевтическому воздействию DR5-B.

Мы предположили, что загрузка ПМК-DR5-B субтоксичными концентрациями DOX приведет к синергетическому цитотоксическому воздействию. Для проверки этого предположения использовали три модельные клеточные линии: MCF-7 (клетки резистентные к DR5-B), HCT116 (клетки чувствительные к DR5-B), а также фибробласты крайней плоти человека Bj-5ta (нераковые клетки). Для эксперимента был выбран образец термосжатых капсул ПМК<sub>300</sub>-DR5-B, поскольку в предыдущих экспериментах они проявляли более выраженный противоопухолевый эффект по сравнению с ПМК<sub>500</sub>-DR5-B. Таким образом, был получен образец термосжатых капсул, модифицированных DR5-B и загруженных DOX (ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX). В качестве контролей использовали свободный DOX, свободный DR5-B, комбинацию свободного DR5-B со свободным DOX (образец DR5-B+DOX) и немодифицированные лигандом, но загруженные DOX капсулы (образец ПМК<sub>300</sub>+DOX).

Как видно из Рисунка 79 и Таблицы 31, в случае клеток HCT116 использование образца ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX показало более высокий цитотоксический эффект по сравнению с капсулами без DOX (ПМК<sub>300</sub>-DR5-B) как в 2D, так и в 3D модели *in vitro*, что было особенно заметно после 48 ч инкубации. Так, для образца ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX значения IC<sub>50</sub> составили  $47,3 \pm 4,0$  (2D модель *in vitro*) и  $49,6 \pm 6,6$  нг/мл (3D модель *in vitro*), а для образца ПМК<sub>300</sub>-DR5-B они составляли только  $98,0 \pm 9,7$  (2D модель *in vitro*) и  $167,2 \pm 21,0$  нг/мл (3D модель *in vitro*). Стоит отметить, что аналогичный синергетический эффект наблюдался также и в случае контролей: значения IC<sub>50</sub> для комбинации DR5-B+DOX были в среднем в 2–4 раза ниже, чем для свободного DR5-B (без DOX).

При этом как свободный DOX, так и немодифицированные лигандом капсулы с DOX (образец ПМК<sub>300</sub>+DOX) оказывали цитотоксическое действие только при крайне высоких концентрациях образцов. Так, например, IC<sub>50</sub> свободного DOX составляли только  $836,1 \pm 37,4$  нг/мл после 48 ч (2D модель *in vitro*) и  $956,3 \pm 64,8$  нг/мл после 72 ч (3D модель *in vitro*), что объясняется использованием очень невысоких (субтоксичных) концентраций DOX для загрузки в капсулы. Таким образом, можно заключить, что усиление цитотоксического воздействия связано непосредственно с синергетическим эффектом комбинации DOX и DR5-B (как в свободном виде, так и в составе капсул), а не с терапевтическим действием самого DOX.

## НСТ116 (колоректальная карцинома человека)

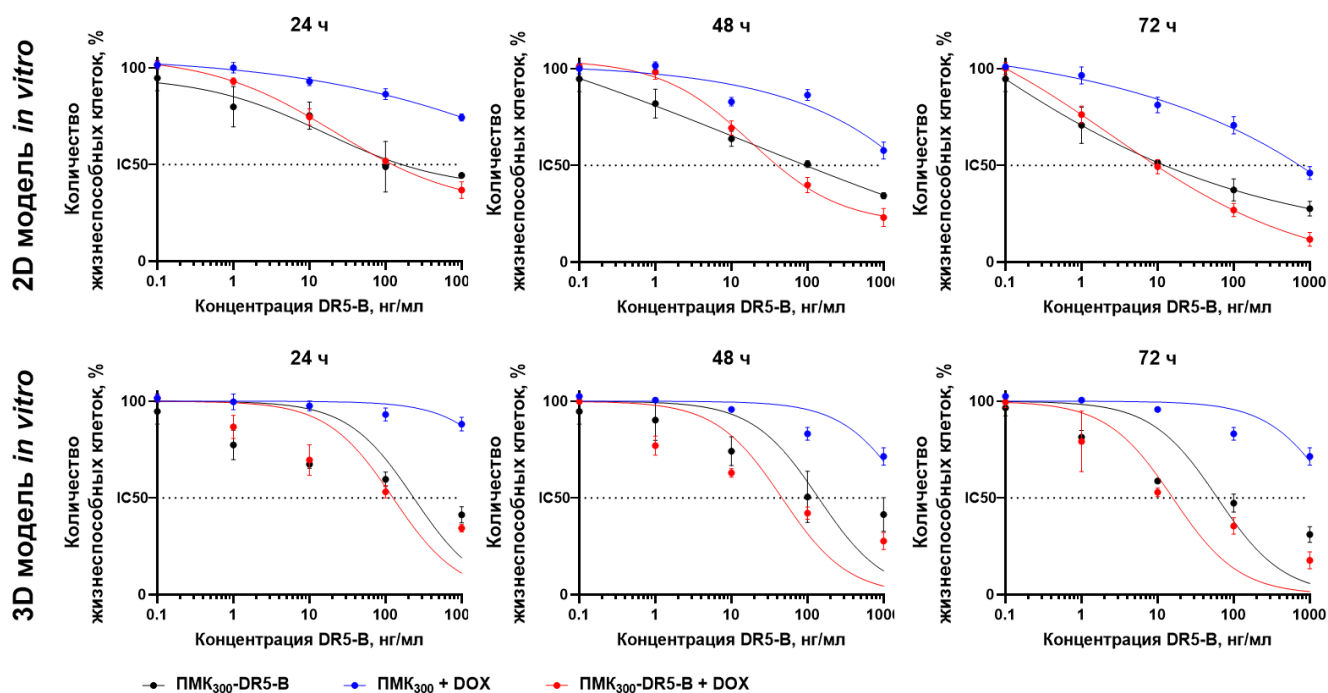


Рисунок 79 – Цитотоксичность капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B, для клеток НСТ116. Контроль – необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток). Результаты МТТ–теста

Таблица 31 – Значения IC<sub>50</sub> капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B, для клеток НСТ116. Результаты МТТ–теста

| Образцы                         | Значения IC <sub>50</sub> , нг/мл |              |              |                           |              |              |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|
|                                 | 2D модель <i>in vitro</i>         |              |              | 3D модель <i>in vitro</i> |              |              |
|                                 | 24 ч                              | 48 ч         | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч         |
| ПМК <sub>300</sub> + DOX        | >1000,0                           |              | 678,4 ± 50,5 | >1000,0                   |              |              |
| ПМК <sub>300</sub> -DR5-B       | 145,8 ± 11,8                      | 98,0 ± 9,7   | 18,1 ± 4,8   | 246,1 ± 41,5              | 167,2 ± 21,0 | 75,3 ± 12,4  |
| ПМК <sub>300</sub> -DR5-B + DOX | 106,5 ± 9,0                       | 47,3 ± 4,0   | 10,6 ± 1,7   | 148,0 ± 12,2              | 49,6 ± 6,6   | 20,9 ± 1,8   |
| <b>Контроли:</b>                |                                   |              |              |                           |              |              |
| ПМК <sub>300</sub>              | >1000,0                           |              |              |                           |              |              |
| свободный DR5-B                 | 52,7 ± 5,5                        | 45,0 ± 6,1   | 14,7 ± 3,2   | 69,1 ± 9,3                | 52,6 ± 7,1   | 46,8 ± 7,0   |
| свободный DOX + свободный DR5-B | 21,1 ± 1,8                        | 8,0 ± 2,3    | 4,5 ± 0,9    | 56,5 ± 8,4                | 34,7 ± 5,0   | 11,2 ± 2,7   |
| свободный DOX                   | >1000,0                           | 836,1 ± 37,4 | 702,5 ± 35,2 | >1000,0                   |              | 956,3 ± 64,8 |

IC<sub>50</sub> - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Для клеток MCF-7 (Рисунок 80, Таблица 32), как и в случае линии HCT116, использование комбинации DR5-B с DOX (в свободной форме и при загрузке в капсулы) приводило к значительному усилению цитотоксического эффекта, что, в свою очередь, позволило преодолеть резистентность клеток. Так, комбинация свободных препаратов (образец **DR5-B+DOX**) проявляла наиболее выраженный цитотоксический эффект по сравнению с другими образцами и вызывала гибель клеток MCF-7 уже после 24 ч инкубации в случае 2D модели *in vitro* ( $IC_{50} 804,8 \pm 30,7$  нг/мл) и после 48 ч в случае 3D модели *in vitro* ( $IC_{50} 732,0 \pm 28,1$  нг/мл).

Что касается капсул, то цитотоксичность образца **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX** становилась сопоставима с цитотоксичностью **DR5-B+DOX** уже через 48 ч в 2D модели *in vitro*: значения  $IC_{50}$  составляли  $341,2 \pm 17,8$  нг/мл и  $279,6 \pm 22,0$  нг/мл для образцов **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX** и **DR5-B+DOX**, соответственно. Схожую динамику наблюдали также и в случае 3D модели *in vitro*, в которой  $IC_{50}$  **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX** и **DR5-B+DOX** составили  $227,4 \pm 13,4$  и  $186,5 \pm 16,6$  нг/мл после 72 ч инкубации, соответственно. Это особенно важно, поскольку капсулы без DOX (образец **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B**) не проявляли в этой модели цитотоксического эффекта ( $IC_{50} > 1000,0$  нг/мл). Подобные результаты подтверждают возможность преодоления резистентности клеток к DR5-B-терапии за счет синергетического эффекта DR5-B и DOX в составе капсул даже в условиях сложной трехмерной конструкции сфероидов.

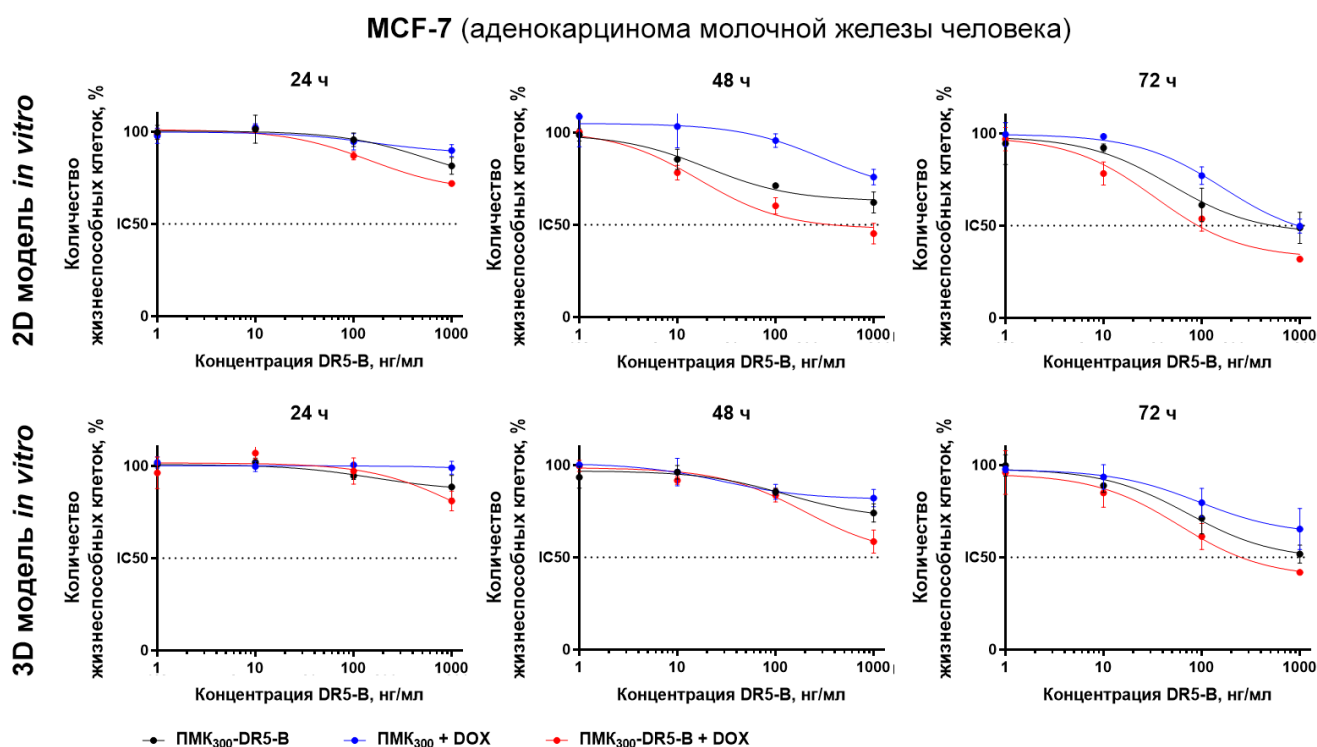


Рисунок 80 – Цитотоксичность капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B, для клеток MCF-7. Контроль – необработанные клетки (100 % жизнеспособных клеток).

Результаты МТТ–теста

Таблица 32 – Значения IC50 капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B, для клеток MCF-7. Результаты МТТ–теста

| Образцы                         | Значения IC50, нг/мл      |              |              |                           |              |              |
|---------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|
|                                 | 2D модель <i>in vitro</i> |              |              | 3D модель <i>in vitro</i> |              |              |
|                                 | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч         |
| ПМК300 + DOX                    | >1000,0                   |              |              |                           |              |              |
| ПМК300-DR5-B                    | >1000,0                   |              | 535,8 ± 31,5 | >1000,0                   |              |              |
| ПМК300-DR5-B + DOX              | >1000,0                   | 341,2 ± 17,8 | 98,1 ± 9,9   | >1000,0                   |              | 227,4 ± 13,4 |
| Контроли:                       |                           |              |              |                           |              |              |
| ПМК300                          | >1000,0                   |              |              |                           |              |              |
| свободный DR5-B                 | >1000,0                   |              | 663,3 ± 56,4 | >1000,0                   |              |              |
| свободный DOX + свободный DR5-B | 804,8 ± 30,7              | 279,6 ± 22,0 | 87,4 ± 10,5  | >1000,0                   | 732,0 ± 28,1 | 186,5 ± 16,6 |
| свободный DOX                   | >1000,0                   |              |              |                           |              |              |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Наконец, для того, чтобы убедиться в безопасности (отсутствии токсичности) капсул, модифицированных DR5-B и загруженных DOX (образец **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX**), для нормальных клеток, был изучен их цитотоксический эффект с использованием линии нормальных (нераковых) клеток фибробластов крайней плоти человека (Bj-5ta). Было показано, что все образцы оставались нетоксичными как в 2D, так и в 3D модели *in vitro* (IC50 > 1000 нг/мл) в диапазоне концентраций белка 1-1000,0 нг/мл, что подтверждает таргетную доставку капсул только в раковые клетки.

#### Заключение

Таким образом, методом послойной адсорбции полиэлектролитов (сульфата декстрана и поли-L-аргинина) были получены мультислойные полиэлектролитные капсулы двух размеров: **ПМК<sub>500</sub>** (500 ± 65 нм) и термосжатые **ПМК<sub>300</sub>** (320 ± 80 нм). Оба образца ПМК были загружены субтоксичным количеством DOX и модифицированы лигандом DR5-B (рекомбинантным вариантом цитокина TRAIL, способным селективно воздействовать на рецептор DR5).

Было показано, что термосжатые **ПМК<sub>300</sub>** накапливались в клетках более эффективно, чем **ПМК<sub>500</sub>**; а капсулы, модифицированные лигандом DR5-B – более эффективно, чем немодифицированными образцы (без лиганда). При этом уровни накопления всех образцов в сфероидов были ниже, чем в монослойной культуре клеток.

Также установлено, что цитотоксичность образцов, модифицированных лигандом DR5-B, зависела от клеточной линии. Так, в случае клеток HCT166, чувствительных к действию DR5-B, использование образцов капсул, модифицированных белком DR5-B, приводило к усилению цитотоксического эффекта, который дополнительно увеличивался при их загрузке DOX. В случае линии MCF-7, резистентной к действию DR5-B, DR5-B-модифицированные образцы без DOX практически не вызывали гибель клеток ( $IC_{50} > 1000,0$  нг/мл после 48 ч), тогда как при загрузке DOX цитотоксичность образцов существенно возрастала и позволяла преодолеть резистентность клеток ( $IC_{50} 341,2 \pm 17,8$  нг/мл после 48 ч). При использовании нормальных клеток фибробластов (Bj-5ta) было доказано таргетное действие капсул, модифицированных белком DR5-B, только на опухолевые клетки.

Таким образом, ПМК, загруженные DOX и модифицированные белком DR5-B, могут быть предложены в качестве новой системы таргетной доставки препарата в раковые клетки, позволяющей преодолеть резистентность опухолевых клеток благодаря синергетическому эффекту DR5-B и DOX.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны наноносители на основе катионных липопептидов (липосомы, в том числе модифицированные различными производными ПЭГ, и керасомы). На основе катионных ПЭГилированных липоплексов разработана система доставки ДНК и миРНК. Методом пост-модификации получены фолатные липосомы для таргетной доставки доксорубина в опухолевые клетки.
2. Получены полимерные наноносители на основе природных биоразлагаемых полисахаридов и/или синтетических пептидов, в частности наноконтейнеры для пассивной доставки липофильного препарата тимохинона и полиэлектролитные мультислойные капсулы с доксорубином, модифицированные белком DR5-B, индуцирующим апоптоз раковых клеток, для таргетной доставки.
3. Изучены физико-химические свойства всех липосомальных и полимерных наноносителей. Показано, что в зависимости от их состава и метода получения можно варьировать их параметры (средний диаметр и  $\zeta$ -потенциал, стабильность при хранении, время высвобождения препарата и др). Так, различные модификации поверхности липосом позволили увеличить их стабильность при хранении с 14 дней (немодифицированные липосомы) до 90 дней (ПЭГилированные липосомы) и 120 дней (керасомы).
4. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучена эффективность накопления и особенности локализации наноносителей в клетках в 2D (монослойная культура) и 3D (сфероиды) моделях *in vitro* с использованием 8 линий опухолевых клеток (HEK293T, HepG2, MCF-7, HeLa, U-87MG, C6, M3, HCT116) и 2 линий нормальных клеток (MSC, Bj-5ta). Показано, что уровни накопления наноносителей в сфероидах были в 2 и более раз меньше, чем в монослойной культуре клеток. При этом локализация наноносителей внутри сфероидов зависела от состава и/или размера носителя.
5. Установлено, что при переходе от 2D к 3D модели *in vitro* цитотоксичность всех наноносителей снижалась, что подтверждает более высокую резистентность клеток в сфероидах. Так, для образца капсул ПМК<sub>500</sub>-DR5-B при инкубации (48 ч) с клетками HCT116 значения IC<sub>50</sub> составляли  $111,7 \pm 10,9$  нг/мл и  $>1000$  нг/мл для 2D и 3D моделей *in vitro*, соответственно. Показано, что комбинация субтоксичных концентраций DOX (0,002 мкг DOX на капсулу) с белком DR5-B позволила преодолеть резистентность клеток MCF-7 благодаря синергетическому эффекту (IC<sub>50</sub>  $98,1 \pm 9,9$  нг/мл против  $535,8 \pm 31,5$  нг/мл для капсул с DR5-B без DOX). Продемонстрирована таргетная доставка капсул только в опухолевые клетки.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую признательность научному руководителю д.х.н. Марквичевой Е. А. за мудрость, терпение и поддержку на всех этапах работы над диссертацией.

Автор искренне благодарен сотрудникам кафедры Химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н. А. Преображенского РТУ МИРЭА д.х.н. Себякину Ю. Л., к.х.н. Будановой У. А. и Сарычеву Г. А. за помощь в получении керасом и фолат-конъюгированных липосом, а также за их профессиональные консультации и конструктивную критику.

Также автор признателен к.х.н. Колосковой О. О. из Института иммунологии ФМБА России за совместную работу по получению и изучению ПЭГилированных липосом, а также за неоценимый вклад в формирование методологической базы этой части исследований.

Кроме того, автор благодарит к.х.н. Бородину Т. Н. и к.х.н. Трушину Д. Б. из Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники за предоставленные для работы образцы полиэлектролитных наноконтейнеров и мультислойных капсул, а также за их внимание к деталям, позволившее существенно улучшить качество проведенного исследования.

Также автор хотел бы поблагодарить д.х.н. Букова С. В. (Цитомед, Санкт-Петербург) за предоставление RGD-пептида (cyclo-RGDfK(TPP)), который использовали для получения 3D моделей *in vitro*, и к.б.н. Яголович А. В. (ИБХ РАН) за плодотворное сотрудничество по модификации полиэлектролитных капсул лигандом DR5-B для таргетной доставки в раковые клетки.

Отдельную благодарность автор выражает всем сотрудникам Лаборатории биомедицинских материалов за их профессионализм, готовность делиться опытом и атмосферу взаимопомощи и понимания.

Наконец, автор выражает искреннюю благодарность Казакову В.Г., наставления и поддержка которого способствовали становлению автора как ученого.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data|UICC, <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-globalcancer-data> (электронный ресурс).
2. Liu B. et al. Exploring treatment options in cancer: tumor treatment strategies // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2024. Vol. 9, № 1. P. 1–44.
3. Schein C.H. Repurposing approved drugs for cancer therapy // *Br. Med. Bull.* 2021. Vol. 137, № 1. P. 13–27.
4. Tomeh M.A., Hadianamrei R., Zhao X. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 5. P. 1–26.
5. Mahmoud Y.K., Abdelrazek H.M.A. Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy // *Biomed Pharmacother.* 2019. Vol. 115. P. 1–14.
6. Ioele G. et al. Anticancer Drugs: Recent Strategies to Improve Stability Profile, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties // *Molecules.* 2022. Vol. 27, № 17. P. 5436.
7. Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 Years of progress // *Nat. Rev. Cancer.* 2008. Vol. 8, № 6. P. 473–480.
8. Rodrigues J. et al. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor–Stroma Interactions // *Trends in Cancer.* 2021. Vol. 7, № 3. P. 249–264.
9. Wang J.J., Lei K.F., Han F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018. Vol. 22, № 12. P. 3855–3864.
10. Subhan M.A. et al. Recent advances in tumor targeting via EPR-effect for cancer treatment // *J. Pers. Med.* 2021. Vol. 11, № 571. P. 1–27.
11. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs // *Cancer Res.* 1986. Vol. 46. P. 6387–6392.
12. Nakamura Y. et al. Nano-drug delivery: Is the enhanced permeability and retention (EPR) effect sufficient for curing cancer? // *Bioconjug Chem.* 2016. Vol. 27, № 10. P. 2225–2238.
13. Xie X. et al. Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2018. Vol. 19, № 4. P. 257–276.
14. Holder J.E. et al. The use of nanoparticles for targeted drug delivery in non-small cell lung cancer // *Front. Oncol.* 2023. Vol. 13, № March. P. 1–7.
15. Torchilin V.P. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2010. № 197. P. 3–53.
16. Vieira D.B., Gamarra L.F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment // *Einstein (Sao Paulo).* 2016. Vol. 14, № 1. P. 99–103.
17. Halwani A.A. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market // *Pharmaceutics.* 2022. Vol. 14, № 1. P. 1–21.
18. Baker A. et al. Smart Nanocarriers for the Targeted Delivery of Therapeutic Nucleic Acid for Cancer Immunotherapy // *Pharmaceutics.* 2023. Vol. 15. P. 1743.

19. Peetla C., Vijayaraghavalu S., Labhasetwar V. Biophysics of cell membrane lipids in cancer drug resistance: Implications for drug transport and drug delivery with nanoparticles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65, № 13–14. P. 1686–1698.
20. Fan Y., Marioli M., Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery // *J. Pharm. Biomed. Anal. Elsevier B.V.*, 2021. Vol. 192. P. 113642.
21. Bangham A.D., Horne R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope // *J. Mol. Biol. Academic Press Inc. (London) Ltd.*, 1964. Vol. 8, № 5. P. 660–668.
22. Gregoriadis G., Ryman B.E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases // *Biochem. J.* 1971. Vol. 124, № 5. P. 58.
23. Allahou L.W., Madani S.Y., Seifalian A. Investigating the Application of Liposomes as Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Treatment of Cancer // *Int. J. Biomater.* 2021. Vol. 2021, № 3041969. P. 1–16.
24. Bobo D. et al. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date // *Pharm. Res. Pharmaceutical Research*, 2016. Vol. 33, № 10. P. 2373–2387.
25. Bulbake U. et al. Liposomal formulations in clinical use: An updated review // *Pharmaceutics*. 2017. Vol. 9, № 2. P. 1–33.
26. Anselmo A.C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic: An update // *Bioeng. Transl. Med.* 2019. Vol. 4, № 3. P. 1–16.
27. Large D.E. et al. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. Vol. 176. P. 113851.
28. Kapoor M., Lee S.L., Tyner K.M. Liposomal Drug Product Development and Quality: Current US Experience and Perspective // *AAPS J.* 2017. Vol. 19, № 3. P. 632–641.
29. Barenholz Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned // *J. Control. Release.* 2012. Vol. 160, № 2. P. 117–134.
30. Fan Y., Zhang Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations // *Asian J. Pharm. Sci.* 2013. Vol. 8, № 2. P. 81–87.
31. Medina O.P., Zhu Y., Kairemo K. Targeted Liposomal Drug Delivery in Cancer // *Curr Pharm Des.* 2004. Vol. 10, № 24. P. 2981–2989.
32. Sercombe L. et al. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery // *Front Pharmacol.* 2015. Vol. 6, № 286. P. 1–13.
33. Ewert K.K. et al. Cationic liposomes as vectors for nucleic acid and hydrophobic drug therapeutics // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 9. P. 1–33.
34. Felgner P.L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987. Vol. 84, № 21. P. 7413–7417.
35. Templeton N.S. Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo // *Biosci. Rep.* 2002. Vol. 22,

- № 2. P. 283–295.
36. Jagwani S. et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Resveratrol Loaded Cationic Liposomes for Targeting Hepatocellular Carcinoma // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020. Vol. 6, № 9. P. 4969–4984.
  37. Lee H. et al. A study of the effects of doxorubicin-containing liposomes on osteogenesis of 3D stem cell spheroids derived from Gingiva // *Materials (Basel)*. 2019. Vol. 12, № 7. P. 1–12.
  38. Chen X. et al. Co-delivery of paclitaxel and anti-survivin siRNA via redox-sensitive oligopeptide liposomes for the synergistic treatment of breast cancer and metastasis // *Int. J. Pharm.* 2017. Vol. 529, № 1–2. P. 102–115.
  39. Su Q. et al. Co-delivery of anionic epitope/CpG vaccine and IDO inhibitor by self-assembled cationic liposomes for combination melanoma immunotherapy // *J. Mater. Chem. B*. 2021. Vol. 9, № 18. P. 3892–3899.
  40. Yadav K. et al. Multifaceted targeting of cationic liposomes via co-delivery of anti-IL-17 siRNA and corticosteroid for topical treatment of psoriasis // *Med. Hypotheses*. 2020. Vol. 145. P. 110322.
  41. Krasnici S. et al. Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels // *Int. J. Cancer*. 2003. Vol. 105, № 4. P. 561–567.
  42. Abu Lila A.S., Ishida T., Kiwada H. Recent advances in tumor vasculature targeting using liposomal drug delivery systems // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2009. Vol. 6, № 12. P. 1297–1309.
  43. Hobson B., Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: Continuous labelling studies // *Br. J. Cancer*. 1984. Vol. 49, № 4. P. 405–413.
  44. Campbell R.B. et al. Fighting Cancer: From the Bench to Bedside Using Second Generation Cationic Liposomal Therapeutics // *J. Pharm. Sci.* 2009. Vol. 98, № 2. P. 411–429.
  45. Abu Lila A.S., Ishida T., Kiwada H. Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes // *Pharm. Res.* 2010. Vol. 27, № 7. P. 1171–1183.
  46. Kim S. et al. Lipid Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems: Therapeutic Advances in the Treatment of Lung Cancer // *Int J Nanomedicine*. 2023. Vol. 18, № 18. P. 2659–2676.
  47. Sahle F.F. Polymeric Nanoparticles-Based Drug and Gene Delivery to Macrophages // *Macrophage Targeted Delivery Systems*. 2022. P. 145–167.
  48. Xiao X. et al. Polymeric nanoparticles –Promising carriers for cancer therapy // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. Vol. 10. P. 1–20.
  49. Taghipour-Sabzevar V., Sharifi T., Moghaddam M.M. Polymeric nanoparticles as carrier for targeted and controlled delivery of anticancer agents // *Ther. Deliv.* 2019. Vol. 10, № 8. P. 527–550.
  50. Salari N. et al. Polymer-based drug delivery systems for anticancer drugs: A systematic review // *Cancer Treat. Res. Commun. Elsevier Ltd*, 2022. Vol. 32. P. 100605.
  51. Deng S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: Current status, challenges and opportunities // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, № 847. P.

- 1–36.
52. Torchilin V.P. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives // *Pharm. Res.* 2007. Vol. 24, № 1. P. 1–16.
53. Rostamizadeh K., Torchilin V.P. Polymeric nanomicelles as versatile tool for multidrug delivery in chemotherapy // *Nanopharmaceuticals*. 2020. Vol. 10, № 2. P. 45–72.
54. Zhang Y., Huang Y., Li S. Polymeric micelles: Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery // *AAPS PharmSciTech*. 2014. Vol. 15, № 4. P. 862–871.
55. Trubetskoy V.S. Polymeric micelles as carriers of diagnostic agents // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999. Vol. 37, № 1–3. P. 81–88.
56. Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. Amphiphilic Block Copolymers for Drug Delivery // *Pharm. Assoc. J Pharm Sci.* 2003. Vol. 92, № 7. P. 1343–1355.
57. Torchilin V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems // *J. Control. Release*. 2001. Vol. 73, № 2–3. P. 137–172.
58. Boddu S.H.S. et al. Polyamide / Poly(Amino Acid) Polymers for Drug Delivery // *J Funct Biomater*. 2021. Vol. 12, № 58. P. 1–25.
59. Hwang D., Ramsey J.D., Kabanov A. V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020. Vol. 156, № 3. P. 80–118.
60. Elsabahy M., Wooley K.L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications // *Chem Soc Rev.* 2013. Vol. 41, № 7. P. 2545–2561.
61. Fonseca-santos B. Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease // *Int J Nanomedicine*. 2015. Vol. 10. P. 4981–5003.
62. Madej M., Kurowska N., Strzalka-Mrozik B. Polymeric Nanoparticles - Tools in a Drug Delivery System in Selected Cancer Therapies // *Appl. Sci.* 2022. Vol. 12, № 9479. P. 1–21.
63. Vauthier C., Vauthier C. A journey through the emergence of nanomedicines with poly (alkylcyanoacrylate) based nanoparticles A journey through the emergence of nanomedicines with poly ( alkylcyanoacrylate ) based nanoparticles // *J. Drug Target*. 2019. Vol. 5, № 6. P. 502–524.
64. Andrieux K., Couvreur P. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009. Vol. 1, № 5. P. 463–474.
65. Lee J.H., Yeo Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers // *Chem Eng Sci*. 2015. Vol. 125. P. 75–84.
66. Volodkin D. CaCO<sub>3</sub> templated micro-beads and -capsules for bioapplications // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014. Vol. 207, № 1. P. 306–324.
67. Trushina D.B. et al. Heat-driven size reduction of biodegradable polyelectrolyte multilayer hollow capsules assembled on CaCO<sub>3</sub> template // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2018. Vol. 170. P. 312–321.

68. Caminade A.-M., Turrin C.-O. Dendrimers for drug delivery // *J. Mater. Chem. B*. 2014. Vol. 2, № 26. P. 4055.
69. Wang J. et al. Dendrimer-based drug delivery systems: history, challenges, and latest developments // *J. Biol. Eng. BioMed Central*, 2022. Vol. 16, № 1. P. 1–12.
70. Tabar zad M., Ghorbani-Bidkorbeh F., Hosseiniabadi T. Dendrimers as antiinflammatory prodrugs // *Dendrimer-Based Nanotherapeutics*. 2021. P. 417–434.
71. Ruiz M.E., Gantner M.E., Talevi A. Applications of nanosystems to anticancer drug therapy (Part II. Dendrimers, micelles, lipid-based nanosystems) // *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov*. 2014. Vol. 9, № 1. P. 99–128.
72. Ouyang Z. et al. Dendrimer-based nanohybrids in cancer photomedicine // *Mater. Today Bio*. 2021. Vol. 10, № 100111. P. 1–13.
73. Esfand R., Tomalia D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications // *Drug Discov. Today*. 2001. Vol. 6, № 8. P. 427–436.
74. Duncan R., Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2005. Vol. 57, № 15. P. 2215–2237.
75. Jain K. et al. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge // *Int. J. Pharm*. 2010. Vol. 394, № 1–2. P. 122–142.
76. King Heiden T.C. et al. Developmental toxicity of low generation PAMAM dendrimers in zebrafish // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2007. Vol. 225, № 1. P. 70–79.
77. Tomalia D. a, Reyna L. a, Svenson S. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging // *Biochem. Soc. Trans*. 2007. Vol. 35. P. 61–67.
78. Cheng Y. et al. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives // *Chem. Soc. Rev*. 2011. Vol. 40. P. 2673–2703.
79. Svenson S. The dendrimer paradox – high medical expectations but poor clinical translation // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 44, № 12. P. 4131–4144.
80. Mignani S. et al. Clinical diagonal translation of nanoparticles: Case studies in dendrimer nanomedicine // *J. Control. Release. Elsevier B.V.*, 2021. Vol. 337. P. 356–370.
81. Manimaran V. et al. Nanogels as novel drug nanocarriers for CNS drug delivery // *Front. Mol. Biosci*. 2023. P. 1–18.
82. Ghobril C., Grinstaff M.W. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 44, № 7. P. 1820–1835.
83. Attama A.A. et al. Nanogels as target drug delivery systems in cancer therapy: A review of the last decade // *Front Pharmacol*. 2022. Vol. 8, № 13. P. 1–23.
84. Jain K.K. Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier // *Nanomedicine*. 2012. Vol. 7, № 8. P. 1225–1233.
85. Neamtu I. et al. Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications // *Drug Deliv*. 2017. Vol. 24, № 1. P. 539–557.

86. Atanase L.I., Riess G. Thermal cloud point fractionation of poly(vinyl alcohol-co-vinyl acetate): Partition of nanogels in the fractions // *Polymers (Basel)*. 2011. Vol. 3, № 3. P. 1065–1075.
87. Gupta R. et al. Advancement In Nanoemulsion And Nanogels Technology For Topical Drug Delivery // *Int. J. Pharm. Sci.* 2024. Vol. 2, № 5. P. 1816–1834.
88. Ahmed S., Alhareth K., Mignet N. Advancement in Nanogel formulations provides controlled drug release // *Int. J. Pharm.* 2020. Vol. 30, № 584. P. 119435.
89. Ghaeini-Hesaroeiye S. et al. Thermoresponsive Nanogels Based on Different Polymeric Moieties for Biomedical Applications // *Gels*. 2020. Vol. 6, № 3. P. 20.
90. Soni K.S., Desale S.S., Bronich T.K. Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation // *J Control Release*. 2016. Vol. 28, № 240. P. 109–126.
91. Gupta J., Sharma G. Nanogel: A versatile drug delivery system for the treatment of various diseases and their future perspective // *Drug Deliv Transl Res*. 2024. Vol. 15, № 2. P. 455–482.
92. Greene M.K., Johnston M.C., Scott C.J. Nanomedicine in pancreatic cancer: Current status and future opportunities for overcoming therapy resistance // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 24. P. 1–26.
93. Shi Z. et al. Inorganic nano-carriers based smart drug delivery systems for tumor therapy // *Smart Mater. Med.* 2020. Vol. 1. P. 32–47.
94. Farjadian F. et al. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment // *Chem. Eng. J.* 2019. Vol. 359. P. 684–705.
95. Lei W. et al. Polydopamine-coated mesoporous silica nanoparticles for multi-responsive drug delivery and combined chemo-photothermal therapy // *Mater. Sci. Eng. C*. 2019. Vol. 105. P. 110103.
96. Shao D. et al. Bioinspired Diselenide-Bridged Mesoporous Silica Nanoparticles for Dual-Responsive Protein Delivery // *Adv. Mater.* 2018. Vol. 30, № 29. P. 1–8.
97. Kim M.H. et al. Facile synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles with ultralarge pores and their application in gene delivery // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 5. P. 3568–3576.
98. Fan J., Cheng Y., Sun M. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications // *Chem. Rec.* 2020. Vol. 20, № 12. P. 1474–1504.
99. Kesharwani P. et al. Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy // *Mol. Cancer. BioMed Central*, 2023. Vol. 22, № 1. P. 1–31.
100. Cobley C.M. et al. Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* 2011. Vol. 40, № 1. P. 44–56.
101. Sakthi Devi R. et al. Applications of Gold and Silver Nanoparticles in Theranostics // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2022. Vol. 194, № 9. 4187–4219 p.
102. Alphandéry E. Iron oxide nanoparticles for therapeutic applications // *Drug Discov. Today*. 2020. Vol. 25, № 1. P. 141–149.

103. Chowdhury P. et al. Magnetic nanoformulations for prostate cancer // *Drug Discov. Today*. 2017. Vol. 22, № 8. P. 1233–1241.
104. Canese R., Vurro F., Marzola P. Iron oxide nanoparticles as theranostic agents in cancer immunotherapy // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, № 8. P. 1–16.
105. Panda J., Das D. Global Translational Medicine Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based nanosystems for cancer theranostics // *Glob. Transl Med*. 2025. Vol. X, № X. P. 1–20.
106. Jiwanti P.K. et al. Recent Development of Nano-Carbon Material in Pharmaceutical Application: A Review // *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 21. P. 1–42.
107. Anselmo A.C., Mitragotri S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles // *AAPS J*. 2015. Vol. 17, № 5. P. 1041–1054.
108. Babu A. et al. Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. // *AAPS PharmSciTech*. 2014. Vol. 15, № 3. P. 709–721.
109. Sultana S. et al. Stability issues and approaches to stabilised nanoparticles based drug delivery system // *J. Drug Target*. 2020. Vol. 28, № 5. P. 468–486.
110. Donahue N.D., Acar H., Wilhelm S. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2019. Vol. 143. P. 68–96.
111. Saadh M.J., Mustafa M.A. Stealth Nanocarriers in Cancer Therapy: a Comprehensive Review of Design, Functionality, and Clinical Applications // *AAPS PharmSciTech*. 2024. Vol. 25, № 6. P. 140.
112. Jokerst J. V et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy // *Nanomedicine*. 2011. Vol. 6, № 4. P. 715–728.
113. Ishihara H. Current status and prospects of polyethyleneglycol-modified medicines // *Biol. Pharm. Bull*. 2012. Vol. 36, № 6. P. 883–888.
114. Suk J.S. et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2016. Vol. 99. P. 28–51.
115. Immordino M.L., Dosio F., Cattel L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential // *Int. J. Nanomedicine*. 2006. Vol. 1, № 3. P. 297–315.
116. Gabizon A., Shmeeda H., Grenader T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: Impact on cancer therapy // *Eur. J. Pharm. Sci*. 2012. Vol. 45, № 4. P. 388–398.
117. Jeetah R., Bhaw-Luximon A., Jhurry D. Polymeric nanomicelles for sustained delivery of anti-cancer drugs // *Mutat. Res*. 2014. Vol. 768. P. 47–59.
118. Gill K.K., Kaddoumi A., Nazzal S. PEG-lipid micelles as drug carriers: physiochemical attributes, formulation principles and biological implication // *J. Drug Target*. 2015. Vol. 23, № 3. P. 222–231.
119. Szczepanowicz K. et al. Pegylated polyelectrolyte nanoparticles containing paclitaxel as a promising candidate for drug carriers for passive targeting // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016. Vol. 143. P. 463–471.

120. van Elk M. et al. Nanomedicines for advanced cancer treatments: Transitioning towards responsive systems // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 515, № 1–2. P. 132–164.
121. Allen T.M., Cullis P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. Vol. 65, № 1. P. 36–48.
122. Farr K.P., Safwat A. Palmar-plantar erythrodysesthesia associated with chemotherapy and its treatment // *Case Rep. Oncol.* 2011. Vol. 4, № 1. P. 229–235.
123. Kumar N. et al. Hand–foot syndrome induced by chemotherapy drug: Case series study and literature review // *Indian J. Pharmacol.* 2018. Vol. 49, № 5. P. 344–347.
124. Shi Y. et al. PMPCylated liposomes in drug delivery and beyond // *Mater. Today Bio.* 2026. Vol. 24, № 37. P. 102960.
125. Iminova R. et al. From PEGylation to Next-Generation Polymers: Overcoming Biological Barriers - A Review // *Molecules.* 2026. Vol. 31, № 4. P. 675.
126. Zhang L., Granick S. How to stabilize phospholipid liposomes (Using nanoparticles) // *Nano Lett.* 2006. Vol. 6, № 4. P. 694–698.
127. Mohanraj V.J., Barnes T.J., Prestidge C.A. Silica nanoparticle coated liposomes: A new type of hybrid nanocapsule for proteins // *Int. J. Pharm.* 2010. Vol. 392, № 1–2. P. 285–293.
128. Bégu S. et al. Liposil, a promising composite material for drug storage and release // *J. Control. Release.* 2007. Vol. 118, № 1. P. 1–6.
129. Katagiri K., Ariga K., Kikuchi J. Preparation of Organic-Inorganic Hybrid Vesicle “Cerasome” Derived from Artificial Lipid with Alkoxysilyl Head // *Chemistry Letters.* 1999. Vol. 28, № 7. P. 661–662.
130. Katagiri K. et al. Preparation and characterization of a novel organic-inorganic nanohybrid “cerasome” formed with a liposomal membrane and silicate surface // *Chemistry (Easton).* 2007. Vol. 13, № 18. P. 5272–5281.
131. Jin Y. et al. Cerasomal doxorubicin with long-term storage stability and controllable sustained release // *Acta Biomater.* 2012. Vol. 8, № 9. P. 3372–3380.
132. Jin Y. et al. Liposomal nanohybrid cerasomes for controlled insulin release // *RSC Adv. Royal Society of Chemistry,* 2014. Vol. 4, № 81. P. 42808–42815.
133. Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. Vol. 91. P. 3–6.
134. Nakamura Y. et al. Nano-drug delivery: Is the enhanced permeability and retention (EPR) effect sufficient for curing cancer? // *Bioconjug Chem.* 2016. Vol. 27, № 10. P. 2225–2238.
135. Kobayashi H., Watanabe R., Choyke P.L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target? // *Theranostics.* 2014. Vol. 4, № 1. P. 81–89.
136. Chauhan V.P. et al. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner // *Nat Nanotechnol.* 2012. Vol. 7, № 6. P. 383–388.
137. Kobayashi H. et al. Application of a macromolecular contrast agent for detection of alterations

- of tumor vessel permeability induced by radiation // *Clin. Cancer Res.* 2004. Vol. 10, № 22. P. 7712–7720.
138. Zhao X., Bai J., Yang W. Stimuli-responsive nanocarriers for therapeutic applications in cancer // *Cancer Biol Med.* 2021. Vol. 18, № 2. P. 319–335.
  139. Ashrafizadeh M. et al. Stimuli-responsive liposomal nanoformulations in cancer therapy: Pre-clinical & clinical approaches // *J. Control. Release.* 2022. Vol. 351. P. 50–80.
  140. Ji K. et al. Acidosis and proteolysis in the tumor microenvironment // *Cancer Metastasis Rev.* 2019. Vol. 38, № 1–2. P. 103–112.
  141. Consolino L. et al. Non-invasive Investigation of Tumor Metabolism and Acidosis by MRI-CEST Imaging // *Front. Oncol.* 2020. Vol. 10. P. 1–9.
  142. Anemone A. et al. Imaging tumor acidosis: a survey of the available techniques for mapping in vivo tumor pH // *Cancer Metastasis Rev.* 2019. Vol. 38, № 1–2. P. 25–49.
  143. Karimi M. et al. pH-Sensitive stimulus-responsive nanocarriers for targeted delivery of therapeutic agents // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 2016. Vol. 8, № 5. P. 696–716.
  144. Bae Y. et al. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy // *Bioconjug. Chem.* 2005. Vol. 16, № 1. P. 122–130.
  145. Bersani S. et al. PH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine) decorated liposomes for the delivery of gemcitabine to cancer cells // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014. Vol. 88, № 3. P. 670–682.
  146. Paliwal S.R. et al. Hyaluronic acid modified pH-sensitive liposomes for targeted intracellular delivery of doxorubicin // *J. Liposome Res.* 2016. Vol. 2104. P. 1–12.
  147. Zong W. et al. Polydopamine-coated liposomes as pH-sensitive anticancer drug carriers // *J. Microencapsul.* 2016. Vol. 33, № 3. P. 257–262.
  148. Quader S. et al. Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy // *J. Control. Release.* 2014. Vol. 188. P. 67–77.
  149. Zou J. et al. Poly(ethylene oxide)-block-Polyphosphoester-graft-Paclitaxel Conjugates with Acid-Labile Linkages as a pH-Sensitive and Functional Nanoscopic Platform for Paclitaxel Delivery // *Adv. Healthc. Mater.* 2014. Vol. 3, № 3. P. 441–448.
  150. Madhusudana Rao K. et al. Curcumin encapsulated pH sensitive gelatin based interpenetrating polymeric network nanogels for anti cancer drug delivery // *Int. J. Pharm.* 2015. Vol. 478, № 2. P. 788–795.
  151. She W. et al. PEGylated dendrimer-doxorubicin conjugates as pH-sensitive drug delivery systems: Synthesis and in vitro characterization // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2015. Vol. 11, № 6. P. 964–978.

152. Mukhopadhyay P. et al. PH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* 2015. Vol. 72. P. 640–648.
153. Alsawaftah N.M. et al. pH-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14. P. 936.
154. Amin M., Lammers T., ten Hagen T.L.M. Temperature-sensitive polymers to promote heat-triggered drug release from liposomes: Towards bypassing EPR // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2022. Vol. 189. P. 114503.
155. Yatvin M. et al. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia // *Science* (80-. ). 1978. Vol. 202, № 4374. P. 1290–1293.
156. Weinstein J.N. et al. Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors // *Science*. 1979. Vol. 204, № 4389. P. 188–191.
157. Gomes I.P. et al. Thermosensitive Nanosystems Associated with Hyperthermia for Cancer Treatment // *Pharm.* 2019. Vol. 12, № 4. P. 1–22.
158. Graham W. et al. Magnetic Nanoparticles and Drug Delivery Systems for Anti-Cancer Applications: A Review // *Nanomater.* 2025. Vol. 15, № 4. P. 285.
159. Nguyen M.D. et al. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications // *Appl Sci.* 2021. Vol. 11, № 23. P. 11301.
160. Ganapathe L.S., Mohamed M.A., Yunus R.M. Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation // *Magnetochemistry*. 2020. Vol. 6, № 68. P. 1–35.
161. Motoyama J. et al. Size dependent heat generation of magnetite nanoparticles under AC magnetic field for cancer therapy // *Biomagn Res Technol.* 2008. Vol. 6, № 4. P. 1–9.
162. Preiss M.R., Bothun G.D. Stimuli-responsive liposome-nanoparticle assemblies. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011. Vol. 8, № 8. P. 1025–1040.
163. Widder K.J., Senyei A.E. Magnetic microspheres: a vehicle for selective targeting of drugs // *Pharmacol. Ther.* 1983. Vol. 20, № 3. P. 377–395.
164. Soenen S.J.H., De Cuyper M. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro: current status and future prospects // *Nanomedicine (Lond)*. 2010. Vol. 5, № 8. P. 1261–1275.
165. Malhotra N. et al. Potential Toxicity of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: A Review // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 14. P. 1–26.
166. Lu C.H., Hsiao J.K. Diagnostic and therapeutic roles of iron oxide nanoparticles in biomedicine // *Tzu Chi Med. J.* 2023. Vol. 35, № 1. P. 11–17.
167. Schroeder A. et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology // *Nat. Rev. Cancer*. Nature Publishing Group, 2011. Vol. 12, № 1. P. 39–50.
168. Yoo J. et al. Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems // *Cancers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 5.
169. Ebrahimnejad P. et al. An updated review of folate-functionalized nanocarriers: A promising ligand in cancer // *Drug Discov. Today*. 2022. Vol. 27, № 2. P. 471–489.

170. Young O. et al. Folate Receptor as a Biomarker and Therapeutic Target in Solid Tumors // *Curr. Probl. Cancer*. 2023. Vol. 47, № 1. P. 100917.
171. Scaranti M. et al. Exploiting the folate receptor  $\alpha$  in oncology // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020. Vol. 17, № 6. P. 349–359.
172. Bajracharya R. et al. Functional ligands for improving anticancer drug therapy: current status and applications to drug delivery systems // *Drug Deliv.* 2022. Vol. 29, № 1. P. 1959–1970.
173. Narmani A. et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems // *Drug Dev. Res.* 2019. Vol. 80, № 4. P. 404–424.
174. Scodeller P., Ascianto E.K. Targeting tumors using peptides // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 4. P. 1–24.
175. Javid H. et al. RGD peptide in cancer targeting: Benefits, challenges, solutions, and possible integrin–RGD interactions // *Cancer Med.* 2024. Vol. 13, № 2. P. 1–44.
176. Qian J. et al. Recent advances in the tumor-penetrating peptide internalizing RGD for cancer treatment and diagnosis // *Drug Dev. Res.* 2023. Vol. 84, № 4. P. 654–670.
177. Kang S., Lee S., Park S. iRGD peptide as a tumor-penetrating enhancer for tumor-targeted drug delivery // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 9. P. 1–27.
178. Zuo H. iRGD: A Promising Peptide for Cancer Imaging and a Potential Therapeutic Agent for Various Cancers // *J. Oncol.* 2019. № 9367845. P. 1–15.
179. Mann A.P. et al. Identification of a peptide recognizing cerebrovascular changes in mouse models of Alzheimer's disease // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, № 1403. P. 1–11.
180. Han Z. et al. EDB fibronectin specific peptide for prostate cancer targeting // *Bioconjug. Chem.* 2015. Vol. 26, № 5. P. 830–838.
181. Yeow Y.L. et al. Immune-mediated ECM depletion improves tumour perfusion and payload delivery // *EMBO Mol. Med.* 2019. Vol. 11, № 12. P. 1–20.
182. Gowland C. et al. Development of a LC-MS/MS method for the quantification of toxic payload DM1 cleaved from BT1718 in a Phase I study // *Bioanalysis*. 2021. Vol. 13, № 2. P. 101–113.
183. Yang M. et al. Diverse functions of macrophages in different tumor microenvironments // *Cancer Res.* 2018. Vol. 78, № 19. P. 5492–5503.
184. Leber N. et al.  $\alpha$ -Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages // *Macromol. Biosci.* 2019. Vol. 19, № 7. P. 1–12.
185. Ascianto E.K. et al. Phage-Display-Derived Peptide Binds to Human CD206 and Modeling Reveals a New Binding Site on the Receptor // *J. Phys. Chem. B*. 2019. Vol. 123, № 9. P. 1973–1982.
186. Ngambenjawong C. et al. Serum stability and affinity optimization of an M2 macrophage-targeting peptide (M2pep) // *Theranostics*. 2016. Vol. 6, № 9. P. 1403–1414.
187. Chiu M.L. et al. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics // *Antibodies*. 2019. Vol. 8, № 4.

188. Hoppenz P., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Peptide-Drug Conjugates and Their Targets in Advanced Cancer Therapies // *Front. Chem.* 2020. Vol. 8. P. 1–24.
189. Arslan F.B., Ozturk K., Calis S. Antibody-mediated drug delivery // *Int. J. Pharm.* 2021. Vol. 596, № 120268. P. 1–12.
190. Jiang Z. et al. Peptide ligand-mediated targeted drug delivery of nanomedicines // *Biomater. Sci. Royal Society of Chemistry*, 2019. Vol. 7, № 2. P. 461–471.
191. Koneru T. et al. Transferrin: Biology and Use in Receptor-Targeted Nanotherapy of Gliomas // *ACS Omega*. 2021. Vol. 6, № 13. P. 8727–8733.
192. Ramalho M.J. et al. Transferrin Receptor-Targeted Nanocarriers: Overcoming Barriers to Treat Glioblastoma // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14, № 279. 1–31 p.
193. Cycle M.-C. et al. Transferrin-Conjugated Docetaxel–PLGA Nanoparticles for Tumor Targeting: Influence on MCF-7 Cell Cycle // *Polymers (Basel)*. 2019. Vol. 11, № 1905. P. 1–20.
194. Cui Y.N. et al. Enhanced intracellular delivery and controlled drug release of magnetic PLGA nanoparticles modified with transferrin // *Acta Pharmacol. Sin.* 2017. Vol. 38, № 6. P. 943–953.
195. Pirollo K.F. et al. Safety and efficacy in advanced solid tumors of a targeted nanocomplex carrying the p53 gene used in combination with docetaxel: A phase 1b study // *Mol. Ther.* 2016. Vol. 24, № 9. P. 1697–1706.
196. Ion G.N.D., Nitulescu G.M., Popescu C.I. Targeting TRAIL // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2019. Vol. 29, № 18. P. 2527–2534.
197. Bellail A. et al. TRAIL Agonists on Clinical Trials for Cancer Therapy: The Promises and the Challenges // *Rev. Recent Clin. Trials*. 2009. Vol. 4, № 1. P. 34–41.
198. Dianat-Moghadam H. et al. TRAIL in oncology: From recombinant TRAIL to nano- and self-targeted TRAIL-based therapies // *Pharmacol. Res.* 2020. Vol. 155. P. 104716.
199. Guimarães P.P.G. et al. Nanoparticles for Immune Cytokine TRAIL-Based Cancer Therapy // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12, № 2. P. 912–931.
200. Yagolovich A. V, Gasparian M.E. Recent Advances in the Development of Nanodelivery Systems Targeting the TRAIL Death Receptor Pathway // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 2. P. 1–37.
201. Grisanti L.A. TRAIL and its receptors in cardiac diseases // *Front. Physiol.* 2023. Vol. 14. P. 1–14.
202. Lemke J. et al. Getting TRAIL back on track for cancer therapy // *Cell Death Differ.* 2014. Vol. 21, № 9. P. 1350–1364.
203. Wong S.H.M. et al. The TRAIL to cancer therapy: Hindrances and potential solutions // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2019. Vol. 143. P. 81–94.
204. He F. et al. Aptamer-Based Targeted Drug Delivery Systems: Current Potential and Challenges // *Curr. Med. Chem.* 2020. Vol. 27, № 13. P. 2189–2219.
205. Cerchia L. Aptamers: Promising tools for cancer diagnosis and therapy // *Cancers (Basel)*. 2018. Vol. 10, № 132. P. 1–4.

206. Moosavian S.A., Sahebkar A. Aptamer-functionalized liposomes for targeted cancer therapy // *Cancer Lett.* 2019. Vol. 448. P. 144–154.
207. Hashemi M. et al. Aptamer-conjugated PLGA nanoparticles for delivery and imaging of cancer therapeutic drugs // *Arch. Biochem. Biophys.* 2020. Vol. 691. P. 108485.
208. Taghavi S. et al. Chitosan-modified PLGA nanoparticles tagged with 5TR1 aptamer for in vivo tumor-targeted drug delivery // *Cancer Lett.* 2017. Vol. 400. P. 1–8.
209. Yan J. et al. Aptamer-Targeted Photodynamic Platforms for Tumor Therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2021. Vol. 13, № 24. P. 27749–27773.
210. Bahreyni A. et al. A novel MUC1 aptamer-modified PLGA-epirubicin-P $\beta$ AE-antimir-21 nanocomplex platform for targeted co-delivery of anticancer agents in vitro and in vivo // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2019. Vol. 175. P. 231–238.
211. Lakhin A. V., Tarantul V.Z., Gening L. V. Aptamers: Problems, solutions and prospects // *Acta Naturae.* 2013. Vol. 5, № 19. P. 34–43.
212. Cadete A., Alonso M.J. Targeting cancer with hyaluronic acid- based nanocarriers: recent advances and translational perspectives // *Nanomedicine (Lond).* 2016. Vol. 11, № 17. P. 2341–2357.
213. Luo Z., Dai Y., Gao H. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery // *Acta Pharm. Sin. B.* 2019. Vol. 9, № 6. P. 1099–1112.
214. Jiao Y., Pang X., Zhai G. Advances in Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems // *Curr. Drug Targets.* 2016. Vol. 17, № 6. P. 720–730.
215. Cho H.J. Recent progresses in the development of hyaluronic acid-based nanosystems for tumor-targeted drug delivery and cancer imaging // *J. Pharm. Investig.* 2020. Vol. 50, № 2. P. 115–129.
216. Rios de la Rosa J.M., Tirella A., Tirelli N. Receptor-Targeted Drug Delivery and the (Many) Problems We Know of: The Case of CD44 and Hyaluronic Acid // *Adv. Biosyst.* 2018. Vol. 2, № 6. P. 1–19.
217. Sakurai Y., Harashima H. Hyaluronan-modified nanoparticles for tumor-targeting // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2019. Vol. 16, № 9. P. 915–936.
218. Almalik A. et al. Hyaluronic Acid Coated Chitosan Nanoparticles Reduced the Immunogenicity of the Formed Protein Corona // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–9.
219. Fu C.P. et al. Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Anticancer Drug Delivery // *Polymers (Basel).* 2023. Vol. 15, № 10. P. 1–15.
220. Huang B.W., Gao J.Q. Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research // *J. Control. Release.* 2018. Vol. 270. P. 246–259.
221. Pinto B. et al. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research // *Pharmaceutics.* 2020. Vol. 12, № 12. P. 1–38.
222. Elliott N.T., Yuan F. A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies // *J. Pharm. Sci.* 2011. Vol. 100, № 1. P. 59–74.

223. Hillegass J.M. et al. Assessing nanotoxicity in cells in vitro // WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2010. Vol. 2, № 3. P. 219–231.
224. Engel B.J. et al. Multilayered, Hyaluronic Acid-Based Hydrogel Formulations Suitable for Automated 3D High Throughput Drug Screening of Cancer-Stromal Cell Cocultures // Adv. Healthc. Mater. 2015. Vol. 4, № 11. P. 1664–1674.
225. Roy S.M. et al. Kinetics of Nanomedicine in Tumor Spheroid as an In Vitro Model System for Efficient Tumor-Targeted Drug Delivery With Insights From Mathematical Models // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. Vol. 9. P. 1–31.
226. Jacob F. et al. A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity // Cell. 2020. Vol. 180, № 1. P. 188–204.
227. Chia S.L. et al. Biomimicry 3D gastrointestinal spheroid platform for the assessment of toxicity and inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles // Small. 2015. Vol. 11, № 6. P. 702–712.
228. Michy T. et al. Verteporfin-loaded lipid nanoparticles improve ovarian cancer photodynamic therapy in vitro and in vivo // Cancers (Basel). 2019. Vol. 11, № 11. P. 1–19.
229. Chen H. et al. The study of establishment of an in vivo tumor model by three-dimensional cells culture systems methods and evaluation of antitumor effect of biotin-conjugated pullulan acetate nanoparticles // Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 2019. Vol. 47, № 1. P. 123–131.
230. Weeber F. et al. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015. Vol. 112, № 43. P. 13308–13311.
231. Hoarau-Véhot J. et al. Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19, № 181. P. 1–24.
232. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids // J. Vis. Exp. 2011. Vol. 20, № 51. P. 4–7.
233. Jørgensen A. et al. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: A model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche // Br. J. Cancer. 2014. Vol. 110, № 10. P. 2604–2614.
234. Филиппова С.Ю. et al. Применение силиконового покрытия для оптимизации процесса получения клеточных сфероидов методом висячей капли // Южно-Российский онкологический журнал. 2022. Vol. 3, № 3. P. 15–23.
235. Lin R.Z., Chang H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research // Biotechnol. J. 2008. Vol. 3, № 9–10. P. 1172–1184.
236. Habanjar O. et al. 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, № 22. P. 1–35.
237. Park J.H. et al. Subaqueous 3D stem cell spheroid levitation culture using anti - gravity bioreactor based on sound wave superposition // Biomater. Res. 2023. Vol. 27, № 1. P. 1–14.
238. Yoo S., Lee H.J. Spheroid-Hydrogel-Integrated Biomimetic System: A New Frontier in

- Advanced Three-Dimensional Cell Culture Technology // *Cells Tissues Organs*. 2025. Vol. 214, № 2. P. 128–147.
239. Tibbitt M.W., Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. Vol. 103, № 4. P. 655–663.
  240. Caliri S.R., Burdick J.A. A practical guide to hydrogels for cell culture // *Nat. Methods*. 2016. Vol. 13, № 5. P. 405–414.
  241. Tokuda E.Y., Jones C.E., Anseth K.S. PEG–peptide hydrogels reveal differential effects of matrix microenvironmental cues on melanoma drug sensitivity // *Integr. Biol.* 2017. Vol. 9, № 1. P. 76–87.
  242. Gunti S. et al. Organoid and spheroid tumor models: Techniques and applications // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 4. P. 1–18.
  243. Costa E.C. et al. Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches // *Biotechnol. J.* 2018. Vol. 13, № 1. P. 130.
  244. Akasov R. et al. Formation of multicellular tumor spheroids induced by cyclic RGD-peptides and use for anticancer drug testing in vitro // *Int. J. Pharm.* 2016. Vol. 506, № 1–2. P. 148–157.
  245. Vakhshiteh F. et al. Heterotypic tumor spheroids: a platform for nanomedicine evaluation // *J. Nanobiotechnology*. 2023. Vol. 21, № 1. P. 1–33.
  246. Akasov R. et al. 3D in vitro co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly // *Biotechnol. Lett.* 2017. Vol. 39, № 1. P. 45–53.
  247. Koloskova O.O. et al. Synthesis and evaluation of novel lipopeptide as a vehicle for efficient gene delivery and gene silencing // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2016. Vol. 102. P. 159–167.
  248. Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation // *Methods Mol. Biol.* 2017. Vol. 1522. P. 17–22.
  249. Gileva A.M. et al. Transfection efficacy and drug release depends upon the PEG derivative in cationic lipoplexes: Evaluation in 3D in vitro model and in vivo // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2023. Vol. 111, № 9. P. 1614–1628.
  250. Gileva A. et al. Lipoamino acid-based cerasomes for doxorubicin delivery: Preparation and in vitro evaluation // *Mater. Sci. Eng. C*. 2019. Vol. 100. P. 724–734.
  251. Borodina T. et al. Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D in vitro model // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2021. Vol. 109, № 4. P. 527–537.
  252. Akasov R. et al. Ultrasonically Assisted Polysaccharide Microcontainers for Delivery of Lipophilic Antitumor Drugs: Preparation and in Vitro Evaluation // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. Vol. 7, № 30. P. 16581–16589.
  253. Gileva A. et al. Doxorubicin-Loaded Polyelectrolyte Multilayer Capsules Modified with Antitumor DR5-Specific TRAIL Variant for Targeted Drug Delivery to Tumor Cells // *Nanomaterials*. 2023. Vol. 13, № 5. P. 902.

254. Koloskova O.O. et al. Effect of lipopeptide structure on gene delivery system properties: Evaluation in 2D and 3D in vitro models // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2018. Vol. 167. P. 328–336.
255. Joon Sig Choi et al. New cationic liposomes for gene transfer into mammalian cells with high efficiency and low toxicity // *Bioconjug. Chem.* 2001. Vol. 12, № 1. P. 108–113.
256. Paecharoenchai O. et al. Structure relationship of cationic lipids on gene transfection mediated by cationic liposomes // *AAPS PharmSciTech*. 2012. Vol. 13, № 4. P. 1302–1308.
257. Kim B.K. et al. DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2015. Vol. 1848, № 10. P. 1996–2001.
258. Bunker A., Magarkar A., Viitala T. Rational design of liposomal drug delivery systems, a review: Combined experimental and computational studies of lipid membranes, liposomes and their PEGylation // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2016. Vol. 1858, № 10. P. 2334–2352.
259. Do Minh A. et al. Cell transfection // *Comprehensive Biotechnology*. 2019. Vol. 1. 383–390 p.
260. Kang J.H., Jang W.Y., Ko Y.T. The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging // *Pharm. Res. Pharmaceutical Research*, 2017. Vol. 34, № 4. P. 704–717.
261. Huang H. et al. A porphyrin-PEG polymer with rapid renal clearance // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 76. P. 25–32.
262. Sarychev G.A. et al. Design, synthesis and morphology of the organosiloxane hybrid particles based on L-aspartic acid derivatives // *Mendeleev Commun.* 2017. Vol. 27, № 2. P. 155–156.
263. Zhu L. et al. Structural and formulation factors influencing pyridinium lipid-based gene transfer // *Bioconjug. Chem.* 2008. Vol. 19, № 12. P. 2499–2512.
264. Gopal V. et al. Synthesis and transfection efficiency of cationic oligopeptide lipids: Role of linker // *Bioconjug. Chem.* 2011. Vol. 22, № 11. P. 2244–2254.
265. Choi D.G., Yang S.M. Effect of two-step sol-gel reaction on the mesoporous silica structure // *J. Colloid Interface Sci.* 2003. Vol. 261, № 1. P. 127–132.
266. Lofgreen J.E., Ozin G.A. Controlling morphology and porosity to improve performance of molecularly imprinted sol-gel silica // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, № 3. P. 911–933.
267. Lee S.H. et al. Size-dependency of the surface ligand density of liposomes prepared by post-insertion // *Biol. Pharm. Bull.* 2017. Vol. 40, № 7. P. 1002–1009.
268. Silverstein S.C., Steinman R.M., Cohn Z.A. Endocytosis. // *Annu. Rev. Biochem.* 1977. Vol. 46. P. 669–722.
269. Banerjee S. et al. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, № 13. P. 5575–5583.
270. Racoma I.O. et al. Thymoquinone Inhibits Autophagy and Induces Cathepsin-Mediated, Caspase-Independent Cell Death in Glioblastoma Cells // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 9 (e72882).

271. Salmani J.M.M. et al. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone; probing the effects of solvents, pH and light // *Molecules*. 2014. Vol. 19, № 5. P. 5925–5939.
272. Schneider-Stock R. et al. Thymoquinone: Fifty years of success in the battle against cancer models // *Drug Discov. Today*. 2014. Vol. 19, № 1. P. 18–30.
273. Hu Q. et al. Anticancer Platelet-Mimicking Nanovehicles // *Adv. Mater.* 2015. Vol. 27, № 44. P. 7043–7050.
274. Das S. et al. Etoposide and doxorubicin enhance the sensitivity of triple negative breast cancers through modulation of TRAIL-DR5 axis // *Apoptosis*. 2017. Vol. 22. P. 1205–1224.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

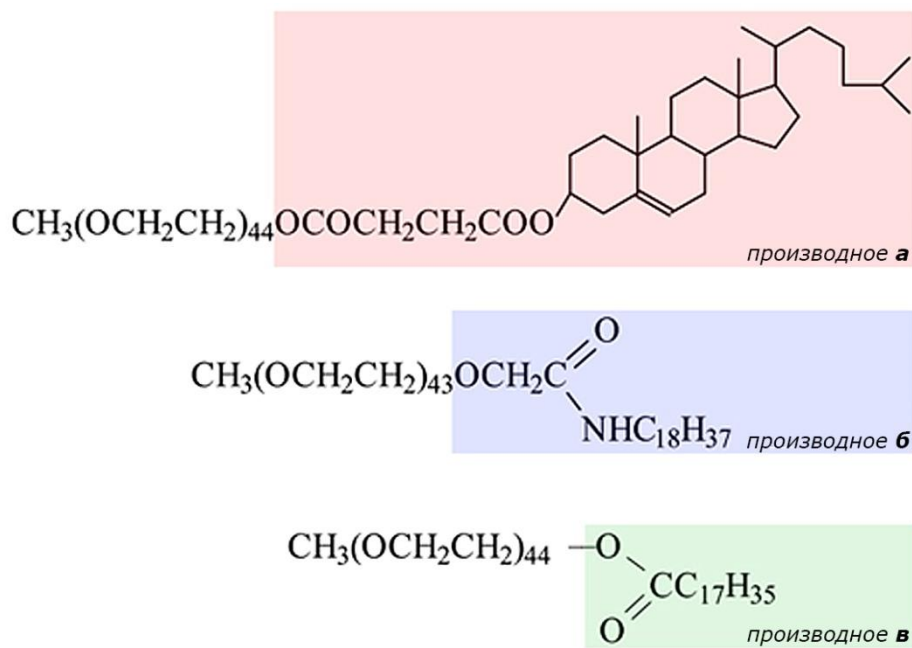


Рисунок П1 – Структура производных ПЭГ с различной природой гидрофобного фрагмента: **а** – на основе холестерина, **б** – на основе октадециламина, **в** – на основе стеариновой кислоты

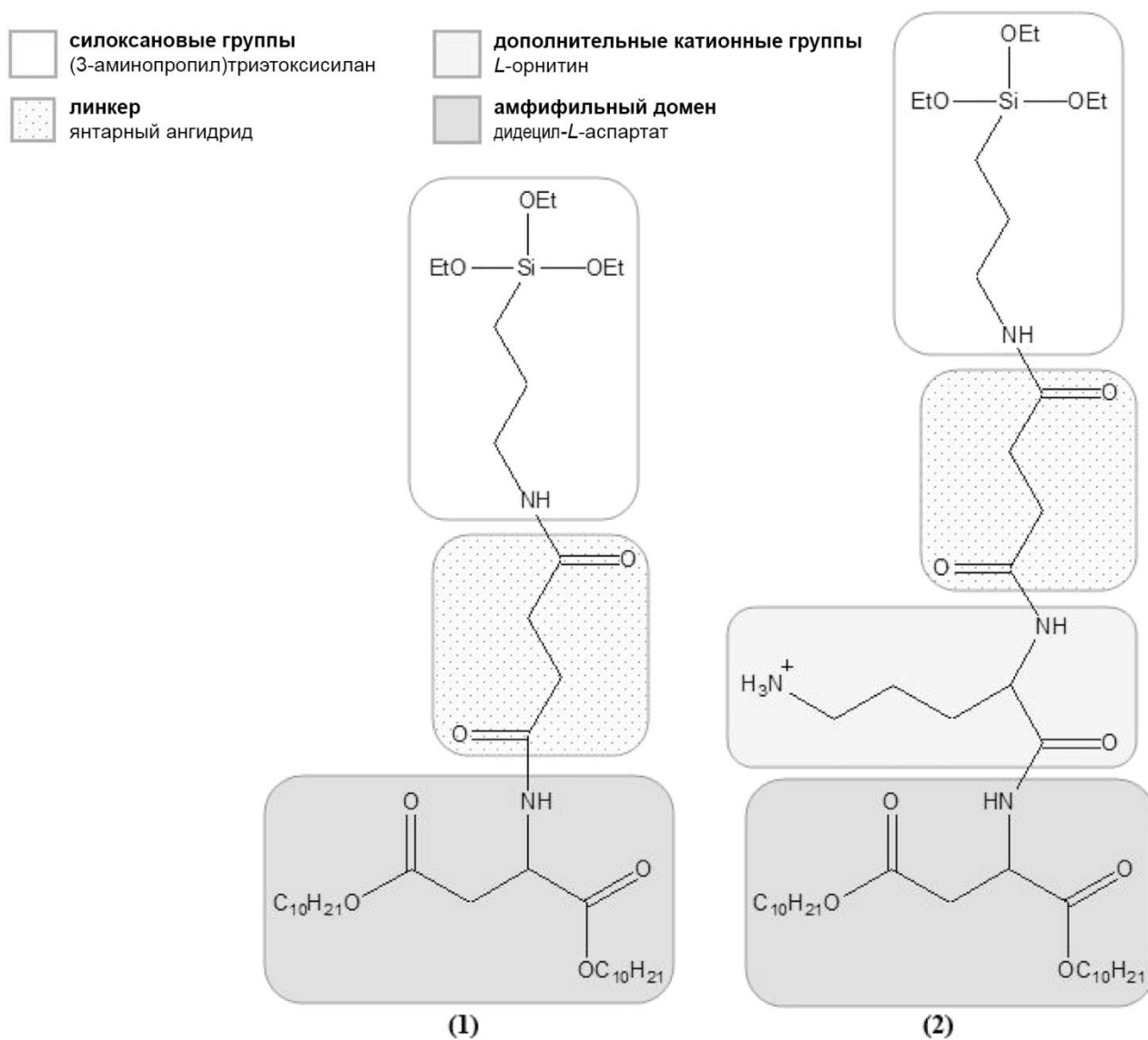


Рисунок П2 – Структурные блоки керасом-образующих липоаминокислот (CFLA) и соединения, полученные из этих блоков: нейтральная CFLA (1) и катионная CFLA (2)

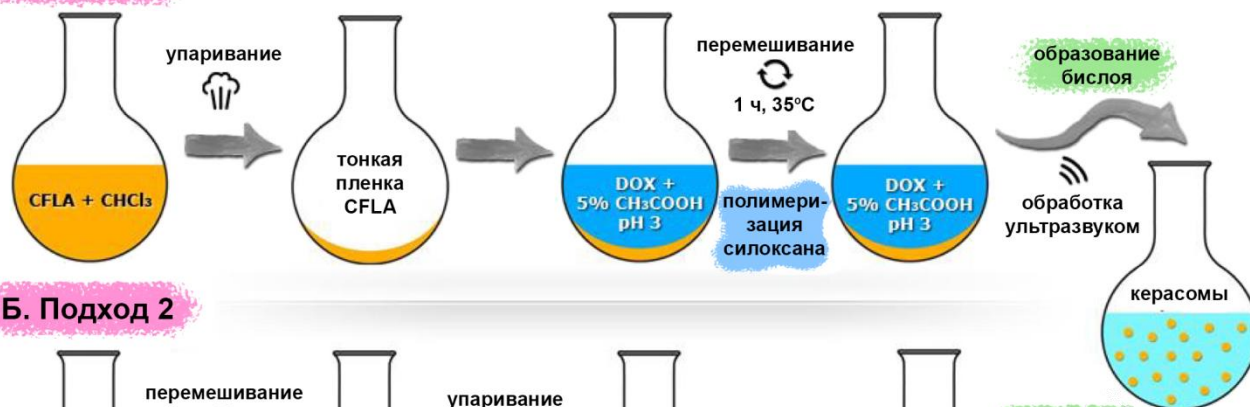
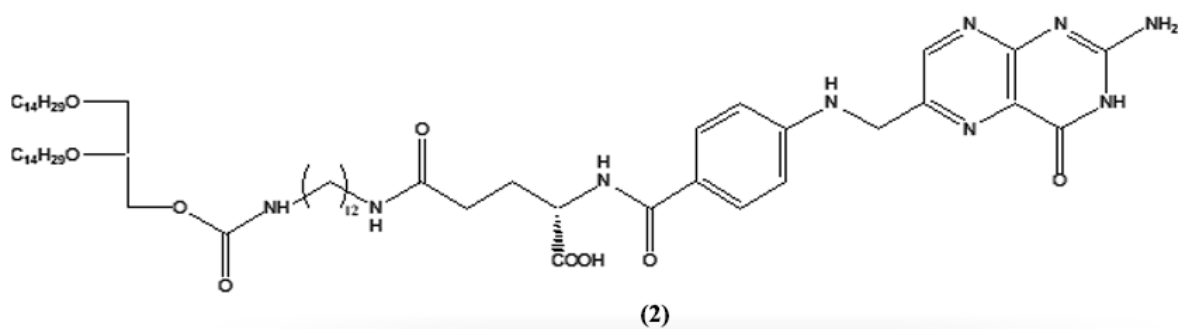
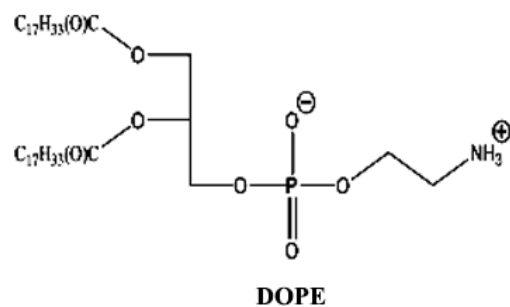
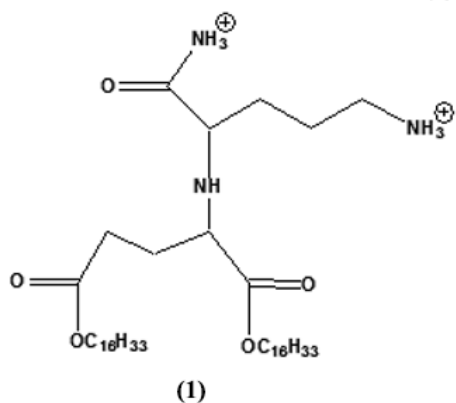
**А. Подход 1****Б. Подход 2**

Рисунок ПЗ – Схема формирования красом двумя методами

## Обычные липиды (без лигандов)

95%, масс.



## Фолат-конъюгированные липиды

5%, масс.

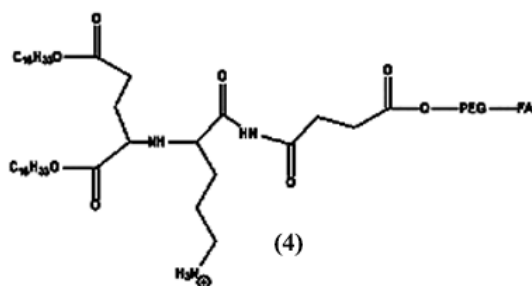
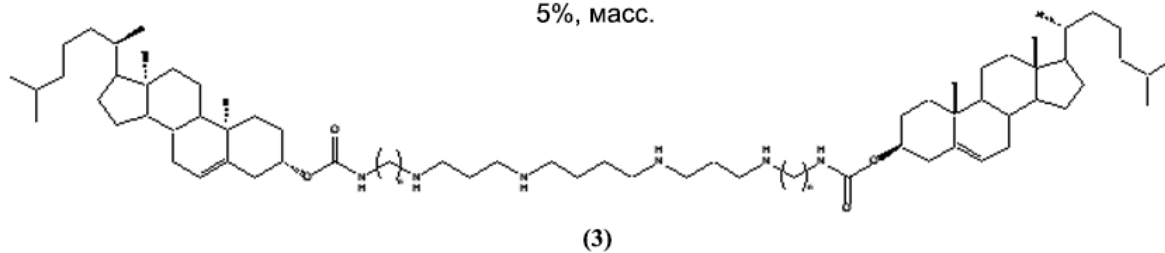


Рисунок П4 – Соединения, использованные для формирования фолат-конъюгированных липосом методом гидратации тонкой липидной пленки (FLP-ТП)

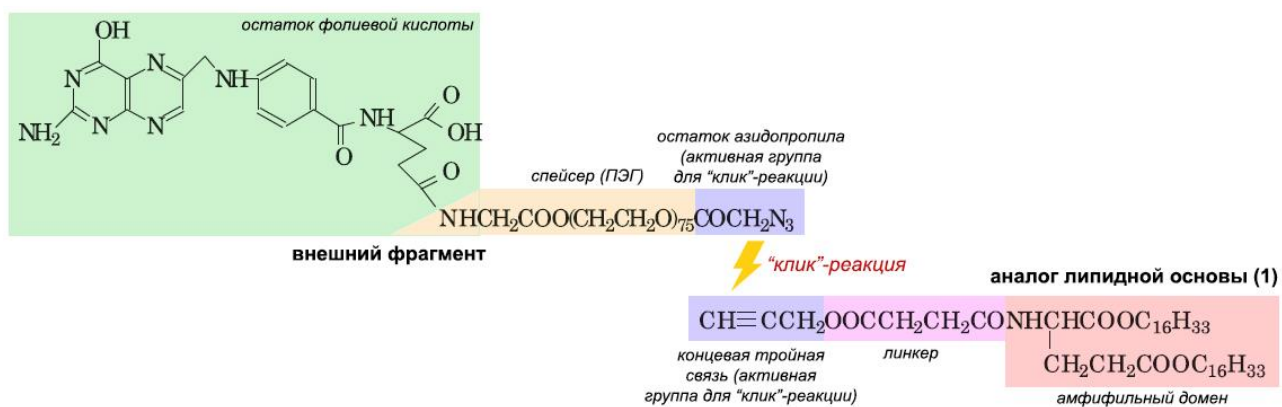


Рисунок П5 – Соединения, использованные для формирования фолат-конъюгированных липосом методом пост-модификации (FLP-ПМ)

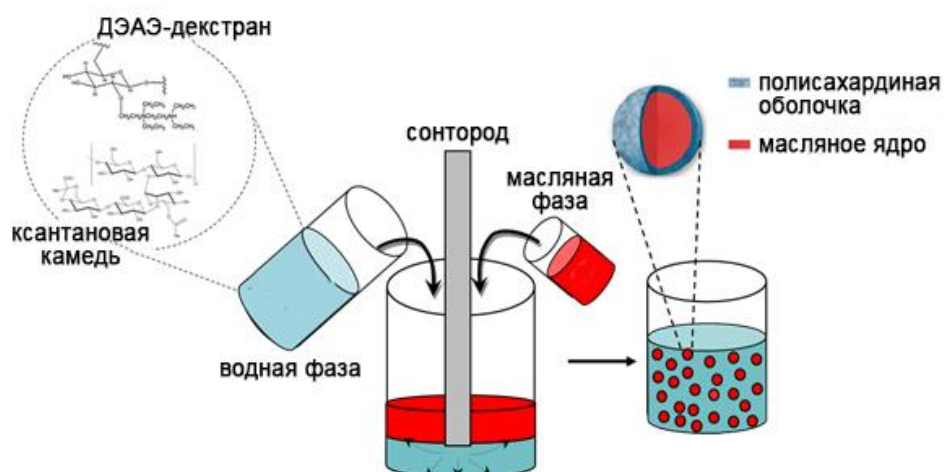


Рисунок П6 – Получение полимерных наноcontainers методом послойной адсорбции полиэлектролитов (LbL)

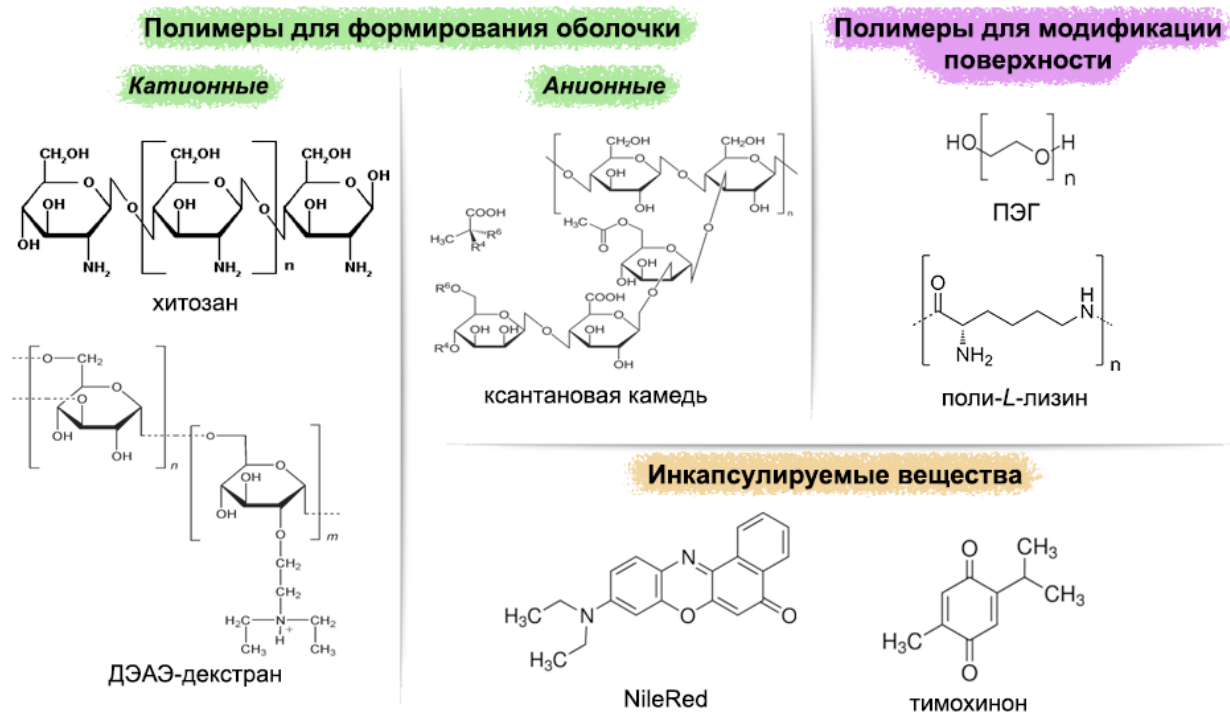


Рисунок П7 – Соединения, использованные для формирования и модификации полимерных наноконтейнеров, а также инкапсулированные препараты

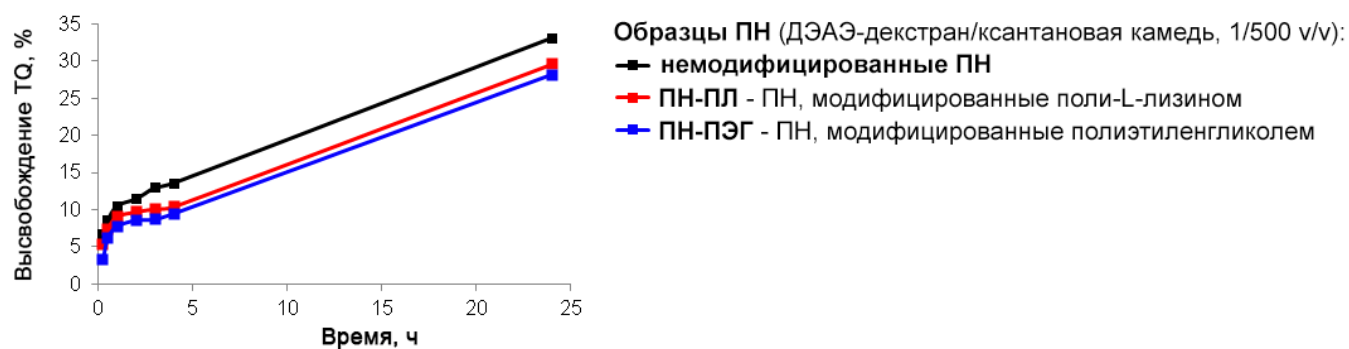


Рисунок П8 – Профили высвобождения тимохинона из ПН. Диализ *in vitro*