МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*

**Храмцов Юрий Викторович**

# Оптимизация строения модульных молекулярных конструкций, используемых в качестве инструмента для направленного воздействия на выбранную внутриклеточную мишень

Специальность 1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена Российской академии наук.

**Научный консультант** – *Соболев Александр Сергеевич*
академик РАН, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты** – *Деев Сергей Михайлович* – академик РАН, доктор биологических наук, профессор, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория молекулярной иммунологии, заведующий лабораторией

*Прасолов Владимир Сергеевич* – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория клеточных основ развития злокачественных заболеваний, заведующий лабораторией

*Шайтан Константин Вольдемарович* – доктор физико-математических наук, профессор, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, профессор

Защита диссертации состоится «17» сентября 2026 года в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: https://dissovet.msu.ru/dissertation/3948 .

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.5,
кандидат физико-математических наук П.В. Фурсова

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность темы исследований

Эффективная и высокоизбирательная доставка в клетку биологически активных соединений, особенно лекарственных веществ, стала насущной задачей последних десятилетий, решением которой занимаются многие лаборатории мира. Это связано с тем, что большинство таких соединений неспособно самостоятельно проникать в живые клетки. Примерами таких молекул являются нуклеиновые кислоты и антителоподобные молекулы. Доставка генетического материала, позволяющего синтезировать необходимый белок в клетке, как правило, осуществляется с помощью вирусов. Однако последние имеют целый ряд существенных недостатков, что заставляет искать им подходящую альтернативу. Но эффективность доставки нуклеиновых кислот с помощью невирусных систем доставки часто невысока, что делает задачу повышения этой эффективности весьма актуальной. Еще одним из актуальных направлений медицинской биофизики является воздействие (связывание или деградация) на внутриклеточные белки, которые участвуют в развитии различных патологий. В настоящее время это воздействие преимущественно осуществляется с помощью низкомолекулярных веществ, способных самостоятельно проникать в живые клетки. Однако такие вещества можно подобрать только к весьма ограниченному количеству внутриклеточных белков, в отличие от антител и антителоподобных молекул. Но для их использования необходимо наличие эффективной системы их доставки в клетку. В настоящее время примеров такой успешной доставки практически нет, что делает задачу разработки молекулярных конструкций, осуществляющих эффективную доставку в нужную область клетки антителоподобных молекул, очень актуальной.

## Степень разработанности темы исследований

В настоящее время для лечения различных заболеваний в качестве лекарственных средств, как правило, используются низкомолекулярные вещества, способные проникать в живые клетки за счет диффузии. Однако из-за отсутствия клеточной специфичности и порой недостаточной специфичности к нужному внутриклеточному белку, терапевтически эффективная концентрация таких веществ часто приводит к различным нежелательным побочным эффектам. Кроме того,

высокоспецифичные низкомолекулярные вещества можно подобрать не более чем к 15% внутриклеточных белков, участвующих в патологических процессах (Spradlin et al., 2021), в то время как антитела или антителоподобные молекулы (например, такие как аффибоди, монободи, нанободи и др.) можно получить на практически любой белковый антиген (Gebauer and Skerra, 2020; Shipunova and Deyev, 2022; Tolmachev at al., 2022; Шилова и др., 2024). Антитела тоже используются в качестве традиционных лекарственных средств, однако самостоятельно проникать в живые клетки они не могут, поэтому на внутриклеточные процессы они оказывают воздействие не напрямую, а опосредованно, например, за счет взаимодействия с рецепторами на поверхности клеток. Для связывания непосредственно с внутриклеточным белком-мишенью антителам и существенно меньшим по размеру антителоподобным молекулам требуются специальные системы их доставки в клетку. Но, несмотря на большое разнообразие существующих систем доставки веществ, практически нет примеров успешной доставки антителоподобных молекул в живые клетки заданного типа и к выбранному внутриклеточному белку. Тем более не изучено, как строение систем доставки влияет на эффективность этого процесса. Получение подобных эффективных систем доставки позволит получить инструмент, воздействующий на функции любого выбранного внутриклеточного белка, что имеет огромный потенциал для различных научных и практических приложений.

Синтез нужного белка можно осуществить путем доставки в клетку гена, кодирующего этот белок. При этом система доставки должна быть способна упаковывать ДНК. В качестве внутриклеточной мишени для ДНК выступает клеточное ядро, куда ДНК можно доставить как с помощью вирусов, так и разнообразных синтетических конструкций (Alavi et al., 2024; Khan, 2024). Вирусы обладают наилучшей эффективностью трансфекции, однако размер переносимого ими генетического материала ограничен, они имеют высокую иммуногенность и их применение может быть опасно за счет возможного возвращения к дикому типу (Alavi et al., 2024; Khan, 2024). Вирусы также имеют собственную клеточную специфичность, которая может отличаться от желаемой для генотерапии. Поэтому все большее распространение получают синтетические системы доставки, представляющие собой комплексы нуклеиновых кислот как с катионными липидами (липоплексы), так и с катионными полимерами (полиплексы), а также более сложные

системы на их основе (Xu and Anchordoquy, 2011; Khan, 2024; Panday et al., 2024). Однако, несмотря на то что эти системы доставки позволяют решать проблемы с токсичностью, иммуногенностью и размером переносимого генетического материала, эффективность доставки с помощью этих систем весьма ограничена. До конца не ясно, какие стадии процесса транспорта ограничивают эффективность трансфекции, и как на них влияет состав этих систем доставки и их концентрация. Решение этих задач позволит существенно повысить эффективность генотерапевтических препаратов.

Эффективность подавления функций любого внутриклеточного белка можно повысить путем его деградации, что позволяет осуществить длительное воздействие на определенные клеточные процессы (Verma et al., 2020; Zhao et al., 2022). Одним из наиболее распространенных и уже дошедших до клинических испытаний способов направленной деградации является создание низкомолекулярных соединений, называемых химерами, вызывающими направленный протеолиз (PROTACs, PROteolysis-TArgeting Chimeras) (Mullard, 2021; Song et al., 2023). Они состоят из лиганда к выбранному белку-мишени и молекулы, привлекающей убиквитинлигазу E3, соединенных линкером. Убиквитинированный белок-мишень в итоге подвергается протеолитической деградации. Однако, используемые в PROTACs лиганды являются низкомолекулярными соединениями, и, как уже указывалось, могут быть получены далеко не ко всем внутриклеточным белкам. Применение антителоподобных молекул в качестве лигандов позволило бы существенно расширить данную технологию на множество как фундаментальных, так и практических приложений. Основная проблема опять в высокоэффективной системе доставки этих химерных молекул в заданный компартмент выбранных клеток (Niamsuphap et al., 2020; Tolmachev et al., 2022).

Исходя из общей необходимости эффективных молекулярных систем, позволяющих осуществлять синтез, ингибирование или деградацию нужного внутриклеточного белка, формулируется цель настоящей работы.

**Цель и задачи исследования**

**Целью настоящей работы является разработка высокоэффективных модульных молекулярных конструкций, используемых для доставки генетического материала или антителоподобных молекул в заданную область**

**клетки, путем изменения строения или числа функциональных модулей этих конструкций.**

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Повысить эффективность доставки в клетки генетического материала модульными молекулярными конструкциями путем выявления ключевых этапов, ограничивающих его поступление в клетку, и воздействия на эти этапы изменением состава или концентрации данных конструкций.
2. Разработать модульные молекулярные конструкции, содержащие антителоподобную молекулу и позволяющие избирательно и с высоким сродством связываться с внутриклеточным белком-мишенью.
3. Разработать модульные молекулярные конструкции, содержащие антителоподобную молекулу и аминокислотную последовательность, привлекающую убиквитинлигазу Е3, и способные вызывать направленную деградацию внутриклеточного белка-мишени.
4. Повысить накопление молекулярных конструкций в опухолях при их введении в кровоток лабораторных животных путем изменения в них строения функциональных модулей или добавления новых модулей.

**Объект и предмет исследования**

Объектом исследования являются искусственные модульные молекулярные конструкции, способные за счет использования естественных процессов внутриклеточного транспорта макромолекул доставлять генетический материал или антителоподобные молекулы в клетки. Доставку нуклеиновых кислот осуществляли полиплексами – модульными конструкциями, состоящими из модуля, компактизующего и связывающего ДНК (положительно заряженные блок-сополимеры полиэтиленимин (ПЭИ) - полиэтиленгликоль (ПЭГ)), модуля, обеспечивающего проникновение в клетки (ТАТ пептид), и доставляемую ДНК. Антителоподобные молекулы доставлялись в составе модульных нанотранспортеров (МНТ) – полипептидных химерных конструкций, состоящих из нескольких соединенных пептидными связями модулей, представляющих собой части природных или модифицированных белков и пептидов. Лигандный модуль (ЛМ) позволял МНТ

связываться с рецепторами на поверхности клеток-мишеней и интернализоваться в эти клетки. За счет эндосомолитического модуля (ЭМ) МНТ выходили из эндосом в цитозоль, а сигнал ядерной локализации (СЯЛ) отвечал за попадание МНТ в ядра клеток. Все модули вместе объединял модуль-носитель (МН).

Предметом исследования является поиск таких изменений строения и числа функциональных модулей молекулярных конструкций, которые способствуют увеличению эффективности доставки ими биологически активных молекул в заданные ткань и клетку организма, а также выявление основных этапов процесса транспорта макромолекул, ограничивающих эффективность процесса доставки.

**Научная новизна работы**

Ключевыми этапами процесса транспорта молекул ДНК полиплексами на основе полиэтиленимина в клетки, ограничивающими общую эффективность этого процесса, являются проникновение полиплексов в клетки и их распаковка в закисляемых компартментах.

Полипептидные модульные конструкции, позволяющие использовать естественные механизмы внутриклеточного транспорта макромолекул и деградации белков, можно применить для высокоизбирательной доставки антителоподобных молекул к внутриклеточному белку-мишени и для направленной деградации этого белка.

Новый способ определения внутриклеточной концентрации молекул позволяет определять концентрацию только тех молекул (как находящихся в составе транспортных молекулярных конструкций, так и индивидуальных), которые сохраняют в условиях клетки способность взаимодействовать с белком-мишенью.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенные работы показали возможность влияния на эффективность трансфекции клеток молекулами ДНК, доставляемыми полиплексами, путем изменения состава и концентрации полиплексов. Установлено, что ключевыми этапами процесса транспорта, ограничивающими эту эффективность, являются проникновение полиплексов в клетку и их распаковка в закисляемых компартментах. Показана возможность воздействовать на любые выбранные внутриклеточные белки с помощью доставляемых молекулярными конструкциями антителоподобных

молекул. В результате этих работ появилась теоретическая возможность влиять на широкий спектр белок-белковых взаимодействий в клетке, как за счет избирательного связывания с нужным белком соответствующей антителоподобной молекулы, так и за счет направленной деградации этого белка путем привлечения к нему убиквитинлигазы E3. Показана возможность увеличения сродства доставляемой антителоподобной молекулы к внутриклеточному белку-мишени за счет ее отщепления от молекулярной конструкции в закисляемых компартментах. Предложен способ оценки эффективной концентрации доставляемой в цитозоль молекулы на основании анализа термочувствительности белка, с которым может взаимодействовать эта молекула. Показана возможность увеличения времени циркуляции молекулярных конструкций в крови за счет присоединения к ним модуля для связывания с альбумином, а также возможность увеличения накопления этих конструкций в опухоли за счет введения сайта расщепления опухолеспецифичными протеазами.

Полученные результаты могут послужить основой для создания высокоэффективных средств лечения широкого круга социально-значимых заболеваний, таких как онкологические заболевания, вирусные заболевания и заболевания, связанные с окислительным стрессом.

**Методология и методы исследования**

Методы исследования и методология соответствовали поставленным задачам. Визуализацию ключевых стадий процесса транспорта изучаемых молекулярных конструкций проводили как на культивируемых клетках с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), в том числе флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM), так и на лабораторных мышах с использованием однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и рентгеновской компьютерной томографии (КТ). Транспорт систем доставки в клетке и в организме описывали предложенными автором компартментными математическими моделями. Для изучения взаимодействия между молекулами в растворе, а также для изучения влияния разных модулей исследуемых молекулярных конструкций на этот процесс использовали метод термофореза. Взаимодействие между молекулами в живых клетках изучали с помощью флуоресценции резонансного переноса энергии по Фёрстеру (FRET) на КЛСМ, а

также с помощью клеточного анализа теплового сдвига (CETSA) с использованием иммуноблоттинга с антителами на изучаемый белок. Для оценки цитозольной концентрации доставляемой молекулы использовали CETSA и разработанную автором равновесную модель взаимодействия между молекулами. Для изучения строения молекулярных конструкций использовали методы динамического светорассеяния, атомно-силовой микроскопии (АСМ), просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и малоуглового рентгеновского рассеяния (МРР). Для изучения механизма образования дефектов в липидном бислое транспортными конструкциями, а также влияния на этот процесс разных модулей конструкций применяли АСМ. Для проверки функциональной активности всех модулей в составе транспортных конструкций, а также для изучения биологического эффекта, оказываемого доставляемой молекулой, и влияние на него состава конструкций использовали ряд биофизических, молекулярно-биологических, химических и биохимических методов, включающих в себя помимо перечисленных выше методов, определение электрофоретической подвижности, проточную цитофлуориметрию, радиолигандный анализ, спектрофотометрические, спектрофлуориметрические и люминесцентные методы, работу с клетками, исследование цитотоксичности и другие методы.

**Основные положения, выносимые на защиту**

- Компартментные математические модели позволяют выявлять ключевые параметры процесса транспорта молекул в нужную ткань или область клетки, ограничивающие эффективность всего процесса транспорта.
- Основными стадиями транспорта полиплексов (комплексов блок-сополимеров полиэтиленимин-полиэтиленгликоль-(ТАТ пептид) и молекул ДНК) в клетку, влияющими на общую его эффективность, являются стадии проникновения в клетку и распаковки в закисляемых компартментах и эта эффективность повышается вплоть до 100% увеличением концентрации ДНК и/или соотношения азот в блок-сополимерах/фосфат в ДНК.
- Метод оценки внутриклеточной концентрации молекул, основанный на изменении термочувствительности цитозольного белка при взаимодействии с этими молекулами и равновесной математической модели взаимодействия, позволяет сравнивать эффективность доставки данных молекул в цитозоль в случаях, когда они находятся в составе доставляющих их модульных конструкций

и когда они отщепляются от этих конструкций на определенных стадиях процесса их транспорта.

- Модульные нанотранспортеры (МНТ) проникают в клетки заданного типа и избирательно и с высоким сродством связываются с выбранным внутриклеточным белком за счет антителоподобной молекулы к этому белку, а сродство этого связывания повышается в несколько раз путем отщепления этой молекулы от МНТ в закисляемых компартментах.
- МНТ, содержащие аминокислотную последовательность, привлекающую убиквитинлигазу Е3, и антителоподобную молекулу к выбранному внутриклеточному белку вызывают направленную деградацию этого белка.
- Накопление МНТ в опухолях лабораторных животных при его системном применении увеличивается заменой эндосомолитического модуля, транслокационного домена дифтерийного токсина, на эндосомолитический пептид GALA3, введением сайта расщепления опухолеспецифичными протеазами и введением модуля, способного взаимодействовать с альбумином.

**Достоверность и апробация работы**

Полученные результаты опубликованы в рецензируемых журналах международного уровня и не противоречат результатам, полученным другими авторами. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на 28 Всероссийских и международных съездах и конференциях, включая: The International Society of Nuclear Medicine, США, Вашингтон, 2-6 июня 2007; Пятый московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Россия, Москва, 16-20 марта 2009; Второй Международный форум по нанотехнологиям, Россия, Санкт-Петербург, 6-8 октября 2009; International symposium “Control of gene expression and cancer”, Россия, Москва, 21-25 июня 2010; III Международный форум по нанотехнологиям, Россия, Дубна, 1-3 ноября 2010; American Society of Gene & Cell Therapy 14$^{th}$ Annual Meeting, США, Сиэтл, 18-21 мая 2011; IV съезд биофизиков России, Россия, Нижний Новгород, 20-26 августа 2012; 21st International Symposium "Nanostructures: Physics and Technology", Россия, Санкт-Петербург, 24-28 июня 2013; V съезд биофизиков России, Россия, Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015; International Conference BIOMEMBRANES, Россия, Долгопрудный, 1-5 октября 2018; The 9th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular and

Medical Aspects of Auger Processes, Великобритания, Оксфорд, 22-24 августа 2019; VI Съезд биофизиков России, Россия, г. Сочи, 16-21 сентября 2019; VII Съезд биофизиков России, Россия, Краснодар, 17-23 апреля 2023.

**Личный вклад**

Автор принимал значительное участие, как в планировании, так и проведении экспериментальных работ, описанных в диссертации, а также в анализе и интерпретации полученных результатов. Автором предложены все компартментные модели, а также равновесная модель взаимодействия МНТ с Nrf2-системой, описанные в диссертации. Кроме того, им предложен новый способ оценки эффективной внутриклеточной концентрации молекул, способных взаимодействовать с выбранным белком-мишенью. В применении большинства методов, описанных в диссертации, автор принимал основное участие, включая атомно-силовую микроскопию, конфокальную микроскопию, микроскопию времени жизни флуоресценции, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию, термофорез, динамическое светорассеяние, проточную цитофлуориметрию и другие методы. Автором также осуществлялся сбор и анализ литературных данных, а также подготовка публикаций и докладов по теме диссертационной работы. По ходу изложения материалов диссертации перечислены все коллеги, принимавшие участие в проведении описанных работ.

**Публикации**

Основные положения, результаты и выводы диссертации отражены в 39 научных трудах, 38 из которых опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика.

**Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 282 страницах и состоит из следующих частей: введение (включая цели и задачи исследования), основная часть, состоящая из разделов: обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы, заключение и список литературы. Диссертация содержит 86 рисунков и 10 таблиц. Библиография включает 422 ссылки.

**Список сокращений**

АСМ – атомно-силовая микроскопия; АСД – альбуминсвязывающий домен белка G Streptococcus, G148; МНТ – модульные нанотранспортеры; ДТокс – транслокационный домен дифтерийного токсина; КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия; КТ – компьютерная томография; ЛМ – лигандный модуль; МН – модуль-носитель; МРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; αМСГ – α-меланоцитстимулирующий гормон; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ПЭИ – полиэтиленимин; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; РЭФР – рецептор эпидермального фактора роста; СЯЛ – сигнал ядерной локализации; ТАТ – пептид из трансактиватора транскрипции вируса иммунодефицита; ЭФР – эпидермальный фактор роста; ЭМ – эндосомолитический модуль; CETSA – клеточный анализ теплового сдвига; cDCF – карбокси-2',7'-дихлорофлуоресцеин; FLIM – флуоресцентрая микроскопия с временным разрешением; FRET – флуоресцентный резонансный перенос энергии по Фёрстеру; HMP – гемоглобиноподобный белок *E.coli*; Keap1_E3PB – последовательность, способная взаимодействовать с убиквитинлигазой Keap1; N/P – отношение азота блок-сополимера к фосфату ДНК; QD – квантовая точка.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснованы актуальность темы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи работы, определены объект и предмет исследования, изложены научная новизна, теоретическая и практическая значимость представляемой работы, методология и методы диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и апробация работы.

**Основная часть** работы состоит из разделов: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы».

В **Обзоре литературы** описаны специфическая и неспецифическая доставки локально-действующих веществ в заданный компартмент клеток. Рассмотрена одна из ключевых стадий процесса доставки – выход молекул из эндосом и разобраны возможные механизмы этого выхода, включающие в себя эффект протонной губки, выход из эндосом липидных наночастиц, выход из эндосом путем дестабилизации

мембран и выход из эндосом бактериальных токсинов. Завершается раздел описанием одного из способов математического моделирования транспорта молекул в клетку или ткань, основанного на использовании компартментных моделей. В качестве примера этих моделей подробно разобрана наиболее близкая к теме диссертации модель поступления антител из кровотока в опухоль.

В разделе **Материалы и методы исследования** рассмотрены используемые культуры клеток, синтез блок-сополимеров на основе ПЭИ, ПЭГ и ТАТ-пептида и их очистка, а также процессы приготовления полиплексов на основе этих блок-сополимеров и трансфекции клеток этими полиплексами. Средний размер и электрофоретическую подвижность полиплексов изучали с помощью динамического светорассеяния, а с помощью АСМ получили их распределение по размеру. Описано также получение и очистка МНТ с помощью аффинной хроматографии и диализа. Для изучения характерных размеров МНТ, а также их трехмерного строения были использованы методы АСМ, ПЭМ и МРР. Образование дефектов в липидном бислое изучали с помощью метода АСМ, путем измерения проводимости плоских липидных мембран, а также по выходу флуоресцентного красителя кальцеина из липосом. Для изучения сохранения функциональной активности СЯЛ выделили $\alpha$ и $\beta$-импортины. В качестве основного метода изучения взаимодействий между молекулами в растворе выступал метод термофореза. Этим методом, например, изучали взаимодействие МНТ с гетеродимером импортинов или белком Keap1. Взаимодействие между молекулами, например, между МНТ и Keap1, в живых клетках изучали с помощью методов FLIM-FRET и CETSA. Описано изучение фототоксичности МНТ с присоединенными фотосенсибилизаторами. Изучение активации Nrf2-системы с помощью полученных МНТ проводили с помощью иммуноблоттинга с антителами на Nrf2 и Keap1. Для оценки внутриклеточных концентраций молекул определяли объем клеток и их ядер. Для установления оптимального сайта расщепления катепсином В проводили изучение кинетики расщепления соответствующих пептидов. Результат активации Nrf2-системы оценивали по интенсивности флуоресценции красителя cDCF, чувствительной к концентрации активных форм кислорода в клетке. Биораспределение МНТ, меченных радиоактивным изотопом, изучали с помощью метода ОФЭКТ/КТ или аутопсии мышей и последующего изучения радиоактивности

в извлеченных органах и тканях. Времена циркуляции МНТ в кровотоке определяли по флуоресценции образцов крови.

Раздел **Результаты** состоит из восьми основных подразделов. В **первом** изучены **полиплексы – транспортные молекулярные конструкции для доставки нуклеиновых кислот в клетки.** Для синтеза желаемого белка в клетках применяли полиплексы – комплексы положительно заряженных полимеров с ДНК. Для их образования использовали блок-сополимеры, состоящие из 25 кДа ПЭИ для компактизации и защиты ДНК, ПЭГ из 24 звеньев, необходимого для минимизации взаимодействий с белками плазмы крови и эритроцитами, и TAT-пептида, который нужен для лучшего проникновения полиплексов в клетку. В процессе оптимизации состава полиплексов в качестве варьируемых параметров выбрали соотношения ПЭГ/ПЭИ в блок-сополимерах и N/P – азота блок-сополимера к фосфату ДНК в полиплексах. Переносимая полиплексами плазмидная ДНК кодировала зеленый флуоресцентный белок. При различных комбинациях ПЭГ/ПЭИ и N/P для восьми клеточных линий был определен процент клеток, нарабатывающих этот белок (эффективность трансфекции). Полученные зависимости эффективности трансфекции от ПЭГ/ПЭИ и N/P обладали схожим внешним видом и позволили заключить, что оптимальными для трансфекции являются полиплексы, имеющие ПЭГ/ПЭИ = 0,5–5 и N/P ≥ 20. Изучение распределения полиплексов по размеру с использованием метода АСМ показало, что ПЭГ/ПЭИ и N/P определяют долю полиплексов, которая наиболее эффективно трансфицирует клетки (диаметром 50–75 нм).

Наилучшее в изучаемых диапазонах ПЭГ/ПЭИ и N/P значение эффективности трансфекции в зависимости от выбранной клеточной линии варьировало от 17,7 до 100%. Чтобы понять, с чем это связано, для линий клеток A549, Calu-1 и меланомы Клаудмана (клон M3), сильно отличающихся по эффективности трансфекции, с помощью КЛСМ в сочетании с методом FRET получали относительное содержание упакованных и распакованных полиплексов в различных клеточных компартментах в зависимости от времени. В случае упакованных полиплексов FRET возникал между молекулами ДНК, меченными квантовыми точками QD605, и блок-сополимерами, меченными AF647. Для анализа полученных кинетических данных, касающихся транспорта и распаковки полиплексов в клетках, автором были предложены четыре компартментных модели, начиная с самой простой (рис. 1).

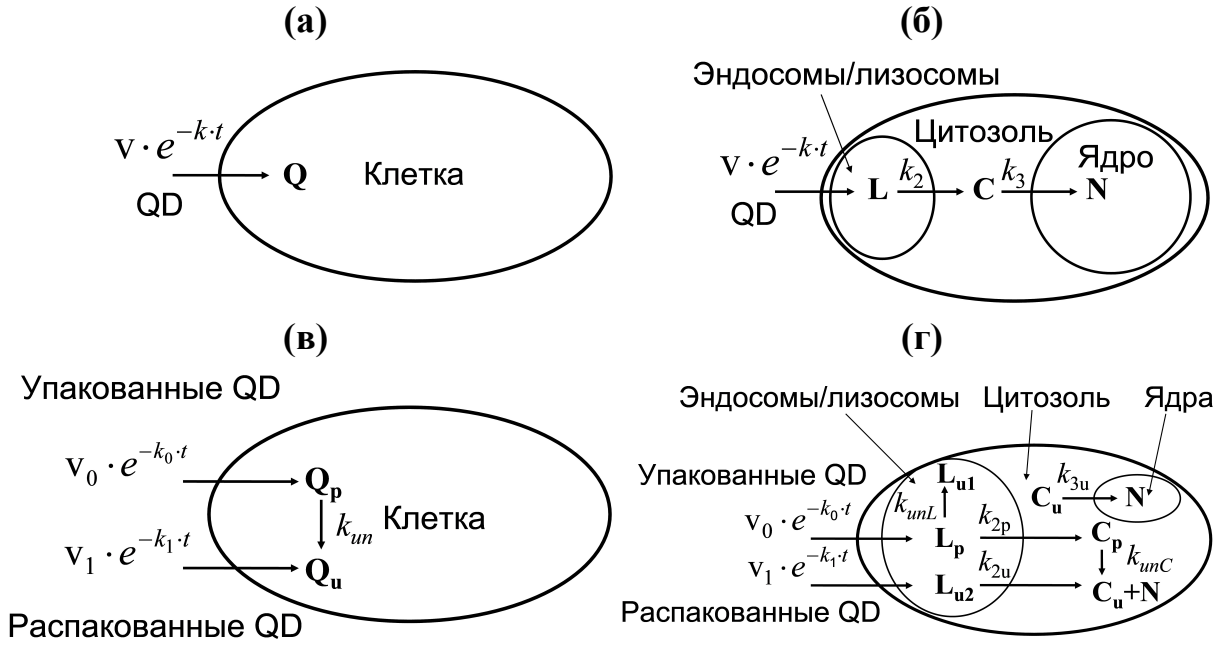


**Рисунок 1. Схемы транспорта и распаковки ДНК в составе полиплексов, меченной квантовыми точками, QD, согласно моделям 1 (а), 2 (б), 3 (в) и 4 (г).** Q – общий воксельный объем квантовых точек на клетку; v – начальная скорость входа квантовых точек в клетку, $k$ – константа скорости уменьшения входа квантовых точек в клетку за счет изменения их концентрации вне клетки; L, C и N – воксельные объемы квантовых точек в эндосомах и лизосомох, цитозоле и ядрах, соответственно; $k_2$ – константа скорости выхода QD из эндо/лизосом; $k_3$ – константа скорости входа QD в ядро; $Q_p$ – общий воксельный объем сигнала квантовых точек упакованной ДНК с QD на клетку (наблюдался FRET); $Q_u$ – общий воксельный объем квантовых точек неупакованной ДНК с QD на клетку (FRET не наблюдался); $k_{un}$ – константа скорости распаковки; $v_0$ и $v_1$ – начальные скорости проникновения в клетку упакованных и неупакованных ДНК с QD, соответственно; $k_0$ и $k_1$ – константы скорости уменьшения входа квантовых точек в клетки за счет изменения их концентраций вне клетки для упакованной и распакованной ДНК с QD, соответственно; $L_{u1}$ – воксельный объем квантовых точек для ДНК, подвергающейся распаковке внутри эндосом и лизосом; $L_{u2}$ – воксельный объем квантовых точек для ДНК, которая попала в эндосомы и лизосомы после предварительной распаковки вне клетки; $C_p$ и $L_p$ – воксельные объемы квантовых точек для упакованной в полиплексы ДНК с QD в цитозоле и эндосомах/лизосомах, соответственно; $k_{unL}$ – константа скорости распаковки ДНК с QD в эндосомах/лизосомах; $k_{unC}$ – константа скорости распаковки ДНК с QD в цитозоле; $k_{2p}$ и $k_{2u}$ – константы скорости выхода упакованной и распакованной ДНК с QD из эндосом/лизосом соответственно; $k_{3u}$ – константа скорости входа ДНК с QD в ядра.

В модели 1 (рис. 1а) описывался общий вход полиплексов в клетку, а в модели 2 (рис. 1б) уже учитывался внутриклеточный транспорт полиплексов между эндосомами/лизсомами, цитозолем и ядром. Распаковка всех полиплексов в клетке представлялась моделью 3. Наиболее подробная модель 4 описывала одновременно внутриклеточный транспорт и распаковку полиплексов в клеточных компартментах.

В каждой последующей модели фиксировались параметры, оцененные в предыдущей модели, что позволило оценить все параметры данных моделей.

Из всего набора кинетических параметров, описывающих транспорт и распаковку полиплексов, отбирали только те из них, для которых наблюдалась корреляция с эффективностью трансфекции. Такими ключевыми параметрами оказались скорость входа полиплексов в клетку, v, и константа скорости распаковки полиплексов в эндосомах/лизосомах, $k_{unL}$. Они указывают на то, что для повышения эффективности трансфекции нужно либо увеличить v, либо уменьшить $k_{unL}$. Ранняя распаковка полиплексов в эндосомах приводит к тому, что доставляемые молекулы ДНК не могут выйти из эндосом и попадают в лизосомы, где подвергаются деградации. Согласно предложенным автором моделям, параметр v можно увеличить за счет повышения внеклеточной концентрации полиплексов или концентрации переносимой плазмидной ДНК. А параметр $k_{unL}$ теоретически будет уменьшаться при увеличении N/P, так как при этом будет увеличиваться доля блок-сополимеров, не входящих в полиплексы, что в эндосомах будет препятствовать распаковке этих полиплексов. Эти теоретические выводы автора были подтверждены им экспериментально и показано, что увеличением концентрации ДНК и/или значения N/P в полиплексах можно повысить эффективность трансфекции вплоть до 100 % (рис. 2).

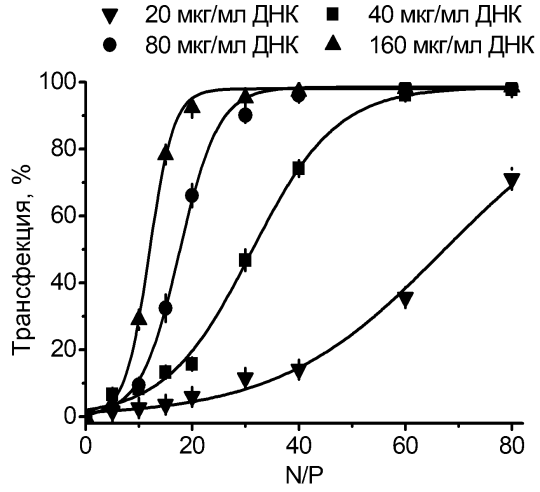


**Рисунок 2. Зависимости эффективности трансфекции полиплексами клеточной линии A549 от соотношений N/P при различных концентрациях плазмидной ДНК в полиплексах.** Полиплексы (ПЭГ/ПЭИ = 4,9, ТАТ/ПЭИ = 0,4) содержали ген желтого флуоресцентного белка, TurboYFP, под контролем цитомегаловирусного промотера. Долю клеток, экспрессирующих TurboYFP, определяли с помощью проточной цитофлуориметрии.

**В подразделе 2** изучены **модульные нанотранспортеры (МНТ) и их строение.** Для доставки антителоподобных молекул к внутриклеточным белкам-мишеням лучше всего подходят МНТ. В используемых МНТ в качестве ЛМ выступали эпидермальный фактор роста (ЭФР) человека, аффибоди, способное специфически связываться с рецептором ЭФР (РЭФР), или α-меланоцитстимулирующий гормон

(αМСГ). Транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс) выполнял функцию ЭМ, а большой Т-антиген вируса SV40 – СЯЛ. В качестве МН выступал гемоглобиноподобный белок *E.coli* (HMP). Проведенные эксперименты показали, что все эти модули в составе МНТ сохраняют свои функциональные свойства. Для понимания того, как можно изменить строение МНТ, чтобы увеличить эффективность связывания доставляемых молекул со своей внутриклеточной мишенью, была изучена трехмерная структура МНТ.

Так как многократные попытки кристаллизовать МНТ оказались безуспешными, его строение изучили с помощью сочетания методов АСМ, ПЭМ и МРР. Изображения молекул МНТ-αМСГ (рис. 3а) и МНТ-ЭФР (рис. 3б) на слюде были получены автором с помощью метода АСМ в жидкой фазе при pH 8,0. МНТ имеют немного изогнутую форму, где хорошо различимы два отдельных домена – ЭМ и МН, а ЛМ благодаря своим небольшим размерам был не виден. По полученным изображениям были построены частотные распределения отношения длина/ширина для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР (рис. 3в и 3г), которые показывают наличие двух конформаций МНТ – «компактной» и «вытянутой». Определенные по максимумам пиков соотношения длина/ширина для этих конформаций составляли 1,4 и 2,0, а частота их встречаемости для МНТ-αМСГ – 67 и 33%, соответственно.

Совместно с И.Б. Эйдлиным и А.С. Ореховым из «Научно-исследовательского центра» Курчатовского института были проведены эксперименты по изучению строения МНТ с помощью ПЭМ при pH ~5. Также как и по данным АСМ, на изображениях ПЭМ установлено наличие двух основных конформаций МНТ – «компактной» и «вытянутой», для которых соотношения длина/ширина составляли 1,4-1,6 и 2,1. Используя данные ПЭМ и известные из баз данных структуры ДТокс и HMP, была проведена 3D реконструкция строения молекулы МНТ-αМСГ (рис. 4).

Совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым, А.И. Куклиным и В.И. Горделием из МФТИ было проведено изучение строения МНТ-αМСГ при pH 8,0 методом МРР. Эти данные были обработаны с помощью метода оптимизации ансамбля и получен ансамбль из четырех 3D моделей молекулы МНТ-αМСГ (рис. 5). Три их этих моделей отличались друг от друга лишь незначительно, поэтому можно заключить, что МНТ-αМСГ может принимать только две конформации – «компактную» (встречаемость 71%) и «вытянутую» (встречаемость 29%). Отношения

длина/ширина для этих конформаций были 1,2–1,5 и 2,2, что совпадает с результатами методов АСМ и ПЭМ.

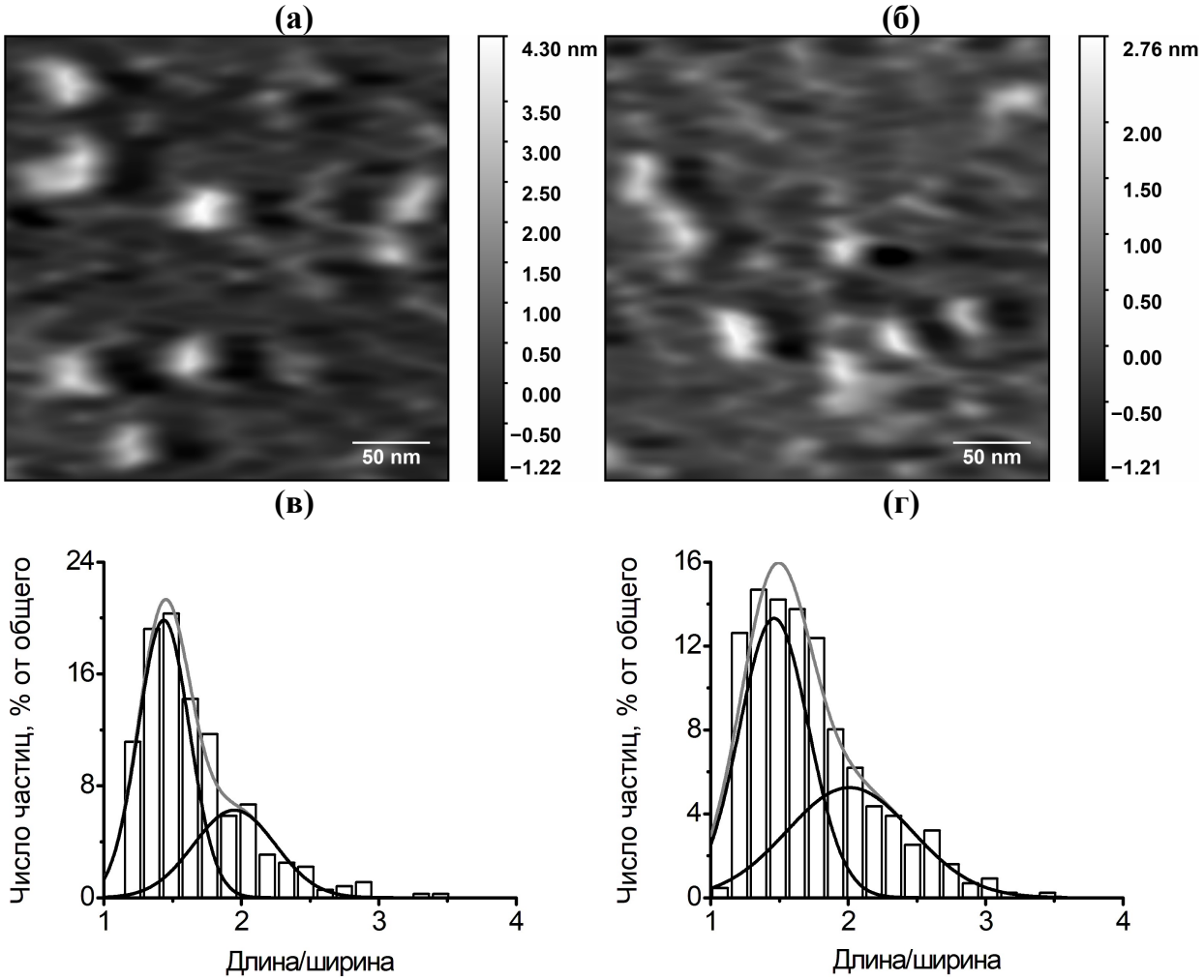


**Рисунок 3. Типичные изображения частиц МНТ-αМСГ (а) и МНТ-ЭФР (б), полученные с помощью АСМ в режиме прерывистого контакта в фосфатном буфере (pH 8). Частотные распределения отношения длина/ширина для частиц МНТ-αМСГ (в) и МНТ-ЭФР (г).** Кривые Гаусса показаны черным цветом, а их сумма – серым. Общее число частиц, использованных при построении распределений, составляло 507 и 436 для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно.

**Рисунок 4. Проведенная на основании данных ПЭМ 3D реконструкция молекулы МНТ-αМСГ с наложенными атомарными PDB моделями для НМР и ДТокс (pH 5).** Для проведения реконструкции использовали не менее 5000 изображений молекул МНТ-αМСГ. Данные ПЭМ получены совместно с И.Б. Эйдлиным и А.С. Ореховым из «Научно-исследовательского центра» Курчатовского института, а реконструкция проведена совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым и А.И. Куклиным из МФТИ.

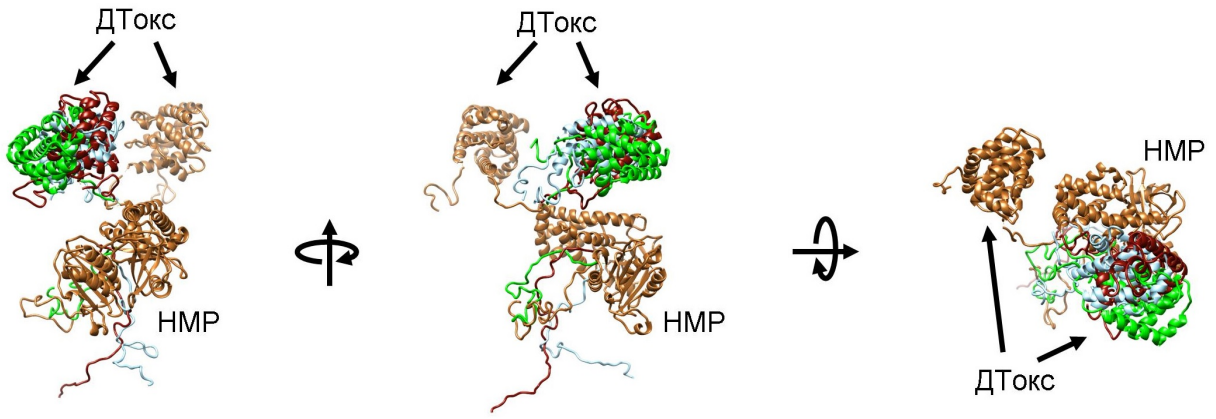


**Рисунок 5. Четыре 3D модели молекулы МНТ-αМСГ, полученные с помощью метода MPP и метода оптимизации ансамбля (pH 8).** Во входных данных домен НМР был фиксирован, а ДТокс свободен. Модели получены совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым и А.И. Куклиным из МФТИ.

Итак, было показано, что при pH 8 преобладает «компактная» конформация МНТ. При такой конформации крупные модули в составе МНТ будут уменьшать сродство доставляемой антителоподобной молекулы к белку-мишени. Поэтому автором диссертационной работы в качестве оптимизации строения МНТ было предложено добавить сайт отщепления протеазами антителоподобной молекулы от МНТ. Причем это отщепление должно происходить на этапе процесса транспорта, предшествующем взаимодействию МНТ с цитозольным белком-мишенью, т.е. на этапе выхода МНТ из эндосом. Однако, в этом случае, в зависимости от механизма этого выхода, отщепленная антителоподобная молекула может остаться в эндосомах или выйти в цитозоль. Поэтому необходимо было понимать механизм выхода МНТ из эндосом, для чего были изучены дефекты, которые образуются в липидном бислое под действием МНТ при закислении среды.

В **подразделе 3** описано **изучение дефектов, которые образуются в липидном бислое на слюде под действием МНТ.** Образование этих дефектов автор изучал с помощью метода АСМ в жидкости. При уменьшении pH с 7,5 до 5,5 в липидном бислое, к которому был добавлен МНТ-ЭФР, образовывались кольцевые структуры диаметром 30–50 нм (рис. 6а). Эти структуры обусловлены наличием НМР, т.к. для МНТ, лишенного эндосомолитического модуля, сходные структуры тоже наблюдались, а для отдельного ДТокс этих структур обнаружено не было (рис. 6б). Затем из кольцевых структур в липидных бислоях начинали возникать крупные флуктуирующие поры диаметром от 50 до 200 нм (рис. 6в), глубина которых

составляла 3,5–5 нм (рис. 6г), что отвечает толщине бислоя. На основании этих данных был предложен следующий механизм выхода МНТ из эндосом. При закислении содержимого эндосом модуль ДТокс в составе МНТ изменяет конформацию и встраивается в липидный бислой. Модуль НМР приводит к олигомеризации МНТ с образованием кольцевых структур, что повышает локальную концентрацию ДТокс в липидном бислое. Это, в свою очередь, вызывает образование крупных пор, через которые не связавшиеся с мембраной молекулы МНТ могут выходить из эндосом; благодаря возникшим порам происходит также увеличение pH внутри эндосом. При таком механизме часть молекул МНТ расходуется на связывание с липидной мембраной и в цитозоль не попадает. Можно предположить, что при отщеплении антителоподобной молекулы от МНТ в эндосомах, все эти молекулы будут выходить из эндосом в цитозоль и потерь за счет связывания с мембраной у них не будет. Иными словами, можно ожидать, что такое отщепление не только приведет к увеличению сродства антителоподобных молекул к белкам-мишеням, но и позволит увеличить эффективность их выхода из эндосом.

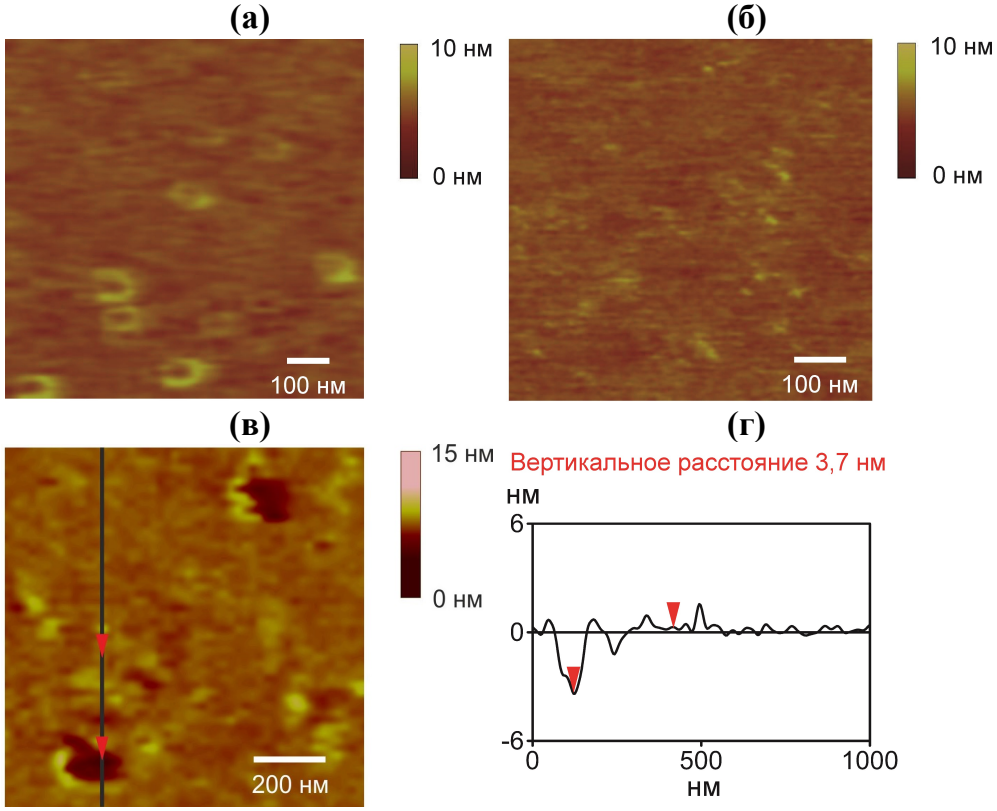


**Рисунок 6. Типичные изображения АСМ, полученные в режиме прерывистого контакта для МНТ-ЭФР (а) и ДТокс (б), а также в контактном режиме для МНТ-ЭФР (в) в бислое, состоящем из яичного фосфатидилхолина, на слюде при pH 5,5. (г) Поперечное сечение изображения (в).** Скорость сканирования составляла 2–3 Гц.

В **подразделе 4** изучена **доставка антителоподобных молекул с помощью МНТ к внутриклеточному белку-мишени.** В качестве примера белка-мишени был выбран белок Keap1, который является естественным ингибитором транскрипционного фактора Nrf2, регулирующего экспрессию нескольких сотен генов, отвечающих за антиокислительную защиту и регенеративные процессы. В нормальных условиях практически весь Nrf2 находится в комплексе с Keap1. Нарушение этого комплекса вызванное, например, окислительным стрессом, сопровождается повышением концентрации Nrf2 в цитозоле и ядре, активацией соответствующих генов и наработкой белков, защищающих клетки от окислительного стресса. Нарушить этот комплекс можно также за счет связывания с антителоподобной молекулой, способной взаимодействовать с Keap1 в том же участке, где этот белок связывается с Nrf2. Для этого нами была выбрана антителоподобная молекула – монободи R1 (антиKeap1), способная с высоким сродством взаимодействовать с Keap1. Активация Nrf2 системы таким способом может привести к заметному терапевтическому эффекту при лечении нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и некоторых вирусных заболеваний. Для доставки в клетку антиKeap1 был выбран МНТ следующего состава: антиРЭФР–ДТокс–НМР–антиKeap1, обозначенный $МНТ_м$. МНТ без антиKeap1 обозначен $МНТ_к$. В качестве ЛМ у $МНТ_м$ была выбрана антителоподобная молекула – аффибоди к РЭФР (антиРЭФР), которая не вызывала нежелательных побочных эффектов за счет активации данного рецептора. За счет того, что существенная доля Keap1 находится на поверхности митохондрий, $МНТ_м$ может быть также использован для доставки различных биологически активных молекул к поверхности этих органелл.

Было показано, что антиРЭФР, антиKeap1 и ДТокс в составе $МНТ_м$ и $МНТ_к$ сохраняют свои функциональные свойства. Методом FRET, регистрируемого с помощью визуализации времени жизни флуоресценции (FLIM) было показано взаимодействие $МНТ_м$ с Keap1 в живых клетках AML-12, временно экспрессирующих Keap1 слитый с зеленым флуоресцентным белком hrGFP (рис. 7). FRET в определенных областях клетки наблюдали по уменьшению времени жизни донора, hrGFP, и увеличению стандартного отклонения, $\chi^2$, падения флуоресценции от одноэкспоненциальной зависимости. Причем, достоверное наличие FRET, т.е.

взаимодействия $МНТ_м$ с Keap1, наблюдали уже спустя 15 минут инкубации клеток AML-12 с $МНТ_м$-AF568.

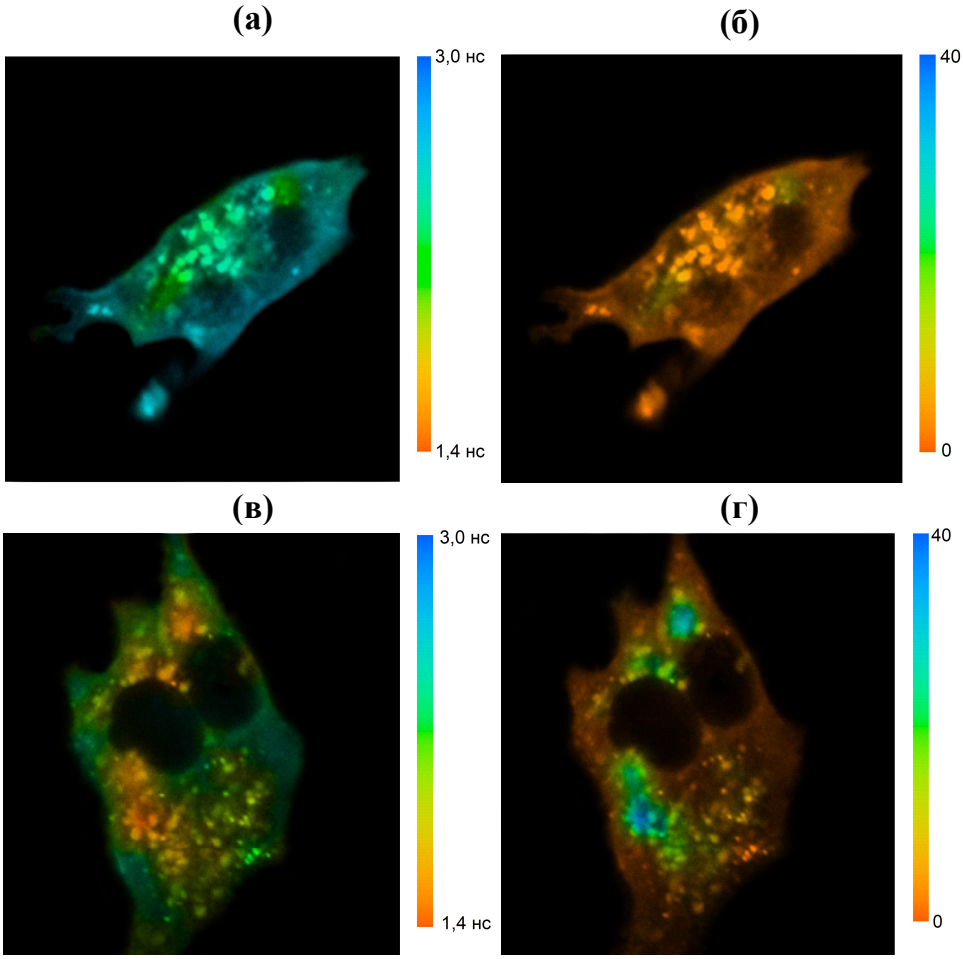


**Рисунок 7. Анализ с помощью метода FLIM-FRET взаимодействия внутриклеточного белка Keap1-hrGFP с $МНТ_м$-AF568 (500 нМ), добавленного к клеткам AML-12, экспрессирующим Keap1-hrGFP.** Распределение среднего времени жизни флуоресценции hrGFP в клетке, к которой не был добавлен $МНТ_м$-AF568 **(а)** и в клетке, которая инкубировалась 1 час с $МНТ_м$-AF568 **(в)**. Распределение стандартного отклонения, $\chi^2$, падения флуоресценции от одноэкспоненциальной зависимости в клетке, к которой не был добавлен $МНТ_м$-AF568 **(б)** и в клетке, которая инкубировалась 1 час с $МНТ_м$-AF568 **(г)**.

Способность $МНТ_м$ взаимодействовать в клетках AML12 с белком Keap1 была показана также с помощью клеточного анализа теплового сдвига (CEllular Thermal Shift Assays, CETSA). Этот метод основан на термостабилизации белков из-за образования ими комплексов с лигандами, что сказывается на кривой плавления этого белка – зависимости доли неагрегированного белка от температуры. С помощью CETSA было показано, что $МНТ_м$, в отличие от $МНТ_к$, способен взаимодействовать с Keap1 в живых клетках AML-12 и ингибирование эндоцитоза при 4 °C предотвращает это взаимодействие (рис. 8а). Связывание $МНТ_м$ с Keap1 приводило к вытеснению

части молекул Nrf2 из комплекса с Keap1 (рис. 8б), что, в свою очередь, вызывало увеличение минимум вдвое общей концентрации Nrf2 в ядре и цитоплазме.

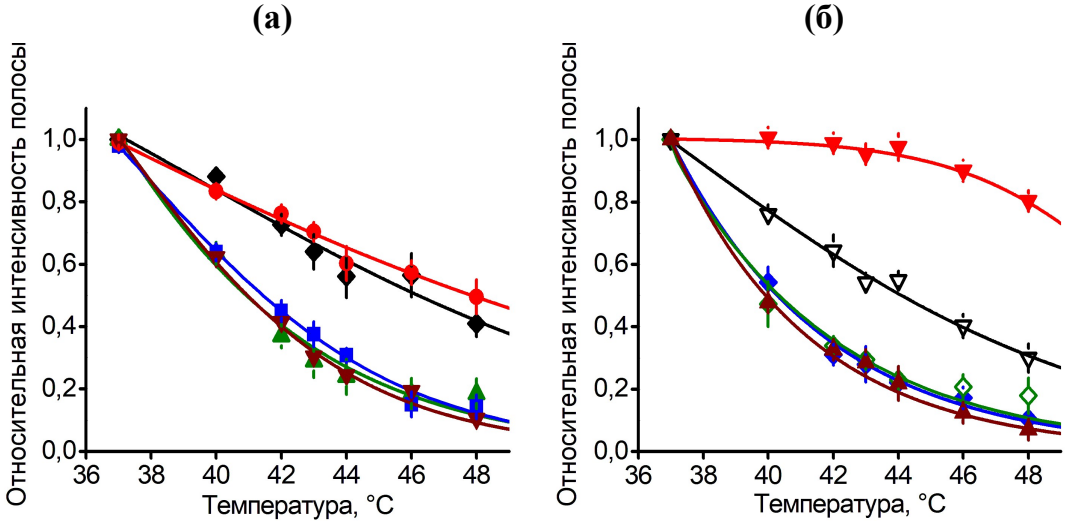


**Рисунок 8. Кривые плавления Keap1 (а) или Nrf2 (б) в комплексе Keap1:Nrf2 (синяя кривая), в комплексе Keap1:МНТ$_м$ или для свободного Nrf2 (красная кривая), после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_м$ (черная кривая) или с 500 нМ МНТ$_к$ (зеленая кривая) или с 500 нМ МНТ$_м$ при 4 °C (коричневая кривая).** Зависимости нормированы на среднюю интенсивность полосы иммуноблоттинга, отвечающей Keap1 или Nrf2 при 37°C. Указаны средние значения ± стандартная ошибка ($n$ = 4–14).

С помощью метода FLIM было показано, что взаимодействие МНТ$_м$ с Keap1 в живых клетках приводило к накоплению этого МНТ в области митохондрий. Поэтому его можно использовать, например, для доставки фотосенсибилизаторов к митохондриальной мембране, что потенциально может вызвать клеточную гибель. И действительно, на клетках A431 мы наблюдали достоверное 8,6-кратное усиление фотоцитотоксического эффекта фотосенсибилизатора хлорина $e_6$, присоединенного к МНТ$_м$, по сравнению со свободным фотосенсибилизатором. Напротив, присоединение этого фотосенсибилизатора к МНТ$_к$ не приводило к достоверному увеличению его фотоцитотоксичности.

Влияние МНТ на вызванный перекисью водорода окислительный стресс в клетках AML-12 изучали с помощью 6-карбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (cDCFH-DA), который в клетке образует флуоресцентный продукт (cDCF) после дезацетилирования и взаимодействия с активными формами кислорода. При определенных временах инкубации клеток с МНТ$_м$ наблюдалась достоверная их защита от действия перекиси водорода, в то время, как МНТ$_к$ не обладал достоверным защитным эффектом (рис. 9).

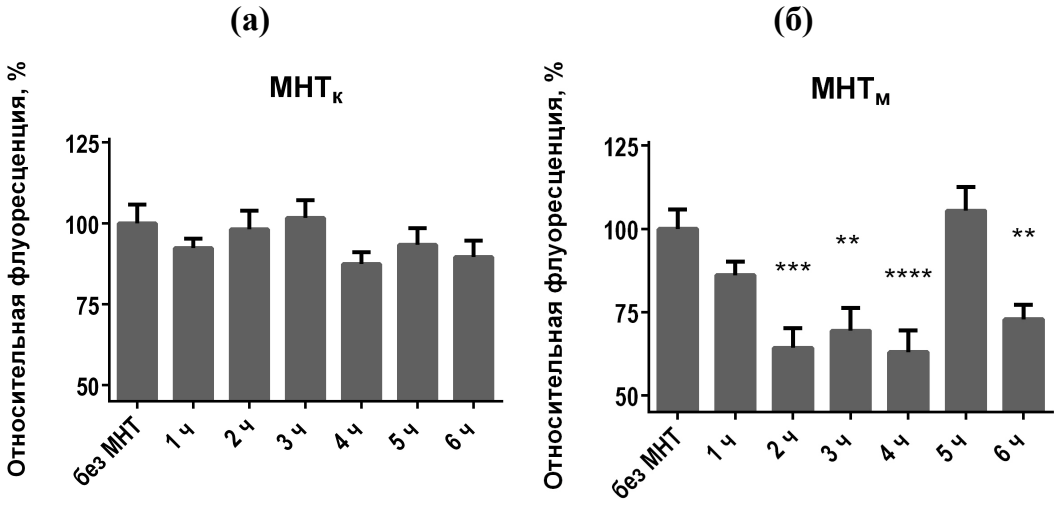


**Рисунок 9. Действие МНТ на образование активных форм кислорода. Влияние 15 минутной предварительной инкубации 500 нМ $МНТ_к$ (а) или 500 нМ $МНТ_м$ (б) на флуоресценцию cDCF от времени после добавления МНТ.** 10 мМ $H_2O_2$ добавлялась за 15 минут до снятия клеток с подложки. Указаны средние значения ± стандартная ошибка ($n$ = 6–18). Достоверность отличия от контроля (без МНТ): ** $p$ < 0,01, *** $p$ < 0,001, **** $p$ < 0,0001.

Защитное действие $МНТ_м$ было также проверено *in vivo*. Для этого использовали хорошо известную мышиную модель окислительного поражения печени, вызванного большими дозами парацетамола. Известно, что высокий уровень парацетамола в печени приводит к появлению *N*-ацетил-р-бензохинонимина , что вызывает окислительный стресс из-за резкого уменьшения уровня глутатиона и последующую гибель гепатоцитов. При данном поражении печени мы наблюдали возрастание уровней сывороточной активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) в 3-5 раз, а веса печени – в 1,5 раза. Внутривенное введение $МНТ_м$ в дозе 0,58 мг (7 нмоль) на мышь за 2 часа до введения парацетамола приводило к достоверному ингибированию роста активности АЛТ и АСТ, а также увеличения веса печени, вызванного парацетамолом. Причем это ингибирование составляло от 25 до 43% от величины эффекта парацетамола. Таким образом, $МНТ_м$ способен приводить к защите печени от цитотоксического действия больших доз парацетамола.

В **подразделе 5** описана **разработка подхода к сравнению эффективности доставки молекул в цитоплазму с помощью разных МНТ.** Для оценки эффективности выхода доставляемых антителоподобных молекул из эндосом автором диссертационной работы был разработан подход, позволяющий оценивать эффективную концентрацию в цитоплазме доставляемых с помощью МНТ молекул.

Под эффективной концентрацией подразумевается концентрация только тех молекул, которые находятся в одном компартменте с белком-мишенью (цитозоле) и сохраняют в условиях клетки способность взаимодействовать с ним. Для этого подхода, разработана математическая модель, в которой предполагается, что образование комплекса доставляемой молекулы и белка-мишени происходит в относительно равновесных условиях. Для Nrf2-системы кроме равновесных констант диссоциации соответствующих комплексов, чтобы оценить искомую концентрацию антителоподобных молекул нужно знать только долю свободного Nrf2, F(Nrf2). Эту долю автор определял при разных температурах по кривым плавления Nrf2, полученным с помощью CETSA, и путем экстраполяции до 37 °C оценивал F(Nrf2) при физиологических температурах. При оценке концентрации изучаемой молекулы все равновесные константы диссоциации были либо взяты из литературных данных, либо измерены автором с помощью метода термофореза. С целью верификации предложенного подхода автором были оценены концентрации Nrf2 и Keap1 в пяти линиях клеток. Показано хорошее соответствие концентраций, полученных с помощью разработанного подхода, и концентраций, известных из литературы. Установлено, что если Nrf2-система в клетке изначально не активирована, то средние концентрации Nrf2 и Keap1 в цитоплазме не зависят от типа клеток и равны 62 ± 5 и 269 ± 4 нМ, соответственно. Еще одна верификация предложенного подхода была проведена путем оценки концентрации $МНТ_м$ в цитоплазме клеток AML-12 двумя разными подходами. В первом случае концентрацию $МНТ_м$ автор оценивал предложенным подходом по кривым плавления Nrf2 (иммуноблоттинг с антителами на Nrf2), а во втором – по данным иммуноблоттинга с антителами на МНТ и с использованием калибровочных зависимостей. Полученные двумя подходами концентрации $МНТ_м$ были: 249 ± 14 и 264 ± 30, 291 ± 12 и 286 ± 21, 373 ± 17 и 420 ± 47 нМ, для 5, 10 и 15 минут инкубации 500 нМ $МНТ_м$ с клетками AML-12. Совпадение в пределах ошибки эксперимента величин, полученных различными подходами, указывает на применимость предложенного автором подхода. В отличие от существующих методов, этот подход позволяет оценить концентрацию доставляемой антителоподобной молекулы в цитозоле вне зависимости от того, находится ли она в составе МНТ или нет. Это позволяет изучить изменение эффективности выхода этих молекул из эндосом при их отщеплении от МНТ.

В **подразделе 6** описана **оптимизация строения МНТ путем отщепления доставляемой молекулы в закисляемых компартментах.** Для повышения эффективности взаимодействия доставляемой антителоподобной молекулы с белком-мишенью, автором настоящей работы было предложено включить в состав МНТ последовательность для отщепления этой молекулы кислыми протеазами, такими как катепсин В. Им была подобрана последовательность (FKFL) с наибольшей скоростью отщепления, которая при pH эндосом (pH 6,0) расщеплялась в 8 раз быстрее, чем при внеклеточном pH (pH 7,5). Было показано, что в составе МНТ ($МНТ_{мр}$) данная последовательность была доступна для действия протеазы. С помощью метода термофореза автором было показано, что при отщеплении монободи к Keap1 от $МНТ_{мр}$ равновесная константа диссоциации его комплекса с Keap1 уменьшалась с 4,9 ± 1,3 до 0,27 ± 0,05 нМ. Судя по зависимостям F(Nrf2) от времени инкубации (рис. 10), $МНТ_{мр}$ значительно эффективнее вызывал высвобождение Nrf2 из комплекса с Keap1 в клетках, чем $МНТ_{м}$.

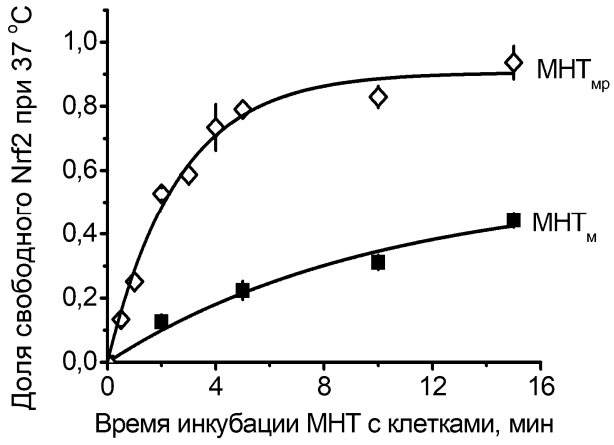


**Рисунок 10. Зависимости доли свободного Nrf2 при 37 °C от времени инкубации МНТ (500 нМ) с клетками AML-12 для монободи в составе $МНТ_{м}$ и $МНТ_{мр}$ с возможностью отщепления монободи к Keap1 в эндосомах.** Показаны средние значения ± стандартная ошибка экспериментальных данных ($n$ = 4–19).

Оцененные с помощью предложенного подхода концентрации антиKeap1 в цитоплазме были: 214,9 ± 1,3 и 251 ± 9 нМ для 2 и 5 минут инкубации $МНТ_{мр}$ с клетками AML12, соответственно. Полученные значения достоверно не отличались от соответствующих значений для $МНТ_{м}$: 195 ± 10 и 240 ± 21 нМ. Иными словами, при отщеплении антителоподобных молекул от МНТ в эндосомах эффективность их выхода в цитозоль существенно не изменяется. Вероятно, это связано с тем, что потери МНТ за счет связывания с мембраной эндосом невелики и согласно приведенной оценке составляют ≤ 10 % от всех молекул МНТ. $МНТ_{мр}$ значительно эффективнее защищал клетки AML12 от действия перекиси водорода, чем $МНТ_{м}$. Так, для $МНТ_{мр}$ защитный эффект наблюдался уже при 5 мин его

инкубации с клетками, в то время, как в этих условиях $МНТ_м$ таким эффектом не обладал.

В **подразделе 7** описаны **МНТ, нацеленные на нуклеокапсидный белок (N-белок) вируса SARS-CoV-2.** Идея об отщеплении антителоподобных молекул в эндосомах была применена для МНТ, способного взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Этот белок связывается с вирусной РНК и принимает активное участие в сборке и упаковке вируса, а также участвует в репликации и транскрипции вирусной РНК и задействован в подавлении клеточного иммунитета. Для получения нужного МНТ ($МНТ_{N1}$) в $МНТ_{мр}$ монободи к Keap1 было поменяно на монободи NC2, способное с высоким сродством ($K_d$ = 6,7 нМ) взаимодействовать с N-белком. Показано, что при отщеплении монободи NC2 от $МНТ_{N1}$ константа диссоциации комплекса монободи с N-белком уменьшалась с 116 ± 20 до 10 ± 3 нМ. Взаимодействие $МНТ_{N1}$ с N-белком в живых клетках показано с помощью CETSA. Известно, что в клетках N-белок может вызывать разделение фаз жидкость-жидкость с образованием каплевидных структур, называемых биоконденсатами. Для вирусов они играют очень важную роль, служа так называемыми «вирусными фабриками», которые являются основой для образования вирусных капсидов. Показано, что $МНТ_{N1}$, в отличие от МНТ без монободи NC2, $МНТ_к$, приводил к разрушению этих биоконденсатов (рис. 11).

Длительное воздействие на выбранный вирусный белок возможно за счет его направленной деградации. Для этого в состав $МНТ_{N1}$ была включена последовательность DPETGEYL (Keap1_E3PB), которая способна взаимодействовать с убиквитинлигазой Keap1 с наномолярной аффиностью. Показано, что отщепление монободи NC2 с Keap1_E3PB от полученного $МНТ_{N2}$ в три раза увеличивало его сродство к N-белку. По данным иммуноблоттинга была показана достоверная деградация N-белка, слитого с флуоресцентным белком mRuby3, в клетках, которые инкубировались с $МНТ_{N2}$ (рис. 12). Показано, что данная деградация преимущественно идет по пути автофагии. Оценка концентрации белка N-mRuby3 в клетках A431 и A549, показала, что скорость его деградации одинакова для этих двух линий клеток и составляет 130-160 нМ/мин.

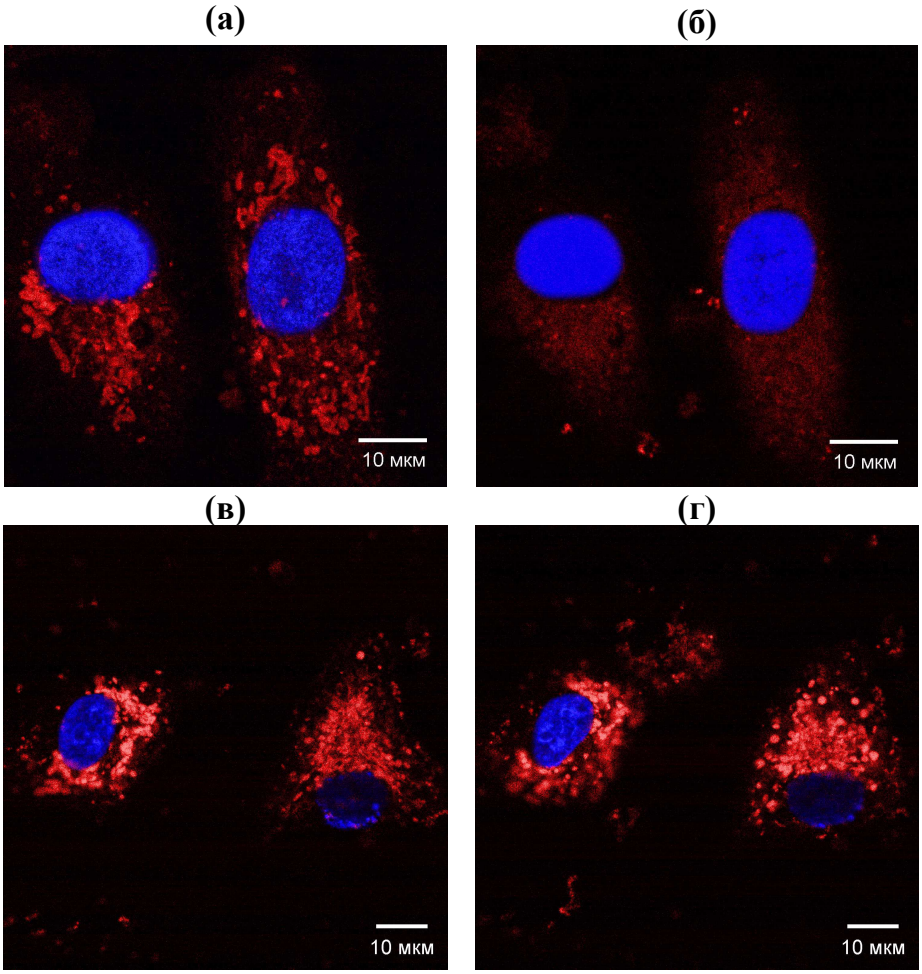


**Рисунок 11. Полученные с помощью конфокальной микроскопии изображения клеток A549, временно экспрессирующих N-белок, слитый с флуоресцентным белком mRuby3, инкубированных с 500 нМ $МНТ_{N1}$ в течение 0 мин (а) и 80 мин (б) или с 500 нМ $МНТ_{к}$ в течение 0 мин (в) и 80 мин (г).** Синим показана прокраска ядер флуоресцентным красителем Hoechst 33342.

Для деградации N-белка в любых типах клеток на основе $МНТ_{N2}$ был получен $МНТ_{S10}$, где лигандный и эндосомолитический модуль были заменены на шатл-пептид S10, состоящий из проникающего в клетку пептида и эндосомолитического пептида. Показано, что в клетках линии Vero при 1 мкМ $МНТ_{S10}$ спустя двое суток наблюдается деградация 80% белка N-mRuby3. Совместно с лабораторией экспериментальной вирусологии НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН (заведующая И.А. Ленева) было показано, что добавление каждые сутки 1 мкМ $МНТ_{S10}$ к инфицированным вирусом SARS-CoV-2 (штамм Wuhan 2019) клеткам Vero на четвертые сутки приводило к ингибированию репродукции вируса в 400 тысяч раз.

Итак, на примере N-белка вируса SARS-CoV-2 было показано, что с помощью модульных молекулярных конструкций можно осуществить не только связывание с

выбранным внутриклеточным белком, но и его направленную деградацию за счет привлечения к нему убиквитинлигазы.

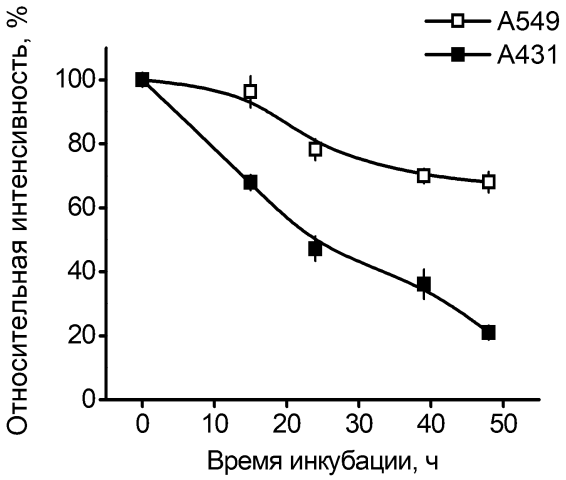


**Рисунок 12. Относительная интенсивность полосы иммуноблоттинга для N-белка в клетках A549 и A431 (за 100% принималась интенсивность полосы иммуноблоттинга для клеток, к которым не добавлялся МНТ) после того, как они инкубировались различные времена с 500 нМ $МНТ_{N2}$.** Данные были нормированы на концентрацию клеток в образце. Показаны средние значения ± стандартная ошибка ($n$ = 7-15).

В **подразделе 8** описаны **способы повышения эффективности доставки МНТ *in vivo*.** Оптимизация строения МНТ проводилась также и для улучшения его накопления в опухолях лабораторных мышей. Проведенные эксперименты по некропсии мышей с привитой меланомой Клаудмана S91 (клон M3) показали, что заметного улучшения накопления МНТ-αМСГ, меченного радиоизотопом $^{111}$In, в опухоли и увеличения времени его циркуляции в крови можно достигнуть присоединением к нему 40 кДа ПЭГ. С помощью метода ОФЭКТ/КТ были получены кинетики накопления меченных $^{111}$In МНТ-αМСГ и МНТ-αМСГ с присоединенным 40 кДа ПЭГ в крови и опухолях мышей (рис. 13). ПЭГ был с возможностью (МНТ-ПЭГ) и без возможности отщепления опухолеспецифичными протеазами (МНТ-$ПЭГ_н$). Для обработки кинетик автор использовал предложенную компартментную математическую модель (рис. 14), в которой также был учтен вклад сигнала от МНТ в кровеносных сосудах опухоли. Оцененные параметры модели представлены в Таблице. Присоединение ПЭГ существенно увеличивало время циркуляции МНТ в кровотоке, что повышало его накопление в опухоли. А введение в МНТ сайта отщепления ПЭГ опухолеспецифичными протеазами приводило к значительной задержке этого МНТ в опухоли.

Автором было показано, что альтернативой присоединению к МНТ ПЭГ является замена модуля ДТокс на эндосомолитический пептид GALA3 (LAEALAEALEALAA). Эта замена приводила к значительному увеличению времени циркуляции МНТ в кровотоке, что, согласно модели (рис. 14), сопровождается

увеличением накопления МНТ в опухоли в четыре раза. Причем, для МНТ, содержащих антителоподобную молекулу к Keap1, эта замена не ухудшала эффективность поступления МНТ в цитозоль клеток AML-12 и не уменьшала защиту клеток от действия перекиси водорода.

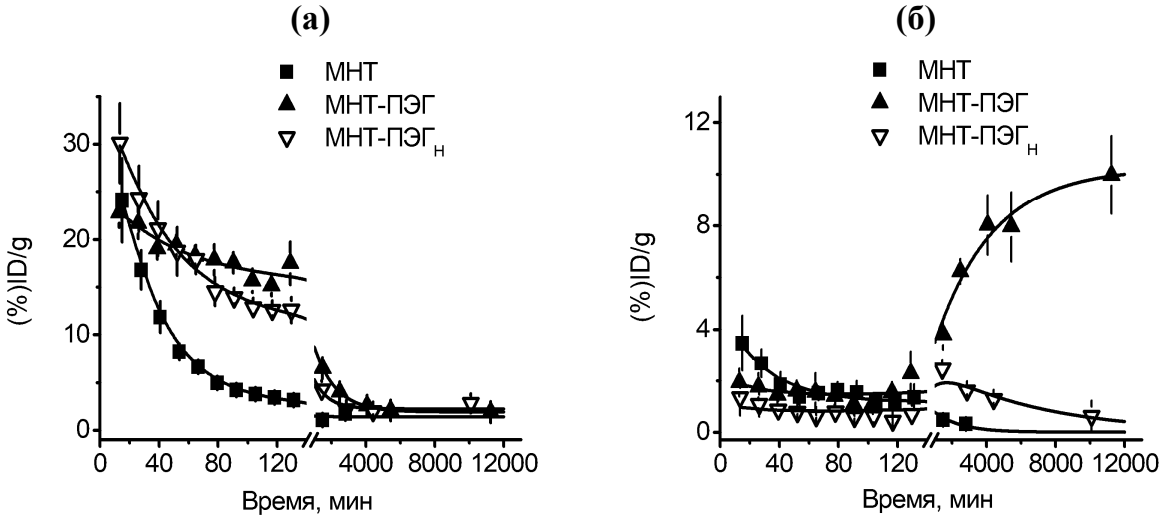


**Рисунок 13. Изменение содержания МНТ, меченного $^{111}$In, в крови (а) и опухоли (б) мышей при внутривенном введении МНТ.** Содержание указано в % от введенной дозы на грамм ткани (%ID/g). Указаны средние значения ± стандартная ошибка ($n$ = 2-3). Линиями показаны результаты интерполяции в соответствии с теоретическими зависимостями. МНТ – МНТ без ПЭГ, МНТ-ПЭГ – МНТ с 40 кДа ПЭГ с возможностью отщепления опухолеспецифическими протеазами и МНТ-ПЭГ$_н$ – МНТ с 40 кДа ПЭГ без возможности его отщепления.

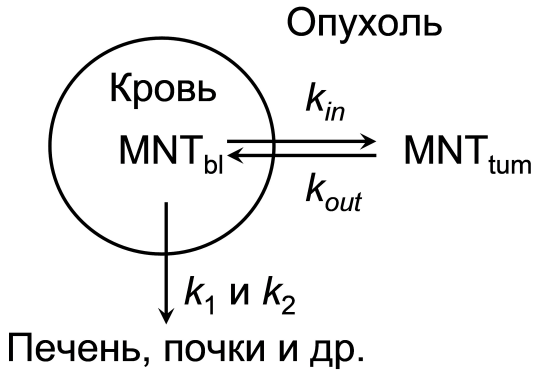


**Рисунок 14. Математическая модель, описывающая накопление МНТ, МНТ-ПЭГ и МНТ-ПЭГ$_н$ в опухолях мышей.** $MNT_{bl}$ – концентрация МНТ в крови; $MNT_{tum}$ – концентрация МНТ в опухоли; $k_1$ и $k_2$ – константы скорости ухода МНТ из крови, а $MNT_{bl01}$ и $MNT_{bl02}$ – концентрации МНТ в крови, отвечающие вкладам каждой из этих компонент; $k_{in}$ и $k_{out}$ – константы скорости входа МНТ в опухоль и выхода из опухоли, соответственно.

Чтобы еще увеличить время циркуляции МНТ в крови в состав МНТ с GALA3 был включен альбуминсвязывающий домен белка G Streptococcus, G148 (АСД), с возможностью его отщепления опухолеспецифичными протеазами. Добавление АСД заметно не сказывалось на способности МНТ связываться с клетками AML-12 и защищать их от действия перекиси водорода, но существенно увеличивало время циркуляции МНТ в крови за счет уменьшения $k_2$ в двадцать раз. Согласно

предложенной модели, ожидаемое накопление МНТ в опухоли при этом увеличится в 11 раз.

**Таблица. Параметры, полученные в результате интерполяции экспериментальных данных в соответствии с теоретическими зависимостями.** Описание параметров дано на Рисунке 14.

| Тип МНТ | Кровь | | | | Опухоль | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $MNT_{bl01}$, (%)ID/g | $MNT_{bl02}$, (%)ID/g | $k_1 \times 10^{-3}$, мин$^{-1}$ | $k_2 \times 10^{-3}$, мин$^{-1}$ | $k_{in} \times 10^{-4}$, мин$^{-1}$ | $k_{out} \times 10^{-4}$, мин$^{-1}$ |
| МНТ | 35,1 ± 1,9 | 1,9 ± 2,5 | 35 ± 4 | 3 ± 10 | 10,1 ± 0,9 | 6,7 ± 2,2 |
| МНТ-ПЭГ | 8,0 ± 1,3 | 15,3 ± 1,2 | 24 ± 12 | 0,80 ± 0,14 | 2,09 ± 0,19 | ≤ 0,15 |
| МНТ-$ПЭГ_н$ | 24,1 ± 1,1 | 10,6 ± 1,0 | 25 ± 3 | 1,2 ± 0,3 | 2,8 ± 0,4 | 1,6 ± 0,6 |

Данные представлены в виде значений оцениваемых параметров ± стандартная ошибка.

Таким образом, предложенные автором замена модуля ДТокс на GALA3, добавление альбуминсвязывающего домена и последовательности для расщепления опухолеспецифичными протеазами вызывают увеличение ожидаемого накопления МНТ в опухоли в 44 раза.

В разделе **Обсуждение результатов** описано, каким образом, оптимизируя строение и число функциональных модулей доставляющих нуклеиновые кислоты или антителоподобные молекулы модульных конструкций, можно достичь эффективного преодоления ими ряда барьеров, как на организменном, так и на клеточном уровне и поступление доставляемых молекул к заданной внутриклеточной мишени. Для полиплексов на основе полиэтиленимина оптимизацию проводили путем варьирования их состава и концентрации. Это позволило повысить вплоть до 100% долю клеток, экспрессирующих нужный белок. Описание экспериментальных данных компартментными математическими моделями позволило выявить, что ключевыми стадиями транспорта полиплексов в клетку, которые определяют эффективность поступления ДНК в клетки, являются стадии проникновения полиплексов в клетку и их распаковки в эндосомах/лизосомах. Для МНТ, используя компартментную математическую модель его накопления в опухоли, равновесную математическую модель его взаимодействия с Keap1 и Nrf2, а также целый ряд биофизических методов были предложены следующие возможные пути увеличения эффективности воздействия МНТ на выбранный внутриклеточный белок: 1) добавление в МНТ сайта отщепления доставляемой молекулы в эндосомах для увеличения ее сродства к белку-

мишени; 2) добавления в МНТ сайта, привлекающего убиквитинлигазу E3, для направленной деградации белка-мишени; 3) присоединение к МНТ ПЭГ с возможностью его отщепления в опухоли для увеличения времени циркуляции МНТ в кровотоке и повышения его накопления в опухоли; 4) замена ЭМ с ДТокс на GALA3 для увеличения времени циркуляции МНТ в кровотоке; 5) добавление альбумин-связывающего домена с возможностью его отщепления от МНТ в опухоли для существенного увеличения времени циркуляции МНТ в кровотоке. Таким образом, в диссертации были предложены способы оптимизации строения молекулярных конструкций, позволяющие улучшить эффективность их транспорта в заданные ткань организма и компартмент клетки, что позволило получить эффективный инструмент воздействия на выбранную внутриклеточную мишень.

## Выводы

1. Анализ полученных экспериментальных данных с помощью компартментных математических моделей установил, что основными стадиями процесса транспорта полиплексов на основе полиэтиленимина, определяющими общую эффективность доставки в ядра клеток плазмидной ДНК, являются стадии проникновения полиплексов в клетку и их распаковки в закисляемых компартментах.
2. Показано, что варьирование состава полиплексов (соотношений азот полиэтиленимин/фосфат ДНК и полиэтиленгликоль/полиэтиленимин) и их концентрации позволяет повысить эффективность трансфекции клеток доставляемым полиплексами генетическим материалом вплоть до 100%.
3. Установлено, что МНТ, содержащий антителоподобную молекулу к Keap1, взаимодействует с этим белком в живых клетках, локализуется в области митохондрий и приводит к защите клеток от окислительного стресса как *in vitro*, так и *in vivo*.
4. Установлено, что МНТ, содержащий антителоподобную молекулу к N-белку вируса SARS-CoV-2, взаимодействует с этим белком в живых клетках и вызывает разрушение образуемых N-белком биоконденсатов.
5. С помощью разработанного подхода для оценки эффективной концентрации доставляемых молекул в цитозоле показано, что отщепление от МНТ антителоподобных молекул в закисляемых компартментах в несколько раз

увеличивает их связывание с молекулами внутриклеточного белка-мишени, но не сказывается на эффективности их поступления в цитозоль.

6. Показано, что МНТ, содержащий аминокислотную последовательность, привлекающую убиквитинлигазу E3, и антителоподобную молекулу к N-белку вируса SARS-CoV-2, вызывает деградацию этого белка и в 400 тысяч раз подавляет репродукцию данного вируса в клетках.
7. Проведенный с помощью компартментной модели анализ полученных данных биораспределений МНТ в организмах мышей установил, что значительного увеличения накопления МНТ в опухоли можно достичь заменой транслокационного домена дифтерийного токсина на эндосомолитический пептид GALA3, введением сайта расщепления опухолеспецифичными протеазами, а также добавлением аминокислотной последовательности, способной взаимодействовать с альбумином.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общим итогом проведенной работы явилось создание эффективных и универсальных средств, позволяющих синтезировать нужный белок в клетках, связываться с этим белком или вызывать его направленную деградацию. Наилучшая эффективность этих средств, представляющих собой модульные молекулярные конструкции, была получена с помощью варьирования их строения и числа функциональных модулей. Путем воздействия на основные этапы, ограничивающие транспорт генетического материала в клетки, были получены молекулярные конструкции, позволяющие добиться синтеза нужного белка в 100% обрабатываемых клеток. На примере белков Keap1 и N-белка вируса SARS-CoV-2 было показано, что выбором антителоподобной молекулы в составе модульных молекулярных конструкций можно добиться избирательного связывания этих конструкций с любым выбранным внутриклеточным белком и вызвать желаемые клеточные эффекты. Установлены компоненты этих конструкций, замена или добавление которых способны как улучшить их связывание с цитозольными белками-мишенями, так и увеличить время циркуляции этих конструкций в крови, что приводит к лучшему их накоплению в нужной ткани. Предложены модульные молекулярные конструкции,

которые за счет привлечения убиквитинлигазы позволяют осуществлять направленную деградацию любого выбранного внутриклеточного белка.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки)** (приведен импакт-фактор журнала; объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах)**:**

1. Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., Sergienko O.V., **Khramtsov Y.V.**, Timofeyev K.N., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters // Cancer Research. – 2006. – Vol. 66. – № 21. – Pp. 10534-10540. EDN: LJRATX. Импакт-фактор 16,6 (JIF); 1,2/0,15 п.л.
2. **Khramtsov Y.V.**, Rokitskaya T.I., Rosenkranz A.A., Trusov G.A., Gnuchev N.V., Antonenko Y.N., Sobolev A.S. Modular drug transporters with diphtheria toxin translocation domain form edged holes in lipid membranes // Journal of Controlled Release. – 2008. – Vol. 128. – № 3. – Pp. 241-247. EDN: LLDYYB. Импакт-фактор 11,5 (JIF); 1,3/0,7 п.л.
3. Rosenkranz A.A., **Khramtsov Y.V.**, Trusov G.A., Gnuchev N.V., Sobolev A.S. A study of pore formation in lipid bilayers by modular nanotransporters containing the diphtheria toxin translocation domain // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2008. – Vol. 421. – № 1. – Pp. 244-246. EDN: RHNLAB. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,12 п.л. [Розенкранц А.А., **Храмцов Ю.В.**, Трусов Г.А., Гнучев Н.В., Соболев А.С. Исследование механизма образования пор в липидных бислоях модульными нанотранспортерами, содержащими транслокационный домен дифтерийного токсина // Доклады Академии Наук. – 2008. – Т. 421. – № 6. – С. 835–837. EDN: JJWIJR. 0,3/0,12 п.л.]
4. Ulasov A.V., **Khramtsov Y.V.**, Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy // Molecular Therapy. – 2011. – Vol. 19. – № 1. – Pp. 103-112. EDN: OAPFEV. Импакт-фактор 12 (JIF); 1,7/0,5 п.л.

5. Trusov G.A., Ulasov A.V., Beletskaia E.A., **Khramtsov Y.V.**, Durymanov M.O., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Investigation of transport and unpacking mechanisms of polyplexes for transfection efficacy on different cell lines // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2011. – Vol. 437. – № 1. – Pp. 77-79. EDN: OHVTYJ. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,08 п.л. [Трусов Г.А., Уласов А.В., Белецкая Е.А., **Храмцов Ю.В.**, Дурыманов М.О., Розенкранц А.А., Свердлов Е.Д., Соболев А.С. Исследование влияния механизмов транспорта и распаковки полиплексов на эффективность трансфекции различных клеточных линий // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т. 437. – № 2. – С. 266–268. EDN: NEGEEX. 0,3/0,08 п.л.]
6. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Schiffelers R.M., Lupanova T.N., **Khramtsov Y.V.**, Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Modular nanotransporters: a multipurpose in vivo working platform for targeted drug delivery // International Journal of Nanomedicine. – 2012. – Vol. 7. – Pp. 467-482. EDN: PDJIVN. Импакт-фактор 6,5 (JIF); 2,2/0,3 п.л.
7. Durymanov M.O., Beletkaia E.A., Ulasov A.V., **Khramtsov Y.V.**, Trusov G.A., Rodichenko N.S., Slastnikova T.A., Vinogradova T.V., Uspenskaya N.Y., Kopantsev E.P., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Subcellular trafficking and transfection efficacy of polyethylenimine-polyethylene glycol polyplex nanoparticles with a ligand to melanocortin receptor-1 // Journal of Controlled Release. – 2012. – Vol. 163. – № 2. – Pp. 211-219. EDN: RGHSQP. Импакт-фактор 11,5 (JIF); 1,4/0,2 п.л.
8. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Kuzmich A.I., **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34. – № 38. – Pp. 10209-10216. EDN: SKUWOP. Импакт-фактор 12,9 (JIF); 1,4/0,2 п.л.
9. Розенкранц А.А., Уласов А.В., Сластникова Т.А., **Храмцов Ю.В.**, Соболев А.С. Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки // Биохимия. – 2014. – Т. 79. – № 9. – С. 1148–1168. EDN: SNQWSH. Импакт-фактор 1,859 (РИНЦ); 2,7/0,4 п.л.

10. Durymanov M.O., Yarutkin A.V., **Khramtsov Y.V.**, Rosenkranz A.A., Sobolev A.S. Live imaging of transgene expression in Cloudman S91 melanoma cells after polyplex-mediated gene delivery // Journal of Controlled Release. – 2015. – Vol. 215. – Pp. 73-81. EDN: UFHWDH. Импакт-фактор 11,5 (JIF); 1,3/0,15 п.л.
11. **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Tsvetkova A.D., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Characterization of new modular nanotransporters with albumin-binding domain // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 472. – № 1. – Pp. 81-83. EDN: QYZOTN. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,2 п.л. [**Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Цветкова А.Д., Розенкранц А.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Характеристика новых модульных нанотранспортеров, содержащих альбуминсвязывающий домен // Доклады Академии Наук. – 2017. – Т. 472. – № 6. – С. 730–732. EDN: YIVXCV. 0,3/0,2 п.л.]
12. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., **Khramtsov Y.V.**, Karyagina T.S., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Antitumor efficacy of Auger electron emitter $^{111}$In delivered by modular nanotransporter into the nuclei of cells with folate receptor overexpression // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 473. – № 1. – Pp. 85-87. EDN: XNDBYR. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,05 п.л. [Розенкранц А.А, Сластникова Т.А., **Храмцов Ю.В.**, Карягина Т.С., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Противоопухолевая эффективность эмиттера электронов Оже $^{111}$In, доставляемого модульным нанотранспортером в ядра клеток с повышенной экспрессией фолатного рецептора // Доклады Академии Наук. – 2017. – Т. 473. № 1. С. 98–100. EDN: YIVXLH. 0,3/0,05 п.л.]
13. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., **Khramtsov Y.V.**, Karyagina T.S., Ovechko S.A., Sobolev A.S. Development and evaluation of a new modular nanotransporter for drug delivery into nuclei of pathological cells expressing folate receptors // Drug Design, Development and Therapy. – 2017. – Vol. 11. – Pp. 1315-1334. EDN: XNCCJS. Импакт-фактор 5,1 (JIF); 2,6/0,3 п.л.
14. **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Study of biodistribution of the modular nanotransporters after systemic administration in murine Cloudman S91 melanoma model // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2018. – Vol. 478. – № 1. – Pp. 55-57. EDN: UXTZZC. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,2 п.л. [**Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Розенкранц А.А., Георгиев Г.П.,

Соболев А.С. Исследование распределения модульных нанотранспортеров после внутривенного введения мышам с привитой меланомой Клаудмана S91 // Доклады Академии Наук. – 2018. – Т. 478. – № 6. – С. 720–722. EDN: YSJIHE. 0,3/0,2 п.л.]

15. Ulasov A.V., **Khramtsov Y.V.**, Lupanova T.N., Tsvetkova A.D., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. MNT optimization for intracellular delivery of antibody fragments // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2018. – Vol. 479. – № 1. – Pp. 62-65. EDN: XXEPJJ. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,05 п.л. [Уласов А.В., **Храмцов Ю.В.**, Лупанова Т.Н., Цветкова А.Д., Розенкранц А.А., Сластникова Т.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Оптимизация модульных нанотранспортеров для внутриклеточной доставки фрагментов антител // Доклады Академии Наук. – 2018. – Т. 479. – № 1. – С. 92–95. EDN: YSJGOW. 0,3/0,05 п.л.]
16. Kamaletdinova T.R., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., **Khramtsov Y.V.**, Tsvetkova A.D., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Modular nanotransporters with P21 fragment inhibits DNA repair after bleomycin treatment // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2018. – Vol. 479. – № 1. – Pp. 95-97. EDN: XXWYCT. Импакт-фактор 0,223 (SJR); 0,3/0,05 п.л. [Камалетдинова Т.Р., Розенкранц А.А., Уласов А.В., **Храмцов Ю.В.**, Цветкова А.Д., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Модульный нанотранспортер с фрагментом белка p21 тормозит репарацию повреждений ДНК, вызванных блеомицином // Доклады Академии Наук. – 2018. – Т. 479. – № 4. – С. 456–459. EDN: YWMUSC. 0,3/0,05 п.л.]
17. Rosenkranz A. A., Slastnikova T.A., Karmakova T.A., Vorontsova M.S., Morozova N.B., Petriev V. M., Abrosimov A.S., **Khramtsov Y.V.**, Lupanova T.N., Ulasov A.V., Yakubovskaya R.I., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Antitumor activity of Auger electron emitter $^{111}$In delivered by modular nanotransporter for treatment of bladder cancer with EGFR overexpression // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – Vol. 9. – P. 1331. EDN: MBAVIQ. Импакт-фактор 4,8 (JIF); 2,5/0,25 п.л.
18. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Розенкранц А.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Стабилизация модульных нанотранспортеров путем встраивания в них гемина в модифицированном штамме-продуценте с рецептором гема // Доклады

Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 490. – № 1. – С. 59-61. EDN: DYCSRQ. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.

19. Karyagina T.S., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Lupanova T.N., **Khramtsov Y.V.**, Georgiev G.P., Sobolev A.S. Targeted delivery of $^{111}$In into the nuclei of EGFR overexpressing cells via modular nanotransporters with anti-EGFR affibody // Frontiers in Pharmacology. – 2020. – Vol. 11. – P. 176. EDN: JJSMVC. Импакт-фактор 4,8 (JIF); 2,5/0,25 п.л.
20. Карягина Т.С., Уласов А.В., Розенкранц А.А., Сластникова Т.А., **Храмцов Ю.В.**, Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Новые рекомбинантные носители, специфически связывающиеся с рецептором эпидермального фактора роста // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2020. – Т. 490. – № 1. – С. 31-34. EDN: GBUPWF. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,04 п.л.
21. **Khramtsov Y.V.**, Vlasova A.D., Vlasov A.V., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Ryzhykau Y.L., Kuklin A.I., Orekhov A.S., Eydlin I.B., Georgiev G.P., Gordeliy V.I., Sobolev A.S. Low-resolution structures of modular nanotransporters shed light on their functional activity // Acta Crystallographica Section D: Structural Biology. – 2020. – Vol. 76. – № 12. – Pp. 1270-1279. EDN: NWMHXK. Импакт-фактор 1,82 (SJR); 1,0/0,3 п.л.
22. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Среди антителоподобных молекул, монободи, способных взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV, есть монободи с высоким сродством к нуклеокапсидному белку вируса SARS-CoV-2 // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 503. – № 1. – С. 189-191. EDN: GPHOHJ. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.
23. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Доставка антителоподобных молекул, монободи, способных связываться с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2, в клетки-мишени // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 506. – № 1. – С. 383-386. EDN: IVHGPM. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.
24. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., **Khramtsov Y.V.**, Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Mouse syngeneic melanoma model with human

epidermal growth factor receptor expression // Pharmaceutics. – 2022. – Vol. 14. – № 11. – P. 2448. EDN: ZTXGNJ. Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1,3/0,2 п.л.

25. Лупанова Т.Н., Уласов А.В., **Храмцов Ю.В.**, Розенкранц А.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Внутриклеточная доставка антителоподобной молекулы, способной ингибировать c-Myc // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2023. – Т. 509. – № 1. – С. 202-204. EDN: LZEHSX. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,05 п.л.
26. **Храмцов Ю.В.**, Георгиев Г.П., Соболев А.С. Выбор аминокислотного сайта с одной из самых быстрых кинетик расщепления эндосомной протеазой катепсином B для потенциального применения в системах доставки лекарств // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2023. – Т. 509. – № 1. – С. 211-214. EDN: NBOJNC. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,25 п.л.
27. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Модульные нанотранспортеры, способные связываться в клетках-мишенях с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2 // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2023. – Т. 510. – № 1. – С. 259-262. EDN: QHSOXH. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.
28. **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. An approach to evaluate the effective cytoplasmic concentration of bioactive agents interacting with a selected intracellular target protein // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 324. EDN: HIXSXG. Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1,3/1,1 п.л.
29. **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Modular nanotransporters delivering biologically active molecules to the surface of mitochondria // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 12. – P. 2687. EDN: MRZCWT. Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1,4/0,9 п.л.
30. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Количественное описание деградации N-белка вируса SARS-CoV-2 в клетках, стабильно его экспрессирующих, под действием новых модульных нанотранспортеров // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2024. – Т. 515. – № 1. – С. 25-28. EDN: WFRQEA. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.

31. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Модульные нанотранспортеры, способные вызывать внутриклеточную деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2 в клетках A549 с временной экспрессией этого белка, слитого с флуоресцентным белком mRuby3 // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2024. – Т. 515. – № 1. – С. 45-48. EDN: WFGUMP. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.
32. **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Lupanova T.N., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Bunin E.S., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Intracellular degradation of SARS-CoV-2 N-protein caused by modular nanotransporters containing anti-N-protein monobody and a sequence that recruits the Keap1 E3 ligase // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16. – № 1. – P. 4. EDN: KVRYLQ. Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1,3/0,9 п.л.
33. Alieva R.T., Ulasov A.V., **Khramtsov Y.V.**, Slastnikova T.A., Lupanova T.N., Gribova M.A., Georgiev G.P., Rosenkranz A.A. Optimization of a modular nanotransporters design for targeted intracellular delivery of photosensitizer // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16. – № 8. – P. 1083. EDN: GKPGSD. Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1,2/0,2 п.л.
34. **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Modular nanotransporters deliver anti-Keap1 monobody into mouse hepatocytes, thereby inhibiting production of reactive oxygen species // Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 16. – № 10. – P. 1345. EDN: OLAFHT. Импакт-фактор 5,5 (JIF); 1,3/0,8 п.л.
35. **Храмцов Ю.В.**, Бунин Е.С., Уласов А.В., Лупанова Т.Н., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Модульные нанотранспортеры, содержащие GALA3, способны осуществлять доставку монободи к Keap1 в клетки-мишени и ингибировать образование в клетках активных форм кислорода // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2025. – Т. 520. – № 1. – С. 159-163. EDN: SVXDCS. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.
36. **Храмцов Ю.В.**, Лупанова Т.Н., Розенкранц А.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Оптимизация эффективности трансфекции клеток A549 плазмидой, кодирующей N-белок вируса SARS-CoV-2 // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2025. – Т. 521. – № 1. – С. 204-207. EDN: XNECNC. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.

37. **Храмцов Ю.В.**, Уласов А.В., Сластникова Т.А., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Увеличение накопления модульных нанотранспортеров в опухолях мышей путем присоединения к этим нанотранспортерам полиэтиленгликоля с возможностью его отщепления в опухоли // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2025. – Т. 521. – № 1. – С. 214-218. EDN: DTKPYH. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,2 п.л.
38. **Храмцов Ю.В.**, Розенкранц А.А., Уласов А.В., Сластникова Т.А., Лупанова Т.Н., Алиева Р.Т., Георгиев Г.П., Соболев А.С. Модульные нанотранспортеры, содержащие монободи к Keap1, способны уменьшать токсическое действие парацетамола на печень мышей // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. – 2025. – Т. 521. – № 1. – С. 225-228. EDN: QDNAQK. Импакт-фактор 0,462 (РИНЦ); 0,3/0,15 п.л.

**Иные публикации:**

1. Rosenkranz A.A., **Khramtsov Y.V.**, Ulasov A.V., Rodichenko N., Sobolev A.S. Intracellular Transport and Unpacking of Polyplex Nanoparticles // Handbook of Clinical Nanomedicine. Vol. 2. Law, Business, Regulation, Safety, and Risk. Raj Bawa, Gerald F. Audette, Brian E. Reese (Eds.). Singapore: Pan Stanford Publishing, 2016. – Pp. 823-843. EDN: YVEGDL. Импакт-фактор отсутствует, индексируется в WoS; 1,0/0,3 п.л.