ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

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

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН, доктор биологических наук,
профессор А.С. Соболев

Москва – 2026

Оглавление

Список сокращений 5
1. **Введение** 8
Основная часть 22
2. **Обзор литературы** 22
2.1. Специфическая и неспецифическая доставка локально действующих веществ в заданный компартмент клеток 22
2.2. Использование рецептора эпидермального фактора роста для направленной доставки локально действующих веществ 29
2.3. Возможные механизмы выхода молекул из эндосом при их внутриклеточной доставке 39
2.3.1. Выход из эндосом с помощью эффекта протонной губки 39
2.3.2. Выход из эндосом липидных наночастиц 41
2.3.3. Выход из эндосом путем дестабилизации мембран 42
2.3.4. Выход из эндосом токсинов 44
2.4. Компартментные модели транспорта молекул 48
3. **Материалы и методы исследования** 56
3.1. Культуры клеток 56
3.2. Синтез блок-сополимеров на основе полиэтиленимина (ПЭИ) и полиэтиленгликоля (ПЭГ) 56
3.3. Получение полиплексов 57
3.4. Исследование размеров и электрофоретической подвижности полиплексов с помощью динамического светорассеяния 58
3.5. Изучение размеров полиплексов с помощью атомно-силовой микроскопии 59
3.6. Трансфекция клеток полиплексами 61
3.7. Изучение внутриклеточного транспорта и распаковки полиплексов 61
3.8. Получение модульных нанотранспортеров (МНТ) 63
3.9. Атомно-силовая микроскопия МНТ 65
3.10. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) МНТ 66
3.11. Малоугловое рентгеновское рассеяние (МРР) МНТ 66
3.12. Атомно-силовая микроскопия МНТ в липидном бислое 67
3.13. Характеристика проводимости плоских липидных мембран (ПЛМ) при добавлении МНТ при различных pH 68
3.14. Изучение мембранолитической активности МНТ на липосомах 69
3.15. Выделение и очистка α и β-импортинов 70
3.16. Изучение взаимодействия между молекулами методом термофореза 72
3.16.1. Изучение взаимодействия МНТ с гетеродимером импортинов 72
3.16.2. Изучение взаимодействия МНТ с белком Keap1 72
3.17. Изучение взаимодействия МНТ с Keap1 с помощью FLIM-FRET 73
3.18. Изучение фототоксичности МНТ с фотосенсибилизаторами (ФС) 74

3.19. Изучение активации Nrf2-системы с помощью МНТ по данным иммунофлуоресценции 75
3.20. Оценка объема клеток и их ядер 76
3.21. Изучение взаимодействия между белками с помощью клеточного анализа теплового сдвига (CETSA) 77
3.22. Изучение кинетики расщепления пептидов катепсином B 78
3.23. Определение активных форм кислорода в клетке 79
3.24. Постановка экспериментов по аутопсии мышей 80
3.25. Изучение биораспределения МНТ с помощью ОФЭКТ/КТ 81
3.26. Определение времени циркуляции МНТ в крови 82
4. **Результаты** 83
4.1. Полиплексы – транспортные молекулярные конструкции для доставки нуклеиновых кислот в клетки 83
4.1.1. Корреляция характеристик полиплексов с эффективностью трансфекции 83
4.1.2. Компартментная модель проникновения полиплексов в клетку 91
4.2. Модульные нанотранспортеры (МНТ) и их строение 103
4.3. Изучение дефектов, которые образуются в липидном бислое на слюде под действием МНТ 114
4.4. Доставка антителоподобных молекул с помощью МНТ к внутриклеточному белку-мишени 121
4.4.1. Взаимодействие МНТ с выбранным внутриклеточным белком-мишенью 121
4.4.2. Доставка молекул к митохондриям с помощью МНТ 133
4.4.3. Активация Nrf2-системы с помощью МНТ 136
4.5. Разработка подхода к сравнению эффективности доставки молекул в цитоплазму с помощью разных МНТ 142
4.5.1. Модель для бинарных взаимодействий 142
4.5.2. Модель тройных конкурентных систем 143
4.5.3. Модель для Nrf2 системы 145
4.5.4. Оценка концентраций Nrf2 и Keap1 предложенным подходом 147
4.5.5. Оценка концентрации МНТ предложенным подходом 152
4.6. Оптимизация строения МНТ путем отщепления доставляемой молекулы в закисляемых компартментах 155
4.7. МНТ, нацеленные на нуклеокапсидный белок (N-белок) вируса SARS-CoV-2 167
4.7.1. МНТ, способные взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2 167
4.7.2. МНТ, способные вызывать деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2 175
4.7.3. МНТ, способные вызывать деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2 независимо от типа клеток 184
4.8. Способы повышения эффективности доставки МНТ *in vivo* 190
4.8.1. Подходы к увеличению накопления МНТ в опухоли 190
4.8.2. Математическая модель, описывающая накопление МНТ в опухоли 194
4.8.3. Замена эндосомолитического модуля МНТ 200

4.8.4. МНТ, способные связываться с альбумином 206
5. **Обсуждение результатов** 213
6. **Выводы** 241
Заключение 243
Благодарности 282

Список сокращений

АЛТ – аланинаминотрансфераза

антиРЭФР – антителоподобная молекула – аффибоди – к рецептору эпидермального фактора роста

антиKeap1 – антителоподобная молекула – монободи R1 – к белку Keap1

АСД – альбуминсвязывающий домен белка G Streptococcus, G148

(АСД)МНТ$_{EGF}$ – модульный нанотранспортер с АСД и эпидермальным фактором роста в качестве лигандного модуля, состав АСД- His tag-uPA site-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР

(АСД)МНТ$_{г}$ – модульный нанотранспортер с АСД, аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля и GALA3, состав АСД- His tag-uPA site-антиРЭФР-GALA3-НМР-FKFL-антиKeap1

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДИ – 95% доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТокс – транслокационный домен дифтерийного токсина

ДТТ – дитиотреитол

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КТ – компьютерная томография

αМСГ – α-меланоцитстимулирующий гормон

миРНК – микроРНК

МНТ – модульный нанотранспортер

МНТ-αМСГ – модульный нанотранспортер с α-меланоцитстимулирующим гормоном в качестве лигандного модуля, состав His tag-ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ

МНТ$_{г}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля, GALA3 в качестве эндосомолитического модуля и возможностью отщепления монободи к Keap1 в эндосомах, состав антиРЭФР-His tag-GALA3-НМР-FKFL-антиKeap1

МНТ$_{гк}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля и GALA3 в качестве эндосомолитического модуля, состав антиРЭФР-His tag-GALA3-НМР

МНТ$_{к}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля, состав антиРЭФР-His tag-ДТокс-НМР

МНТ$_{м}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля, состав антиРЭФР-His tag-ДТокс-НМР-антиKeap1

$МНТ_{мр}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля и возможностью отщепления монободи к Keap1 в эндосомах, состав антиРЭФР-His tag-ДТокс-НМР-FKFL-антиKeap1

МНТ-ПЭГ – МНТ с возможностью отщепления ПЭГ опухолеспецифичными протеазами по сайту LSGRSDNH

$МНТ-ПЭГ_{н}$ – МНТ без возможности отщепления ПЭГ опухолеспецифичными протеазами

$МНТ_{N1}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля и возможностью отщепления монободи NC2 к N-белку вируса SARS-CoV-2 в эндосомах, состав антиРЭФР-His tag-ДТокс-НМР-FKFL-NC2

$МНТ_{N2}$ – модульный нанотранспортер с аффибоди к РЭФР в качестве лигандного модуля и возможностью отщепления монободи NC2 к N-белку вируса SARS-CoV-2 и Keap1_E3BP в эндосомах, состав антиРЭФР-His tag-ДТокс-НМР-FKFL-Keap1_E3BP-NC2

$МНТ_{S10}$ – модульный нанотранспортер с пептидом S10 и возможностью отщепления монободи NC2 к N-белку вируса SARS-CoV-2 и Keap1_E3BP в эндосомах, состав His tag-S10-FKFL-Keap1_E3BP-NC2

МНТ-ЭФР – модульный нанотранспортер с эпидермальным фактором роста в качестве лигандного модуля, состав His tag-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР

МРР – малоугловое рентгеновское рассеяние

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЛМ – плоские липидные мембраны

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭИ – полиэтиленимин

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

РЭФР – рецептор эпидермального фактора роста

СЯЛ – сигнал ядерной локализации

ТАТ – пептид из трансактиватора транскрипции вируса иммунодефицита

$ТЦД_{50}$ – тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая 50% гибель клеток

ФС – фотосенсибилизатор

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭФР – эпидермальный фактор роста

cDCFH-DA – 6-карбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат

cDCF – карбокси-2',7'-дихлорофлуоресцеин

CETSA – cellular thermal shift assays, клеточный анализ теплового сдвига

CPP – cell penetrating peptides, проникающие в клетку пептиды

EC_{50} – эффективная концентрация 50% эффекта

FKFL – сайт расщепления эндосомной протеазой катепсином B

FLIM – Fluorescence lifetime microscopy, флуоресцентрая микроскопия с временным разрешением

Fn-N – антителоподобная молекула, монободи, к N-белку вируса SARS-CoV

FRET – Förster's resonance energy transfer, флуоресцентный резонансный перенос энергии по Фёрстеру

FLIM-FRET – определение флуоресцентного резонансного переноса энергии по Фёрстеру с помощью визуализации времени жизни флуоресценции донора

GALA3 – синтетический эндосомолитический пептид, LAEALAEALEALAA

GFP – зеленый флуоресцентный белок

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

His tag – пептид из шести гистидиновых остатков

HMP – гемоглобиноподобный белок *E.coli*

pLys – поли-L-лизин

IMEM – Improved MEM Zinc Option, улучшенная среда MEM с добавлением цинка

mAb – моноклональные антитела

MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

mRuby3 – красный флуоресцентный белок

NC2 – антителоподобная молекула, монободи, к N-белку вируса SARS-CoV-2

Nrf2 – Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, транскрипционный ядерный фактор эритроидного 2- родственного фактора 2

Keap1 – Kelch-like ECH-associated protein 1, белок 1, ассоциированный с ECH, подобный Kelch

Keap1t – C-концевой фрагмент белка Keap1 (312-624 аминокислотные остатки) с молекулярной массой 38260 г/моль, который ответственен за связывание с Nrf2

Keap1_E3PB – последовательность DPETGEYL, которая способна взаимодействовать с убиквитин-лигазой Keap1

N-белок – нуклеокапсидный белок

S10 – шатл-пептид, включающий в себя CPP и катионный эндосомолитический пептид

SDS – додецилсульфат натрия

QD – квантовая точка

uPA – активатор плазминогена урокиназного типа, опухолеспецифичная протеаза

uPA site – аминокислотная последовательность, способная расщепляться протеазой uPA

1. Введение

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 аффиболи, 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; Obozina et al., 2026; Deyev et al., 2026). 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 (Makarova et al., 2025). 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.

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-(TAT 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 E3, 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 14th 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.

Ряд результатов диссертации нашли отражение в патентах:

1. Российский патент № 2 476 596. 27.02.2013. Многопрофильный промотор, экспрессирующий вектор и способ избирательного убийства раковых клеток с их использованием. Алексеенко И.В., Виноградова Т.В., Демидюк И.В., Костров С.В., Плешкан В.В., Чернов И.П., Митяев М.В., Зиновьева М.В., Георгиев Г.П., Соболев А.С., Розенкранц А.А., Уласов А.В., Кузьмин Д.В., **Храмцов Ю.В.**, Копанцев Е.П., Успенская Н.Я., Костина М.Б., Монастырская Г.С., Свердлов Е.Д.
2. Российский патент № 2 575 077. 10.02.2016. Фармакологическая комбинация поликатионного носителя ПЭГ-ПЭИ-ТАТ с заключенной в нем плазмидой, несущей терапевтические гены HSVtk и GM-CSF для генотерапии опухолевых заболеваний. Алексеенко И.В., Виноградова Т.В., Зиновьева М.В., Копанцев Е.П., Монастырская Г.С., Костина М.Б., Плешкан В.В., Костров С.В., Потапов В.К., Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Успенская Н.Я., Розенкранц А.А., Соболев А.С., Уласов А.В., **Храмцов Ю.В.**, Свердлов Е.Д.

Публикации

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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., and Sobolev A.S. Intracellular Transport and Unpacking of Polyplex Nanoparticles // In: Handbook of Clinical Nanomedicine. R. Bawa, G.F. Audette, B. Reese Eds. Taylor & Francis Group. N-Y. 2016. – Vol. 2. – Pp. 823-843. EDN: YVEGDL. Импакт-фактор отсутствует, индексируется в WoS; 1,0/0,3 п.л.

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.

Личный вклад автора

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.

Основная часть

2. Обзор литературы

2.1. Специфическая и неспецифическая доставка локально действующих веществ в заданный компартмент клеток

Несмотря на все успехи в разработке новых терапевтических подходов, широкий круг социально-значимых заболеваний до сих пор не поддается эффективному лечению. Традиционные терапевтические подходы часто имеют свои ограничения, связанные с узким эффективным диапазоном доз применяемых средств, когда высокие дозы являются токсичными, а низкие – практически не оказывают необходимого воздействия. Однако, все лучшее понимание биологических процессов, лежащих в основе различных заболеваний, открывает новые возможности для их терапии. В этих новых подходах требуется доставка веществ не просто в заданный тип клеток, но и часто в конкретный их компартмент. Особенно это относится к локально действующим веществам, т.е. веществам способным воздействовать на свое ближайшее окружение, ограниченное размером клетки или даже отдельного компартмента этой клетки. Иными словами, данные вещества проявляют свою максимальную эффективность только в нужном клеточном компартменте.

Традиционные лекарственные средства по способам их распределения в клетках и организме можно приблизительно разделить на две группы. В первую группу можно включить преимущественно низкомолекулярные вещества, которые за счет процессов диффузии и конвекции пассивно распределяются в тканях и клетках организма. Для того чтобы они оказались эффективными необходимо достичь определенной их концентрации в месте воздействия, которое часто представлено определенным типом клеток. Во вторую группу можно включить вещества, которые не способны к пассивной диффузии благодаря своим размерам или заряду. Данные вещества оказывают свое воздействие на внутриклеточные процессы либо опосредованно путем взаимодействия с рецепторами на поверхности клеток, либо напрямую, путем высвобождения действующего низкомолекулярного агента после их эндоцитоза внутрь клетки.

Однако данные традиционные вещества, как правило, не способны оказывать прямое специфическое воздействие на множество внутриклеточных регуляторных процессов, происходящих за счет взаимодействий между макромолекулами. Дело в том, что низкомолекулярные вещества хоть и попадают внутрь клетки, но не всегда способны обеспечить нужную степень специфичности для данного взаимодействия. Кроме того, для оказания необходимого воздействия низкомолекулярным веществам нужно связаться в

некотором кармане белка, в то время как многие поверхности, участвующие в белок-белковых взаимодействиях, не имеют выраженных карманов для связывания (Lo et al., 1999; Chen et al., 2013; Spradlin et al., 2021). А вещества, которые активируют или блокируют рецепторы на поверхности клеток, даже обладая высокой специфичностью для этого процесса, влияют, как правило, не на один регуляторный процесс, а на целую сеть этих процессов.

Следует отметить, что при большинстве заболеваний происходит нарушение в клетке взаимодействий между макромолекулами. Поэтому крайне необходимо разработать средства доставки внутрь клетки макромолекул, которые способны повлиять на эти патологические взаимодействия или восполнить недостаток нормальных взаимодействий между регуляторными макромолекулами. Данные средства будут иметь огромное практическое значение, т.к. дают возможность подойти к лечению различных социально-значимых заболеваний, вызванных нарушением регуляторных процессов в заданном типе клеток. В частности, появляется возможность воздействия на злокачественные новообразования путем направленной доставки цитотоксических агентов за счет изменения как числа и типа доступных на поверхности опухолевых клеток рецепторов, так и внутриклеточного транспорта и регуляторных процессов в данных клетках.

Локально действующие вещества, которые проявляют максимальную эффективность только в определенном внутриклеточном компартменте, представляют собой весьма неоднородную группу функциональных молекул (Соболев, 2013). Так, например, к ним можно отнести различные белки или пептиды, способные взаимодействовать с нужными мишенями внутри клетки, а также различные низкомолекулярные вещества, такие как фотосенсибилизаторы и ингибиторы разных внутриклеточных процессов. К ним также относятся различные радиоактивные изотопы, если испускаемые ими частицы имеют малую длину пробега. Такими веществами еще являются используемые для генотерапии нуклеиновые кислоты, включая не только ДНК, но и siRNA, miRNA, shRNA, а также антисмысловые олигонуклеотиды. Для превалирующей части локально действующих веществ пассивный транспорт в клетку малоэффективен, либо сопровождается повышенной токсичностью для нецелевых клеток. Причем часть этих веществ не только наиболее эффективна в определенном клеточном компартменте, но и строго ограничена этим компартментом. Примером могут послужить ДНК-содержащие генотерапевтические препараты, где целевым компартментом является клеточное ядро.

Для доставки генетической информации в клеточное ядро используют как вирусы, так и разнообразные синтетические конструкции (Ibraheem et al., 2014; Alavi et al., 2024; Khan, 2024). Вирусные системы доставки отличаются от синтетических конструкций значительно более высокой эффективностью трансфекции, однако, уступают им по целому ряду позиций. К ним можно отнести высокую иммуногенность вирусных систем и связанную с ней токсичность, возможность возвращения к дикому типу за счет рекомбинации и мутаций, а также довольно ограниченный размер переносимого генетического материала (Alavi et al., 2024; Khan, 2024). Кроме того, клеточная специфичность вирусов может отличаться от необходимой для генетической терапии. Следует также отметить, что генетический материал некоторых используемых для генотерапии вирусов, например, ретровирусов, способен встраиваться в геном клетки-хозяина, что может вызвать активацию онкогенов и образование опухолевых клеток. Поэтому на людях применять вирусные системы доставки довольно опасно, что подтверждается, например, развитием лейкоза в случае генной терапии с использованием ретровируса (Howe et al., 2008) или, например, аутоиммунной реакцией на аденоассоциированную вирусную систему доставки (Manno et al., 2006). Синтетические системы доставки представляют 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). Эффективность доставки генетического материала и время экспрессии доставленной ДНК у синтетических систем доставки обычно ниже, чем у вирусных систем, однако липоплексы и полиплексы, как правило, менее токсичны и практически не иммуногенны, а также не ограничены размерами переносимой ДНК и требуют заметно меньших трудовых и денежных затрат при производстве.

Еще одним примером локально действующих веществ являются антитела или антителомиметики к внутриклеточным белкам-мишеням. Безусловно, существует множество низкомолекулярных веществ, способных самостоятельно проникать в клетки и влиять на нужный белок. Примером этому могут служить низкомолекулярные ингибиторы вирусных белков (De and Li, 2016). Однако не ко всем белкам-мишеням можно подобрать такой ингибитор. Напротив, практически к любому белковому антигену можно получить антитела или антителомиметики (Gebauer and Skerra, 2020; Shipunova and Deyev, 2022; Makarova et al., 2025). Последние являются наиболее подходящими для применения в различных системах доставки, т.к. имеют значительно меньшую молекулярную массу, чем антитела, в то время как практически не уступают антителам по сродству к белкам-мишеням (Tolmachev et al., 2022; Шилова и др., 2024; Obozina et al.,

2026; Deyev et al., 2026). Однако в настоящее время антитела и антителомиметики преимущественно применяются только для поверхностных антигенов (Makarova et al., 2025; Obozina et al., 2026; Deyev et al., 2026), т.к. самостоятельно не могут проникать через клеточные мембраны.

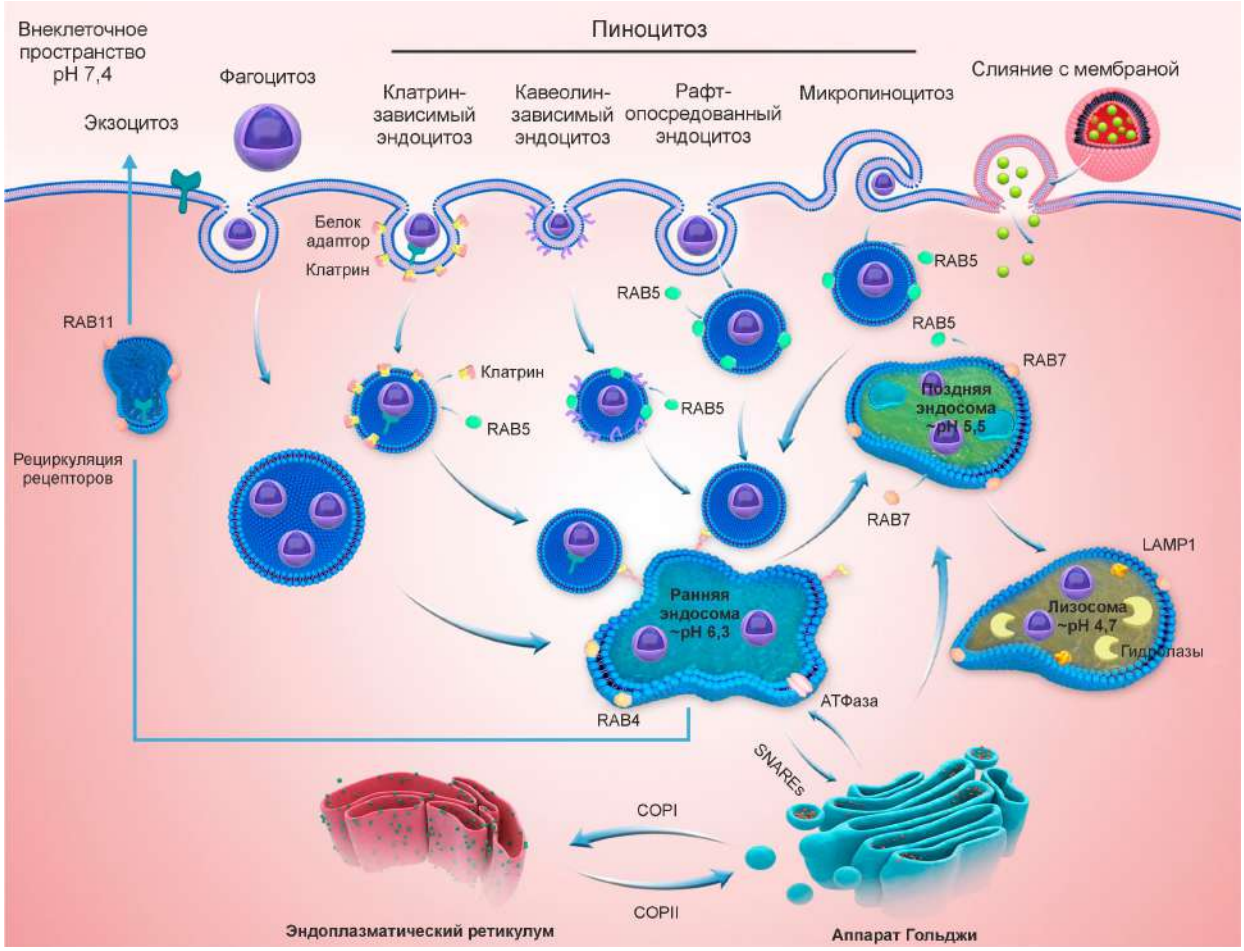


Рисунок 2.1. Пути проникновения в клетку и дальнейшего транспорта различных систем доставки. Выполнено на основании рисунка из (Qiu et al., 2023).

Сама клетка и многие ее части отделены от окружающего пространства липидными мембранами, иными словами, представляют собой замкнутые компартменты. Для попадания локально действующего вещества, неспособного самостоятельно проникать через мембраны, в нужный компартмент клетки ему нужно преодолеть эти мембранные барьеры. Прежде всего, ему нужно, каким-то образом попасть внутрь клетки. Используемые для этого системы доставки в зависимости от их строения могут проникать в клетки путем фагоцитоза, пиноцитоза и непосредственного проникновения через плазматическую мембрану, например, путем слияния с этой мембраной (Рис. 2.1) (Devarajan et al., 2019; Qiu et al., 2023). Фагоцитозом обычно поступают очень крупные частицы, в то время как пиноцитоз отвечает за поступление в клетку относительно небольших веществ. Пиноцитоз в свою очередь подразделяется по типу эндоцитоза на клатрин-зависимый или рецептор-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-зависимый

эндоцитоз, эндоцитоз, опосредованный липидными рафтами и микропиноцитоз (Рис. 2.1). Клатрин-зависимый эндоцитоз вызывается связыванием лигандов с определенными рецепторами и регулируется набором адаптерных белков, таких как клатрин и адаптины. В этом процессе плазматическая мембрана выпячивается внутрь клетки с образованием окаймленных ямок, внутриклеточная сторона которых покрыта пяти и шести угольной сетчатой структурой, образованной клатрином и адаптинами. Далее происходит отшнуровывание вакуолей, открепление клатрина и попадание в ранние, а затем поздние эндосомы (Smith and Smith, 2022). Клатрин-зависимый эндоцитоз является одним из основных путей проникновения различных систем доставки в клетку (Devarajan et al., 2019; Qiu et al., 2023).

Кавеолин-зависимый эндоцитоз (Рис. 2.1) протекает за счет образования колбообразных инвагинаций плазматической мембраны – кавеол (Devarajan et al., 2019; Терпинская, 2021). Кавеолы характеризуются более плотной упаковкой липида и повышенным содержанием холестерина, гликосфинголипидов и сфингомиелина (Sui et al., 2017). В образовании кавеол кроме белков кавеолинов 1, 2 и 3, принимают участие кавины, актин и ряд вспомогательных белков (Matthaeus and Taraska, 2020). Многие наночастицы проникают в клетку путем кавеолин-зависимого эндоцитоза (Qiu et al., 2023). Примером могут послужить магнитные наночастицы, содержащие siRNA к зеленому флуоресцентному белку. Кроме того, этот путь может быть одним из основных путей эндоцитоза комплексов полиэтиленимина с ДНК и поли(амидоамина) с ДНК (Hwang et al., 2015). Следует отметить, что диаметр кавеол составляет 30–80 нм, поэтому слишком большие наночастицы не могут интернализоваться путем кавеолин-зависимого эндоцитоза. Так, например, кремневые наночастицы с антителами на HER2 могут интернализоваться этим путем, если их диаметр 90 нм, и не могут, если имеют диаметр 200 нм (Huang et al., 2016).

Также как и кавеолы, липидные рафты представляют собой небольшие регионы клеточной мембраны, обогащенные белковыми рецепторами, холестерином и сфинголипидами, но еще более упорядоченные и компактные (Devarajan et al., 2019; Qiu et al., 2023). Эндоцитозом, опосредованным липидными рафтами (Рис. 2.1), часто поступают в клетку вирусные частицы за счет связывания с гликопротеином (Teissier and Pecheur, 2007).

Микропиноцитоз (Рис. 2.1) является неспецифическим путем проникновения в клетки водорастворимых молекул (Devarajan et al., 2019; Kauffmann and Evans, 2024). Он включает в себя образование из клеточной мембраны больших, нерегулярных эндоцитозных везикул и позволяет эндоцитироваться крупным наночастицам (250 нм)

(Lim and Gleeson, 2011). Этот процесс зависит от актина и регулируется различными белками, такими как фосфоинозитид-3-киназа и белками семейства Rab. Известно, что микропиноцитоз чувствителен к pH цитоплазмы: так, закисление цитоплазмы приводит к уменьшению скорости этого процесса (Egami, 2016). Поглощение за счет микропиноцитоза ограничено внеклеточной концентрацией вещества, а также не способно обеспечить поступление этого вещества в гиалоплазму. Считается, что с помощью микропиноцитоза могут поступать в клетку некоторые липидные системы доставки нуклеиновых кислот. Так, этот способ считается единственным путем проникновения в клетки протамин-ДНК-катионных липосом (Pozzi et al., 2013).

Системы доставки различных веществ могут поступать в клетку за счет прямого проникновения через плазматическую мембрану, например, путем слияния с этой мембраной (Рис. 2.1). Последний процесс проходит через стадии приближения липидных бислоев друг к другу и прямому их контакту, затем их слиянию, опосредованному белками, и в конечном итоге образования поры. В нем участвуют различные белки, такие как SNAREs (**s**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive factor **a**ttachment protein **re**ceptors), белки Rab и белки, связанные с Sec1/Munc-18 (Fuhrmans et al., 2015). Путем слияния с клеточной мембраной в клетку могут попадать, например, вирусоподобные экзосомы, содержащие доставляемый белок (Yang et al., 2017b). Для прямого проникновения через плазматическую мембрану можно воспользоваться конструкциями, содержащими пептиды, проникающие в клетку (cell penetrating peptides, CPP) (Langel, 2021). Однако исследования показали, что прямое проникновение для этих конструкций малоэффективно, а заметная их доля поступает в клетку за счет неспецифического эндоцитоза с последующим выходом конструкций из эндосом (Richard et al., 2003). Часто именно выход из замкнутых мембранных образований, например, эндосом, и является вторым барьером на пути проникновения локально действующих веществ в нужный клеточный компартмент. Поэтому зачастую вместе с CPP применяют различные мембранолитические пептиды (Ahmad et al., 2019).

Следует отметить, что применение систем доставки, содержащих CPP, неспецифично по отношению к типу клеток. Поэтому для достижения нужного эффекта надо насытить весь организм конструкцией данного типа. Однако в целом ряде случаев это чревато возникновением нежелательных побочных эффектов. Поэтому привлекательной выглядит идея специфической доставки конструкций в заданный тип клеток-мишеней. Для этой доставки можно воспользоваться специфичными или сверхэкспрессированными на данном типе клеток интернализуемыми рецепторами и механизмами дальнейшего внутриклеточного транспорта молекул. Для этого в состав

системы доставки или так называемого транспортера необходимо включить компонент, способный узнавать эти рецепторы.

В зависимости от выбранного рецептора и типа эндоцитоза поступивший в клетку путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза транспортер с переносимым веществом может за счет процесса рециркуляции возвратиться на поверхность клетки, а может продолжать продвигаться по эндосомному пути, в конечном счете, попадая в лизосомы, где он подвергается протеолизу (Рис. 2.1). Данный транспортер, содержаший определенный компонент, может также путем сортировки и последующего везикулярного транспорта быть направлен в эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи (Рис. 2.1) (Devarajan et al., 2019). В этом случае непосредственно перенесения транспортера через мембрану не происходит. Однако если требуется доставка в другие клеточные компартменты, такие как гиалоплазма, ядро или митохондрии, то доставляемому веществу необходимо пройти либо через одинарную (выход из эндоплазматического ретикулума или эндосом), либо через двойную (вход в ядро (Alber et al., 2007) или внутреннее пространство митохондрий (Becker et al., 2012)) мембрану. Поэтому чтобы осуществить транспорт в эти компартменты нужно в состав транспортера помимо компонента, направляющего его в соответствующий компартмент, включить еще компонент для эффективного преодоления мембраны. Так, например, включение в состав способного интернализоваться в клетки транспортера только сигнала ядерной локализации не будет приводить к его транспорту в ядро.

Таким образом, для локально действующих веществ возникает задача их доставки в заданный компартмент клеток-мишеней. Для этого этим веществам нужно преодолеть ряд мембранных барьеров. Прежде всего, веществу необходимо попасть в клетку, что может быть осуществлено либо непосредственно через плазматическую мембрану, либо путем эндоцитоза. Если целевой компартмент отличается от эндосом/лизосом, то возникает задача выхода с эндоцитозных путей, которые приводят либо к выходу вещества из клетки, либо к его деградации. Поэтому одним из ключевых компонентов системы доставки локально действующих веществ зачастую является компонент, позволяющий ей выходить из замкнутых мембранных образований, эндосом.

Часть представленного в данном пункте материала опубликована в статье: Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Khramtsov Y.V., Sobolev A.S. Use of intracellular transport processes for targeted drug delivery into a specified cellular compartment // Biochemistry (Moscow) – 2014. – V. 79. – P. 928-946 (вклад автора состоит в написании 1/6 части этого обзора).

2.2. Использование рецептора эпидермального фактора роста для направленной доставки локально действующих веществ

Идея доставлять лекарственные вещества с использованием интернализуемых рецепторов была предложена уже несколько десятков лет назад. Так исследования по этой теме начались в 1980-х годах, когда было установлено, что некоторые рецепторы сверхэкспрессированы на поверхности опухолевых клеток, в то время как они отсутствуют или представлены в значительно меньшем количестве на поверхности нормальных клеток. Данные рецепторы можно распознать с помощью специфических для данного рецептора молекул, таких как регуляторные молекулы, антитела, антителомиметики и аптомеры (Byrne et al., 2008). Если эти рецепторы способны еще интернализоваться в опухолевые клетки, то их можно использовать для доставки лекарственных веществ внутрь клеток путем рецептор-опосредованного эндоцитоза (Muro, 2012; Devarajan et al., 2019). Описанный подход может быть использован не только при лечении опухолевых заболеваний, т.к. даже разные типы нормальных клеток могут существенно отличаться по экспрессии многих рецепторов. Однако на настоящий момент этот подход применяется преимущественно при лечении раковых заболеваний, где есть многочисленные примеры увеличения экспрессии поверхностных рецепторов (Slastnikova et al., 2015). Причем во многих случаях эти рецепторы не только являются маркерами опухолевых клеток, но и служат причиной злокачественной трансформации или перехода на следующую стадию заболевания. В качестве примеров использования данных рецепторов для адресной доставки лекарственных средств можно назвать рецепторы трансферина (Tros de Ilarduya and Düzgüneş, 2013), которые использовались для доставки доксорубицина (Golla et al., 2013), гидроксикамптотецина (Hong et al., 2010) и оксалиплатина (Suzuki et al., 2008); эпидермального фактора роста для доставки цисплатина (Wang et al., 2014), индия-111 (Razumienko et al., 2013), йода-125 (Slastnikova et al., 2012), астата-211 (Rosenkranz et al., 2008) и ингибиторов рецептора тирозинкиназы (Ivanenko et al., 2025); фолата для доставки доксорубицина (Watanabe et al., 2012), паклитаксела (Stevens et al., 2004), производного винбластина (Naumann et al., 2013) и siRNA (Dong et al., 2013); фактора роста эндотелия сосудов для доставки доцитаксела (Liu et al., 2011); меланокортинового рецептора первого типа для доставки фотосенсибилизаторов (Rosenkranz et al., 2003); соматостатина для доставки висмута-213 (Nayak et al., 2007), паклитаксела (Shen et al., 2008), комбретастатина и доксорубицина (Dai et al., 2012), гидроксикамптотецина (Su et al., 2013) и иринотекана (Iwase and Maitani, 2012); $\alpha_v\beta_3$-интегрина для доставки доксорубицина (Amin et al., 2013), фотосенсибилизатора HPPH (Amin et al., 2013), siRNA (Schiffelers et al., 2004) и

терапевтического гена (Hemminki et al., 2001). Однако чаще всего для адресной доставки молекул в опухолевые клетки используют рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР), поэтому число научных публикаций, касающихся изучения структуры, свойств и функционирования этого рецептора, уже составляет порядка ста тысяч (Розенкранц и Сластникова, 2020).

Взаимодействие с РЭФР различных регуляторных факторов, включающих эпидермальный фактор роста (ЭФР) и трансформирующий фактор роста альфа (TGFα), может запускать активацию нескольких внутриклеточных сигнальных каскадов, приводя в конечном итоге, к пролиферации клеток, ингибированию в них апоптоза и увеличению выживаемости клеток (Jorissen et al., 2003; Yarden and Pines, 2012). РЭФР особенно привлекает внимание при поиске способов лечения онкологических заболеваний. Известно, что одним из факторов, приводящих к появлению фенотипа раковых стволовых клеток, является активация РЭФР (Lamouille et al., 2014). Кроме того, возникновение и прогрессия опухолей часто сопровождаются мутациями этого рецептора и увеличением его экспрессии (Sigismund et al., 2018; Obozina et al., 2026). Последнее встречается при очень многих онкологических заболеваниях (Розенкранц и Сластникова, 2020). Так, существенное увеличение экспрессии РЭФР наблюдается при раке головы и шеи, раке шейки матки, мезотелиоме, раке толстой кишки, раке поджелудочной железы, немелкоклеточном раке легкого, раке молочной железы, раке яичников, глиоме, раке мочевого пузыря и в нейроэндокринных опухолях (Розенкранц и Сластникова, 2020).

Взаимодействие природных лигандов с РЭФР оказывает влияние на обширную сигнальную сеть, насчитывающую более 300 компонентов, которые связаны друг с другом более чем 200 реакциями (Lemmon and Schlessinger, 2010). Эта сигнальная сеть сильно зависит от типа и концентрации используемого лиганда и настраивается в клетках с помощью различных скоординированных механизмов, включающих в себя регуляцию фосфатазами и обратными связями расположенных ниже звеньев этой сети, а также эндоцитоз и внутриклеточный транспорт (Lemmon and Schlessinger, 2010). Этот рецептор принадлежит семейству тирозинкиназ, образованному четырьмя сходными мембранными рецепторами: EGFR/ErbB1/HER1, Neu/ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4 (Рис. 2.2). Название семейства ErbB человека пошло от avian erythroblastic leukemia viral oncogene B homolog – гомолог B вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц. В это семейство входят крупные трансмембранные белки, состоящие из богатой цистеинами внеклеточной части (четыре домена), единственного трансмембранного участка и цитоплазматической части, подразделяющейся на примембранный, тирозинкиназный и С-концевой домены (Lemmon et al., 2014). Активация РЭФР соответствующими лигандами, такими как ЭФР,

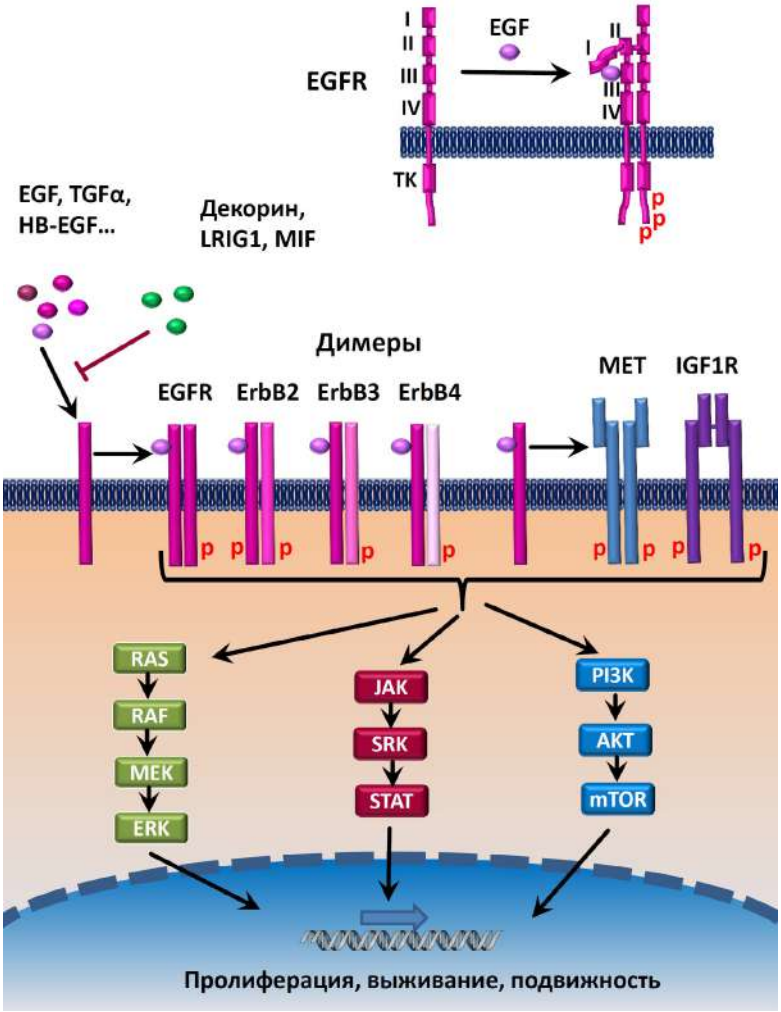


Рисунок 2.2. Схема основных активируемых РЭФР сигнальных путей. I-IV – внеклеточные домены РЭФР, ТК – тирозинкиназный домен, Р – фосфорилированные тирозины, MET – рецептор фактора мезенхимально-эпителиального перехода, IGF1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1. Рисунок взят из (Розенкранц и Сластникова, 2020).

приводит к образованию гомодимеров, так и гетеродимеров с другим рецептором, принадлежащим ErbB семейству (Рис. 2.2). При этом активируется тирозинкиназный домен и происходит фосфорилирование тирозиновых остатков в цитоплазматической части рецептора-партнера. Далее к фосфорилированным остаткам присоединяются сигнальные молекулы, и происходит активация всей сигнальной сети. Гетеродимеры образуются преимущественно между РЭФР и ErbB2, т.к. ErbB3 и ErbB4 экспрессируются в основном в нервной ткани (Frolov et al., 2007; Huang et al., 2012). Кроме рецепторов семейства ErbB РЭФР может образовывать димеры с другими рецепторными тирозинкиназами, что тоже будет приводить к активации запускаемых этими рецепторами регуляторных внутриклеточных путей (Рис. 2.2). Это было показано, например, для рецепторов тромбоцитарного фактора роста бета (Black et al., 2011), для рецепторов инсулиноподобного фактора роста 1 (Morgillo et al., 2006), рецепторов MET (Tanizaki et al., 2011) и RON (Peace et al., 2003). Поэтому ответ клетки на связывание лиганда с РЭФР

будет определяться не только этим рецептором, но и набором всех рецепторов-партнеров на клеточной поверхности.

Активация РЭФР в нормальных клетках регулируется большим набором природных полипептидных лигандов. Лиганды могут быть как агонистами, так и антагонистами РЭФР. К первым можно отнести, например, ЭФР, TGFα, амфирегулин, бетацеллюлин, гепарин-связывающий фактор роста, эпирегулин, неурегулины 2α и 2β и ангиогенин (Pinkas-Kramarski et al., 1998; Holbro and Hynes, 2004; Gilmore et al., 2006; Wang et al., 2018b; Wang et al., 2018c). Причем некоторые из них способны активировать не только РЭФР, но и другие рецепторы ErbB семейства. В качестве антагонистов может выступать протеогликан декорин, который способен с высоким сродством (наномолярная константа диссоциации) связываться с РЭФР и уменьшать его количество на поверхности клетки за счет кавеолин-зависимого эндоцитоза и последующей его деградации в клетке (Santra et al., 2002; Zhu et al., 2005). Его гомолог – LRIG1 (Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains-1) тоже является антагонистом РЭФР за счет конкурирования с ЭФР за связывание с этим рецептором (Goldoni et al., 2007). В свою очередь, регулятор врожденного иммунитета – MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов) за счет связывания с внеклеточным доменом РЭФР способен блокировать его активацию (Zheng et al., 2015). Биологический ответ на разные лиганды-агонисты РЭФР может сильно отличаться, что связано с различием их воздействия на процессы образования гомо- и гетеродимеров ErbB. Этот ответ также может регулироваться путем изменения в несколько раз сродства лигандов к РЭФР, например, за счет метилирования внеклеточной части этого рецептора (Liao et al., 2015a). Такое увеличение сродства наблюдалось для таких лигандов, как ЭФР, TGFα и ангиогенин (Liao et al., 2015b; Wang et al., 2019).

Для непрерывного деления опухолевых клеток им необходима постоянная активация РЭФР. В опухолях это достигается, как правило, либо за счет увеличения экспрессии РЭФР и продукции соответствующих лигандов, либо мутациями РЭФР, приводящими к его перманентной активации (Розенкранц и Сластникова, 2020). Соответственно прервать активацию РЭФР можно либо блокировкой связывания активирующего лиганда, либо ингибированием тирозинкиназной активности. Блокировку РЭФР можно осуществить, например, различными искусственными полипептидами, включающими в себя химерные и однодоменные антитела, фрагменты антител и антителомиметики (London and Gallo, 2020). Примерами последних могут служить аффиболи, полученное на основе Z-домена белка A (Z1907 (Kim et al., 2012)), и монободи, полученное на основе 10-го домена III типа фибронектина человека (London and Gallo, 2020). Блокировка РЭФР антителами оказалась успешной при лечении опухолей и ряд

препаратов антител уже дошли до терапевтической практики (Cunningham et al., 2004; Cohenuram and Saif, 2007; Boland and Bebb, 2009; Garrido et al., 2011; Thatcher et al., 2015; Trivedi et al., 2016; Li and Yan, 2018). Однако существует целый ряд моноклональных антител, блокирующих РЭФР, которые не оказывают достаточно выраженного противоопухолевого эффекта (London and Gallo, 2020). Известно, что РЭФР довольно часто подвергается мутациям, таким, например, как KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA и PTEN, которые приводят к постоянной активации одного или нескольких сигнальных путей, запускаемых РЭФР (Therkildsen et al., 2014). Блокирующие антитела к РЭФР не действуют на опухоли, если РЭФР имеют такие мутации. Известно, что только мутации KRAS встречаются в 15–30% случаев немелкоклеточного рака легких и 40–45% случаев колоректального рака (Ciardiello and Tortora, 2008). Эти мутации обычно также приводят к возникновению вторичной резистентности опухолей после первичного успешного ответа на лечение данными антителами (Misale et al., 2012; Siravegna et al., 2015).

Кроме блокировки РЭФР заметное распространение получили ингибиторы тирозинкиназной активности. Испытания уже первых ингибиторов фосфорилирования РЭФР (гефитиниб и эрлотиниб) показали их большую эффективность, по сравнению с традиционной химиотерапией (Mok et al., 2009). Кроме гефитиниба и эрлотиниба в клиническую практику лечения онкологических заболеваний вошли также лататиниб, афатиниб, осимертиниб, бригатиниб, дакомитиниб и икотиниб (Roskoski, Jr., 2020; Yang et al., 2017a). Они эффективны при различных мутациях РЭФР, поэтому, как правило, применяют не один ингибитор, а сочетание разных ингибиторов. Однако при длительном применении ингибиторов из-за большого количества опухолевых клеток с разными мутациями РЭФР происходит селекция устойчивых к этим ингибиторам клеток (Murtuza et al., 2019). Поэтому высокая гетерогенность и генетическая нестабильность опухолевых клеток сильно снижает эффективность подходов к лечению опухолей, основанных на блокировке РЭФР или ингибировании тирозинкиназной активности. Устойчивость онкологических заболеваний к терапии можно преодолеть с помощью другого подхода, где РЭФР используется для направленного уничтожения опухолевых клеток.

В последнее время все большее распространение получают системы направленной доставки в клетки, содержащие различные лиганды к РЭФР (Розенкранц и Сластникова, 2020). В клетках эндоцитоз РЭФР является способом уменьшения ответа клетки на внешнее воздействие. После интернализации РЭФР оказываются в эндосомах, откуда они могут возвращаться на плазматическую мембрану, деградировать в лизосомах, либо попадать в ряд других клеточных компартментов, например, ядро, где они могут осуществлять регуляторные функции (Caldieri et al., 2018). Без лиганда скорость

интернализации РЭФР очень низкая и время полуобновления этого рецептора составляет от 6–10 часов до суток и более. Связывание РЭФР с лигандом на порядки увеличивает скорость этого процесса (Sorkin and Goh, 2009). При этом связывании активируются несколько сигналов интернализации, находящихся в цитоплазматической части РЭФР. К ним относятся, например, два различных мотива, которые через комплекс адаптерных белков, образованный субъединицами α, β, μ и σ, связывают РЭФР с клатриновой решеткой (Goh and Sorkin, 2013; Shin et al., 2021). При фосфорилировании РЭФР E3 убиквитин лигаза Cbl может с ним связываться как напрямую, так и через другой адаптерный белок Grb2 (Waterman et al., 1999; Jiang et al., 2003). Множественное дублирование механизмов интернализации РЭФР делают этот процесс очень устойчивым к различным воздействиям, в том числе к мутациям этого рецептора (Goh and Sorkin, 2013). Известно, что для подавления клатрин-зависимого эндоцитоза РЭФР необходимо одновременно выключить работу мотивов, взаимодействующих с AP2, множественное убиквитинирование и ацетилирование этого рецептора (Goh et al., 2010). Кроме того, в зависимости от внешнего воздействия эндоцитоз РЭФР может проходить не только клатрин-зависимым путем, но и клатрин-независимым, и эндофилин-зависимым путем, и путем макропиноцитоза (Henriksen et al., 2013; Boucrot et al., 2015). Эффективность эндоцитоза тоже сильно зависит от типа используемого лиганда. Так, например, в течение часа 45% связавшихся с клетками молекул ЭФР интернализуется в клетки, и только 19-24 % аффибоди Z1907 (Gostring et al., 2010). Это связано с тем, что ЭФР приводит к димеризации РЭФР, его фосфорилированию и активации последующих сигнальных путей, а аффибоди Z1907 нет (Розенкранц и Сластникова, 2020). Поэтому, если необходимо минимизировать ответ клетки на действие лиганда, то в системах доставки предпочтительнее использовать аффибоди, а не ЭФР. Это особенно актуально для раковых клеток, где ЭФР вызывает их дополнительную нежелательную пролиферацию.

Известно, что после эндоцитоза, вызванного такими лигандами, как ЭФР, TGFα и бетацеллюлин, небольшая часть полноразмерного РЭФР обнаруживается в ядре (Hsu and Hung, 2007; Faria et al., 2016). Причем этот процесс наблюдается только в определенных тканях или при некоторых условиях (Shah et al., 2019). Этот процесс зависит от β1 импортина, что указывает на использование в этом процессе активного переноса через ядерную пору (Lo et al., 2006). Интересно, что РЭФР обнаруживали как в нуклеоплазме, так и внутренней ядерной мембране, причем в комплексе с ЭФР (Lo, 2010; De Angelis Campos et al., 2011). Механизмы поступления РЭФР в ядро до конца пока не ясны. Предположительно часть РЭФР при помощи ретроградного транспорта выходит в цитозоль из эндоплазматического ретикулума, а далее, за счет сигнала ядерного импорта,

поступает в ядро через ядерные поры (Lo, 2010; Shah et al., 2019). Однако, не ясно, как при этом обеспечивается растворимость РЭФР в цитоплазме и нуклеоплазме, а также каким образом в ядре сохраняется комплекс РЭФР с ЭФР. Предполагают также, что существует прямой транспорт фракции эндосом к ядру, приводящий к их слиянию с ядерной оболочкой и поступлению РЭФР во внутреннюю мембрану ядра (Chaumet et al., 2015).

Поступление РЭФР в цитозоль и последующее проникновение его в ядро указывает на то, что минимальной системой доставки в клетки могут являться лиганды к РЭФР, с присоединенной биологически активной молекулой. Примером этому могут служить лиганды, меченные радиоактивным изотопом. Так, способные к интернализации мышиные антитела к РЭФР mAb 425 (Emrich et al., 1996), меченные радиоактивным изотопом ^{125}I, при внутривенном введении увеличивали с 7 до 16 месяцев продолжительности жизни пациентов с тяжелыми формами глиобластомы (Li et al., 2010). Другим примером может служить ЭФР с присоединенным хелатирующим агентом DTPA, который может связывать радиоизотоп ^{111}In (Rosenkranz et al., 2020). Этот изотоп является эмиттером электронов Оже, которые из-за малого пробега эффективны только вблизи ядерной ДНК, поэтому хорошо подходят для направленного уничтожения раковых клеток (Rosenkranz et al., 2020). Для [^{111}In]-DTPA-ЭФР было показано, что 15% интернализованной в клетки рака молочной железы радиоактивности достигало клеточного ядра. Была показана эффективность и безопасность данного препарата на мышиной модели рака молочной железы, и он успешно прошел первую фазу клинических испытаний (Reilly et al., 2006; Vallis et al., 2014). Причем данный препарат оказался эффективным даже в случае урезанного варианта ЭФР, который не способен активировать РЭФР (Panosa et al., 2015). Добавление к [^{111}In]-DTPA-ЭФР сигнала ядерной локализации существенно увеличивало накопление данной конструкции в ядре и, соответственно, ее цитотоксичность (Розенкранц и Сластникова, 2020). Хотя α-частицы имеют пробег порядка десятков микрометров (то есть больше размеров клеточного ядра), тем не менее ядерная локализация α-эмиттеров существенно увеличивает их цитотоксичность. Так, применение моноклонального антитела к РЭФР, цетуксимаба, меченного α-эмиттером ^{213}Bi, показало высокую цитотоксичность на клетках трижды негативного рака молочной железы (Song et al., 2013). Одно- или двукратное применение данного радиофармпрепарата для людей, имеющих рак мочевого пузыря, привело к полной ремиссии опухоли у 3 из 12 пациентов (Autenrieth et al., 2018).

Лиганды к РЭФР часто использовались и в составе более сложных систем доставки, чаще всего липосом. Так, например, иммунолипосомы, содержащие антитело к РЭФР панитумумаб и нагруженные радиоизотопами ^{186}Re или ^{188}Re, показали заметно

лучший терапевтический эффект на опухолях рака молочной железы, чем липосомы без лиганда к РЭФР (Li et al., 2012). Другим примером иммунолипосом, нацеленных на РЭФР, являются липосомы, к которым для увеличения времени жизни в крови присоединены молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), а для взаимодействия с РЭФР используется Fab'-фрагмент цетуксимаба (Mamot et al., 2012). Эти липосомы, нагруженные известным противораковым цитотоксическим агентом – доксорубицином, показали себя успешными при проведении клинических испытаний, направленных на лечение трижды негативного рака молочной железы, и способны в шесть раз увеличить накопление данного лекарства в этих опухолях (Mamot et al., 2005). Много подобного типа липосом, содержащих различные химиотерапевтические средства, пока находятся за стадии доклинических испытаний. Например, липосомы, где в качестве лиганда к РЭФР и химиотерапевтического средства выступают нимотузумаб и цисплатин (Vazquez-Becerra et al., 2017), цетуксимаб и 5-фторурацил (Petrilli et al., 2018), антитела к РЭФР EGa1 и фотосенсибилизатор фталоцианин цинка (Broekgaarden et al., 2016), ЭФР и оксалиплатин (Zalba et al., 2016), mAb к РЭФР и цисплатин (Jung et al., 2015), ПЭГ-mAb к РЭФР и гемцитабин (Aggarwal et al., 2013). Для достижения наилучшего эффекта порой используют сочетание разных цитотоксических агентов. Так, например, липосомы, содержащие в качестве лиганда однодоменные scFv EGFR-s10, и цитостатики доксорубицин и винорелбин (Wang et al., 2020) или, например, иммунолипосомы с цетуксимабом и доксорубицином и ^{188}Re (β-излучатель) (Hsu et al., 2015). Для улучшения доставки в заданные органы и ткани порой используют так называемые функционализованные липосомы. Примером этих липосом могут служить липосомы, содержащие доксорубицин и пептид GE11, которые при температуре тела являются стабильными, но при нагревании до 40 °C становятся неустойчивыми и высвобождают заключенное в них лекарство (Haeri et al., 2016). Это позволяет за счет локального нагрева повысить селективность воздействия. Другим примером являются pH-чувствительные иммунолипосомы с mAb к РЭФР, которые при уменьшении pH способны высвобождать гемцитабин (Kim et al., 2009). Это позволяет с одной стороны повысить селективность доставки в опухоли, где внеклеточная среда более кислая, чем в нормальных тканях, а с другой стороны повысить эффективность выхода цитостатика из эндосом за счет их закисления по мере созревания.

Кроме липосом доставку противораковых препаратов с помощью лиганда к РЭФР осуществляют и с помощью мицелл. Так, например, мицеллы, полученные на основе сополимеров гидроксипропилметакриламида и лактата, содержащие ПЭГ, присоединенный через pH-чувствительный линкер доксорубицин и наноантитело к РЭФР

EGa1, способны тормозить рост опухоли рака головы и шеи как за счет токсичности доставленного в клетки доксорубицина, так и за счет блокировки РЭФР (Talelli et al., 2013). Другим примером являются фосфолипидные мицеллы, содержащие паклитаксел и квантовые точки, к которым через ПЭГ присоединен лиганд к РЭФР (цетуксимаб или аптомер) (Kang et al., 2018). Присоединение этого лиганда достоверно увеличивало торможение роста опухоли рака поджелудочной железы. Используются также мицеллы, которые доставляют несколько цитотоксических агентов. Например, катионные мицеллы, содержащие в качестве лиганда цетуксимаб, а в качестве активных агентов цитотоксик гемцитабин и миРНК miR-205. Это привело к повышению эффективности терапии прогрессирующего рака поджелудочной железы по сравнению с каждым из активных агентов, доставляемых по отдельности (Mondal et al., 2017).

Лиганды к РЭФР используются и в других системах доставки на основе наночастиц различного строения. Примером могут служить гибридные наночастицы, образованные липидом и сополимером молочной и гликолевой кислот, PLGA (Gao et al., 2014). Эти частицы, к которым через ПЭГ были присоединены Fab'-фрагменты антител к РЭФР и которые были загружены адрианомицином, заметно тормозили рост опухолей гепатоцеллюлярной карциномы. Или, например, наночастицы на основе полиглутамата и хитозана, к которым был присоединен цетуксимаб, осуществляли успешную доставку паклитаксела в клетки рака желудка как *in vitro*, так и *in vivo* (Sreeranganathan et al., 2017). Еще одним примером являются наночастицы из двуокиси кремния, которые были модифицированы цетуксимабом и использовались для доставки доксорубицина (Wang et al., 2017). Эти наночастицы оказывали заметный терапевтический эффект на ксенографты гепатоцеллюлярной карциномы. Иногда используется само строение наночастиц для оказания терапевтического эффекта. Так, наночастицы из оксида железа, модифицированные цетуксимабом, могут в переменном магнитном поле генерировать активные формы кислорода, что заметно увеличивало эффект радиотерапии ксенографтов глиомы (Bouras et al., 2015). Или, например, золотые наночастицы, покрытые антителами к РЭФР, успешно использовались для фототермального уничтожения опухолевых клеток (El-Sayed et al., 2006).

Лиганды к РЭФР используются также в составе полиплексов для целей генотерапии (Kang et al., 2019). Для этого использовались пептидные лиганды, такие как GE11 (YHWYGYTPQ NVI) или GE7 (NPVVGYIGERPQYRDL) пептиды, способные с высоким сродством связываться с РЭФР и при этом не вызывать пролиферацию клеток (Liu et al., 2003; Li et al., 2005). Так, Шпицвег и др. в качестве блок-сополимера для полиплексов использовали линейный ПЭИ, к которому через ПЭГ был присоединен GE11

(Urnauer et al., 2017). Присоединение последнего существенно увеличивало эффективность трансфекции клеток и опухолей мышей, содержащих РЭФР. В другой лаборатории было показано, что использование в полиплексах блок-сополимеров, состоящих из низкомолекулярного ПЭИ, ПЭГ и GE11 или разветвленного GE11, приводило к заметному увеличению эффективности трансфекции, способности осуществлять трансфекцию только РЭФР содержащих клеток и низкой цитотоксичности полученных полиплексов (Lee et al., 2015). Причем разветвленный GE11 лучше осуществлять нацеливание на РЭФР-положительные клетки, чем обычный GE11. Полиплексы, содержащие другой способный связываться с РЭФР пептид, GE7, тоже показали свою способность эффективно доставлять терапевтические гены в опухоли, сверхэкспрессирующие РЭФР, при системном применении (Liu et al., 2003).

Итак, среди всех интернализуемых рецепторов особенное внимание уделяется изучению и практическому использованию РЭФР. Такой интерес обусловлен тем, что данный рецептор встречается на большинстве типов опухолей, причем их возникновение и прогрессия часто сопровождается существенным увеличением экспрессии этого рецептора на поверхности клеток. Подходы, направленные на блокировку сигнала, опосредованного этим рецептором, имеют весьма ограниченное применение из-за частых мутаций этого рецептора, приводящих к постоянной его активации. Поэтому все большее распространение получают подходы, где используются различные системы доставки биологически активных молекул, содержащие лиганды к РЭФР. Это связано как со сверхэкспрессией данного рецептора на поверхности опухолевых клеток, так и высокой скоростью его интернализации. Использование в системах доставки некоторых лигандов, являющихся антогонистами к ЭФР, например антителоподобной молекулы аффибоди Z1907, позволяет использовать РЭФР для интернализации без активации этого рецептора. Это позволяет избежать нежелательной для опухолевых клеток активации их пролиферации. Поэтому в настоящей диссертационной работе в составе одного из основных объектов исследования – МНТ чаще всего использовалось именно данное аффибоди.

2.3. Возможные механизмы выхода молекул из эндосом при их внутриклеточной доставке

2.3.1. Выход из эндосом с помощью эффекта протонной губки

Различные системы доставки проникают в клетки преимущественно путем клатрин-зависимого или рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Однако этот процесс зачастую оканчивается в лизосомах, где доставляемое вещество подвергается деградации. Поэтому для успешной доставки этого вещества в цитозоль в состав системы доставки нужно включить компонент, позволяющий ей выходить из эндосом. В зависимости от строения этого компонента механизмы выхода могут существенно отличаться. Рассмотрим, прежде всего, выход систем доставки из эндосом с помощью «эффекта протонной губки».

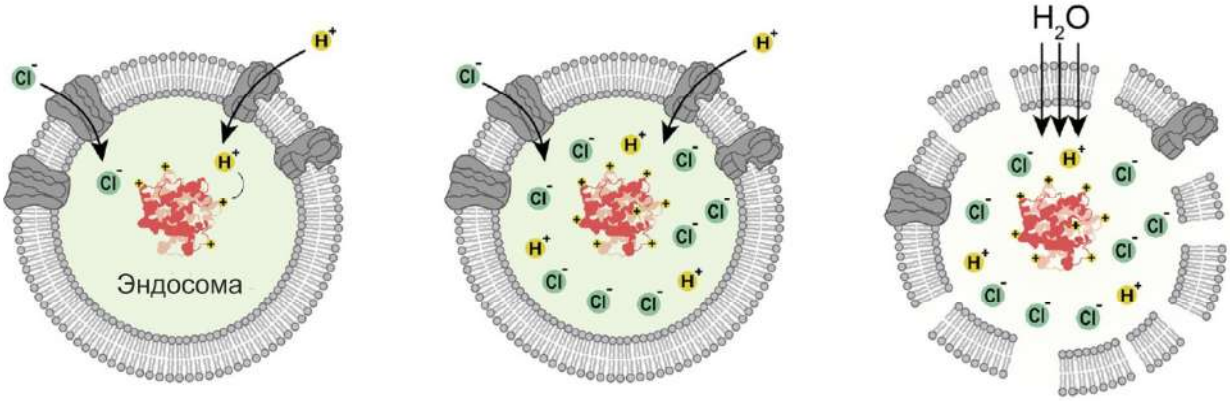


Рисунок 2.3.1. Механизм выхода веществ из эндосом с помощью «эффекта протонной губки». Выполнено на основании рисунка из (Volta-Duran et al., 2023).

Механизм выхода из эндосом с помощью «эффекта протонной губки» (Рис. 2.3.1) был предложен для поликатионных веществ, обладающих большой буферной емкостью в физиологическом диапазоне pH, включая полиэтиленимин (ПЭИ) (Neuberg and Kichler, 2014), дендримеры полиамидоамина (ПАМАМ) (Bober et al., 2022), поли-L-лизин (Dhandapani et al., 2021), хитозан (Ragelle et al., 2013), поли(силамин) (Christie et al., 2010), хитозан, модифицированный уроканиновой кислотой (Xiao et al., 2016), хлорохин (Liu et al., 2018a), а также другие вещества, содержащие вторичные или третичные амины. Он заключается в следующем. Содержимое эндосом закисляется за счет действия протонных насосов. Однако, из-за большой буферной емкости систем доставки это закисление происходит слабо, приводя к постоянной работе данных насосов. Поступление протонов сопровождается поступлением в эндосомы ионов хлора и за счет осмоса поступлением молекул воды (Рис. 2.3.1). Это приводит к набуханию эндосом и дальнейшему их разрушению, за счет чего их содержимое поступает в цитозоль.

Предполагается, что по этому механизму из эндосом могут выходить богатые гистидином полипептиды (Liu et al., 2022b; Vanova et al., 2022). В этом случае

протонирование происходит по имидазольному кольцу гистидина при pH ниже 6 (He et al., 2020). Следует отметить, что полигистидиновые последовательности, чаще всего состоящие из шести гистидинов (His tag), широко используются для очистки белков с помощью аффинной хроматографии. Более того, известно, что их добавление не влияет на связывание белков с целевыми клетками (Dhankher et al., 2021; Yu et al., 2021). Поэтому для доставки лекарств пептиды, содержащие His tag, являются весьма привлекательными, т.к. помимо функции очистки белков при выделении, обладают еще эндосомолитическими свойствами, предположительно связанными с эффектом протонной губки (Lopez-Laguna et al., 2020). Помимо His tag в системах доставки для выхода из эндосом используются и другие богатые гистидином пептиды. Так, например, пептид ppTG21 в составе системы доставки CRISPR-Cas рибонуклеопротеинов способствует выходу этой конструкции из эндосом (Rouet and Christ, 2019). Кроме того, модификация гистидином некоторых пептидов, способных образовывать поры, улучшает их эндосомолитические свойства. Примером этому может служить пептид EB1, который является синтетическим аналогом пенетратина, где некоторые остатки заменены на гистидин (Lundberg et al., 2007).

Однако существует целый ряд работ, ставящий под сомнение механизм выхода из эндосом с помощью эффекта протонной губки. В этих исследованиях было показано, что для некоторых полимерных систем доставки буферной емкости недостаточно для осуществления их выхода из эндосом (Cabral et al., 2018; Wang et al., 2018a). Кроме того, осмотическое давление, возникающее при закислении эндосом, недостаточно для их разрыва (Won et al., 2009). Причем форма эндосом часто не сферическая, что тоже затрудняет их осмотический разрыв (Helmuth et al., 2009). Кроме того, есть указания на то, что полиплексы на основе ПЭИ не приводят к изменению лизосомального pH (Benjaminsen et al., 2013). Также в некоторых исследованиях показано, что за выход некоторых полимеров из эндосом отвечает не эффект протонной губки, а образование дефектов в мембранах (Ur et al., 2013; Cabral et al., 2018). Однако большое количество литературных данных указывает на то, что эффект протонной губки все-таки существует (Qiu et al., 2023). При этом сам механизм выхода может быть комплексным, включающим в себя помимо эффекта протонной губки и прямую дестабилизацию мембраны, что, например, было показано для ПЭИ и ПАМАМ (Klemm et al., 1998; Zhang and Smith, 2000).

2.3.2. Выход из эндосом липидных наночастиц

Липидные наночастицы, как правило, представляют собой липосомы, на поверхности которых или внутри них находится доставляемое вещество (Chatterjee et al., 2024). Известно, что липидные наночастицы, содержащие ионизуемые липиды, довольно хорошо способны высвобождать свое содержимое из эндосом в цитозоль (Chatterjee et al., 2024). В настоящее время предполагается несколько возможных механизмов этого процесса, из которых обычно выделяют два основных механизма (Chatterjee et al., 2024). Одним из этих механизмов считается выход из эндосом с помощью «эффекта протонной губки» (Рис. 2.3.1). Он связан с буферными свойствами ионизуемого липида, которые при закислении эндосом помимо протонирования липида приводят к накоплению ионов хлора, разбуханию и разрыву эндосом (Sonawane et al., 2003). Есть исследования, которые как поддерживают, так и опровергают данный механизм выхода липидных наночастиц из эндосом (Akinc et al., 2005; Vermeulen et al., 2018).

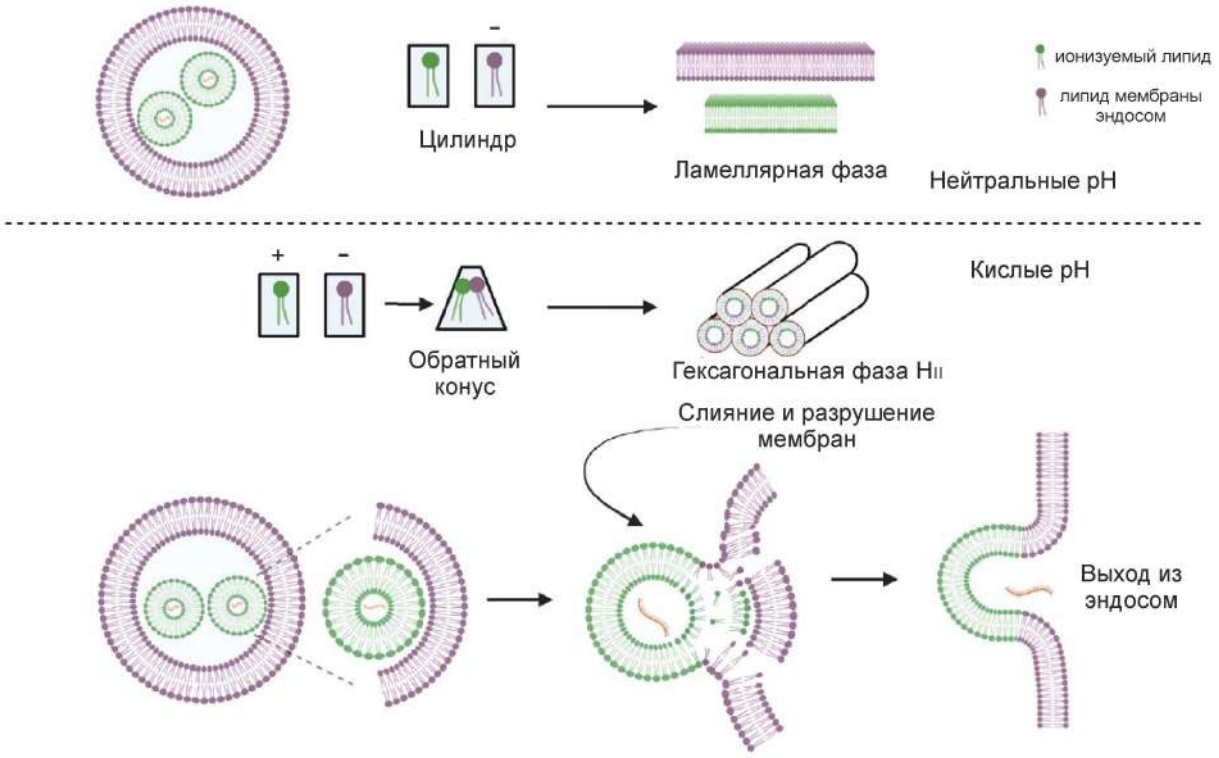


Рисунок 2.3.2. Модель выхода липидных наночастиц из эндосом путем образования гексагональной фазы H_{II}. Выполнено на основании рисунка из (Chatterjee et al., 2024).

В другом предполагаемом механизме выхода липидных наночастиц из эндосом при закислении последних ионизуемые липиды протонируются и взаимодействуют с анионными липидами, представленными на люминальной стороне мембраны эндосом (Рис. 2.3.2) (Chatterjee et al., 2024). Предполагается, что это взаимодействие способствует образованию гексагональной липидной фазы H_{II}, которая является менее стабильной, чем ламеллярная фаза и ее образование приводить к повреждению мембраны эндосом и

высвобождению веществ, содержащихся в липидных наночастицах в цитозоль (Рис. 2.3.2) (Semple et al., 2010). В этом механизме способность липидных наночастиц выходить из эндосом будет определяться способностью липидов образовывать в слабо кислых условиях гексагональную фазу H_{II} (Cullis and Hope, 1978). Например, температура перехода из ламеллярной фазы в гексагональную, T_{BH}, может служить одним из параметров, определяющих эффективность выхода из эндосом (Cullis and de, 1978). Другим ключевым параметром для выхода из эндосом является pKa ионизуемого липида. Считается, что оптимальным для выхода из эндосом гепатоцитов является pKa лежащее в диапазоне 6,2–6,5 (Jayaraman et al., 2012), т.е. как раз отвечающие pH ранних эндосом. Однако известно, что только pKa и T_{BH} не являются достаточными для определения эффективности выхода из эндосом. Так, липидные наночастицы со сходными параметрами pKa и T_{BH} могут сильно отличаться по эффективности выхода из эндосом (Semple et al., 2010). Большое влияние на эту эффективность также могут оказывать и другие факторы, такие как характеристики липидов (подвижность заряженных групп, природа линкера между головкой и липидным хвостом и т.п.) и параметры, специфичные для данного типа клеток (pH эндосом и их размеры, скорость транспорта и т.п.) (Sayers et al., 2019; Paramasivam et al., 2022).

2.3.3. Выход из эндосом путем дестабилизации мембран

Выход систем доставки из эндосом может происходить за счет дестабилизации мембран. Существуют различные механизмы этой дестабилизации, включающие в себя образование пор, разрушение мембраны, слияние с мембраной и фотохимическую интернализацию (Volta-Duran et al., 2023). Некоторые системы доставки, содержащие, например, катионные пептиды или положительно заряженные полимеры, могут вызывать образование пор в мембранах эндосом по моделям «бочонка» или «ковра», а также по тороидальной модели (Рис. 2.3.3) (Matsuzaki, 2019; Priyadarshini et al., 2022). В модели «бочонка» происходит самосборка порообразующей молекулы на поверхности мембраны, ее встраивание в гидрофобную область липидного бислоя с образованием в нем канала (Рис. 2.3.3). В модели «ковра» олигомеризация порообразующей молекулы не является необходимой для образования поры. Вместо этого, данная молекула связывается, например, за счет электростатических взаимодействий, с липидной поверхностью и полностью покрывает ее. После достижения определенной критической концентрации порообразующая молекула действует как детергент, приводя к частичному растворению мембраны (Рис. 2.3.3). В тороидальной модели порообразующая молекула ориентируется сначала параллельно липидному бислою с последующей переориентацией

перпендикулярно ему. Пора в данном случае, в отличие от модели «бочонка», образуется порообразующими молекулами совместно с липидными молекулами (Рис. 2.3.3).

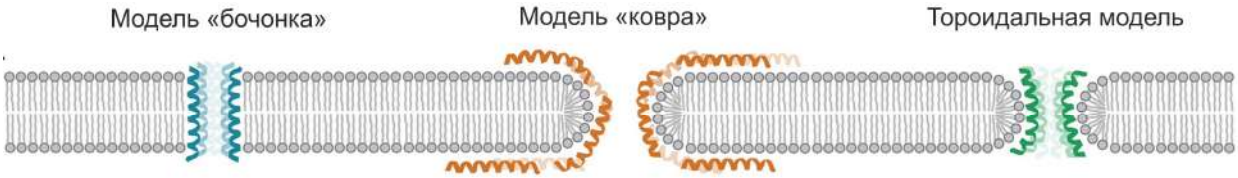


Рисунок 2.3.3. Модели выхода веществ из эндосом с помощью образования пор. Выполнено на основании рисунка из (Volta-Duran et al., 2023).

Примерами порообразующих молекул являются богатые аргинином CPP, такие как TAT-пептид, пенетратин и 8R, способные неспецифически проникать в клетки и выходить из эндосом (Lonn and Dowdy, 2015). Как правило, CPP являются короткими пептидами от 6 до 30 аминокислотных остатков, которые были получены из вирусных белков (Endoh and Ohtsuki, 2009). Однако, несмотря на то что многие из CPP, такие как TAT-пептид, хорошо проникают в клетки, эффективность их выхода из эндосом очень низкая (Suzuki et al., 2022). Эффективность можно существенно повысить, если в состав систем доставки кроме CPP добавить pH-чувствительные эндосомолитические пептиды или пептиды, обеспечивающие слияние с мембраной (Volta-Duran et al., 2023). Эти пептиды имеют вирусное (HA2, L2, gp41, ghH, WNV-ENV, INF-7, DEN), животное (B18), человеческое (S19) или синтетическое (KALA, GALA, GALA3) происхождение (Varkouhi et al., 2011). Характерным представителем данных пептидов является выделенный из вируса гриппа пептид гемагглутинин-2 (HA2) и его производные (например, INF-7) (Lin et al., 2014). В слабокислых условиях данные амфифильные отрицательно заряженные пептиды протонируются, приобретают α-спиральную конформацию, где гидрофобные аминокислотные остатки концентрируются в одной области, что вызывает проникновение этих пептидов в липидный бислой, нарушение целостности мембран эндосом/лизосом и выход вирусных нуклеиновых кислот в цитозоль (Ye et al., 2012).

Другим примером амфифильных отрицательно заряженных эндосомолитических пептидов является синтетический пептид GALA (30 аминокислотных остатков), представляющий собой несколько повторов EALA (Nakase et al., 2011). pH чувствительность данного пептида обусловлена наличием глутаминовой кислоты в его составе, протонирование которой при уменьшении pH с 7 до 5 приводит к превращению структуры GALA в амфифильную α-спираль. Ее встраивание в липидный бислой приводит к нарушению его целостности путем образования поры из 10 пептидов, расположенных в ориентации «голова к хвосту» (Li et al., 2004; Nishimura et al., 2014;

Ahmad et al., 2019). Однако GALA имеет довольно высокую гидрофобность, поэтому обладает тенденцией агрегировать на поверхности плазматической мембраны (Li et al., 2020). Эту проблему удалось решить в новом пептиде GALA3 путем уменьшения числа повторов EALA (Li et al., 2020). Крупные белки (несколько десятков килодальтон) с пришитым GALA3 существенно лучше выходят из эндосом, чем белки с пришитым HA2 или обычным GALA (Li et al., 2020). Следует, однако, отметить, что анионные пептиды, такие как GALA, могут заякориваться в эндосомальной мембране, поэтому для повышения выхода систем доставки из эндосом в цитозоль следует присоединять эти пептиды к ним через гидролизуемые в эндосомах или цитозоле связи (Erazo-Oliveras et al., 2012). GALA3 относится к пептидам слияния, которые изначально были так названы, т.к. существенно облегчают слияние систем доставки на основе липосом с мембраной эндосом (Volta-Duran et al., 2023). По каким механизмам пептиды слияния обеспечивают выход из эндосом связанных с ними белков до сих пор не известно (Volta-Duran et al., 2023). Причем в отличие от механизмов, представленных на рисунке 2.3.3, выход из эндосом путем слияния мембран зачастую не ограничен размерами доставляемых частиц (Selby et al., 2017).

Еще одним механизмом выхода систем доставки из эндосом является фотохимическая интернализация (Berg et al., 2005; Ahmad et al., 2019; Miyoshi et al., 2020). В этом механизме небольшие молекулы, фотосенсибилизаторы, способные под действием света вызывать образование активных форм кислорода, приводят к нарушению целостности мембран эндосом/лизосом и высвобождению их содержимого в цитозоль. Примером системы доставки, использующей подобные принципы, является разработанный Кабралом и др. новый наноноситель, содержащий тиолированный камптотецин и тиолированный ПЭГ-поли(глутаминовую кислоту) (Cabral et al., 2009). Вызванный фотохимической интернализацией выход данного препарата из эндосом составлял до 90% спустя 24 часа после его добавления.

Следует учитывать, что может происходить дестабилизация мембран не только эндосом, но и лизосом, что, в свою очередь, может приводить к клеточной гибели. Поэтому при использовании эндосомолитических агентов важно тестировать систему доставки на цитотоксичность.

2.3.4. Выход из эндосом токсинов

В системах доставки молекул в клетку в качестве эндосомолитического компонента используются также части различных токсинов. Минимальной системой доставки в этом случае является лиганд к рецептору, сверхэкспрессированному на

поверхности выбранных клеток, и часть разных таксинов, таких как псевдомонадный экзотоксин, дифтерийный токсин и сапорин (Simon and FitzGerald, 2016; Deng et al., 2017; Yang et al., 2018). Механизмы выхода в цитозоль у этих токсинов различные. Так, дифтерийный токсин для выхода из эндосом имеет специальный pH-чувствительный транслокационный домен, в то время как псевдомонадный экзотоксин проходит через аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум и попадает в цитозоль путем ретроградного транспорта (Розенкранц и Сластникова, 2020). Следует отметить, что токсины обладают крайне высокой цитотоксичностью, что ограничивает их терапевтическое применение ввиду небольшой ширины терапевтического диапазона (Kim et al., 2020). Однако этот подход является весьма перспективным и уже три иммунотоксина с лигандами к разным рецепторам (не РЭФР) получили одобрение для клинического применения (Kim et al., 2020). Клинические исследования проходит конструкция ТП-38, где в качестве лиганда к РЭФР выступает TGFα, а действующей части – псевдомонадный экзотоксин, который лишен способности связываться с клетками, но сохраняет свою токсическую активность. Введение этого препарата в головной мозг при помощи конвекционно-усиленной доставки привело к выраженному лечебному воздействию на глиобластому у нескольких пациентов (Sampson et al., 2008). Клинические испытания проходит также аналогичный урезанный токсин, который в качестве лиганда содержит вариабельный фрагмент антитела scdsFv как к РЭФР, так и его постоянно активированному мутанту РЭФРvIII, часто встречающемуся при глиобластомах (Chandramohan et al., 2017). У иммунодефицитных мышей с привитой глиомой человека данный препарат приводил к значительному увеличению продолжительности их жизни (Chandramohan et al., 2013).

Для выхода дифтерийного токсина из эндосом предложен механизм транслокации белка в цитозоль (Рис. 2.3.4) (Ladokhin et al., 2021). Дифтерийный токсин (535 а.о.) можно разделить на три функциональных домена: R-домен, отвечающий за связывание с рецептором и последующий рецептор-опосредованный эндоцитоз, T-домен, обеспечивающий транслокацию токсина через мембрану эндосом (далее называемый ДТокс), и каталитический C-домен. Для рецептор-опосредованного эндоцитоза в качестве лиганда выступает R-домен. Между ДТокс и C-доменом находится сайт расщепления протеазой фурином. В ранних эндосомах происходит расщепление по этому сайту и ДТокс и C-домен остаются связанными только дисульфидной связью. ДТокс состоит из девяти α-спиралей, восемь из которых окружают самую гидрофобную α-спираль. В нейтральных условиях (pH 7,4) ДТокс не обладает сродством к мембранам. Однако при закислении содержимого эндосом конформация ДТокс изменяется и гидрофобная α-

спираль начинает контактировать с водой. Это приводит к тому, что ДТокс встраивается в мембрану эндосом, образует небольшую пору, через которую С-домен транслоцируется в цитозоль. В цитозоле дисульфидная связь между ДТокс и С-доменом расщепляется тиоредоксинредуктазой и освободившийся С-домен подвергается рефолдингу в активную конформацию с помощью цитозольного шаперона Hsp90. Далее он катализирует АДФ-рибозилирование фактора элонгации 2 и приводит к клеточной гибели (Schuster et al., 2017).

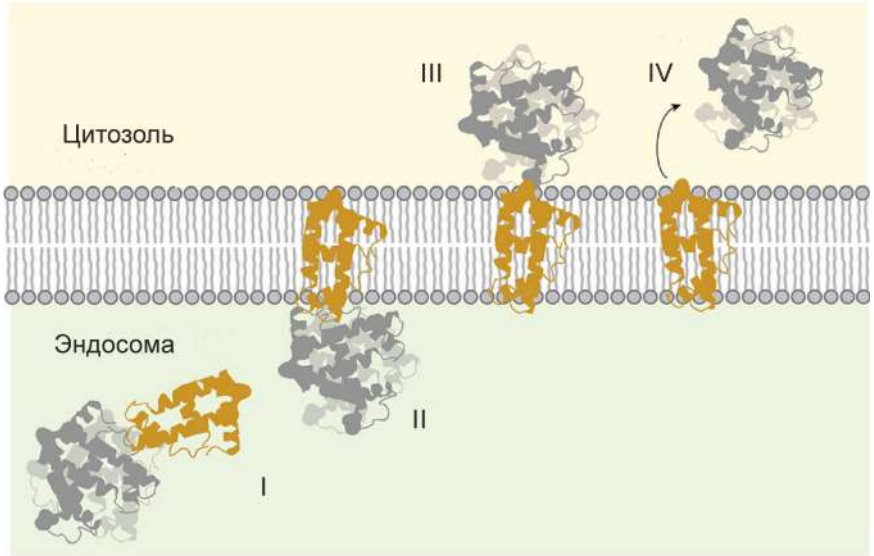


Рисунок 2.3.4. Модель прямой транслокации белка из эндосом в цитозоль, предложенная для дифтерийного токсина. Изменение конформации транслокационного домена дифтерийного токсина (ДТокс) при уменьшении pH эндосом (I), встраивание ДТокс в мембрану эндосом (II), транслокация С-домена в цитозоль (III) и расщепление связи между ДТокс и С-доменом в цитозоле (IV). Выполнено на основании рисунка из (Volta-Duran et al., 2023).

Подобный механизм выхода из эндосом предполагается и для токсина сибирской язвы из Bacillus anthracis. Однако в данном случае одна субъединица, называемая защитным антигеном, выполняет как функцию связывания с рецептором, так и функцию образования пор в липидных мембранах (Friebe et al., 2016). Этот антиген интернализуется рецептор-опосредованным эндоцитозом, а далее в ранних эндосомах претерпевает изменение конформации, что приводит к образованию пор и последующей транслокации ферментативных субъединиц через мембрану (Friebe et al., 2016). Хотя данный антиген уже использовался для транслокации некоторых белков через мембрану эндосом (Bachran et al., 2013; Liao et al., 2014), однако его использование в системах направленной доставки молекул ограничено его собственной клеточной специфичностью.

Следует отметить, что согласно предложенному на рисунке 2.3.4 механизму далеко не все системы доставки, содержащие ДТокс, смогут выходить из эндосом. Однако данный механизм для ДТокс, скорее всего, не является единственным. Так, известно, что

предельный размер молекул, способных проходить сквозь поры, образованные дифтерийным токсином, зависит от его концентрации (Sharpe and London, 1999a). Кроме того, при закислении дифтерийный токсин может олигомеризоваться на мембране, что тоже будет сказываться на размере пор (Kent et al., 2008). Учитывая, что ДТокс сам по себе не является токсичным (Fisher and Wilson, 1997), он является возможным кандидатом для использования в качестве эндосомолитического агента в различных системах доставки молекул.

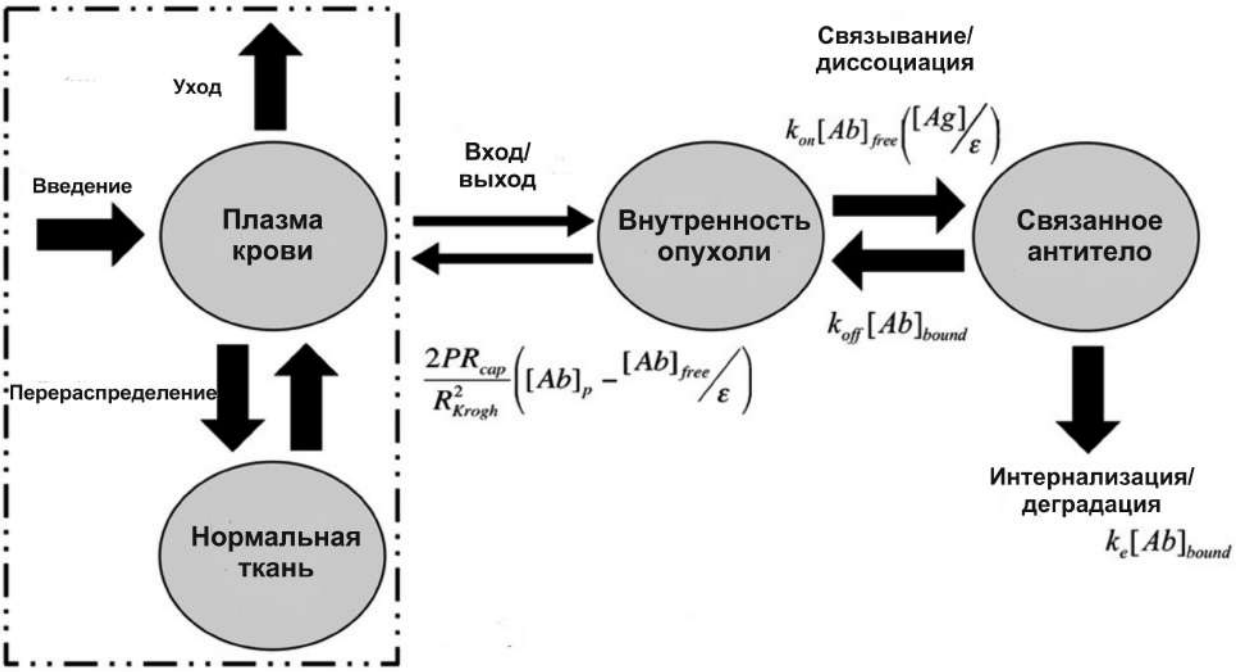
Итак, строение выбранной системы доставки молекул существенно влияет на предполагаемый механизм ее выхода из эндосом в случае рецептор-опосредуемого эндоцитоза. Одним из объектов исследования настоящей диссертационной работы являются полиплексы, которые, как считают, выходят из эндосом как за счет эффекта протонной губки, так и путем прямой дестабилизации мембран эндосом. Эндосомолитическим компонентом в этом случае являются блок-сополимеры, которые используются для компактизации генетического материала. Другим объектом диссертационного исследования являются МНТ – модульные полипептидные конструкции, использующиеся для доставки молекул в нужную часть клетки. В качестве эндосомолитического компонента в этом случае выступает ДТокс, для которого известно, что он может образовывать дефекты в мебране, размер которых зависит от его концентрации и от pH. В настоящей работе в качестве альтернативного эндосомолитического компонента МНТ использовался пептид GALA3. Для него механизм выхода из эндосом до конца не ясен. Его предшественник GALA способен при закислении образовывать поры в мембране, состоящие из 10 пептидов. Однако GALA3 заметно короче, чем GALA, поэтому механизм выхода из эндосом может отличаться. Возможно, что в этом случае GALA3 действует как детергент, приводя к выходу из эндосом по модели «ковра» (Рис. 2.3.3). В любом случае, согласно литературным данным, выбранные для настоящей работы эндосомолитические компоненты доказали свою эффективность при использовании в различных системах доставки молекул в клетку.

2.4. Компартментные модели транспорта молекул

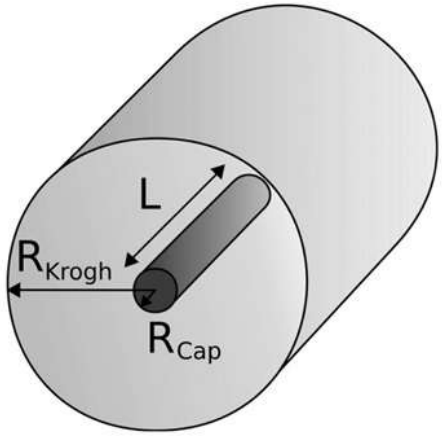
При описании процессов переноса биологически активных молекул в клетку или отдельную ее часть с помощью различных транспортных систем следует принимать во внимание то, что как сама клетка, так и многие ее части представляют собой замкнутые образования – компартменты, отделенные от окружающей среды мембранами. На уровне всего организма отдельными компартментами можно считать его органы и ткани. Для математического описания процесса переноса молекул в клетках или отдельных огранах и тканях очень удобным инструментом являются различные компартментные модели транспорта (Holz and Fahr, 2001; Sadowitz et al., 2002; Watabe et al., 2006; Thurber and Dane, 2012; Steuperaert et al., 2017). В этих моделях считается, что внутри отдельных компартментов изучаемые молекулы распределены относительно равномерно, в то время как между этими компартментами происходит некоторый обмен с определенными константами скоростей. В зависимости от решаемой задачи этими компартментами могут быть части клеток или полные клетки, части органов или тканей или органы и ткани целиком и даже весть организм в целом (Sadowitz et al., 2002; Thurber and Dane, 2012; Steuperaert et al., 2017; Tang et al., 2020). Эти модели позволяют довольно точно предсказать концентрации молекул в определенных компартментах на основании полученных экспериментальных данных, а также возможный биологический эффект доставляемых молекул (Sadowitz et al., 2002; El -Kareh and Secomb, 2003), однако, имеют два заметных ограничения (Steuperaert et al., 2017). Первым ограничением является предположение о том, что внутри каждого компартмента исследуемые молекулы распределяются однородно, а вторым то, что интерпретация полученного результата может быть затруднена, поскольку константы скоростей транспорта молекул между компартментами зачастую отражают не один физический процесс, а несколько разных.

В качестве примера компартментной модели транспорта макромолекулы внутри огранизма рассмотрим наиболее близкую к теме настоящей диссертационной работы модель поступления антител в опухоль (Thurber and Dane, 2012). Поведение выбранных в качестве основного объекта исследования настоящей работы – МНТ во многом будет похоже на поведение антител, т.к. они тоже будут специфически связываться с рецепторами, сверхэкспрессированными на поверхности опухолевых клеток, и размеры этих двух молекул тоже вполне сопоставимы (МНТ приблизительно вдвое меньше, чем антитела). Модель поступления антител в опухоль описывает транспорт антител между плазмой крови, нормальными тканями и межклеточным пространством опухоли, а также связывание антител с клетками-мишенями (Рис. 2.4.1а) (Thurber and Dane, 2012). В этой модели были введены следующие обозначения: $[Ab]_{total}$ – общая концентрация антител

(а)



(б)



$$\frac{\partial[Ab]_{free}}{\partial t} = D\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial[Ab]_{free}}{\partial r}\right) - \frac{k_{on}}{\varepsilon}[Ab]_{free}[Ag] + k_{off}[Ab]_{bound}$$

$$\frac{\partial[Ab]_{bound}}{\partial t} = \frac{k_{on}}{\varepsilon}[Ab]_{free}[Ag] - k_{off}[Ab]_{bound} - k_e[Ab]_{bound}$$

$$\frac{\partial[Ag]}{\partial t} = R_s - \frac{k_{on}}{\varepsilon}[Ab]_{free}[Ag] + k_{off}[Ab]_{bound} - k_e[Ag]$$

Граничные условия

$$-\left(\frac{\partial[Ab]_{free}}{\partial r}\right)\Bigg|_{r=R_{cap}} = \frac{P}{D}\left([Ab]_{plasma} - \frac{[Ab]_{free}}{\varepsilon}\right)$$

$$\frac{\partial[Ab]_{free}}{\partial r}\Bigg|_{r=R_{Krogh}} = 0$$

Рисунок 2.4.1. Схематические изображения компартментной модели (а) и модели цилиндра Крога (б). Стрелками показан транспорт между компартментами. Штрихпунктирная линия ограничивает двухкомпартментную модель для нормальной ткани. Показаны уравнения для модели Крога и граничные условия в ткани. Все обозначения даны в тексте. Рисунок выполнен на основании (Thurber and Dane, 2012).

внутри опухоли (вне кровеносных сосудов), $[Ab]_{free}$ – концентрация свободных молекул антител внутри опухоли, $[Ab]_{bound}$ – концентрация связавшихся с антигеном молекул антител внутри опухоли, K_d – равновесная константа диссоциации комплекса антиген-антитело, [Ag] – концентрация антигена в опухоли, ε – доля свободного (не занятого клетками) внутреннего пространства опухоли. Предполагается, что $[Ab]_{total} < [Ag]$, т.е. насыщения антителами в опухоли не достигается. Обычно насыщающие дозы составляют сотни микрограмм на мышь (Fenwick et al., 1989; Ong and Mattes, 1989; Blumenthal et al., 1991; Thurber and Weissleder, 2011) или сотни миллиграмм на человека (Schroff et al., 1987), поэтому это условие часто реализуется на практике. Другим предположением

модели является достижение локального равновесия в ткани. Это предположение тоже часто выполняется, т.к. связывание антител происходит со скоростью порядка секунд, а интернализация от минут до часов, т.е. не влияет на локальное равновесие (Thurber et al., 2008). При выполнении этих двух предположений верны следующие выражения:

$$[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{free}} = \left(\frac{K_d}{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon) + K_d} \right) [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}} \quad (2.4.1),$$

$$[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{bound}} = \left(\frac{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon)}{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon) + K_d} \right) [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}} \quad (2.4.2),$$

$$[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}} = [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{free}} + [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{bound}} \quad (2.4.3).$$

Проведенный анализ показал, что скорость связывания антител с клетками заметно выше, чем скорость диффузии антител в свободном от клеток внутреннем пространстве опухоли (Graff and Wittrup, 2003), поэтому перед распространением вглубь ткани, антитела, прежде всего, связываются с клетками, прилегающими к кровеносному сосуду. В свою очередь скорость выхода антител из кровеносных сосудов значительно меньше, чем скорости их связывания с клетками и их диффузии во внутреннем пространстве ткани (Thurber et al., 2008; Thurber and Dane, 2012). Отношение скоростей выхода молекул из кровеносного сосуда и скорости диффузии внутри ткани называется числом Биота, *Bi* (Thurber et al., 2008). Оно описывается следующим выражением:

$$Bi = \frac{2PR_{cap}}{D\varepsilon} \quad (2.4.4),$$

где P – коэффициент проницаемости стенки кровеносного сосуда, R_{cap} – радиус кровеносного сосуда и D – коэффициент диффузии. Для антител в опухоли этот коэффициент очень мал (~0,01) (Thurber et al., 2008). Это приводит к тому, что число молекул антител, поступающих в опухоль, не зависит от более быстрых процессов диффузии внутри ткани и связывания с клетками. Поэтому, хотя и распределение антител в опухоли будет гетерогенным, это не будет существенно влиять на среднюю концентрацию антител в опухоли. Это предположение подтверждается сравнением данной компартментной модели с численной моделью цилиндра Крога (Рис. 2.4.1б) (Thurber et al., 2008; Thurber and Dane, 2012). Было показано, что для антител данные модели дают идентичный результат при числе Биота меньше 0,1 (Thurber et al., 2008; Thurber and Dane, 2012). Напротив, для маленьких молекул и кислорода число Биота большое и подобная компартментная модель транспорта для них не применима (Thurber and Dane, 2012).

Если не учитывать связывание антител с клетками, то в рамках предложенной компартментной модели транспорт антител из кровеносного сосуда в опухоль можно описать следующим выражением (Thurber and Dane, 2012):

$$\frac{d[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}}}{dt} = \frac{2PR_{\mathrm{cap}}}{R_{\mathrm{Krogh}}^2}\left([\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma}} - [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{free}}/\varepsilon\right) \quad (2.4.5),$$

где $[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma}}$ – концентрация молекул антител в плазме крови, а R_{Krogh}^2 – средний радиус ткани, окружающей каждый кровеносный сосуд. Два члена в правой части этого выражения описывают поступление антител внутрь опухоли из кровеносного сосуда и их выход обратно в кровоток. Однако в опухоли антитела еще могут связываться с клетками, интернализоваться в них и подвергаться последующей деградации (Рис. 2.4.1а). Убыль концентрации антител в опухоли благодаря этим процессам можно описать константой скорости k_e. Тогда выражение для транспорта антител в опухоль примет следующий вид:

$$\frac{d[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}}}{dt} = \frac{2PR_{\mathrm{cap}}}{R_{\mathrm{Krogh}}^2}\left([\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma}} - [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{free}}/\varepsilon\right) - k_e[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{bound}} \quad (2.4.6).$$

Подставляя в него выражения (2.4.1) и (2.4.2) было получено:

$$\frac{d[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}}}{dt} = \frac{2PR_{\mathrm{cap}}}{R_{\mathrm{Krogh}}^2}\left([\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma}} - \left(\frac{K_d}{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon) + K_d}\right)\frac{[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}}}{\varepsilon}\right) - k_e\left(\frac{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon)}{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon) + K_d}\right)[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}} \quad (2.4.7).$$

Уход антител из плазмы крови обычно хорошо описывается двухэкспоненциальной зависимостью (Fujimori et al., 1989; Sung and van Osdol, 1995; Thurber and Dane, 2012):

$$[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma}} = [\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma,0}}\left(A \times \exp(-k_\alpha t) + B \times \exp(-k_\beta t)\right) \quad (2.4.8),$$

где $[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma,0}}$ – начальная концентрация молекул антител в плазме крови, k_α и k_β – константы скоростей ухода антител из крови, а A и B – соответствующие доли, отвечающие этим константам скоростей. При этом считается, что концентрация антител в крови достаточно высока, так, что можно пренебречь уменьшением этой концентрации за счет поступления в опухоль и нормальные ткани (кроме печени и почек). Подставление выражения (2.4.8) в выражение (2.4.7) и решение дифференциального уравнения дает:

$$\frac{[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}}}{[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma,0}}} = \frac{2PR_{\mathrm{cap}}}{R_{\mathrm{Krogh}}^2}\left(\frac{A}{(\Omega - k_\alpha)}\left[e^{-k_\alpha t} - e^{-\Omega t}\right] + \frac{B}{(\Omega - k_\beta)}\left[e^{-k_\beta t} - e^{-\Omega t}\right]\right) \quad (2.4.9),$$

где

$$\Omega = \frac{2PR_{\mathrm{cap}}}{\varepsilon R_{\mathrm{Krogh}}^2}\left(\frac{K_d}{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon) + K_d}\right) + k_e\left(\frac{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon)}{([\mathrm{Ag}]/\varepsilon) + K_d}\right) \quad (2.4.10).$$

Накопление в опухоли, органе или другой ткани часто выражают в проценте от введенной дозы на грамм ткани, %ID/g:

$$\%\mathrm{ID}/g = \frac{[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{total}} \times 100\%}{[\mathrm{Ab}]_{\mathrm{plasma},0} \mathrm{V}_{\mathrm{plasma}} \rho_{\mathrm{tissue}}} \quad (2.4.11),$$

где плотность ткани ρ_{tissue} считалась ~ 1 г/мл, а объем плазмы крови $\mathrm{V}_{\mathrm{plasma}}$ ~ 2 мл для мыши и ~ 3 л для человека (Thurber and Dane, 2012).

Сравнение результатов, полученных по накоплению в опухоли стандартных антител IgG к РЭФР и одноцепочечных вариабельных фрагментов антител scFv с помощью числовой модели цилиндра Крога и предложенной компартментной модели, показали их хорошее совпадение друг с другом в случае отсутствия насыщения рецепторов опухолевых клеток антителами (Thurber and Dane, 2012). Результаты, полученные этими двумя моделями для неспецифических антител тоже хорошо совпадали (Thurber and Dane, 2012). В случае насыщения рецепторов опухоли антителами, вновь поступающие молекулы остаются свободными и постепенно выходят назад в кровоток, т.е. ведут себя как неспецифичные антитела. Компартментная модель в данном случае дает завышенные значения накопления антител в опухоли (Thurber and Dane, 2012).

Используя известные из литературы параметры, входящие в выражения (2.4.9) и (2.4.10), было проведено сравнение экспериментальных данных, полученных по накоплению меченных радиоактивно антител в ксенографтах опухолей, с предсказанными данной моделью данными (Рис. 2.4.2) (Thurber and Dane, 2012). Экспериментальные кинетики накопления в опухоли были получены для трех антимеланомных IgG и одного неспецифического IgG в опухолях, состоящих из клеток линии SK-MEL-2 или M21 (Рис. 2.4.2а и 2.4.2в) (Shockley et al., 1992). Практически для всех антител и для двух этих клеточных линий данные экспериментальные зависимости хорошо предсказываются предложенной компартментной моделью (Рис. 2.4.2б и 2.4.2г). В частности значения %ID/g и характерные времена довольно хорошо совпадают. Единственное заметное отличие это для линии SK-MEL-2 и антител IND1: эксперимент дает заметно меньшие значения %ID/g, чем предсказанные моделью (ср. Рис. 2.4.2а и 2.4.2б). Однако это может быть связано с тем, что антигенов к IND1 на поверхности SK-MEL-2 в четыре раза меньше, чем на поверхности M21, поэтому может нарушаться условие отсутствия насыщения антителами антигенов в опухоли, а значит, модель может давать завышенные значения накопления (Thurber and Dane, 2012).

Таким образом, не смотря на довольно сильную гетерогенность распределения молекул антител в опухоли, их суммарное накопление хорошо описывается простой механистической компартментной моделью. Компартментные модели являются удобным

инструментом как выявления скорость-лимитирующих стадий транспорта крупных молекул в клетке, ткани или во всем организме, так и сравнения различных систем доставки по их эффективности. Анализ полученных экспериментальных данных с помощью этих моделей позволяет выявлять проблемные места изучаемых систем доставки и оценивать успешность процесса оптимизации строения этих систем.

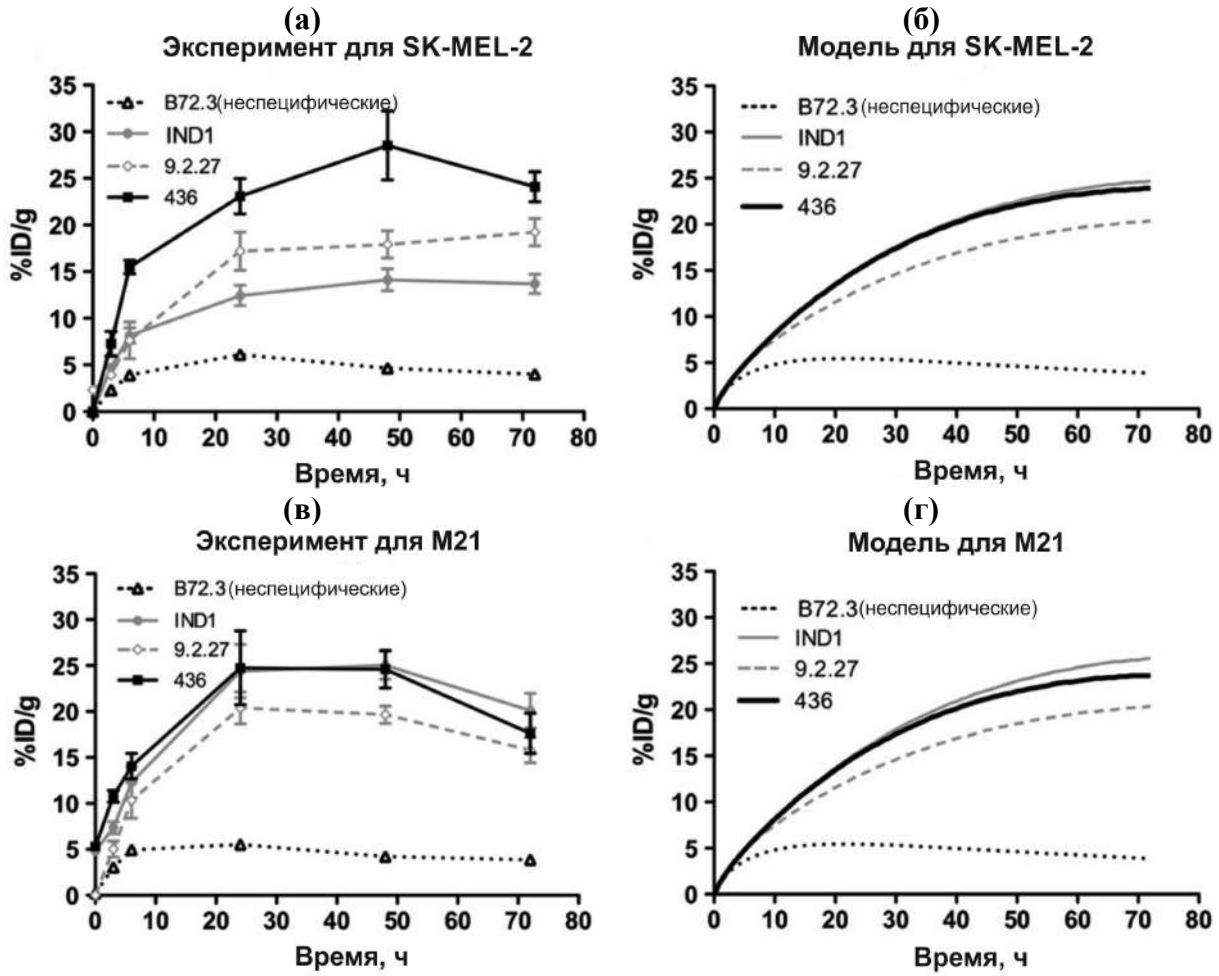


Рисунок 2.4.2. Зависимости накопления в небольших ксенографтах от времени четырех противомелономных IgG. Экспериментальные зависимости (Shockley et al., 1992) накопления для ксенографтов SK-MEL-2 (а) и M21 (с). Предсказанные с помощью компартментной модели зависимости накопления для ксенографтов SK-MEL-2 (б) и M21 (г). Рисунок выполнен на основании (Thurber and Dane, 2012).

Итак, многие биологически активные вещества проявляют наибольшую активность только в определенной части клетки. Эта часть, как правило, представляет собой замкнутое образование – компартмент. Для того чтобы этому веществу попасть в нужный компартмент, ему нужно преодалеть целый ряд барьеров, таких как стенка сосудов, мембрана клеток, мембрана эндосом и мембрана выбранного клеточного компартмента. Самостоятельно это могут проделать только низкомолекулярные, незаряженные вещества, что очень сильно ограничивает круг доступных внутриклеточных мишеней. Все остальные молекулы, такие, например, как нуклеиновые кислоты и

антителоподобные молекулы, для попадания в нужный компартмент нуждаются в определенной системе доставки. Эти системы доставки, представляющие собой, как правило, различные молекулярные конструкции, способны доставлять выбранное вещество в клетки как неспецифически, т.е. не зависимо от типа клеток, так и специфически, т.е. в определенного типа клетки. Широко распространенным примером неспецифических конструкций являются полиплексы – комплексы положительно заряженных полимеров с нуклеиновыми кислотами. Часто используются полиплексы на основе полиэтиленимина, которые также могут включать и другие молекулы, уменьшающие неспецифические взаимодействия, например, полиэтиленгликоль, и способствующие проникновению их в клетки, например, проникающие в клетку пептиды. Не смотря на целый ряд преимуществ полиплексов перед вирусными системами доставки, они, как правило, обладают одним существенным недостатком – низкой эффективностью трансфекции клеток. Для улучшения этой эффективности очень важно установить ключевые этапы процесса транспорта полиплексов в клетку и как на эти этапы влияет строение полиплексов. Специфические системы доставки для проникновения в клетки используют эндоцитируемые рецепторы, сверхэкспрессированные на выбранном типе клеток. Для большинства типов опухолевых клеток такими рецепторами являются рецепторы эпидермального фактора роста (РЭФР), экспрессия которых на клетках существенно увеличивается по мере возникновения и прогрессии опухолей. Помимо повышенной экспрессии, этот рецептор обладает высокой скоростью интернализации, что делает его идеальным кандидатом для специфической доставки молекул с помощью различных молекулярных конструкций. Если в качестве лиганда к этому рецептору использовать в этих конструкциях антогонисты к ЭФР, такие, например, как антителоподобная молекула аффибоди Z1907, то можно добиться интернализации этого рецептора без его активации. Особенно это важно для опухолевых клеток, где вызванная активацией РЭФР пролифирация клеток является нежелательной при лечении опухолей. После попадания в клетки, транспортные молекулярные конструкции часто оказываются в замкнутых мембранных образованиях – эндосомах, а затем поступают в лизосомы, где они вместе с доставляемым веществом подвергаются деградации. Чтобы избежать этого и доставить вещество в цитозоль, в состав транспортных конструкций должен входить компонент, позволяющий им выходить из эндосом. В зависимости от строения этого компонента механизмы выхода могут существенно отличаться. Так, например, для выхода полиплексов и липоплексов из эндосом предложен «эффект протонной губки». Липоплексы могут также выходить из эндосом путем образования гексагональной фазы H_{II} и прямого слияния мембран. Однако, для большинства эндосомолитических

компонентов, таких как катионные пептиды, положительно заряженные полимеры, различные эндосомолитические пептиды предполагается их выход из эндосом путем дестабилизации мембран и образование в них дефектов по моделям «бочонка» или «ковра», а также тороидальной модели. Образование дефектов в мембранах или пор предполагается и для некоторых токсинов, например, дифтерийного. В последнем случае в качестве эндосомолитического компонента выступает транслокационный домен, который осуществляет pH-зависимую дестабилизацию мембран эндосом и транслокацию каталитического домена через мембрану. Таким образом, система доставки локально-действующих веществ в клетку должна содержать лиганд к сверхэкспрессированному на поверхности клеток интернализуемому рецептору, эндосомолитический компонент для выхода из эндосом, а также компонент, позволяющий осуществлять доставку в выбранный компартмент. Примером такой специфической системы доставки молекул, доказавшей свою высокую эффективность, являются предложенные академиком А.С. Соболевым (ИБГ РАН, МГУ им. Ломоносова) модульные нанотранспортеры (МНТ) (Sobolev, 2008; Sobolev, 2009a; Sobolev, 2009b). В исходном варианте они нацелены на доставку веществ в ядра опухолевых клеток, для чего в их состав включен оптимизированный сигнал ядерной локализации. В качестве лигандного модуля в них выступал ЭФР или αМСГ, эндосомолитического модуля – транслокационный домен дифтерийного токсина, а все модули вместе объединялись модулем-носителем гемоглобиноподобным белком *E.coli*. Не смотря на то, что МНТ показали высокую эффективность доставки молекул в ядра, до конца не было выяснено взаимное влияние модулей и возможность оптимизации их строения с целью повышения эффективности доставки молекул не только в клетки-мишени, но и в выбранную ткань организма из кровотока. Для выяснения того, как строение полиплексов или МНТ влияет на разные стадии процесса транспорта молекул в клетку хорошо подходят компартментные математические модели транспорта. Они позволяют выявить ключевые стадии этого процесса, а также провести оптимизацию строения выбранных молекулярных транспортных конструкций с целью повышения общей эффективности доставки молекул в выбранные ткань организма, клетку-мишень и внутриклеточный компартмент.

3. Материалы и методы исследования

3.1. Культуры клеток

В работе использовали следующие клеточные культуры: карциномы шейки матки человека HeLa, меланомы мыши линий B16-F1 и Клаудмана S91 (клон M3), эмбриональных клеток почек человека HEK293, карциномы легкого человека A549 и Calu-1, мукоэпидермоидной карциномы легкого человека NCI-H292, эпидермоидной карциномы человека линии A431, макрофагов мыши линии RAW264.7, легочной карциномы Льюиса 3LL (или LLC-1), карциномы печени Hepa 1-6 и клетки печени AML12, Vero – эпителия почки, взятой у африканской зеленой мартышки. Все клеточные линии вели согласно рекомендациям источников.

3.2. Синтез блок-сополимеров на основе полиэтиленимина (ПЭИ) и полиэтиленгликоля (ПЭГ)

Для синтеза блок-сополимеров использовали схему, предложенную Климан с соавторами (Kleemann et al., 2005). Эта общая схема представлена на Рис. 3.2. Для синтеза использовали линейный бифункциональный ПЭГ (молекулярная масса 1395 Да), содержащий малеимидую и N-гидроксисукцинимидную эфирную группы («Quanta BioDesign», США) и ПЭИ с молекулярной массой 25 кДа («Polysciences», США). В стеклянном флаконе к необходимым навескам бифункционального ПЭГ добавляли раствор ПЭИ (2,83 мг/мл) в 0,1 М боратном буфере при pH 5,5 для получения растворов с молярными соотношениями ПЭГ:ПЭИ от 4,5 до 30. Реакцию проводили в течение 4 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После реакции доводили pH раствора до 7 с помощью 10 М NaOH.

Далее конъюгировали ПЭИ-ПЭГ выбранным пептидом, в качестве которого выступал TAT-пептид (GRKKKRRQRC) или MK1c пептид (CGYGPKKKRKVSGSGSSIISHFRWGKPV), специфичный для меланокортиновых рецепторов первого типа (синтезированы «Русбиолинк», Россия). Для конъюгации использовали водный раствор пептида концентрации 12 мг/мл. Его добавляли к ПЭИ-ПЭГ чтобы с помощью реакции сульфгидрильных групп пептида с малеимидными группами ПЭИ-ПЭГ получить блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ-пептид (Рис. 3.2). Реакцию проводили в течение 2 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее оставляли на ночь в холодильнике при 4 °C при постоянном перемешивании. Удаление не вступивших в реакцию ПЭГ и пептида осуществляли с помощью ячейки Amicon Ultracel-10k («Millipore», США), удаляющей при центрифугировании молекулы с молекулярной массой меньше 10 кДа.

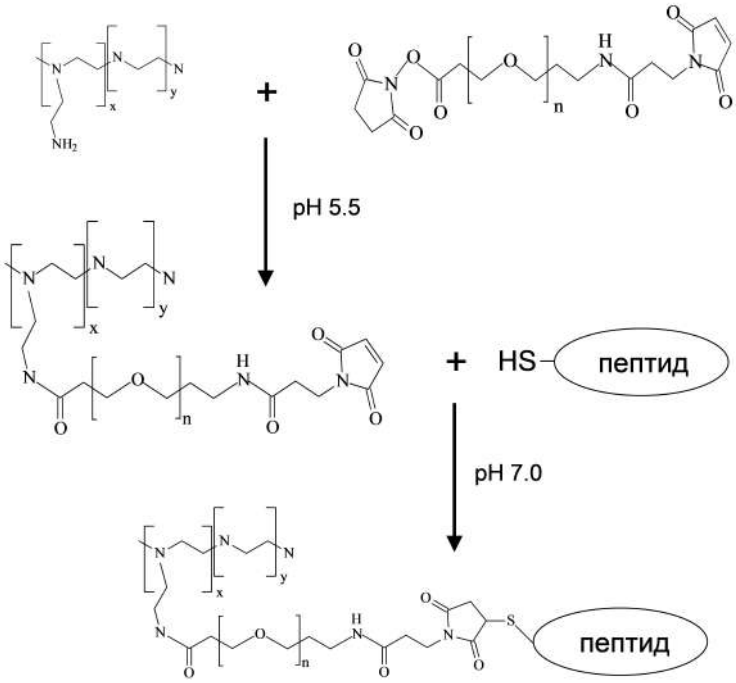


Рисунок 3.2. Общая схема синтеза блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-пептид.

Концентрацию ПЭИ в полученных блок-сополимерах ПЭИ-ПЭГ-пептид определяли спектрофотометрически путем образования медных комплексов иминогрупп (Kunath et al., 2002). А концентрацию ПЭГ в этих блок-сополимерах устанавливали по оптическому поглощению комплекса иодида бария с ПЭГ (Gong et al., 2007). Чтобы определить содержание пептида в блок-сополимерах ПЭИ-ПЭГ-пептид, при их синтезе в раствор добавляли аликвоты очищенного гель-фильтрацией пептида с радиоактивной (^{125}I) или флуоресцентной (Cy3 или Cy5) меткой. Определенные таким образом соотношения TAT:ПЭИ в блок-сополимерах лежали в диапазоне от 0,40 до 0,95. Работы были проведены совместно с А.А. Розенкранцом, А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым и М.О. Дурымановым.

3.3. Получение полиплексов

Для получения полиплексов использовали стерильные растворы блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-пептид и исследуемой плазмиды (хранились при температуре -40 °C), а также 10% стерильный раствор глюкозы (DNAse, RNAse, Protease Free Grade) и 10 мМ HEPES буфер (pH 7,4). Чтобы получить полиплексы, раствор блок-сополимера быстро добавляли к ДНК в 5 мМ HEPES буфере (pH 7,4), содержащем 2,5% глюкозы, перемешивали на вортексе и 20-60 минут инкубировали при комнатной температуре перед их использованием. Для изучения влияния соотношения азота ПЭИ к фосфату ДНК (N/P) на эффективность трансфекции, концентрацию раствора ПЭИ-ПЭГ-TAT при постоянной концентрации ДНК (20 мкг/мл) варьировали так, чтобы получить отношения N:P от 10 до

40. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым и М.О. Дурымановым.

3.4. Исследование размеров и электрофоретической подвижности полиплексов с помощью динамического светорассеяния

Гидродинамический диаметр частиц полиплексов измеряли на приборе ZetaPALS («Brookhaven Instruments», США) в 10 мМ HEPES буфере (pH 7,0), содержащем 2,5% глюкозы. При этом использовали программу BIC Particle Sizing Software. Калибровка прибора была проведена на полимерных наносферах диаметра 92 ± 3,7 нм (Nanoshphere size standards, «Duke Scientific», США). Регистрацию рассеянного света проводили под углом 90° в 40 мкл кварцевой кювете при 25 °С. Скорость счета лежала в диапазоне от 10 до 370 кГц. Проводили как минимум семь циклов измерений продолжительностью 240 секунд каждый. Результаты анализировали с помощью прилагаемой к прибору программы MSD (мультимодального распределения по размеру). Все вычисления проводились в предположении, что частицы имеют сферическую форму. Для используемого 2,5% раствора D-глюкозы на основании литературных данных (Maier et al., 1994; Kohl et al., 1995; Bui and Nguyen, 2004) вычислили коэффициенты преломления и вязкости, которые оказались равны 1,334 и 0,984 сП, соответственно.

Электрофоретическую подвижность измеряли при 25 °С в стандартной электрофоретической ячейке, вмещающей 1,7 мл образца, на приборе ZetaPALS («Brookhaven Instruments», США) в буфере: 2,5% D-глюкоза, 2,5 мМ HEPES, 10 мМ PIPES, pH 7. При этом использовали программу PALS Zeta Potential Analyzer. ζ-потенциал рассчитывали на основании электрофоретической подвижности, используя приближение Смолуховского. В качестве ζ-потенциала принимали среднее значение, полученное в результате 10–20 циклов измерений по 20–30 измерений в каждом. Если ζ-потенциал одного измерения сильно отличался от среднего значения в цикле и имел $\chi^2 > 0{,}02$, то его исключали из рассмотрения. Кроме указанных выше коэффициентов преломления и вязкости раствора, использовали коэффициент диэлектрической проницаемости – 78,54. Этот коэффициент взят таким же, как у воды при 25 °С, т.к. согласно (Hochtl et al., 2000) в диапазоне концентраций 0–0,41 М глюкозы он постоянен. Для определения ζ-потенциала использовали метод PALS (Phase Analysis Light Scattering, анализ фазы рассеянного света), где исследуется сдвиг фаз рассеянного под углом 15° луча света, относительно контрольного луча света. На электрофоретическую ячейку подается переменное синусоидальное напряжение. В результате получается синусоидальная зависимость сдвига фазы рассеянного на образце света от времени, описание которой теоретической

зависимостью дает электрофоретическую подвижность частиц. Измерения были проведены совместно с А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым и М.О. Дурымановым.

3.5. Изучение размеров полиплексов с помощью атомно-силовой микроскопии

Изображения полиплексов получали на мультимодальном атомно-силовом микроскопе с контроллером Nanoscope IIIa («Veeco Instruments», США), оснащенном J-сканером (максимальный размер скана 160 × 160 мкм) и жидкостной ячейкой Tapping Mode Liquid Cell («Veeco Instruments», США), в режиме прерывистого контакта. Измерения проводили в буфере: 2,5% D-глюкоза, 2,5 мМ HEPES, pH 7. Использовали кантилеверы NP-S («Digital Instruments», США), имеющие номинальную константу жесткости 0,06 Н/м и радиус кривизны зонда 10 нм. На свежерасщепленную слюду наносили 100 мкл раствора исследуемого образца полиплексов (1,8–7,2 мкг/мл по ДНК) и инкубировали при комнатной температуре 15 мин. Затем устанавливали жидкостную ячейку и промывали свежим буфером для удаления несвязавшегося со слюдой образца. Все изображения получали с разрешением 512 × 512 точек и частотой сканирования 2–3 Гц. Частота вынужденных колебаний кантилевера составляла ~ 9 кГц.

С помощью программного обеспечения, прилагающегося к атомно-силовому микроскопу, обрабатывали изображения размером 10 × 10 мкм, полученные в семи разных местах образца. Полученные изображения выравнивали с помощью процедуры Flatten для удаления наклона и изгиба образца, а затем удаляли шумные линии с помощью процедуры Erase scan line. Сглаживания изображений не проводилось, т.к. оно изменяет наблюдаемые размеры полиплексов. Анализ высот частиц и площадей их поперечного сечения, параллельного плоскости образца, проводили с помощью процедур Particle Analysis и Grain Size. Чтобы исключить большую часть загрязнений образца и существенную долю молекул свободных блок-сополимеров (со средним диаметром 25,5 нм и высотой 4 нм) в рассмотрение брались только частицы, выше 7 нм. На этой же высоте проводилось поперечное сечение частиц полиплексов. Для каждого типа полиплекса общее число обработанных частиц было от 168 до 2067.

Для анализа распределения по размеру полученных частиц полиплексов строились гистограммы, отображающие частоту встречаемости полиплексов определённой площади поперечного сечения на 1 мкм^2 площади слюды. Для исключения загрязнений буфера и части агрегатов из молекул блок-сополимеров учитывались только частицы имеющие площадь поперечного сечения больше 1000 нм^2. Столбцы гистограммы представляют собой группы частиц определённого размера, отличающиеся друг от друга по площади поперечного сечения не более чем на 2000 нм^2. Вклад свободных частиц

блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ учитывался путем построения аналогичной гистограммы для этого блок-сополимера при той же концентрации (377 нМ). По этим гистограммам определяли число частиц на 1 мкм^2 поверхности слюды, имеющих площадь поперечного сечения 400–1000 нм^2, что совпадает с размерами агрегатов из блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ-ТАТ. Далее находили отношение числа частиц размером 400–1000 нм^2 для образца блок-сополимера и полиплекса, n. Затем проводили коррекцию гистограммы для образца блок-сополимера, поделив высоту каждого столбца на n, что позволяет учесть различие концентраций свободных молекул блок-сополимеров в образцах полиплекса и блок-сополимера. Эта исправленная гистограмма далее вычиталась из гистограммы, полученной для исследуемого полиплекса.

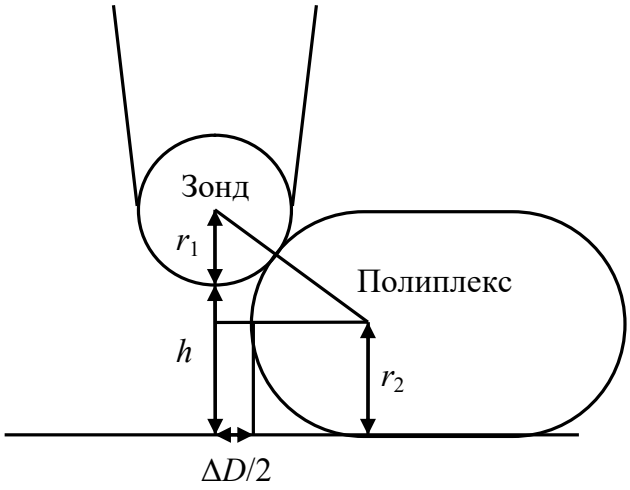


Рисунок 3.5.1. Схема для учета кажущегося уширения размеров частицы полиплекса за счет ограниченных размеров зонда АСМ. Показаны: ΔD – уширение диаметра полиплекса, r_1 – радиус кривизны зонда, $2r_2$ – высота частицы полиплекса, h – высота, на которой измеряется диаметр частицы полиплекса.

Для определения эффективного диаметра полиплексов, прежде всего, учитывали уширение размеров полиплекса за счет зонда используемого кантилевера (Рис. 3.5.1). При этом известно, что средняя высота частиц полиплексов, $2r_2$, составляла 17,0 ± 1,2 нм, номинальный радиус кривизны зонда, r_1, был равен 10 нм, а высота, на которой измерялся диаметр полиплекса, h, была равна 7 нм. Тогда увеличение диаметра частицы полиплекса за счет зонда АСМ можно рассчитать по следующей формуле:

$$\Delta D = 2 \cdot \left\{ (r_1 - r_2 + h) \cdot \sqrt{\left(\frac{r_1 + r_2}{r_1 - r_2 + h} \right)^2 - 1} - r_2 \right\} \qquad (3.5.1).$$

По этой формуле определили, что за счёт радиуса кривизны зонда кантилевера диаметр полиплексов уширяется на 16 нм. Далее учли деформацию молекул полиплекса на слюде. Считая, что молекулы полиплекса в растворе имеют сферическую форму, получаем, что их средний диаметр в растворе равен

$$D = 2 \cdot \sqrt[3]{\frac{3 \cdot D_n^2 \cdot r_2}{8}} \qquad (3.5.2),$$

где D_n – диаметр молекул полиплекса на слюде. Все расчеты выполнены в программе Origin6.0.

3.6. Трансфекция клеток полиплексами

Одиннадцать линий клеток трансфицировали полиплексами, состоящими из блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ и плазмиды, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (EGFP). Для изучения эффективности трансфекции за 24 часа до экспериментов клетки высеивали на 48-луночные планшеты с плотностью 10 000 клеток на лунку. В каждую лунку, содержащую 500 мкл свежей среды, добавляли 12,5 мкл образца полиплексов, полученного, как описано пункте 3.3. Клетки инкубировались с полиплексами без смены среды в течение 48–72 часов. Наличие флуоресценции EGFP в клетках определяли с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) с использованием системы LSM-510 META NLO («Carl Zeiss», Германия). С помощью этого метода определяли процент трансфицированных полиплексами клеток. Эксперименты проводили в трех повторах. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, М.О. Дурымановым, А.А Розенкранцом и Г.А. Трусовым.

3.7. Изучение внутриклеточного транспорта и распаковки полиплексов

Для изучения транспорта и распаковки полиплексов, прежде всего, плазмидную ДНК связывали с флуоресцентной меткой. В качестве ДНК выступала плазмида phTERT-TK длиной 4,7 т.п.н., которая кодировала тимидинкиназу вируса простого герпеса под промотором теломеразы человека. Данную ДНК биотинилировали с использованием биотин-11-dUTP и набора Биотин-Рэндомпрайм («Силекс», Россия). Далее образовывали комплекс биотинилированной ДНК со стрептавидином, конъюгированным с квантовыми точками Qdot605 («Invitrogen», США). Для этого, 2,16 мкл 40 нМ Qdot605, конъюгированных со стрептавидином, добавляли к 9 мкл 40 мкг/мл биотинилированной ДНК, затем перемешивали и инкубировали 15 минут при комнатной температуре (Ho et al., 2006). При двукратном мольном избытке ДНК по сравнению с квантовыми точками с помощью электрофореза в 0,6% агарозном геле было показано, что все квантовые точки участвуют в образовании комплекса с ДНК.

Блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ-ТАТ использовали для мечения N-сукцинимидильным эфиром Alexa Fluor647 («Invitrogen», США). В данном блок-сополимере соотношения ПЭГ/ПЭИ и ТАТ/ПЭИ были 1,74 и 0,53, соответственно. Флуоресцентный краситель растворяли в диметилсульфоксиде и добавляли в 10 кратном молярном избытке к

раствору блок-сополимера при pH 7. Полученную смесь инкубировали при интенсивном перемешивании в течение 12 часов в темноте, а затем еще 2 часа при pH 8 (Chen et al., 2008). Блок-сополимер с присоединенным флуоресцентным красителем отделяли от свободного красителя путем диализа против 25 мМ боратного буфера, pH 7,5. Степень мечения флуорофором блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ определяли на спектрофотометре по поглощению AlexaFluor647 при 647 нм. Она составила 5 молекул красителя на молекулу блок-сополимера.

Флуоресцентно-меченные полиплексы (N/P = 40) готовили следующим образом. Смешивали 2,27 мкл 8,38 мкМ ПЭИ-ПЭГ-ТАТ с присоединенным AlexaFluor647 с 2,83 мкл 20,1 мкМ немеченого ПЭИ-ПЭГ-ТАТ, а затем добавляли к 4,5 мкл 10 мМ HEPES буфера, pH 7,0, содержащего 10% глюкозу. Далее к полученной смеси добавляли 11,16 мкл 40 мкг/мл плазмидной ДНК, меченной квантовыми точками Qd605, перемешивали и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Сходство меченных и немеченых полиплексов со статистически значимым коэффициентом корреляции r = 0,96 было показано путем сравнения частотных распределений площадей их сечений, проведенное с помощью АСМ.

Для трансфекции меченными полиплексами использовали клетки карциномы легких человека A549 и Calu-1 и клетки мышиной меланомы Клаудмана S91 (клон M3). Для этого клетки высевали в камеры POCmini («Cell Cultivation System», Германия) по 20000-50000 в 1 мл среды DMEM/F12 с 10% сывороткой и культивировали при 37 °C и 5% CO_2. Через сутки клетки отмывали и добавляли 700 мкл среды IMEM (Improved MEM Zinc Option) без индикатора с 10% сывороткой, 8 мМ HEPES и 0,15% $NaHCO_3$. К клеткам добавляли флуоресцентно-меченный полиплекс (N/P = 40) в количестве 0,36 мкг по ДНК. Для визуализации клеточных ядер и лизосом/эндосом за час до съемки к клеткам добавляли 5 мкг/мл красителя Хёхст 33258 и 50–75 нМ LysoTracker Green DND-26. Непосредственно перед съемкой эндоцитоз в клетках блокировали путем охлаждения камеры до температуры 11-12 °C. Отбирали в отдельную пробирку культуральную среду с полиплексами, затем, для визуализации плазматической мембраны клетки добавляли на 10 минут 5 мкг/мл лектина из проростков пшеницы (WGA), конъюгированного с Cy3, дважды отмывали клетки средой IMEM и снова добавляли к ним исходную культуральную среду с полиплексами.

Спустя 0,5, 1, 2,5, 4, 8 и 16 часов после трансфекции клеток меченными полиплексами получали изображение этих клеток с помощью мультифотонного конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM-510 Meta NLO («Carl Zeiss», Германия), оснащенного объективом ×63 (NA = 1,4) и охлаждаемой приставкой для

поддержания температуры 10–12 °C. Краситель Хёхст 33258 возбуждали в двухфотонном режиме с помощью фемтосекундного лазера MaiTai Broadband («Spectra-Physics», США) при длине волны 760 нм. Регистрацию флуоресценции Хёхст 33258 проводили в диапазоне волн 435–485 нм. Краситель LysoTracker возбуждали линей 488 нм аргонового лазера, а флуоресценцию регистрировали при 500–530 нм. Квантовые точки возбуждали лазером с длиной волны 458 нм, а собственную флуоресценцию регистрировали в полосе 590–612 нм, в то время как FRET на Alexa 647 регистрировали в полосе 650–710 нм. Изображения клеток получались в режиме оптических срезов (минимум 20 оптических срезов на поле).

Для изучения внутриклеточной локализации и распаковки полиплексов использовали алгоритм пиксельного анализа изображения (Chen et al., 2008). Для каждого времени выбирали случайным образом не менее 30 клеток, что, как было показано ранее (Akita et al., 2004), достаточно для получения статистически значимого результата. Границы клеток определяли как по проходящему свету, так и по их прокраске с помощью Cy3-WGA. Общие объемы флуоресценции квантовых точек на клетку рассчитывали суммированием вокселей (трехмерных пикселей) в программе ImageJ с помощью плагина ObjectCounter3D («Institut Curie», Франция). Является ли ДНК, меченная квантовыми точками, упакованной в полиплексы или распакованной определяли по наличию или отсутствию FRET между квантовыми точками и AlexaFluor647, соответственно. Внутриклеточную локализацию частиц полиплексов определяли путем колокализации квантовых точек со специфическими красителями плазматических мембран, ядер или эндосом/лизосом. Колокализацию определяли в программе ImageJ с помощью плагина Colocalization («Institut Jacques Monod», Service Imagerie, Франция). Воксельные объемы полиплексов в цитозоле вычисляли путем вычитания суммы воксельных объемов полиплексов в ядре, эндосомах/лизосомах и на плазматической мембране из общего воксельного объема полиплексов на клетку. Работы были проведены совместно с А.В. Уласовым, М.О. Дурымановым, А.А. Розенкранцом и Г.А. Трусовым.

3.8. Получение модульных нанотранспортеров (МНТ)

Плазмиды, кодирующие МНТ, были получены А.В. Уласовым, используя более ранние конструкции, или заказаны в GenScript (www.genscript.com). Ранние генно-инженерные конструкции были получены О.В. Сергиенко и В.Г. Луниным. Плазмидами, кодирующими МНТ, трансформировали клетки E. coli. При этом для разных МНТ использовали штаммы Ros(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysS, Ros(DE3), BL21(DE3), CleaColi и C3029. Штаммы Ros(DE3)pLysS и BL21(DE3)pLysS любезно предоставлены Ю.В.

Шидловским (ИБГ РАН). Выделение и очистка конкретного МНТ могла довольно сильно отличаться от стандартного протокола в целях увеличения его выхода и чистоты.

Стандартный протокол выделения МНТ был следующим. Небольшое количество клеток, замороженных в 10% глицерине, бактериальной петлей вносили в 50 мл стерильной культуральной среды следующего состава: 25 г LB (Luria broth base - Miller's LB broth base), 100 мкг/мл натриевой соли ампициллина, 1 л деионизованной воды. Отбирали 25 мл ночной культуры, разводили её в 40 раз культуральной средой, и ставили на качалку при +37 °C, перемешивая с частотой 170 об/мин на 3–4 часа до достижения значения оптической плотности 0,8-0,9 при длине волны 550 нм. В суспензию вносили индуктор изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до 500 мкМ и инкубировали при температуре +16 °C в течение 20 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 30 минут при температуре 4 °C и 9000 об/мин в центрифуге Beckman J2-HS. Клеточный осадок хранили при температуре -40 °C. Полученную бактериальную биомассу с 2 л питательной среды суспендировали на льду в 60 мл лизирующего буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, pH=8,0, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 50 КИЕ/мл апротинин. Затем добавляли лизоцим до концентрации 10 мг/мл. Лизат перемешивали при температуре +4 °C. Через 1 час в лизат добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 0,5%. После чего лизат перемешивали еще 2 часа при температуре +4 °C. Лизат центрифугировали в течение 30 минут при 19000 об/мин при +4 °C в центрифуге Beckman J2-HS. Супернатант наносили на колонку HisTrap™ High Performance (Cytiva) объемом 5 мл на скорости 0,5 мл/мин. После этого колонку промывали 200 мл буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1% глицерин, 0,5% Тритон X-100, 50 мл буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, pH 8,0 и 50 мл буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 8,0. МНТ элюировали с колонки на скорости 0,5 мл/мин элюирующим буфером: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, pH 8,0, 700 мМ имидазол. Фракции, содержащие искомый МНТ, диализовали 3 часа против 1 литра 10 мМ натрий-фосфатного буфера (PBS: 10 мМ Na_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 8,0). Диализный буфер сменяли дважды и диализовали каждый раз не менее трех часов. Раствор МНТ центрифугировали в течение 15 мин при температуре +4 °C и 10000 об/мин. Для определения концентрации МНТ, его смешивали с реактивом Бредфорда (0,01% Кумасси G-250, 5% этиловый спирт, 8,5% ортофосфорная кислота) в соотношении 1:15. Через 5-10 минут измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 595 нм на многофункциональном гибридном ридере Synergy 4 («BioTek», США). Концентрацию белка определяли по предварительно построенной калибровочной кривой зависимости

оптического поглощения от концентрации БСА с аппроксимацией полиномом второй степени. Однородность и молекулярную массу выделенного и очищенного транспортера определяли методом электрофореза белков в полиакриламидном геле.

Чистота полученных МНТ обычно была не менее 80–90%. МНТ, использованные в настоящей работе, были получены совместно с Т.Н. Лупановой, А.В. Уласовым, А.С. Сабуровым и другими коллегами нашей лаборатории.

3.9. Атомно-силовая микроскопия МНТ

Изображения МНТ на слюде получали на мультимодальном атомно-силовом микроскопе с контроллером Nanoscope IIIa («Veeco Instruments», США), оснащенном J-сканером (максимальный размер скана 160 × 160 мкм) и жидкостной ячейкой Tapping Mode Liquid Cell («Veeco Instruments», США), в режиме прерывистого контакта. Перед измерениями на металлический диск диаметром 1,6 см, поставляемый «Veeco Instruments», приклеивали кусочек слюды. На свежерасщепленную слюду наносили каплю из 100 мкл раствора МНТ с концентрацией 3 нМ. Далее инкубировали при комнатной температуре 15 минут и устанавливали жидкостную ячейку микроскопа. Затем промывали 10 мМ фосфатным буфером, чтобы удалить весь не связавшийся со слюдой МНТ. Для измерения использовали кантилевер SNL (sharp nitride lever, «Veeco Instruments», США) с номинальной константой жесткости 0,06 Н/м и радиусом кривизны зонда 2–3 нм. Во время проведения экспериментов силу давления на образец минимизировали. Измерения в режиме прерывистого контакта проводили при скорости сканирования 15 Гц и комнатной температуре. При этом вынужденная чистота колебаний кантилевера была около 10 кГц. Получали изображения размером 1,5×1,5 мкм и разрешением 512×512 точек. Данные изображения выравнивали и сглаживали, используя собственную программу микроскопа. Частичное удаление уширения изображения частиц за счет кривизны зонда или деконволюцию проводили в программе Gwyddion 2.41 (http://gwyddion.net). В этой же программе проводили и всю дальнейшую статистическую обработку. Помечали отдельные частицы или зерна, используя порог в 60% от средней высоты частиц. При таком выборе порога, отдельные зерна близки по размерам к реальным размерам МНТ. Для каждого зерна определяли его среднюю высоту, площадь его проекции на слюду, его ширину (минимальное расстояние в горизонтальной плоскости, через которое зерно может пройти) и длину (максимальное расстояние в горизонтальной плоскости). Объем частицы вычисляли как произведение ее средней высоты на площадь проекции на слюду. Средний диаметр частицы определяли как диаметр сферы, имеющей точно такой же объем, как и частица на слюде.

3.10. Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) МНТ

С помощью ПЭМ изучали раствор МНТ концентрации 0,01 мг/мл. Использовали два основных протокола: OpNS (Zhang et al., 2013) и метод стряхивания (flicking method) (Burgess et al., 2004). Использование метода стряхивания вместо обычного блоттинга позволяет предотвратить слияние частиц. На подложку с образцом наносили каплю контрастирующего агента (2% раствор уранил ацетата pH 3–4) и через 1 минуту его удаляли и подложку высушивали при 20 °C. Измерение проводили на приборе Titan 80-300 TEM/STEM («Thermo Fisher Scientific», США), оборудованного детектором TEM US1000 4k («Gatan», США) и корректором образца Cs («CEOS», Германия) при ускоряющем напряжении 300 кВ. Получение данных проводилось при разрешении ×57000. В этом случае, каждый пиксель на изображении имеет размер 1,96 Å. Полученные изображения обрабатывали в программах RELION 3.0 (Scheres, 2012; Kimanius et al., 2016) и cryoSPARC (Punjani et al., 2017). Фитирование функции передачи контраста осуществляли с помощью Gctf (Zhang, 2016). Далее проводили классификацию двухмерных изображений частиц. Для дальнейшего анализа использовали только частицы, где четко было видно два структурных модуля. Трехмерную реконструкцию осуществляли с помощью cryoSPARC, используя полученную из данных МРР с разрешением 50 Å трехмерную структуру в качестве нулевого приближения. В результате получили структуру с разрешением 2 нм. В полученное трехмерное распределение плотности вписали с помощью USCF Chimera (Pettersen et al., 2004) известные кристаллические структуры транслокационного домена дифтерийного токсина (Bennett and Eisenberg, 1994) и HMP (Ilari et al., 2002b) как твердые тела. Гибкие участки МНТ моделировали с помощью Loopy (Xiang et al., 2002). Работы были проведены совместно с И.Б. Эйдлиным и А.С. Ореховым из «Научно-исследовательского центра» Курчатовского института.

3.11. Малоугловое рентгеновское рассеяние (МРР) МНТ

Эксперименты МРР проводили в ESRF (Гренобль, Франция) на установке BioSAXS beamline BM29, совмещенной с эксклюзионной хроматографией и гель-фильтрацией. Колонка Superdex 200 GL 10/300 («GE Healthcare», США) была соединена с хроматографом высокого давления LC-20ADXR («Shimadzu», Япония) и присоединена непосредственно к входному клапану капилляра для образцов системы BM29 (Pernot et al., 2013; Brennich et al., 2017). Все буферы перед использованием дегазировали. Раствор белка наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером объемом, равным двум объемам этой колонки. Скорость потока была 0,75 мл/мин. Данные МРР получались

при длине волны 0,99 Å и расстоянии между образцом и детектором PILATUS 1M («Dectris») 2,876 м, которое отвечает диапазону q от 0,008 до 0,45 $Å^{-1}$. Весь эксперимент продолжался 35 минут, за которые было получено около 2100 рамок считывания (одно рамка считывания в секунду). Предварительная обработка данных выполнялась автоматически с помощью EDNA (Kanekiyo et al., 2013). В результате для каждой рамки считывания была получена зависимость интенсивности сигнала от q. Для повышения качества кривых МРР разные рамки считывания объединяли в подпрограмме PRIMUS пакета программ ATSAS (Franke et al., 2017). Функции парных распределений получали в подпрограмме GNOM пакета программ ATSAS. 3D структуры низкого разрешения получали с помощью GASBOR на онлайн платформе ATSAS (Svergun et al., 2001). Для анализа рассеяния от макромолекул и интерполяции экспериментальных кривых МРР использовали CRYSOL 2.0 (Svergun, 1992). Для получения ансамбля трехмерных структур белка использовали программу для метода оптимизации ансамбля (Ensemble Optimization Method, EOM) на онлайн платформе ATSAS (Tria et al., 2015b). Работы были проведены совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым, А.И. Куклиным и В.И. Горделием из МФТИ, а также А.Д. Власовой (Цветковой).

3.12. Атомно-силовая микроскопия МНТ в липидном бислое

Изображения поддерживаемого липидного бислоя получали на мультимодальном атомно-силовом микроскопе с контроллером Nanoscope IIIa («Veeco Instruments», США), оснащенном J-сканером (максимальный размер скана 165 × 165 мкм) и жидкостной ячейкой Tapping Mode Liquid Cell («Veeco Instruments», США), в контактном режиме и режиме прерывистого контакта. Перед измерениями на металлический диск диаметром 1,6 см, поставляемый «Veeco Instruments», приклеивали кусочек слюды. Образцы поддерживаемого моноламеллярного липидного бислоя готовили методом слияния везикул, который был описан Пунтирануракoм и др. (Puntheeranurak et al., 2005). Получали суспензию липосом из яичного лецитина в 20 мМ MES-Трис буфере, содержащем 150 мМ NaCl, pH 7,5. Липосомы хранили в атмосфере азота в темноте при 4 °C. На свежерасщепленную слюду наносили каплю из 100 мкл лецитиновой суспензии (3–5 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре 15 минут. Затем устанавливали жидкостную ячейку микроскопа и промывали 20 мМ HEPES, 20 мМ MES буфером, содержащим 150 мМ NaCl, pH 7,5, чтобы удалить излишки липида перед измерением. Для измерения использовали кантилевер NP-S («Veeco Instruments», США) с номинальной константой жесткости 0,06 Н/м и радиусом кривизны зонда 10 нм. Для измерения силы взаимодействия находили реальную константу жесткости кантилевера, так, как это

описано в (Tortonese and Kirk, 1997). А именно, использовали калибровочный кантилевер («Veeco Instruments», США) с константой жесткости k_{ref} = 0,164 ± 0,007 Н/м. Используемый для измерения силы кантилевер приводили в контакт с калибровочным кантилевером и получали наклон кривой силы, δ_{test}. Кроме того, получали наклон кривой силы на жестком основании, δ_{tot}. Константа жесткости исследуемого кантилевера, k_{test}, получалась по выражению: $k_{test} = k_{ref}(\delta_{tot}/\delta_{test}-1)/\cos\theta$, где θ – угол между изучаемым кантилевером и калибровочным кантилевером. Перед измерениями все кантилеверы облучали ультрафиолетом для удаления органических загрязнений. Изображения получали с разрешением 256×256 или 512×512 точек и скоростью сканирования 2–4 Гц. После измерения изображения выпрямляли и сглаживали.

Для модификации зонда кантилевера использовали поликлональные кроличьи антитела на МНТ. Модификацию зонда проводили по методу Цая и Янга (Cai and Yang, 2002; Roes et al., 2006). А именно, кантилевер NP-S инкубировали в смеси 35% HCl/метанол (1:1 по объему) в течение 30 минут, отмывали метанолом и инкубировали в разведенным в 0,5% метаноле 3-(триметилоксисилил)пропил метакрилате («Fluka», Германия) в течение 45 минут, а затем отмывали метанолом и водой. После этого, кантилевер инкубировали в 0,2% (по весу) пероксидисульфата аммония («Fluka», Германия), 0,2% (по весу) N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамина («Fluka», Германия) и растворе антител к МНТ концентрации 5 мкг/мл в течение 45 минут, отмывали водой и 50 мМ фосфатным буфером при pH 8. Все операции проводились или автором работы или студентом, над которым автор осуществлял научное руководство – Г.А. Трусовым.

3.13. Характеристика проводимости плоских липидных мембран (ПЛМ) при добавлении МНТ при различных pH

ПЛМ получали, как описано в (MUELLER et al., 1962). А именно, 2% суспензию липида в декстране наносили на 0,5 мм отверстие в тефлоновой перегородке, разделяющей два резервуара, содержащих буфер 20 мМ MES, 20 мМ Трис, 150 мМ KCl, pH 5,5 или 7,5. Липидная смесь состояла из дипальмитоилфосфатидилглицерина и дипальмитоилфосфатидилхолина (30:70% по молям). МНТ добавляли в стоковом растворе в один из резервуаров при перемешивании, а регистрацию тока проводили без перемешивания для уменьшения уровня шума. Электрический ток измеряли с помощью патч-клампового усилителя BC-525C («Warner Instruments», США), оцифровывали с помощью LabPC 1200 («National Instruments, США) и анализировали на персональном компьютере с помощью WinWCP Strathclyde Electropsyology. Программное обеспечение разработано Дж. Демпстером (Университет Стратклайда, Великобритания). Ток

подвергался фильтрованию нижних частот с отсечкой 100 Гц. Ag-AgCl-электроды помещались непосредственно в резервуары. Работы с ПЛМ выполнены совместно с Т.И. Рокицкой и Ю.Н. Антоненко из Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (МГУ).

3.14. Изучение мембранолитической активности МНТ на липосомах

Для изучения мембранолитической активности МНТ получали липосомы из яичного фосфатидилхолина («Sigma», США или «Химфармзавод», Харьков). Для этого использовали метод обратнофазного выпаривания (Szoka, Jr. and Papahadjopoulos, 1978). Раствор, содержащий 25 мг липида, упаривали в круглодонной колбе на роторном испарителе. Осадок растворяли в 2,5 мл эфира и добавляли 0,75 мл 100 мМ раствора кальцеина («Fluca», Германия) с pH 7,3. Полученную смесь подвергали действию ультразвука в ультразвуковой ванне Finnsonik W-181-T («Cou Ultrasonic», Финляндия) при 90 Вт, 40 кГц и 0 °C до получения прозрачной однофазной системы. Далее выпаривали на роторном испарителе органический растворитель до получения водной суспензии, к которой добавляли 3 мл буфера 20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат Na, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Для получения однородной по размерам суспензии липосом, ее пропускали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (Corning, Нидерланды). Суспензию липида хранили в атмосфере инертного газа при температуре 4 °C. Непосредственно перед экспериментом, ее очищали от кальцеина, находящегося вне липосом, при помощи гель-фильтрации на колонке PD-10 (Sephadex G-25, «GE Healthcare») в буфере для липосом (20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат Na, 110 мМ NaCl, pH 5,0).

В полученных липосомах флуоресцентный краситель кальцеин находился в концентрации самотушения флуоресценции. Под действием МНТ целостность липосом нарушается и кальцеин начинает выходить из них, что приводит к его флуоресценции. Флуоресценцию кальцеина измеряли в 96-луночных планшетах со стеклянным дном («Eppendorf», Германия) на планшетном мультимодальном ридере ClarioStar («BMG LABTECH», Германия) при ее возбуждении на 490 нм и ее регистрации на 520 нм. Изучение выхода кальцеина при действии МНТ проводили в диапазоне pH от 3 до 7,5. Для этого аликвоты очищенной суспензии липосом (5 мкл) инкубировали 30 минут при 25 °C с МНТ (50–100 нМ) в буферах для липосом (20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат Na, 110 мМ NaCl), имеющих различные значения pH. При этом общий объем пробы составлял 60 мкл. Т.к. интенсивность флуоресценции кальцеина зависит от pH, перед измерением в ячейку планшета вносили образец липосом с МНТ при определенном pH (3 повтора) и добавляли 200 мкл буфера, содержащего 40 мМ HEPES, 20 мМ цитрат натрия и 110 мМ

NaCl (pH 8,0). Чтобы определить уровень фоновой флуоресценции, F_0, связанной с самостоятельным выходом кальцеина из липосом, использовали образцы липосом без МНТ при тех же значениях pH. Уровень фоновой флуоресценции вычитали из полученных значений интенсивности флуоресценции образцов, F_t. Максимальный уровень флуоресценции, F_{max}, определяли, разрушая липосомы при тех же pH с помощью детергента Triton X-100 («Serva»), конечная концентрация которого в образце составляла 0,5%. Долю выхода кальцеина из липосом (в процентах), D, определяли по формуле:

$$D = \frac{100 \cdot (F - F_0)}{(F_{max} - F_0)} \qquad (3.14).$$

Концентрационную зависимость выхода кальцеина из липосом получали при фиксированном значении pH (5,5 или 7,5) в диапазоне концентраций МНТ 6–1000 нМ. В одном эксперименте образец при определенном значении pH или концентрации был в трех повторах, а весь эксперимент повторяли, как минимум, три раза.

Работа проведена совместно с А.А. Розенкранцем, адаптировавшего этот метод для оценки свойств МНТ, и другими коллегами лаборатории.

3.15. Выделение и очистка α и β-импортинов

α-импортин, экспрессированный в клетках *E. coli* штамма BL21 в составе вектора pQE60 («QIAgen», Германия), был любезно предоставлен В.Л. Друцей (Институт ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ). Небольшое количество клеток, замороженных в глицерине, бактериальной петлёй вносили в 100 мл стерильной культуральной среды (2,5 г LB («Amersham», Великобритания) и 100 мкг/мл натриевой соли ампициллина, pH 7,5). Отбирали 10 мл ночной культуры и разводили её в 50 раз культуральной средой, а затем ставили на качалку (170 об./мин) при 37 °C на 3–4 часа, до достижения значения оптической плотности среды 0,8-0,9 при длине волны 600 нм. В суспензию вносили индуктор изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 200 мкМ и инкубировали при 18 °C в течение 18–20 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 30 минут при 4 °C и 8900×g в центрифуге Beckman J2-HS («Beckman Instruments Inc», США). Полученную бактериальную биомассу суспендировали на льду в лизирующем буфере (50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, 1 мг/мл лизоцим («Sigma», США), 1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 1,5 мкг/мл апротинин, pH 8,0). Суспензию перемешивали 1 час при 4 °C, а затем добавляли Тритон X-100 («Serva», Германия) до конечной концентрации 0,5% и перемешивали еще 2 часа при 4 °C. Лизат центрифугировали в течение 30 минут при 8900×g и 4 °C на центрифуге Beckman J2-HS («Beckman Instruments Inc», США). К супернатанту добавляли имидазол до конечной

концентрации 10 мМ. Полученный раствор наносили на хроматографическую колонку HisTrap™ Fast Flow («Cytiva», США) объемом 5 мл на скорости 0,5 мл/мин при 4 °С. После нанесения колонку промывали на скорости 0,5 мл/мин 50 мл буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1% глицерин, 0,5% Тритон X-100, pH 8,0. Затем колонку промывали на скорости 1 мл/мин 50 мл буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, pH 8,0. После этого колонку промывали на скорости 1 мл/мин 25 мл буфера следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 8,0. α-импортин элюировали с колонки на скорости 0,5 мл/мин фракциями объемом 1 мл буфером следующего состава: 50 мМ Na_2HPO_4, 300 мМ NaCl, 700 мМ имидазол, pH 8,0. Фракции, содержащие α-импортин, диализовали 3 часа при 4 °С против 1 литра буфера для импортинов (20 мМ HEPES, 110 мМ KCl, 5 мМ $NaHCO_3$, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ эгтазиновая кислота, 1 мМ дитиотреитол, pH 7,4). Диализный буфер сменяли дважды и диализовали каждый раз не менее трех часов. Концентрацию полученного α-импортина определяли методом Бредфорда.

Трансфекция клеток *E. coli* штамма BL21 генетической конструкцией, кодирующей химерный белок β-импортина с глутатион-S-трансферазой, была проведена В.Л. Друцей. Плазмида, содержащая ген химерного белка, была любезно предоставлена профессором Д. Янсом (D. Jans, Австралия). Наработку β-импортина производили точно также, как α-импортина. Очистку полученного раствора β-импортина проводили на хроматографической колонке GSTrap™ Fast Flow (Cytiva, США) объемом 1 мл. Раствор наносили на скорости 0,25 мл/мин при 4 °С. После нанесения колонку промывали на скорости 0,25 мл/мин 25 мл буфера следующего состава: 10 мМ Na_2HPO_4, 140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1,8 мМ KH_2PO_4, 1 мМ ДТТ, pH 7,6. β-импортин элюировали с колонки на скорости 0,1 мл/мин фракциями объемом 1 мл буфером следующего состава: 50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ДТТ, 10 мМ восстановленного глутатиона, pH 8,0. Фракции, содержащие β-импортин, диализовали 3 часа при 4 °С против 1 литра буфера для импортинов (20 мМ HEPES, 110 мМ KCl, 5 мМ $NaHCO_3$, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ эгтазиновая кислота, 1 мМ дитиотреитол, pH 7,4). Диализный буфер сменяли дважды и диализовали каждый раз не менее трех часов. Концентрацию полученного β-импортина определяли методом Бредфорда.

Выделение импортинов осуществлялось совместно с Т.С. Карягиной.

3.16. Изучение взаимодействия между молекулами методом термофореза

3.16.1. Изучение взаимодействия МНТ с гетеродимером импортинов

Прежде всего осуществляли мечение β-импортина флуоресцентным красителем ATTO647. Для этого в 65 мМ карбонатном буфере (pH 8,5) к β-импортину добавляли полуторакратный мольный избыток активированного эфира красителя ATTO647 с дальнейшей инкубацией 1 час при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Далее β-импортин со связавшимся ATTO647 отделяли от свободного ATTO647 на хроматографической колонке PD10 (Sephadex G-25, «GE Healthcare») в 10 мМ фосфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl (pH 8,0). По методу Бредфорда измеряли концентрацию β-импортина и путем измерения оптической плотности при 647 нм определяли долю присоединенного ATTO647 к β-импортину. Обычно она составляла 0,8-1.

Измерения взаимодействия МНТ с гетеродимером импортинов проводили на приборе Monolith NT.115 Series BLUE/RED («NanoTemper Technologies», Германия) в буфере для импортинов (20 мМ HEPES, 110 мМ KCl, 5 мМ $NaHCO_3$, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 1 мМ эгтазиновая кислота, 1 мМ дитиотреитол, pH 7,4). Для исключения адсорбции МНТ и импортинов на используемых в термофорезе капиллярах в буфер для импортинов (pH 7,4) добавляли 0,005% SDS. Для измерения константы диссоциации комплекса МНТ с гетеродимером импортинов в 96 луночном планшете получали серию из 12 разведений МНТ, где концентрация МНТ в первой лунке составляет 1–2 мкМ, а во всех последующих разводится вдвое. В каждом из образцов содержалось 20–80 нМ α-импортина и 10–40 нМ β-импортина. Каждый из образцов помещали в один из 12 капилляров и с помощью прибора для каждого образца получали зависимость относительной флуоресценции в канале «RED» и 30-100% мощности лазера от времени с начала термофореза. Далее измеряли относительную флуоресценцию через 20 секунд после начала термофореза и строили зависимость этой флуоресценции от концентрации МНТ в изученных образцах. По этой зависимости определяли константу диссоциации комплекса МНТ с гетеродимером импортинов. Для тех же образцов получали 3-4 термофоретических кривых, а весь эксперимент повторяли 3-4 раза.

3.16.2. Изучение взаимодействия МНТ с белком Keap1

Для определения сродства между МНТ различного состава и белком Keap1 использовали С-концевой фрагмент этого белка (аминокислотные остатки 312–624), ответственный за связывание с белком Nrf2, и обозначенный tKeap1. Получение E.coli BL21(DE3), экспрессирующих tKeap1, осуществил А.В. Уласов, а выделение и очистку

tKeap1 – Т.Н. Лупанова. Измерения взаимодействия МНТ с tKeap1 проводили на приборе Monolith NT.115 Series BLUE/RED («NanoTemper Technologies», Германия) в фосфатном буфере (25 мМ NaH_2PO_4, 150 мМ NaCl, pH 8,0). Белок tKeap1 пометили флуоресцентным красителем Cy3, для чего к нему в 65 мМ карбонатном буфере (pH 8,5) добавляли 10 кратный мольный избыток N-гидроксисукцинимидного эфира Cy3 («Люмипроб», Россия). Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Очистку модифицированного Cy3 белка tKeap1 от свободного Cy3 проводили на хроматографической колонке PD10 (Sephadex G-25, «GE Healthcare»). В среднем на одну молекулу tKeap1 присоединилось 3,9 молекул Cy3. При фиксированной концентрации tKeap1-Cy3 (40 нМ) и различных концентрациях МНТ получали термофоретические кривые. Для каждого эксперимента получали четыре таких кривых, и весь эксперимент повторяли 3–4 раза. Из каждой термофоретической кривой получали равновесную константу диссоциации комплекса МНТ с tKeap1 и затем усредняли ее по всем 12–16 кривым и определяли стандартную ошибку ее измерения.

3.17. Изучение взаимодействия МНТ с Keap1 с помощью FLIM-FRET

Для изучения взаимодействия МНТ, способного взаимодействовать с Keap1, $МНТ_м$, использовали метод резонансного переноса энергии по Фёрстеру, регистрируемого с помощью микроскопии с временным разрешением (FLIM-FRET). Для этого $МНТ_м$ пометили флуоресцентным красителем AF568 («Люмипроб», Россия) путем инкубации в карбонатном буфере, pH 8,6, 1 час с 4-х кратным мольным избытком N-гидроксисукцинимидного эфира красителя при комнатной температуре. Очистку меченного $МНТ_м$ от несвязавшегося красителя и одновременную замену буфера на фосфатный, pH 7,5, проводили с помощью гель-фильтрации на колонке PD-10 (Сефадекс G-25). Оцененная спектрофотометрически степень модификации $МНТ_м$ красителем составила 1,3 молекул AF568 на одну молекулу $МНТ_м$.

Взаимодействие $МНТ_м$ с Keap1 изучали на клетках AML-12, временно трансформированных плазмидой hrGFP-Keap1 («Addgene»), кодирующей флуоресцентный белок hrGFP. Клетки рассеивали на камеры для микроскопа Poc-mini в количестве 100 тысяч/камеру в 1 мл среды DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Трансформация клеток проводилась А.В. Уласовым согласно инструкциям к K2® Transfection System («Biontex Laboratories», Германия). Спустя два дня среду меняли на среду без сыворотки, содержащую 0,2% бычий сывороточный альбумин (БСА), и добавляли $МНТ_м$-AF568 до конечной концентрации 500 нМ, а затем

инкубировали 15 минут или 1 час. В конце инкубации среду заменяли раствором Хенкса, содержащим 0,2% БСА. В контроле к клеткам не добавляли $МНТ_м$.

Эксперименты FLIM-FRET проводили на мультифотонном конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM-510 META NLO («Carl Zeiss», Германия), оборудованным фемтосекундным лазером Mai Tai Broadband («SpectraPhysics», США) и системой регистрации счета фотонов (time-correlated single-photon counting system (TCSPC), «Becker & Hickl GmbH», Германия). Использовали объектив с увеличением 63× (NA 1,4). Флуоресценцию hrGFP возбуждали с помощью фемтосекундного лазера путем двухфотонного возбуждения при длине волны 800 нм. Регистрацию флуоресценции hrGFP проводили в диапазоне длин волн 500–550 нм.

3.18. Изучение фототоксичности МНТ с фотосенсибилизаторами (ФС)

Для присоединения МНТ использовали ФС хлорин e_6 («Frontier Scientific», США) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид и N-гидроксисукцинимид («Sigma-Aldrich», США). 3 мМ водный раствор хлорина e_6 разводили до 150 мкМ с помощью активирующего буфера (10 мМ MES, 1 мМ SDS, pH 6,5). Полученный раствор смешивали с свежеприготовленными водными растворами (100 мМ) кросс-сшивающих агентов 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида и N-гидроксисукцинимида (100 мМ) в мольном соотношении ФС:карбодиимид:N-гидроксисукцинимид = 1:4,5:15. Смесь инкубировали в течение 1 часа при постоянном перемешивании и температуре 25 °С. После этого, при температуре 25 °С раствор активированного хлорина e_6 постепенно (порциями по 10% от общего объема смеси и время между порциями не меньше 5 минут) добавляли в 10 мкМ раствор МНТ в буфере, содержащем 30 мМ фосфата натрия, 20 мМ бората натрия, 150 мМ NaCl, pH 8,0 и SDS в мольном соотношении МНТ:SDS = 1:5. Реакционную смесь инкубировали на льду в течение 19 часов при постоянном перемешивании. Протекание реакции останавливали с помощью гидроксиламина («Реахим», Россия) в конечной концентрации 10 мМ. Далее, полученную смесь инкубировали еще 1 час при 4 °С и постоянном перемешивании. Полученные конъюгаты очищали с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA Sepharose («Cytiva», США). Клетки А431 рассеивали в 96-луночный культуральный планшет в количестве 1000 клеток на лунку. На следующий день, среду меняли на DMEM, содержащий 10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и различные концентрации конъюгатов МНТ-хлорин e_6 или свободного хлорина e_6. После 20 часов инкубации клетки отмывали два раза раствором Хенкса и облучали 10 минут (мощность облучения 0,0276 Вт/см^2) на проекторе слайдов. При этих условиях выживало 100% клеток, к которым не добавляли МНТ-хлорин e_6 или

свободный хлорин e_6. Далее раствор Хенкса меняли на среду с 10% эмбриональной бычьей сывороткой и клетки наращивали в течение 4–5 дней. Выживаемость клеток определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромида (МТТ). Работа выполнена совместно с Т.А. Сластниковой.

3.19. Изучение активации Nrf2-системы с помощью МНТ по данным иммунофлуоресценции

Для изучения влияния МНТ на Nrf2 сигнальный путь клетки AML12 рассеивали на покровные стекла в лунки 24-луночного культурального планшета. Спустя двое суток проводили замену среды на новую, добавляли нужное количество изучаемого МНТ и инкубировали в CO_2 инкубаторе заданные промежутки времени. В качестве положительного контроля активации Nrf2-системы использовали сульфарафан («LKT Labs», США), который добавляли в конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 2 часов. После инкубации клетки отмывали три раза раствором Хенкса и фиксировали ледяным метанолом в течение 15 минут при –40 °С. Далее фиксированные клетки инкубировали 35 минут в блокирующем растворе следующего состава: 5% обезжиренное молоко, 1% бычий сывороточный альбумин, 0,1% Tween-20 в PBS (10 мМ фосфатный буфер, содержащий 150 мМ NaCl, pH 7,4). После этого, клетки инкубировали с антителами на Nrf2 (anti-Nrf2 antibody, ab31163, «Abcam»), разбавленными в соотношении 1:150 блокирующим раствором, в течение ночи при 4 °С. Затем клетки отмывали три раза фосфатным буфером, содержащим 0,1% Tween-20, и инкубировали 1 час при 37 °С со вторичными антителами, меченными Alexa555 (Alexa Fluor 555^{TM} labeled Goat anti-Rabbit Ig G (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, A-21428, «Invitrogen», США). Затем клетки снова отмывали три раза фосфатным буфером, содержащим 0,1% Tween-20. Ядра прокрашивали инкубацией с 1 мкг/мл раствора 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI), а далее отмывали фосфатным буфером и помещали на предметные стекла с помощью заливочной среды Immu-Mount (#9990402, «Thermo Fisher Scientific», США). Изображения клеток получали с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа STELLARIS 5 («Leica Microsystems», Германия) с использованием объектива ×63 (NA 1,4) при 0,87 единицах Эйри и лазеров с длинами волн 405 и 561 нм. Сигналы флуоресценции, отвечающие белку Nrf2 в цитоплазме и ядре были рассчитаны количественно с помощью модифицированной версии макроса Cyt/Nuc для Image J (Grune et al., 2018). А именно, ядра, идентифицированные из флуоресцентного канала DAPI, были применены в качестве маски к каналу Alexa FluorTM 555, соответствующему распределению Nrf2. Таким образом, была измерен сигнал флуоресценции в ядрах,

отвечающий Nrf2. Флуоресценция в канале Alexa FluorTM 555, но не колокализованная с флуоресценцией DAPI, рассматривалась как отвечающая Nrf2 в цитоплазме. Полученные флуоресцентные сигналы для ядер и цитоплазмы для клеток, инкубированных с МНТ, были далее нормированы на сигналы от необработанных контрольных клеток. Для каждой точки анализировались не менее 10 полей зрения с более чем 170 клетками. Статистические расчеты проводились в программном пакете GraphPad Prism 6 («GraphPad Software Inc.», США). При обработке флуоресцентного сигнала вычитали вклад от автофлуоресценции клеток, не обработанных антителами, и клеток, которые были обработаны только вторичными антителами, но не обработаны первичными антителами на Nrf2. Работа была выполнена совместно с Т.А. Сластниковой и А.А. Розенкранцем.

3.20. Оценка объема клеток и их ядер

Характерные размеры клеток и их ядер получали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP2 («Leica», Германия) в канале проходящего света с использованием воздушного объектива с увеличением ×63 и NA 0,7. Для этого, клетки снимали с подложки 0,25% раствором трипсина, меняли среду на раствор Версена и добавляли клетки в камеру Горяева, которую затем помещали в держатель микроскопа. Для таких ошарившихся клеток определяли длину, L, и ширину, W, клеток и их ядер. Для расчета объема клеток и их ядер, V, они апроксимировались эллипсоидом вращения и вычислялись по формуле: $V = \pi \cdot L \cdot W^2/6$. Полученные объемы клеток и их ядер усредняли по 60–80 клеткам. При этом делящиеся клетки исключали из рассмотрения. Высоту клеток считали равной его ширине. Для проверки этого предположения клетки линии 3LL прокрасили красителем на плазматические мембраны CellMask^{TM} Green («Thermo Scientific», США). Возбуждение этого красителя осуществляли лазером с длиной волны 532 нм, а флуоресценцию снимали в диапазоне 550–600 нм. По трехмерному изображению клеток, полученному с помощью конфокального микроскопа, определяли их длину, ширину и высоту. Было показано, что высота клеток точно такая же, как их ширина. За объем цитоплазмы принимали разницу между объемами клетки и их ядра.

Для линии 3LL размеры клеток были определены не только по данным микроскопии, но и с помощью метода динамического светорассеяния на приборе ZetaPALS («Brookhaven», США) под углом 90° и временем накопления 30 сек в 7 повторах. Для этого определили диаметр сферы, имеющий точно такой же объем, что и измеренный с помощью микроскопии объем клетки, и сравнили его с гидродинамическим диаметром, определенным по данным динамического светорассеяния. По данным микроскопии этот диаметр составил 13,9 ± 0,4 мкм, а по данным динамического

светорассеяния – 13,2 ± 2,7 мкм. Таким образом, метод микроскопии дает корректные размеры клеток.

3.21. Изучение взаимодействия между белками с помощью клеточного анализа теплового сдвига (CETSA)

Клеточный анализ теплового сдвига (the CEllular Thermal Shift Assay, CETSA) проводили следующим образом. Клетки снимали с 25 см^2 культурального флакона с помощью трипсина и центрифугировали 5 минут при 200 g. Затем клетки ресуспендировали в фосфатном буфере (25 мМ NaH_2PO_4, 150 мМ NaCl, pH 8,0), содержащем коктейль ингибиторов протеаз cOmplete («Sigma-Aldrich») и 10 мМ ЭДТА. Концентрацию клеток определяли с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant Analyzer («Miltenyi Biotec GmbH», Франция). Кривые плавления белков получали как для интактных клеток, так и для клеточных лизатов. В первом случае нагревали аликвоты суспензии клеток до различных температур, лежащих в диапазоне 40–60 °C, в течение 3 минут, а одну аликвоту не нагревали. После этого клетки охлаждали до комнатной температуры и лизировали тремя циклами замораживания в жидком азоте – оттаивания при 37 °C. Во втором случае клетки сначала лизировали тремя циклами замораживания – оттаивания, а затем аликвоты клеточных лизатов нагревались до различных температур, лежащих в диапазоне 40–60 °C. После этого, в обоих случаях, клеточные лизаты центрифугировали 60 минут при 8000 g и 4 °C. Затем, супернатанты клеточных лизатов подвергали денатурирующему электрофорезу (10% акриламидный гель) с последующим иммуноблоттингом. Для иммуноблоттинга использовали антитела на белок, для которого получали кривую плавления. В большинстве экспериментов это были антитела на Nrf2 белок (ab31163, «Abcam», Англия) или Keap1 белок (ab139729, «Abcam», Англия). Важно, что данные антитела ранее уже успешно использовались для количественных оценок с помощью иммуноблоттинга (Liu et al., 2018b; Upadhyay et al., 2020; Zhao et al., 2020; Cardoso et al., 2021; Ge et al., 2021; Omachi et al., 2021). Из-за частой неоднородной прокраски мембран иммуноблоттинга, все образцы наносили на гель в трех повторах. Это позволило исключить случайные выбросы для отдельных полос и получить более надежные средние данные. Образцы переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0,22 мкм) используя Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-RAD», США). Для каждого образца определяли интенсивность полосы в выбранной области и интенсивность фонового сигнала в области такого же размера, где не наблюдалось видимых полос (пример на Рис. 3.5.2). Далее интенсивность фонового сигнала вычитали из интенсивности полосы. Для Keap1 наблюдалась полоса около 70 кДа (Рис. 3.5.2а), которая согласно

литературным данным (Upadhyay et al., 2020; Zhao et al., 2020), отвечает Keap1. Для Nrf2 наблюдались две полосы – около 64 кДа и 28 кДа (Рис. 3.5.2б). Проведенный анализ с ингибитором протеасом MG-132 показал, что обе этих полосы отвечают фрагментам белка Nrf2 и кривые плавления Nrf2, полученные по фрагментам различной молекулярной массы, совпадают друг с другом. В дальнейшем, для получения кривой плавления Nrf2 использовали полосу около 64 кДа. Для каждой изученной клеточной линии, интенсивность полосы получали в трех повторах и нормировали на интенсивность полосы для образца, который не подвергали нагреванию. Полученные кривые плавления интерполировали в программе Origin 6.0 с помощью сигмовидной функции. Для каждой линии клеток и выбранных антител иммуноблоттинг повторяли не меньше четырех раз.

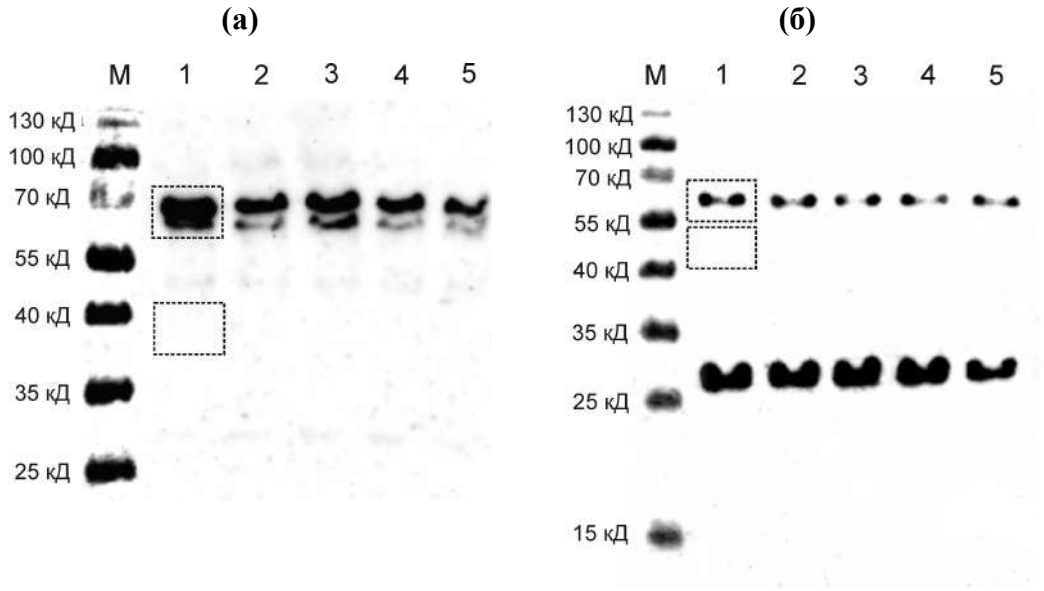


Рисунок 3.5.2. Типичный вид иммуноблоттинга с прокраской антителами на Keap1 (а) и с прокраской антителами на Nrf2 (б). Показаны: лизат клеток 3LL (а) и клетки RAW264.7 (б). Пунктирной линией обозначены области, где определялась интенсивность изучаемого образца и интенсивность фонового сигнала. Образцы слева направо: маркер молекулярных масс (M), не гретый образец (1), гретый до температуры 42 °C (2), 44 °C (3), 46 °C (4) и 48 °C (5) в течение 3 минут.

3.22. Изучение кинетики расщепления пептидов катепсином B

Изучение кинетики расщепления проводили для пептидов: FKFLC, GFLGC, FRRGC, HRFRC, EGEFC, AVGGAGC, GGGGC и GSGSC. Эти пептиды получали химическим синтезом на заказ («Elabscience Biotechnology Inc.», США) с чистотой ≥ 95%. Пептиды метили с обоих концов флуоресцентными красителями sulfo-Cyanine3 и sulfo-Cyanine5, между которыми может наблюдаться FRET. Для этого, в буфере 10 мМ Na_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 7,0 к 400 мкМ пептида добавляли 800 мкМ sulfo-Cyanine3 активированный эфир и 800 мкМ sulfo-Cyanine5 малеимид. Инкубировали 1 час при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Измерение сигнала FRET

проводили в плашках Costar 96 с черными стенками и стеклянным дном на мультимодальном ридере ClarioStar («BMG LABTECH», Германия) при длине возбуждения 485 нм и длине флуоресценции 715 нм, ширина оптической щели 15 нм. Пептид разводили в буфере 20 мМ HEPES, 20 мМ MES, 20 мМ цитрат натрия, 110 мМ NaCl с разными значениями pH до конечной концентрации 20 мкМ. Для расщепления использовали катепсин B (Native human Cathepsin B protein, ab90387, «Abcam») в концентрации 1 мкг/мл. Перед применением катепсин B активировали, как описано в работе Керна и соавт. (Kern et al., 2017). А именно к пептиду добавляли активирующий буфер (10 мМ Na_2HPO_4, 150 мМ NaCl, 20 мМ DTT, 10 мМ ЭДТА, pH 6,0) и инкубировали 15 минут при 37 °C. Кинетику расщепления изучали по уменьшению сигнала FRET до 1 часа с периодичностью 2 минуты. Число повторов кинетики составляло 3–9 раз. В качестве контроля получали в трех повторах кинетики сигнала FRET для образцов, к которым не был добавлен катепсин B (максимальный уровень сигнала FRET), а также кинетики сигнала FRET для образцов не содержащих пептид, а только флуоресцентные красители sulfo-Cyanine3 и sulfo-Cyanine5 в соответствующей концентрации (нулевой уровень). По этим данным рассчитывали долю пептида, подвергающегося расщеплению, при различных временах и значениях pH. По полученным кинетикам расщепления, т.е. зависимостям доли расщепленного пептида, D, от времени, t, рассчитывали константу скорости расщепления, k, путем интерполяции данных кинетик зависимостью $D = 1–\exp(–k\times t)$. Все вычисления и построение зависимостей проводили в программе Origin6.0.

3.23. Определение активных форм кислорода в клетке

Образование активных форм кислорода (АФК) в клетке детектировали с помощью 6-карбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (cDCFH-DA, «Люмипроб», Россия). При попадании в клетки cDCFH-DA подвергается диацетилированию под воздействием АФК с образованием флуоресцентной формы: 6-карбокси-2',7'-дихлорофлуоресцеина (cDCF). Для проведения экспериментов клетки AML12 рассеивали в 48-луночную плашку по 75000 клеток на лунку. На следующий день среду в лунках меняли на свежую, к которой, при необходимости, добавляли МНТ. После определенного времени инкубации с МНТ (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15 минут) в CO_2 инкубаторе, клетки отмывали средой с сывороткой и инкубировали необходимые времена. Перед измерением клетки помещали на 30 минут в среду с сывороткой, содержащую 100 мкМ cDCFH-DA. Затем клетки отмывали фосфатным буфером и добавляли на 15 минут 10 мМ перекиси водорода в темноте. Далее клетки отмывали, снимали с подложки, центрифугировали и суспендировали в растворе Хенкса. Флуоресценцию cDCF в клетках

изучали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S («Beckman Coulter», США). Флуоресценция cDCF регистрировалась только для живых клеток, которые определялись по отсутствию флуоресценции в канале пропидия иодида. Результаты представляли в процентах, где за 100% принимали разницу между флуоресценцией клеток, обработанных перекисью водорода, и клеток без добавления перекиси. Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 6. Эксперименты проведены совместно с Т.Н. Лупановой.

3.24. Постановка экспериментов по аутопсии мышей

Для экспериментов использовали МНТ, где в качестве лигандного модуля выступал α-меланоцитстимулирующий гормон. Методами генной инженерии Уласовым А.В. были получены две модификации этого МНТ: 1) с цистеином на N-конце; 2) с цистеином на N-конце, которому предшествовал сайт LSGRSDNH, способный расщепляться опухолеспецифической протеазой uPA (Desnoyers et al., 2013). Для присоединения к цистеину МНТ использовали полиэтиленгликоли (ПЭГ) с молекулярной массой 10, 20 и 40 кДа, функционализированные концевой малеимидной группой. Для определения накопления МНТ в тканях и органах лабораторных животных эти транспортеры метили ^{111}In, как это описано в статье Розенкранц А.А., Сластникова Т.А., Храмцов Ю.В., Карягина Т.С., Георгиев Г.П., Соболев А.С. (2017) Противоопухолевая эффективность эмиттера электронов Оже ^{111}In, доставляемого модульным нанотранспортером в ядра клеток с повышенной экспрессией фолатного рецептора *ДАН*, **473**, 98-100 (вклад автора состоит в проведении части экспериментальных работ, связанных с изучением распределения транспортера в организме мыши, а также в обсуждении результатов и участии в написании). Вкратце, к МНТ добавляли 10-кратный молярный избыток бифункционального комплексона S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазоциклононан-1,4,7-триацетата (p-SCN-Bn-NOTA, «Macrocyclics», США) в 50 мМ $NaHCO_3$, 150 мМ NaCl и 5 мМ ЭДТА, pH 8,6. После 24 ч инкубации при 20 °C полученный конъюгат МНТ-NOTA или МНТ-ПЭГ-NOTA подвергали ультрафильтрации в 15 мМ NaCl и 10 мМ HEPES, pH 7,5, очищенном с помощью ионообменника Chelex-100 («BioRad», США) от ионов, конкурирующих с индием при комплексообразовании. Самцам мышей DBA/2 прививали меланому Клаудмана S91, клон M3, которая экспрессирует порядка 5000 меланокортиновых рецепторов 1-го субтипа на 1 клетку (Siegrist et al., 1989). Для аутопсии использовали самок мышей линии DBA/2 весом 18-20 г. Мышам (3-6 на группу) за семь дней до проведения эксперимента на правое предплечье прививали опухоли путем инъекции 2 млн. клеток меланомы Клаудмана S91, клон M3.

Эксперимент начали на седьмой день после инокуляции мышам 2 млн. клеток меланомы. Мышам, содержащим опухоли больше 0,1 см^3, в хвостовую вену вводили 300 мкл ^{111}In-МНТ в количестве 0,2 мкг/мышь и суммарной активности 30 кБк. Эвтаназию животного проводили через час после введения. Далее с помощью счетчика радиоактивности определяли радиоактивность всей мыши, ее отдельных органов и опухоли, и измеряли вес органов и опухоли. Активность ^{111}In в органе/ткани представляли в виде доли введенной радиоактивности в соответствующем органе/ткани по отношению к массе этого органа/ткани (%ID/g). Нитроглицерин наносили в виде мази на опухоль за 15-20 мин до введения МНТ. МНТ без лиганда вводили внутривенно в количестве 0,8 мг/мышь в объеме 300 мкл одновременно с изучаемым МНТ. Достоверность отличий результатов для экспериментальных групп животных проверяли по критерию Колмогорова-Смирнова в программе GraphPad Prism. Эксперименты проводились совместно с А.В. Уласовым и Т.А. Сластниковой.

3.25. Изучение биораспределения МНТ с помощью ОФЭКТ/КТ

Биораспределение исследовали для МНТ с αМСГ, нацеленных на клетки меланомы, обладающих избыточной экспрессией меланокортиновых рецепторов. Кроме этих МНТ применялись МНТ с присоединенным ПЭГ с молекулярной массой 40 кДа. Для этого сайт-специфического присоединения в аминокислотную последовательность данного МНТ методами генной инженерии с N-конца ввели цистеин и использовали малеимидное производное ПЭГ. Также получили вариант МНТ-ПЭГ с возможностью отщепления в опухоли. Для этого в МНТ между цистеином и модулем ДТокс ввели сайт LSGRSDNH, способный расщепляться опухолеспецифичными протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) (Desnoyers et al., 2013). Чтобы изучить кинетику накопления МНТ в тканях лабораторных животных полученные варианты МНТ метили изотопом ^{111}In, как это описано в пункте 3.24. Для исследования использовали мышей-самцов DBA/2J весом 22-24 г (Питомник лабораторных животных “Пущино”). Им прививали меланому Клаудмана S91, клон M3, которая содержит 5000 меланокортиновых рецепторов субтипа 1 на одну клетку (Siegrist et al., 1989). Все действия с мышами проводили под анестезией, в качестве которой выступала ингаляция 0,8–1,5% изофлураном в воздухе. Для экспериментов отбирали мышей с опухолями больше 0,2 мл. Мышей разделили на три группы в каждой из которых было три мыши. В хвостовую вену каждой мышки вводили 300 мкл меченного ^{111}In МНТ или МНТ-ПЭГ в количестве 1 мкг/мышь и суммарной активностью около 400 кБк. Распределения радиоактивности в организме мыши проводили в заданные промежутки времени с помощью метода ОФЭКТ на приборе U-SPECT-II/CT scanner («MILabs», Нидерланды), оснащенном коллиматором с

диаметром отверстий 1 мм, а также сочлененном с рентгеновским компьютерным томографом. Каждое изображение снимали 15 минут в первые 2 часа после введения и далее через сутки-двое вплоть до 7 дней. Наблюдение за жизнедеятельностью мышки во время измерения осуществлялось по регистрации ее дыхания. Реконструкцию полученных изображений проводили в программе U-SPECT-Rec2.34b, а дальнейший количественный анализ – в программе PMOD 3.4. Для анатомической привязки полученного биораспределения использовали данные рентгеновской компьютерной томографии (КТ). Радиоактивность в крови определяли в области сердца. Сердце или опухоль описывали одним или несколькими эллипсоидами, в которых затем измеряли суммарную радиоактивность. Считая, что плотность ткани ~ 1 г/мл, деля полученную радиоактивность на объем эллипсоидов получали дозу радиоактивности в ткани на грамм. Введенной дозой (ID) считали суммарную радиоактивность всего организма мыши сразу после введения МНТ, меченного ^{111}In. По отношению дозы радиоактивности в ткани на грамм к ID рассчитывали процент от введенной дозы на грамм ткани ((%)ID/g). При этом учитывали, что период полураспада ^{111}In составляет 2,8 дня. Эксперименты проводились совместно с А.В. Уласовым и Т.А. Сластниковой.

3.26. Определение времени циркуляции МНТ в крови

Для измерения времени жизни МНТ в крови, эти МНТ были мечены флуоресцентным красителем AF488. Для этого к МНТ в 65 мМ карбонатном буфере (pH 8,5) добавляли 10 кратный мольный избыток N-гидроксисукцинимидного эфира AF488 («Люмипроб», Россия). Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Очистку модифицированного AF488 МНТ от свободного AF488 проводили на хроматографической колонке PD10 (Sephadex G-25, «GE Healthcare»). В среднем на одну молекулу МНТ присоединилось 0,4–1,3 молекул AF488. Мышам линии Balb/c в хвостовую вену вводили 300 мкл 1 мкМ изучаемого МНТ, меченного AF488. Забор крови проводили из хвостовой вены до введения МНТ и спустя 15, 30, 45 и 60 минут после введения МНТ. В образцы крови добавляли 50 мкл 100 мМ ЭДТА и центрифугировали при 1000 g в течение 15 минут на центрифуге 1730R («GYROZEN», Южная Корея). Флуоресценцию супернатантов измеряли на приборе Monolith NT.115 Series BLUE/RED («NanoTemper Technologies», Германия). При расчете относительного количества МНТ учитывали различие объемов крови в образцах, а также вычитали сигнал флуоресценции для крови без МНТ. Относительное количество МНТ сразу после введения получали путем экстраполяции данных экспоненциальной зависимостью. Это начальное количество принимали за 100 %. Работы проводились совместно с Т.Н. Лупановой.

4. Результаты

4.1. Полиплексы – транспортные молекулярные конструкции для доставки нуклеиновых кислот в клетки

4.1.1. Корреляция характеристик полиплексов с эффективностью трансфекции

Невирусные системы доставки молекул ДНК привлекают не только значительное внимание при проведении различных исследований, но и применяются больше, чем в 29,4% случаев всех клинических испытаний в области генной терапии (Ginn et al., 2018). Одной из перспективных невирусных систем доставки являются полиплексы – комплексы ДНК с различными поликатионами. В отличие от вирусных векторов, полиплексы довольно легко получить, они обладают низкой иммуногенностью и не ограничены размером переносимой ДНК (Cho et al., 2001; He et al., 2010). Однако невирусные векторы имеют один существенный недостаток, препятствующий их широкому клиническому применению, а именно, они обладают низкой эффективностью трансфекции (He et al., 2010). Поэтому необходимо было провести оптимизацию их строения с целью увеличения этой эффективности.

Одним из наиболее часто используемых полимеров для образования полиплексов является положительно заряженный полиэтиленимин (ПЭИ) (He et al., 2010). Благодаря тому, что поверхность клетки заряжена отрицательно, положительно заряженные наночастицы лучше связываются с ней и эффективнее проникают внутрь клетки (Hillaireau and Couvreur, 2009). С другой стороны, чтобы наночастицы полиплексов достигли нужного органа или ткани, необходимо, чтобы они имели достаточное время циркуляции в крови, для чего следует несколько экранировать их положительный заряд. Для этого, обычно к ним присоединяют полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГилирование приводит к образованию гидрофильной оболочки вокруг ядра, состоящего из ПЭИ и ДНК, а также уменьшает взаимодействие полиплексов с белками плазмы крови и эритроцитами. Кроме того, для улучшения проникновения полиплексов, содержащих ПЭИ-ПЭГ, в клетки в состав блок-сополимера часто включают проникающий в клетку пептид, например, TAT-пептид (Kleemann et al., 2005). Комплексы таких блок-сополимеров с ДНК показывают относительно хорошую эффективность трансфекции не только *in vitro*, но и *in vivo*. Поэтому полиплексы на основе блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ-TAT были выбраны нами для оптимизации их строения.

При проведении оптимизации мы варьировали только состав полиплексов, в то время как строение ПЭИ и ПЭГ оставались неизменными. В качестве ПЭИ мы выбрали линейный полимер с молекулярной массой 25 кДа, а ПЭГ - бифункциональный полиэтиленгликоль, состоящий из 24 звеньев. Синтез и характеристика ПЭИ-ПЭГ-TAT

описаны в разделе «Материалы и методы». Варьируемыми параметрами являлись соотношения ПЭГ/ПЭИ в блок-сополимерах и азота блок-сополимера к фосфату плазмидной ДНК в полиплексах, N/P. На восьми клеточных линиях были получены зависимости эффективности трансфекции клеток полиплексами от этих параметров (Рис. 4.1.1). Для всех изученных клеточных линий эти зависимости обладали схожим внешним видом, и на всех них в области значений ПЭГ/ПЭИ = 0,5–5 и N/P ≥ 20 наблюдался, по меньшей мере, один широкий пик (Рис. 4.1.1). Коэффициенты линейной корреляции поверхностей для различных клеточных линий находились в диапазоне 0,64–0,96 и были статистически значимыми ($p < 0,05$) (Табл. 4.1.1). Это указывает на то, что полученные оптимальные соотношения компонентов полиплекса можно использовать в дальнейшем для произвольной клеточной линии. Заметное отличие для различных клеточных линий было только в максимальной эффективности трансфекции.

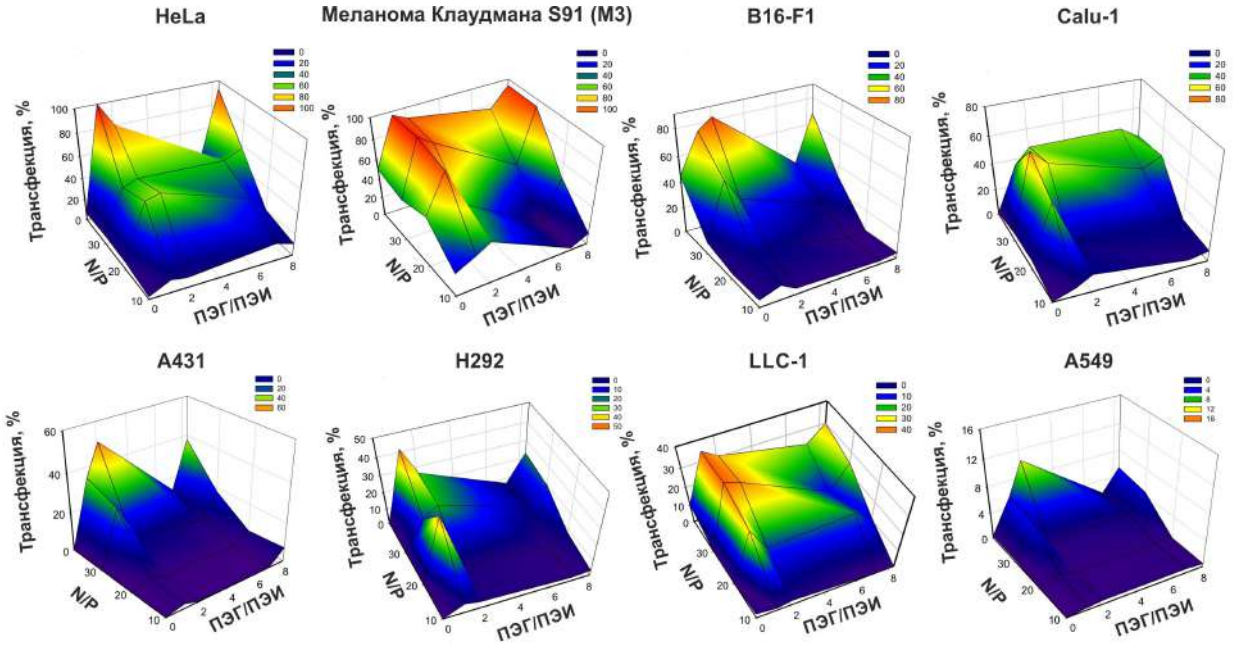


Рисунок 4.1.1. Зависимости эффективности трансфекции полиплексами различных клеточных линий от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P в полиплексах. Полиплесы содержали ген зеленого флуоресцентного белка, eGFP, под контролем цитомегаловирусного промотера. Долю клеток, экспрессирующих eGFP, определяли с помощью КЛСМ. Цветовая шкала высот приведена на врезках в соответствующие панели. Работа проведена совместно с А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым, А.А. Розенкранцем и другими сотрудниками лаборатории.

Для установления связи между ключевым параметром (ПЭГ/ПЭИ или N/P) и эффективностью трансфекции были вычислены частные коэффициенты корреляции первого порядка в случае, когда другой ключевой параметр был фиксирован (Табл. 4.1.2). В результате для большинства изученных клеточных линий была установлена статистически значимая отрицательная корреляция эффективности трансфекции с

соотношением ПЭГ/ПЭИ (при ПЭГ/ПЭИ ≥ 1,22) и положительная корреляция с соотношением ТАТ/ПЭИ.

Далее было установлено, каким образом ключевые параметры полиплексов (соотношения ПЭГ/ПЭИ и N/P) влияют на их размер и поверхностный потенциал. Было показано, что в исследованных диапазонах соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P электрофоретическая подвижность полиплексов не изменялась и рассчитанный ζ-потенциал был равен +21,2 ± 1,5 мВ. Это соответствует литературным данным для полиплексов, образованных похожими блок-сополимерами ПЭИ-ПЭГ-ТАТ, где этот потенциал составлял 20 ± 3 мВ (Kleemann et al., 2005). Таким образом, наночастицы полиплексов имеют высокий положительный заряд, благодаря чему полиплексы устойчивы в водной фазе.

Таблица 4.1.1. Коэффициенты корреляции эффективности трансфекции для различных изученных клеточных линий при соответствующих соотношениях ПЭГ/ПЭИ и N/P. $p < 0,05$ для всех изученных клеточных линий. M3 – меланома Клаудмана S91 (клон M3).

Линия клеток	**HeLa**	**H292**	**A549**	**Calu-1**	**A431**	**M3**	**B16F1**	**LLC-1**
HeLa	1	0,83	0,76	0,7	0,79	0,7	0,77	0,85
H292	0,83	1	0,64	0,74	0,67	0,78	0,67	0,83
A549	0,76	0,64	1	0,66	0,96	0,66	0,87	0,7
Calu-1	0,7	0,74	0,66	1	0,67	0,8	0,62	0,89
A431	0,79	0,67	0,96	0,67	1	0,69	0,91	0,74
M3*	0,7	0,78	0,66	0,8	0,69	1	0,76	0,83
B16F1	0,77	0,67	0,87	0,62	0,91	0,76	1	0,78
LLC-1	0,85	0,83	0,7	0,89	0,74	0,83	0,78	1

Известно, что эффективность трансфекции клеток с использованием полиплексов может зависеть не только ζ-потенциала, но и от размера этих полиплексов (Fischer et al., 2000; Kircheis et al., 2001). Поэтому с помощью динамического светорассеяния были изучены распределения наночастиц полиплексов по размеру. Эти распределения носили

бимодальный характер, как это в качестве примера показано на Рис. 4.1.2а. Два наблюдаемых пика могут отвечать компактизации суперскрученной и релаксированной форм плазмидной ДНК. Однако более 95% частиц представлены частицами меньшего размера, поэтому именно по ним был рассчитан средний гидродинамический диаметр полиплексов. Проведенные эксперименты по кинетике образования полиплексов показали, что через 30 минут размер полиплексов перестает заметно изменяться. Поэтому во всех проведенных экспериментах полиплексы инкубировались при комнатной температуре не меньше часа, а затем только изучались их характеристики или проводилась трансфекция клеток.

Таблица 4.1.2. Коэффициенты частной корреляции между эффективностью трансфекции полиплексов и соотношениями ПЭГ/ПЭИ или ТАТ/ПЭИ. Жирным курсивом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) коэффициенты корреляции.

Линия клеток	M3	B16F1	HeLa	A549	A431	H292	Calu-1	LLC-1
Эффективность трансфекции и ПЭГ/ПЭИ при фиксированном ТАТ/ПЭИ	-0,323	-0,429	***-0,496***	***-0,69***	-0,273	***-0,479***	***-0,717***	***-0,602***
Эффективность трансфекции и ТАТ/ПЭИ при фиксированном ПЭГ/ПЭИ	0,197	0,336	***0,616***	***0,68***	0,354	***0,475***	***0,787***	***0,66***

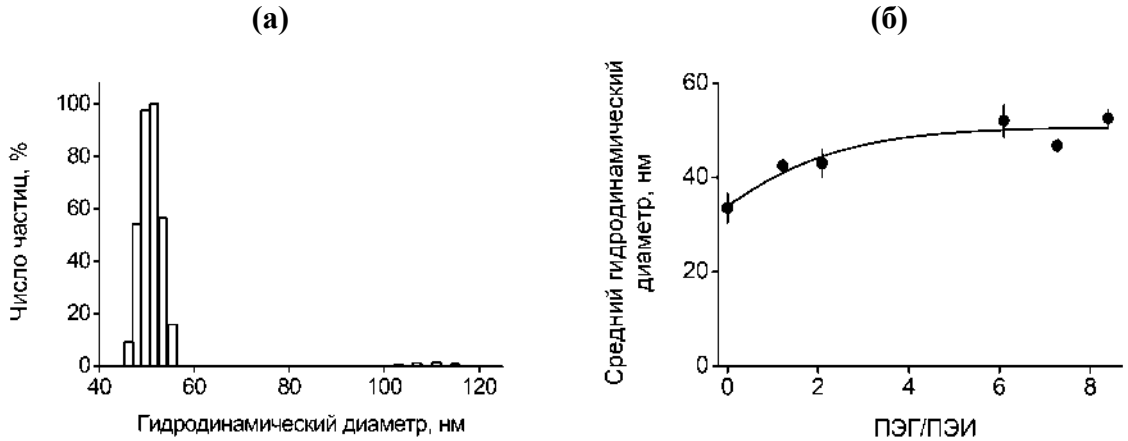


Рисунок 4.1.2. Изучение размеров наночастиц полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ и плазмидной ДНК pCMV-EGFP, произведенное с помощью динамического светорассеяния. (а) – типичное распределение полиплексов по их гидродинамическим диаметрам, представленное в % от максимума (ПЭГ/ПЭИ = 8,4; ТАТ/ПЭИ = 0,77 и N/P = 30). **(б)** – средний гидродинамический диаметр меньшей фракции наночастиц полиплексов.

В пределах ошибок эксперимента средние гидродинамические диаметры полиплексов при различных соотношениях N/P не различались. Напротив, увеличение соотношения ПЭГ/ПЭИ приводило к некоторому увеличению диаметра полиплексов с постепенным выходом на плато при ПЭГ/ПЭИ больше 6 (Рис. 4.1.2б). Изменение диаметра полиплексов может быть связано с увеличением гидратной оболочки полиплексов за счет увеличения числа гидрофильных молекул ПЭГ на их поверхности. Корреляции между размерами полиплексов и эффективностью трансфекции изучаемых клеток обнаружено не было. Это связано с тем, что эффективность трансфекции сильно зависела от соотношения N/P, а гидродинамический диаметр полиплексов напротив не зависел от этого соотношения. Следует отметить, что метод динамического светорассеяния плохо подходит для определения полидисперсности в случае присутствия в смеси множества частиц различных размеров (Mailer et al., 2015). Для определения полидисперсности обычно используются специальные алгоритмы, которые в данном случае могут приводить к некорректным результатам (Mailer et al., 2015). Поэтому для более детального изучения распределения полиплексов по размеру автором диссертации использовался метод АСМ.

С помощью АСМ были получены изображения полиплексов на слюде (типичное изображение полиплекса приведено на Рис. 4.1.3*а*). Полиплексы представляют собой слегка вытянутые частицы с соотношением сторон 1,7 ± 0,4 и размером 25–250 нм. Обработка изображений полиплексов проводилась, как это описано в «Материалах и методах» в Разделе 3.5. Чтобы выявить диапазон размеров полиплексов, который коррелирует с эффективностью трансфекции, были построены частотные гистограммы площади поперечного сечения наблюдаемых частиц (пример на Рис. 4.1.3*б*). Высота, на которой была получена эта площадь, подобрана таким образом, чтобы исключить большую часть загрязнений слюды другими сопутствующими полиплексам молекулами. Учитывая высокие значения N/P, большая часть блок-сополимеров не входит в состав полиплексов. Причем, блок-сополимеры могут образовывать агрегаты и усложнять анализ распределения полиплексов по размеру. В «Материалах и методах» в Разделе 3.5 описано, как проводилось построение гистограмм, где был учтен вклад свободных молекул блок-сополимеров (показана серым цветом на Рис. 4.1.3*б*). Полученные гистограммы позволяют определить долю наночастиц полиплексов определенного диапазона размеров.

Автором диссертации был проведен анализ корреляций этой доли и эффективности трансфекции клеток в культуре и выявлено, что только фракция наночастиц полиплексов с площадью поперечного сечения от 7000 до 17000 нм^2 наилучшим образом коррелирует с трансфекцией. Чтобы рассчитать, какому диапазону

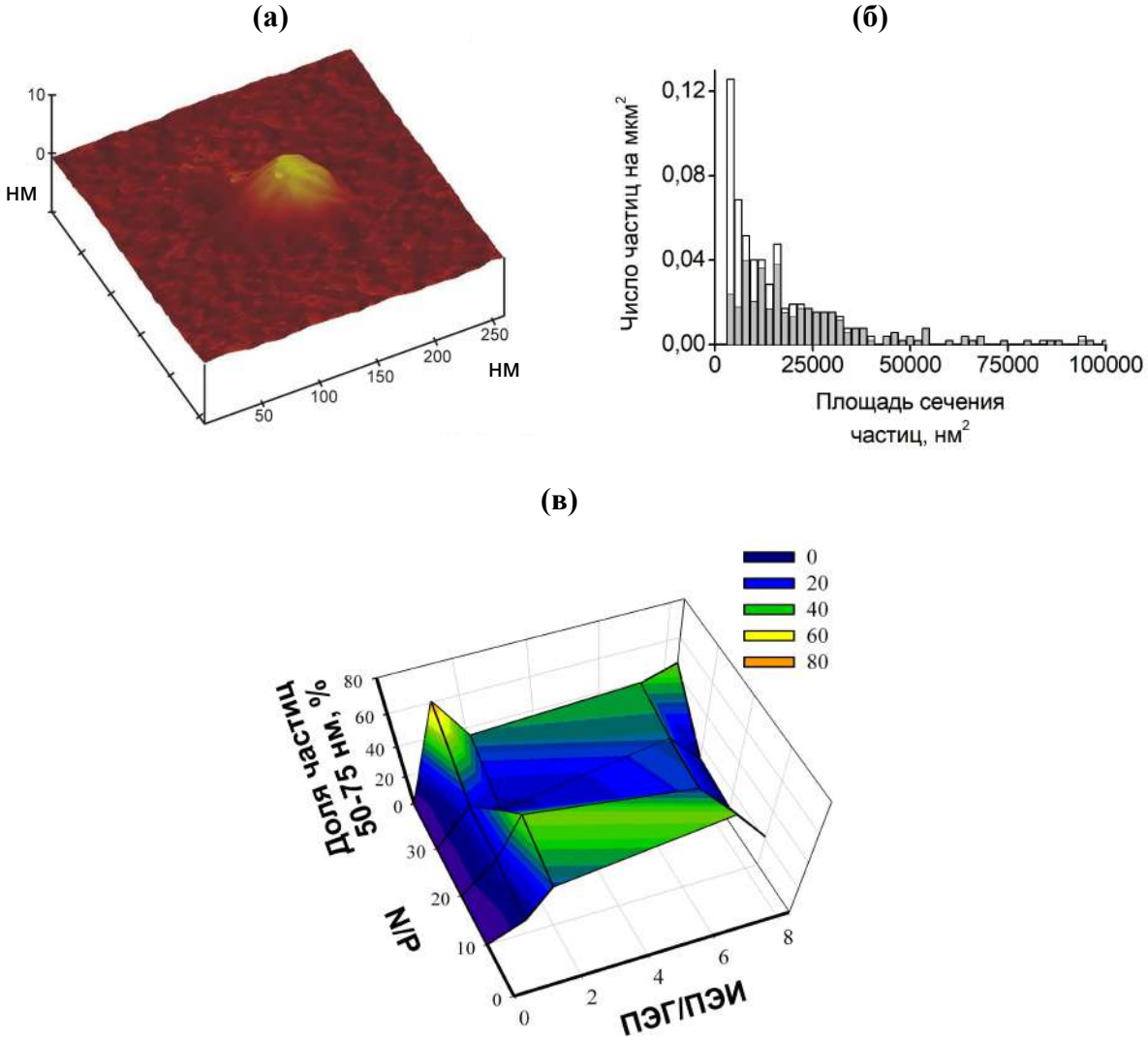


Рисунок 4.1.3. Изучение размеров наночастиц полиплексов на основе блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ-ТАТ и плазмидной ДНК pCMV-EGFP, произведенное с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). (а) – типичный вид частицы полиплекса на слюде (ПЭГ/ПЭИ = 1,22; ТАТ/ПЭИ = 0,4; N/P = 30). **(б)** – гистограмма распределения числа частиц на мкм^2 поверхности слюды от площади поперечного сечения частиц на высоте 7 нм (ПЭГ/ПЭИ = 1,22; ТАТ/ПЭИ = 0,4; N/P = 30, общее количество частиц в гистограмме – 490). Столбцы гистограммы представляют собой группы частиц определенного размера, отличающиеся друг от друга по площади не более чем на 2000 нм^2. Серым цветом показана гистограмма, где учтен вклад свободных молекул блок-сополимеров. **(в)** – Зависимость доли полиплексов средним диаметром 50–75 нм от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P. На врезке представлена шкала высот трехмерной гистограммы.

диаметров этот отвечает, было учтено уширение размеров полиплекса за счёт конечной кривизны используемого зонда АСМ (Раздел 3.5 в «Материалах и методах»). Кроме того, была учтена деформация молекул полиплекса на слюде. При этом предполагалось, что объем полиплекса не изменяется, а эффективный средний диаметр отвечает частицам полиплексов сферической формы. Проведенный анализ позволил заключить, что диапазон площади поперечного сечения полиплексов 7000–17000 нм^2 отвечает диапазону средних

диаметров полиплексов 50–75 нм. Зависимость доли фракции полиплексов диаметром 50–75 нм от соотношений ПЭГ/ПЭИ и N/P показана на Рис. 4.1.3в. Ее внешний вид оказался сходным с зависимостями для эффективности трансфекции (ср. Рис. 4.1.1 и Рис. 4.1.3в). Расчеты, проведенные для различных клеточных линий, показали достоверную линейную корреляцию между долей фракции полиплексов диаметром 50–75 нм и эффективностью трансфекции (Табл. 4.1.3).

Таблица 4.1.3. Линейная корреляция между долей фракции полиплексов диаметром 50–75 нм и эффективностью трансфекции для различных клеточных линий. ***r*** – коэффициент линейной корреляции; ***p*** – достоверность корреляции.

Линия клеток	*r*	*p*
Карцинома шейки матки человека HeLa	0,472	0,018
Мышиная меланома Клаудмана S91 (клон M3)	0,424	0,031
Эмбриональные клетки почки человека HEK 293	0,358	0,061
Меланома мышей B16-F1	0,412	0,035
Легочная карцинома человека Calu-1	0,671	0,0007
Эпидермоидная карцинома человека A431	0,435	0,028
Легочная карцинома человека NCI-H358	0,437	0,035
Легочная карцинома человека NCI-H292	0,413	0,035

Таким образом, было показано, что варьированием состава полиплекса можно достичь существенного увеличения эффективности трансфекции клеток данными полиплексами. Установлено, что эффективнее всего трансфицируют клетки полиплексы со средним диаметром 50–75 нм.

Результаты раздела 4.1.1 в основном изложены в статьях: 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 // Mol. Ther. – 2011. – V. 19. – P. 103-112 (первые три автора имеют одинаковый экспериментальный вклад, вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как синтез блок-сополимеров и определение их состава, анализ размеров полиплексов по данным динамического светорассеяния и полностью всей работы, связанной с получением и анализом изображений атомно-силовой микроскопии, а также в проведенном корреляционном анализе и участии в написании); 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2011. – V. 437. – P. 77-79 (вклад автора состоит в планировании части работ, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, анализе результатов, участии в написании); 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 // J. Control. Rel. – 2012. – Vol. 163. – №. 2. – P. 211-219 (вклад автора состоит в планировании части работ, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, анализе результатов, участии в написании); 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. – P. 10209-10216 (вклад автора состоит в планировании части работ, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, анализе результатов, участии в написании); 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 // J. Control. Rel. – 2015. – Vol. 215. – P. 73-81 (вклад автора состоит в планировании части работ, проведении части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, анализе результатов, участии в написании); Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Optimization of A549 cell transfection efficiency with a plasmid encoding the N-protein of the SARS-CoV-2 virus // Dokl. Biochem. Biophys. – 2025. – V. 521 – P. 157-159 (вклад автора состоит в планировании работ, проведении существенной части экспериментальных работ, в частности, синтеза конъюгатов и определения их состава, образовании полиплексов, изучении эффективности трансфекции с помощью динамического светорассеяния, участие в измерении размеров полиплексов с помощью динамического светорассеяния, анализе результатов, написании основного текста). Автор признателен всем соавторам этих статей, без вклада которых эти работы не могли бы быть осуществлены.

4.1.2. Компартментная модель проникновения полиплексов в клетку

Несмотря на сходство зависимостей эффективности трансфекции от ПЭГ/ПЭИ и N/P для различных клеточных линий, они существенно отличаются по максимально достигаемой эффективности трансфекции (Рис. 4.1.1). Так, для различных клеточных линий эта максимальная трансфекция варьирует от 17,7 до 100% (Табл. 4.1.4). Это отличие может быть связано как с особенностями транспорта полиплексов, так и с различным уровнем экспрессии маркерного гена под контролем цитомегаловирусного промотера в различных клеточных линиях. Чтобы исключить последнее было проведено сравнение эффективности трансфекции клеточных линий между цитомегаловирусным и другим сильным промотором – куриным β-актиновым/кроличьим β-глобиновым (CAGGS) (любезно предоставлен д.б.н. Буздиным А.А. (ИБХ РАН)). Экспрессия генов под контролем этих двух промотеров сопоставима друг с другом (Lebbink et al., 2011). Эффективности трансфекции различных клеточных линий под контролем этих двух промотеров достоверно коррелируют друг с другом (r = 0,962, p < 0,0001, Рис. 4.1.4). Следовательно, отличия в максимальной трансфекции связаны не с различием уровня экспрессии гена, а с различием транспорта полиплексов в клетки.

Таблица 4.1.4. Максимальная эффективность трансфекции полиплексами различных клеточных линий.

Линия клеток	Максимальная эффективность трансфекции, %
Карцинома шейки матки человека HeLa	до 100
Мышиная меланома Клаудмана S91 (клон M3)	98
Меланома мышей B16-F1	83
Легочная карцинома человека Calu-1	63
Эпидермоидная карцинома человека A431	50
Легочная карцинома человека NCI-H292	42
Легочная карцинома мышей LLC-1	35
Легочная карцинома человека A549	17,7

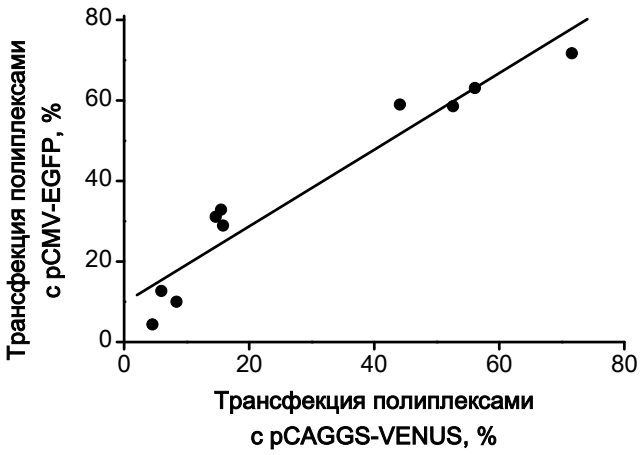


Рисунок 4.1.4. Сравнение эффективности трансфекции клеток полиплексами, содержащими ген зеленого флуоресцентного белка под контролем промоторов CMV и CAGGS. На графике представлены данные по клеточным линиям: A549 (N/P = 30), M3 (N/P = 30), BT-474 (N/P = 30 и 40), Calu-1 (N/P = 30 и 40). Эксперименты проведены совместно с А.В. Уласовым.

Для изучения транспорта и распаковки полиплексов использовалась флуоресцентная микроскопия, в частности конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). В этом случае образование и распад различных комплексов удобнее всего изучать с помощью резонансного переноса энергии по Фёрстеру (Förster Resonance Energy Transfer, FRET). Этот метод ранее был успешно использован для изучения процесса распаковки полиплексов в клетке (Breunig et al., 2006; Ho et al., 2006; Chen et al., 2008). За поведением отдельных наночастиц в клетке следили с помощью квантовых точек (QD) (Wegner and Hildebrandt, 2015), а для изучения распаковки полиплексов, блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ-TAT был помечен флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647. В свою очередь, ДНК было биотинилирована, что позволило присоединить к ней стрептавидин, меченный QD605. Когда QD605 и Alexa Fluor 647 находятся на расстоянии меньше 10 нм, то между ними может наблюдаться FRET. Важно, чтобы препараты плазмидной ДНК не содержали свободных квантовых точек. Специально проведенные эксперименты показали, что когда ДНК больше чем в два раза, чем QD, то свободных квантовых точек не наблюдалось. Таким образом, в клетках можно установить наблюдаются ли полиплексы с упакованной ДНК (наблюдается флуоресценция Alexa Fluor647 при возбуждении QD605, т.е. FRET) или с неупакованной ДНК (наблюдается только флуоресценция QD605, а флуоресценции Alexa Fluor647 при возбуждении QD605 не наблюдается, т.е. не наблюдается FRET). В последнем случае это может быть или свободная плазмидная ДНК или продукты ее деградации.

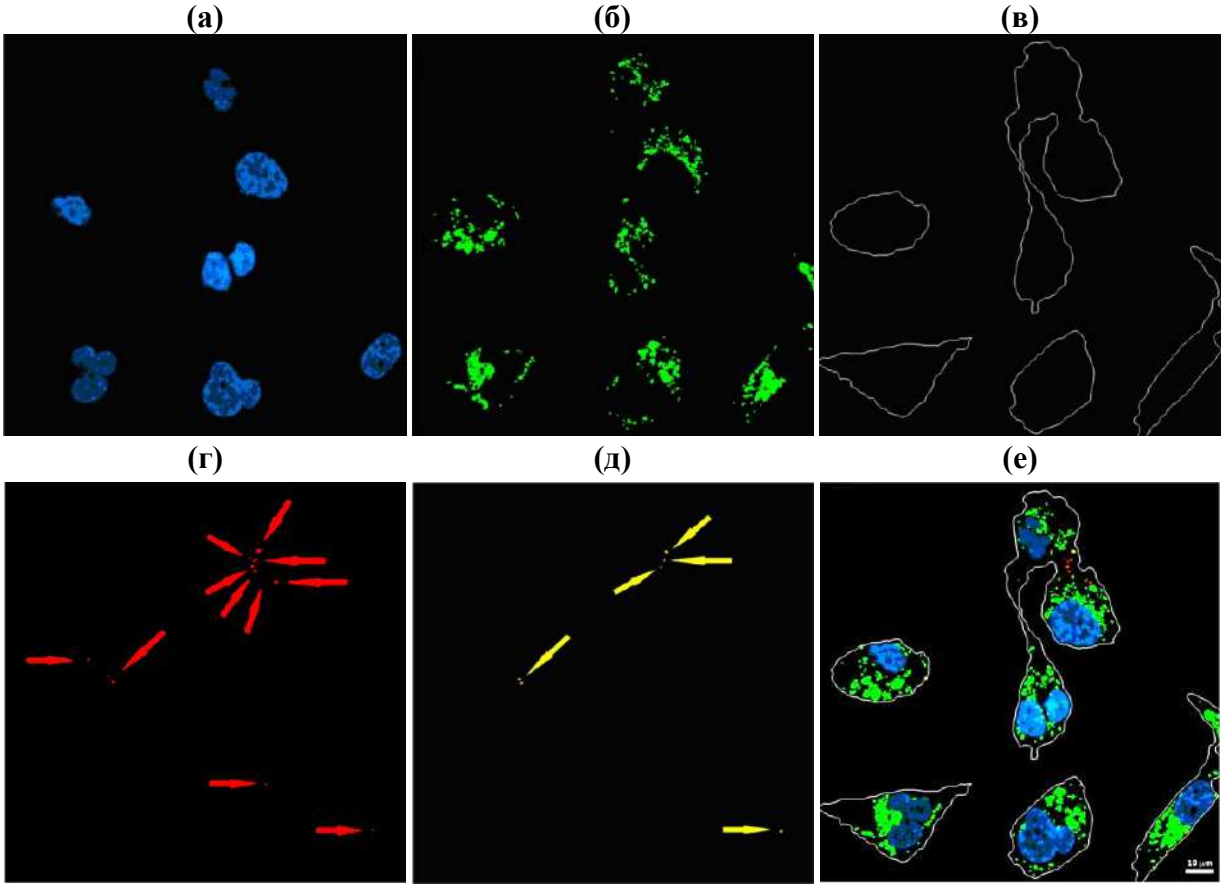


Рисунок 4.1.5. Анализ транспорта и распаковки полиплексов в живых клетках (A549) с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 META NLO. В составе полиплексов (N/P = 40) блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ-ТАТ был мечен Alexa Fluor® 647, а биотинилированная плазмидная ДНК мечена стрептавидиновым конъюгатом Qdot® 605 ITK ™. **(а)** – синяя прокраска ядер с помощью Хёхст 33258 (5 мкг/мл); **(б)** – зеленая прокраска эндо/лизосом с помощью LysoTracker ™ DND-26 (44 нМ); **(в)** – границы клеток, выявленные по флуоресценции Cy3, присоединенного к WGA; **(г)** – красная флуоресценция QD605 (упакованная и неупакованная ДНК); **(д)** – желтый сигнал FRET между QD605 и Alexa647 (упакованные частицы); **(е)** – наложение панелей **(а)** – **(г)**. Наночастицы полиплексов указаны стрелками на панелях **(г)** и **(д)**. Масштаб – 10 мкм. Представленные данные получены совместно с А.В. Уласовым, Г.А. Трусовым и А.А. Розенкранцем.

Изучение кинетики внутриклеточного транспорта и распаковки полиплексов проводили на трех линиях клеток, сильно отличающихся по эффективности трансфекции (Табл. 4.1.4), а именно, на карциномах легких человека A549 и Calu-1 и на мышиной меланоме Клаудмана S91 (клон M3). Типичный пример изображений для такого анализа представлен на Рис. 4.1.5. При этом для выявления ядер использовали Хёхст 33258, эндосом/лизосом – краситель LysoTracker Green DND-26, а поверхности клеток – лектин из проростков пшеницы (WGA), меченный красителем Cy-3. Полиплексы начинали регистрироваться в клетке спустя 30 минут после их добавления. Количество полиплексной ДНК, проникающей в клетку, Q, определялось как общий воксельный (трехмерный пиксель) объем квантовых точек на клетку. Для того чтобы учесть деление

клеток в ходе эксперимента, воксельный объем помножался на $2^{t/\tau}$, где t – время, прошедшее с момента добавки, а τ – время удвоения количества клеток (22 часа для A549 (Kremer et al., 2004), 60 часов для Calu-1 (ATCC) и 24 часа для M3 (Abdel-Malek et al., 1987)). По наличию или отсутствию FRET от квантовых точек к AlexaFluor647 определяли упакована ли ДНК в полиплексе или нет. Отличие воксельных объемов квантовых точек в различных каналах (для флуоресценции AlexaFluor647 и Qdot605, соответственно) учитывали введением поправочного коэффициента, полученного с помощью микроскопии меченных флуоресцентно полиплексов.

Для анализа транспорта и распаковки полиплексов в клетках автором диссертационной работы были предложены четыре компартментных модели, начиная с самой простой.

Модель 1: вход полиплексов в клетку. Вход ДНК полиплексов в клетку можно проиллюстрировать следующей простой схемой (Рис. 4.1.6а). Согласно этой схеме, изменения эффективной концентрации квантовых точек вне клетки, *P*, и общего воксельного объема квантовых точек на клетку, Q, можно описать следующей системой уравнений:

$$\frac{dP}{dt} = -k_{in} \cdot P$$

$$\frac{d\mathrm{Q}}{dt} = k_{in} \cdot P \qquad (4.1.1),$$

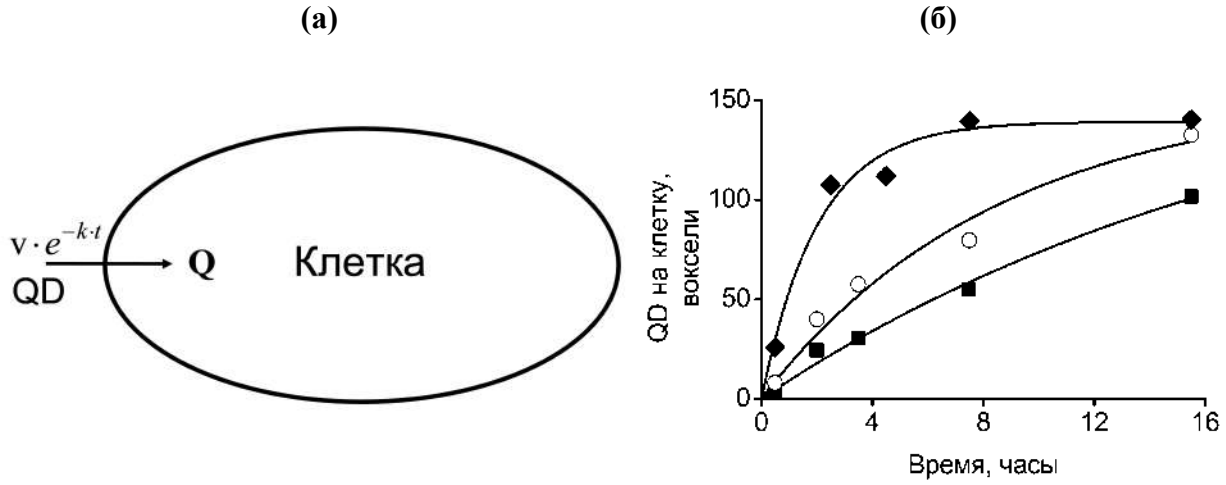


Рисунок 4.1.6. Схема транспорта ДНК в составе полиплексов, меченной квантовыми точками, QD, согласно модели 1 (а) и кинетики накопления QD в клетках (б). Q – общий воксельный объем квантовых точек на клетку; v - начальная скорость входа квантовых точек в клетку, *k* - константа скорости уменьшения входа квантовых точек в клетку за счет изменения их концентрации вне клетки. Показаны клетки A549 (■), Calu-1 (○) и M3 (♦) и интерполяция экспериментальных данных в соответствии с выражением (4.1.2).

где k_{in} – константа скорости входа квантовых точек в клетку. Решение системы уравнений (4.1.1) дает следующее выражение:

$$\mathrm{Q}(t) = \frac{\mathrm{v}}{k} \cdot \left(1 - e^{-k \cdot t}\right) \qquad (4.1.2),$$

где: $\mathrm{v} = k_{in} \cdot P_0$ – начальная скорость входа квантовых точек (P_0 – начальная концентрация квантовых точек вне клетки) и k – константа скорости уменьшения входа квантовых точек в клетки за счет падения их концентрации вне клетки. Была проведена интерполяция экспериментальных данных зависимостью (4.1.2) (Рис. 4.1.6б) и рассчитанные параметры приведены в Таблице 4.1.5. Экспериментальные данные хорошо описывались предложенными теоретическими кривыми (коэффициенты корреляции r = 0,996 (A549), r = 0,991 (Calu-1), r = 0,993 (M3)).

Модель 2: внутриклеточный транспорт полиплексов. Воксельные объемы квантовых точек в эндосомах и лизосомах, цитозоле и ядрах были обозначены как L, C и N, соответственно. Тогда внутриклеточный транспорт полиплексов можно изобразить схемой, представленной на Рис. 4.1.7а. Принимая во внимание то, что скорость входа полиплексов в клетку, $\mathrm{v} \cdot e^{-k \cdot t}$, была оценена в предыдущей модели, изменение концентрации квантовых точек в соответствующих компартментах можно описать следующей системой уравнений:

$$\begin{aligned}
&\frac{d\mathrm{L}}{dt} = \mathrm{v} \cdot e^{-k \cdot t} - k_2 \cdot \mathrm{L}, \\
&\frac{d\mathrm{C}}{dt} = k_2 \cdot \mathrm{L} - k_3 \cdot \mathrm{C}, \\
&\frac{d\mathrm{N}}{dt} = k_3 \cdot \mathrm{C}
\end{aligned} \qquad (4.1.3),$$

где k_2 and k_3 – константы скорости выхода квантовых точек из эндосом/лизосом и входа в ядро, соответственно. Решение системы уравнений (4.1.3) дает следующие выражения

$$\begin{aligned}
&\mathrm{L}(t) = \frac{\mathrm{v} \cdot \left(e^{-k \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t}\right)}{k_2 - k}, \\
&\mathrm{C}(t) = \frac{k_2 \cdot \mathrm{v}}{(k_2 - k) \cdot (k_3 - k)} \cdot \left(e^{-k \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t}\right) + \frac{k_2 \cdot \mathrm{v}}{(k_2 - k) \cdot (k_2 - k_3)} \cdot \left(e^{-k_2 \cdot t} - e^{-k_3 \cdot t}\right), \\
&\mathrm{N}(t) = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot \mathrm{v}}{(k_2 - k) \cdot (k_3 - k)} \cdot \left(\frac{e^{-k_3 \cdot t} - 1}{k_3} - \frac{e^{-k \cdot t} - 1}{k}\right) + \\
&+ \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot \mathrm{v}}{(k_2 - k) \cdot (k_2 - k_3)} \cdot \left(\frac{e^{-k_3 \cdot t} - 1}{k_3} - \frac{e^{-k_2 \cdot t} - 1}{k_2}\right)
\end{aligned} \qquad (4.1.4).$$

Экспериментальные данные были интерполированы соответствующими зависимостями (4.1.4) (Рис. 4.1.7б–г) и рассчитанные параметры приведены в Таблице 4.1.5.

Теоретические кривые описывали экспериментальные данные с коэффициентами корреляции r = 0,978 (A549), r = 0,970 (Calu-1) и r = 0,956 (M3).

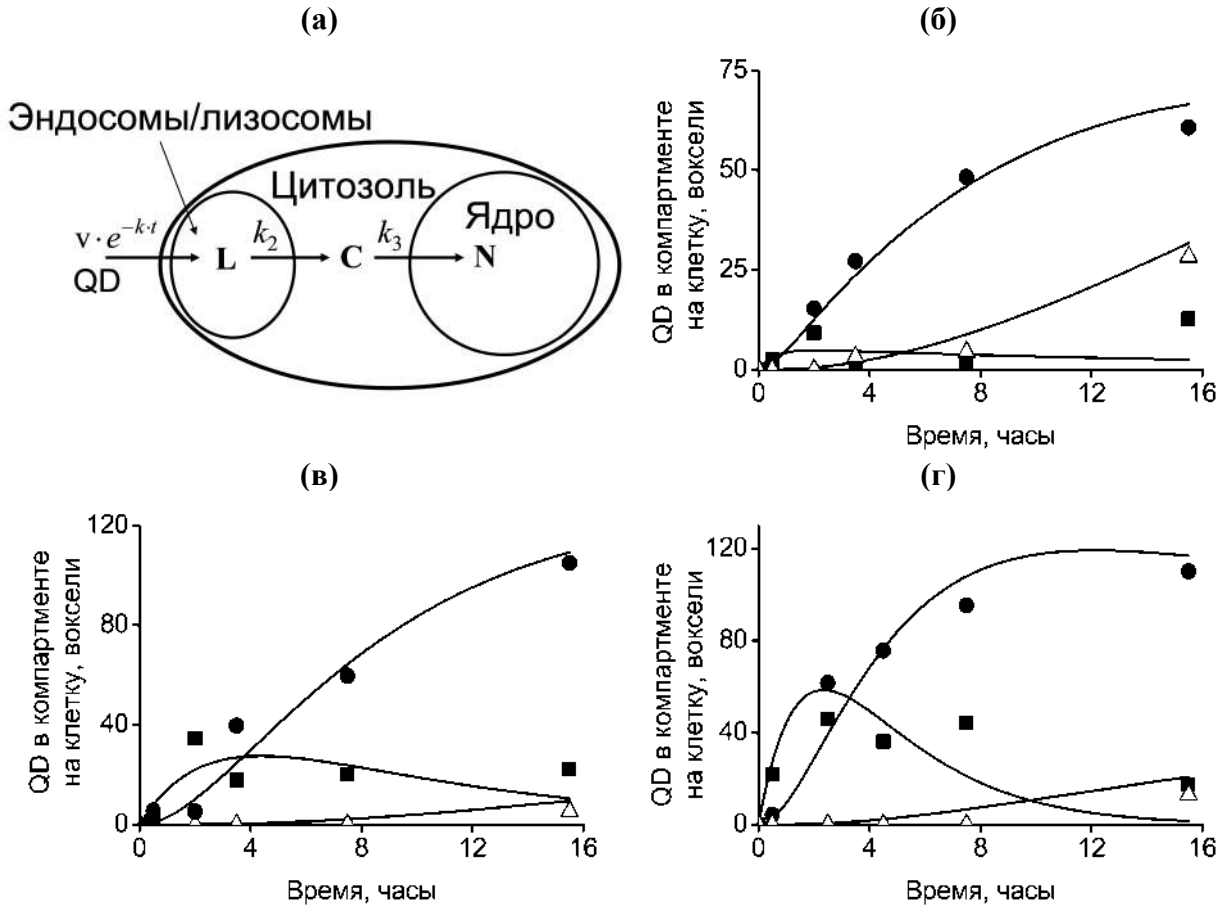


Рисунок 4.1.7. Схема транспорта ДНК в составе полиплексов, меченной квантовыми точками, QD, согласно модели 2 (а) и кинетики накопления QD в эндосомах и лизосомах (■), цитозоле (●) и в ядрах (Δ) для A549 (б), Calu-1 (в) и меланомы Клаудмана S91 (клон M3) (г). k_2 - константа скорости выхода QD из эндо/лизосом; k_3 - константа скорости входа QD в ядро. Сигнал QD представлен в воксельных объемах на клетку. Линиями показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с выражениями (4.1.3).

Модель 3: распаковка полиплексов в клетке. Общий воксельный объем флуоресценции квантовых точек на клетку, Q, можно подразделить на воксельный объем квантовых точек, упакованных в полиплекс, Q_p (наблюдается FRET) и воксельный объем квантовых точек, не входящих в состав полиплексов, Q_u (FRET не наблюдается). Поставленные эксперименты указывают на то, что в клетку попадают не только упакованные в полиплексы квантовые точки, но и неупакованные или частично неупакованные квантовые точки. Последние появляются в клетке даже раньше упакованных квантовых точек. Поэтому надо рассматривать вход упакованных и неупакованных в полиплексы квантовых точек в клетку по отдельности, так как это схематически показано на Рис. 4.1.8а. Тогда изменение концентраций упакованных и распакованных полиплексов в клетке можно описать следующими выражениями:

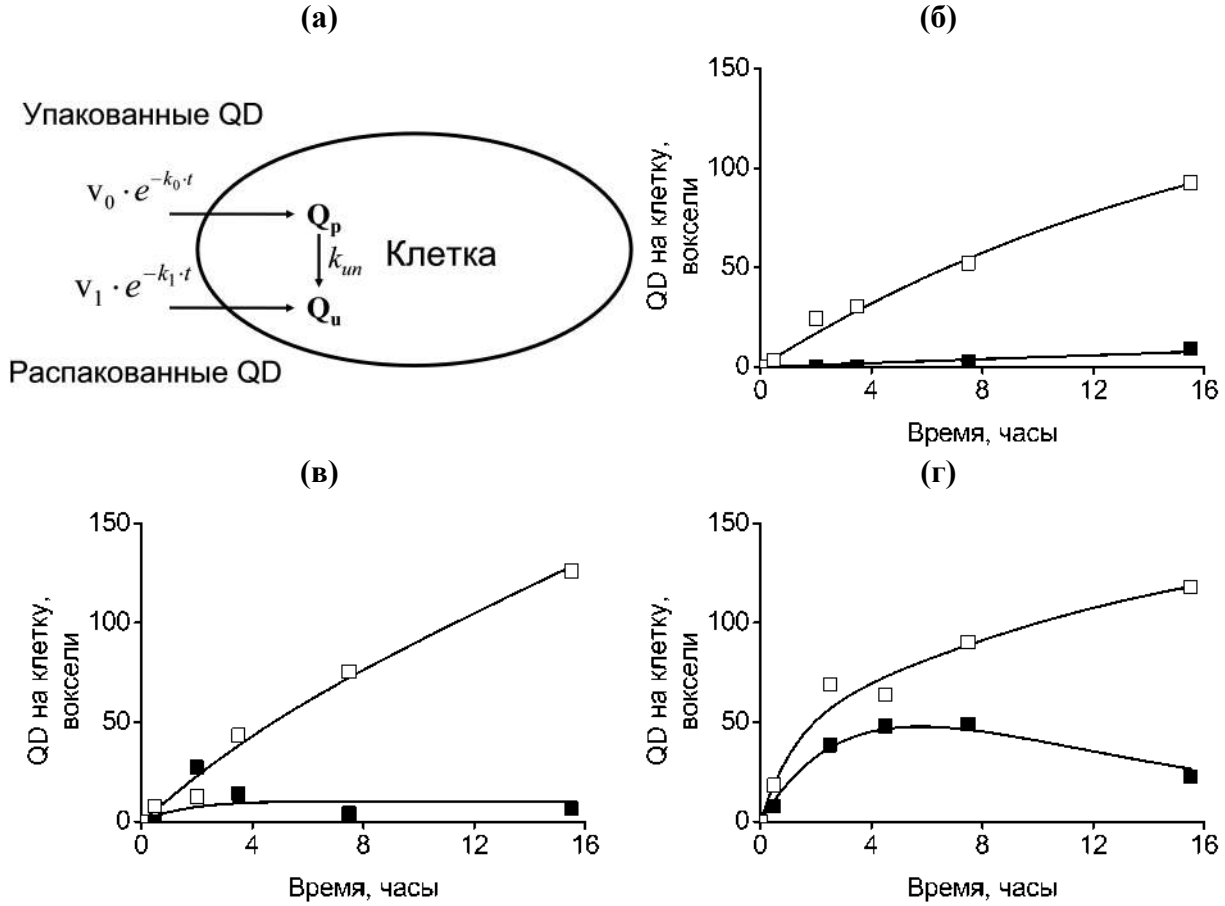


Рисунок 4.1.8. Схема транспорта и распаковки ДНК в составе полиплексов, меченной квантовыми точками, QD, согласно модели 3 (а) и кинетики распаковки ДНК с QD в клетках A549 (б), Calu-1 (в) и меланомы Клаудмана S91 (клон M3) (г). Q_p – общий воксельный объем сигнала квантовых точек упакованной ДНК с QD 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 концентрации вне клетки для упакованной и распакованной ДНК с QD, соответственно. Показаны упакованная в полиплексы ДНК с QD (■) и неупакованная ДНК с QD (□) в клетках. Линиями показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с выражениями (4.1.6).

$$\frac{dQ_p}{dt} = v_0 \cdot e^{-k_0 \cdot t} - k_{un} \cdot Q_p,$$
$$\frac{dQ_u}{dt} = v_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} + k_{un} \cdot Q_p \qquad (4.1.5),$$

где k_{un} – константа скорости распаковки полиплексов, а v_0 и v_1 – начальные скорости входа в клетку упакованных и неупакованных в полиплексы квантовых точек, соответственно ($v_0 + v_1 = v$; v уже было рассчитано выше); k_0 и k_1 – константы скорости уменьшения входа в клетку для упакованных и неупакованных в полиплексы квантовых точек, соответственно. Решение системы (4.1.5) дает следующие выражения:

$$Q_p(t) = \frac{v_0 \cdot \left(e^{-k_0 \cdot t} - e^{-k_{un} \cdot t}\right)}{k_{un} - k_0},$$

$$Q_u(t) = \frac{k_{un} \cdot v_0}{k_{un} - k_0} \cdot \left(\frac{e^{-k_{un} \cdot t} - 1}{k_{un}} - \frac{e^{-k_0 \cdot t} - 1}{k_0} \right) + \frac{v_1}{k_1} \cdot \left(1 - e^{-k_1 \cdot t}\right) \quad (4.1.6).$$

Соответствующие экспериментальные данные были интерполированы зависимостями (4.1.6) (Рис. 4.1.8б–г) и рассчитанные параметры приведены в Таблице 4.1.5. Теоретические кривые описывали экспериментальные данные с коэффициентами корреляции r = 0,996 (A549), r = 0,981 (Calu-1) и r = 0,991 (M3). Полученные константы скорости распаковки полиплексов лежали в диапазоне 0,1–0,84 $ч^{-1}$, что близко к оптимальной скорости распаковки ДНК из полиплексов (10^{-4}–0,6 $ч^{-1}$) согласно проведенному теоретическому анализу (Varga et al., 2001).

Модель 4: внутриклеточный транспорт и распаковка полиплексов в клеточных компартментах. Данная модель схематически представлена на Рис. 4.1.9. В ней учтен не только внутриклеточный транспорт полиплексов, но и распаковка их в различных компартментах. В данной модели концентрация полиплексов (воксельный объем квантовых точек), подвергающихся распаковке в эндосомах и лизосомах, была обозначена как L_{u1}. Напротив, концентрация полиплексов, которые попадают в эндосомы и лизосомы уже в распакованном виде, была обозначена как L_{u2}. Общий воксельный объем квантовых точек на клетку в ядрах был обозначен N, а воксельные объемы упакованных квантовых точек в цитозоле и эндосомах и лизосомах обозначены как C_p и L_p, соответственно. Величины v_0, k_0, v_1 и k_1, входящие в данную модель, были описаны и рассчитаны выше. Данная модель позволяет оценить значения следующих параметров: k_{unL} – константа скорости распаковки ДНК с QD в эндосомах и 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 неупакованной ДНК с QD в ядра. Модель описывает следующая система дифференциальных уравнений:

$$\frac{dL_{u1}}{dt} = k_{unL} \cdot L_p,$$

$$\frac{dL_{u2}}{dt} = v_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} - k_{2u} \cdot L_{u2},$$

$$\frac{dL_p}{dt} = v_0 \cdot e^{-k_0 \cdot t} - k_{unL} \cdot L_p - k_{2p} \cdot L_p,$$

$$\frac{d(C_u + N)}{dt} = k_{unC} \cdot C_p + k_{2u} \cdot L_{u2},$$

$$\frac{dC_p}{dt} = k_{2p} \cdot L_p - k_{unC} \cdot C_p,$$

$$\frac{d\mathrm{N}}{dt} = k_{3\mathrm{u}} \cdot \mathrm{C_u} \qquad (4.1.7).$$

Интегрирование системы (4.1.7) дает следующие выражения для концентраций упакованных и неупакованных в полиплексы квантовых точек в различных клеточных компартментах:

$$\mathrm{L_u}(t) = \frac{\mathrm{v}_1}{k_1} \cdot \left(1 - e^{-k_1 \cdot t}\right) + k_{unL} \cdot \int_0^t \mathrm{L_p} \cdot dt - k_{2\mathrm{u}} \cdot \int_0^t \mathrm{L_u} \cdot dt + k_{2\mathrm{u}} \cdot k_{unL} \cdot \int_0^t \int_0^t \mathrm{L_p} \cdot dt,$$

$$\mathrm{L_p}(t) = \frac{\mathrm{v}_0}{k_0} \cdot \left(1 - e^{-k_0 \cdot t}\right) - \left(k_{unL} + k_{2\mathrm{p}}\right) \cdot \int_0^t \mathrm{L_p} \cdot dt,$$

$$\mathrm{C_u} + \mathrm{N}(t) = k_{unC} \cdot \int_0^t \mathrm{C_p} \cdot dt + k_{2\mathrm{u}} \cdot \int_0^t \mathrm{L_u} \cdot dt - k_{2\mathrm{u}} \cdot k_{unL} \cdot \int_0^t \int_0^t \mathrm{L_p} \cdot dt,$$

$$\mathrm{C_p}(t) = k_{2\mathrm{p}} \cdot \int_0^t \mathrm{L_p} \cdot dt - k_{unC} \cdot \int_0^t \mathrm{C_p} \cdot dt,$$

$$\mathrm{N}(t) = k_{3\mathrm{u}} \cdot \int_0^t \mathrm{C_u} \cdot dt \qquad (4.1.8).$$

Экспериментальные данные описывались уравнениями (4.1.8) с коэффициентами корреляции r = 0,975 (A549), r = 0,833 (Calu-1) и r = 0,941 (M3). Рассчитанные из модели 4 параметры приведены в Таблице 4.1.5.

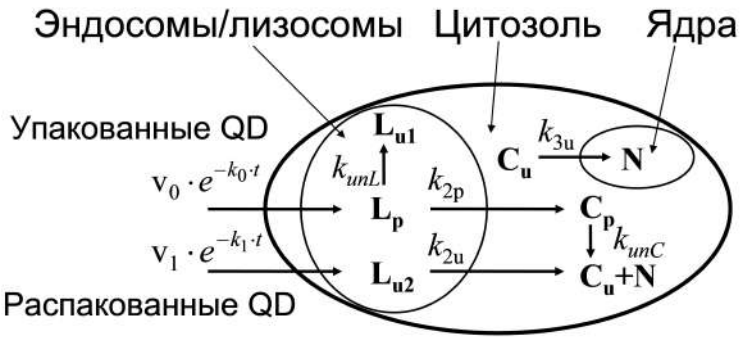


Рисунок 4.1.9. Схема транспорта и распаковки ДНК в составе полиплексов, меченной квантовыми точками, QD, согласно модели 4. $\mathrm{L_{u1}}$ – воксельный объем квантовых точек для ДНК, подвергающейся распаковке внутри эндосом и лизосом; $\mathrm{L_{u2}}$ – воксельный объем квантовых точек для ДНК, которая попала в эндосомы и лизосомы после предварительной распаковки на клеточной поверхности; N – воксельный объем квантовых точек на клетку в ядрах; $\mathrm{C_p}$ и $\mathrm{L_p}$ – воксельные объемы квантовых точек для упакованной в полиплексы ДНК с QD в цитозоле и эндосомах/лизосомах, соответственно; v_0 и v_1 – скорости входа в клетку упакованной и неупакованной 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; 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.

Анализ данных, представленных в Таблице 4.1.5, позволяет заключить, что не наблюдается монотонной зависимости максимальной эффективности трансфекции, TE_{max}, от значений параметров k_{2p}, k_{2u}, k_3, k_{3u} или k_{unC}. Напротив, TE_{max} монотонно возрастала при увеличении скорости входа полиплексов в клетку (v, v_0 или v_1) или уменьшении константы скорости распаковки полиплексов в эндосомах/лизосомах (k_{unL}). Установлена статистически значимая (p = 0,0016) отрицательная линейная корреляция (r = –1) между величиной, обратной скорости входа полиплексов в клетку, 1/v, и TE_{max}. Эта корреляция существует и при различных временах инкубации полиплексов с клетками (Табл. 4.1.6). Кроме того, достоверная отрицательная линейная корреляция обнаружена между величиной TE_{max} и k_{unL}. Это связано, вероятно, с тем, что распаковка полиплексов в эндосомах или лизосомах будет приводить к деградации ДНК, т.е. снижать эффективность трансфекции клеток.

Таблица 4.1.5. Оцененные по предложенным моделям параметры транспорта и распаковки полиплексов.

Параметр	Линия клеток		
	A549	**Calu-1**	**M3**
TE_{max}[a] (%)	17,7 ± 5,2	63,2 ± 1,8	98,0 ± 0,8
v (воксель/ч)	9,4 ± 1,0	18 ± 2	68 ± 10
k (ч$^{-1}$)	0,051 ± 0,017	0,12 ± 0,03	0,49 ± 0,08
1/v (ч/воксель)	0,107 ± 0,011	0,055 ± 0,008	0,015 ± 0,002
v_0 (воксель/ч)	0,49 ± 0,15	7 ± 2	24 ± 4
k_0 (ч$^{-1}$)	0	0	0,28 ± 0,08
v_1 (воксель/ч)	8,9 ± 1,0	11 ± 3	44 ± 10
k_1 (ч$^{-1}$)	0,056 ± 0,005	0,3 ± 0,2	0,73 ± 0,12
k_2 (ч$^{-1}$)	1,7 ± 0,6	0,39 ± 0,06	0,37 ± 0,05
k_{2p}(ч$^{-1}$)	0,2 ± 0,2	0,52 ± 0,09	0,24 ± 0,02
k_{2u}(ч$^{-1}$)	2,21 ± 0,13	3,9 ± 1,7	0,60 ± 0,06
k_3 (ч$^{-1}$)	0,049 ± 0,005	0,010 ± 0,005	0,015 ± 0,006
k_{3u} (ч$^{-1}$)	0,047 ± 0,004	0,0061 ± 0,0007	0,013 ± 0,002
k_{un} (ч$^{-1}$)	≤ 0,84[b]	0,6 ± 0,4	0,10 ± 0,02
k_{unL} (ч$^{-1}$)	0,49 ± 0,05	0,217 ± 0,007	0,063 ± 0,006
k_{unC} (ч$^{-1}$)	≤ 0,95[b]	1,5 ± 0,3	0,14 ± 0,03

[a]TE_{max} – максимальная эффективность трансфекции; [b]оценка сверху.

Таблица 4.1.6. Корреляция между максимальной эффективностью трансфекции и параметрами транспорта и распаковки полиплексов.

Время инкубации с полиплексами, часы	Максимальная эффективность трансфекции для линии (TE_{max},%)			Коэффициент корреляции, r, между TE_{max} и параметром	
	A549	Calu-1	M3	1/v	k_{unL}
16	3,9	15,5	25,1	-0,999*	-0,995*
24	5,2	25,6	44,0	-1*	-0,997*
72	17,7	63,2	98,0	-1*	-0,971*

*$p \leq 0{,}05$

Итак, ключевыми параметрами, влияющими на эффективность трансфекции клеток полиплексами, являются интернализация полиплексов и их распаковка в эндосомах/лизосомах. Согласно предложенным автором диссертационной работы моделям, скорость интернализации полиплесов пропорциональна их концентрации. Иными словами, увеличения эффективности трансфекции можно достичь путем увеличения концентрации переносимой полиплексами плазмидной ДНК. А уменьшение скорости распаковки полиплексов в эндосомах и лизосомах теоретически будет достигаться увеличением соотношения 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 диссертационной работы были подтверждены им экспериментально. Так для линии клеток A549, обладающей наименьшей из изученных нами линий эффективностью трансфекции (см. Табл. 4.1.4), возрастания этой эффективности вплоть до 100% можно достичь как увеличением концентрации плазмидной ДНК, так и увеличением соотношения N/P (Рис. 4.1.10а). Более того, при N/P = 30 наблюдалась статистически значимая отрицательная линейная корреляция (r = -0,997, p < 0,01) между эффективностью трансфекции и обратной концентрацией плазмидной ДНК (Рис. 4.1.10б).

Таким образом, используя компартментные модели проникновения и распаковки полиплексов в клетки, были обнаружены ключевые параметры, влияющие на процент успешной трансфекции клеток полиплексами. Воздействие на эти параметры путем увеличения концентрации полиплексов и соотношения N/P в полиплексах позволило повысить эффективность трансфекции клеток данными полиплексами от нескольких процентов вплоть до 100 %.

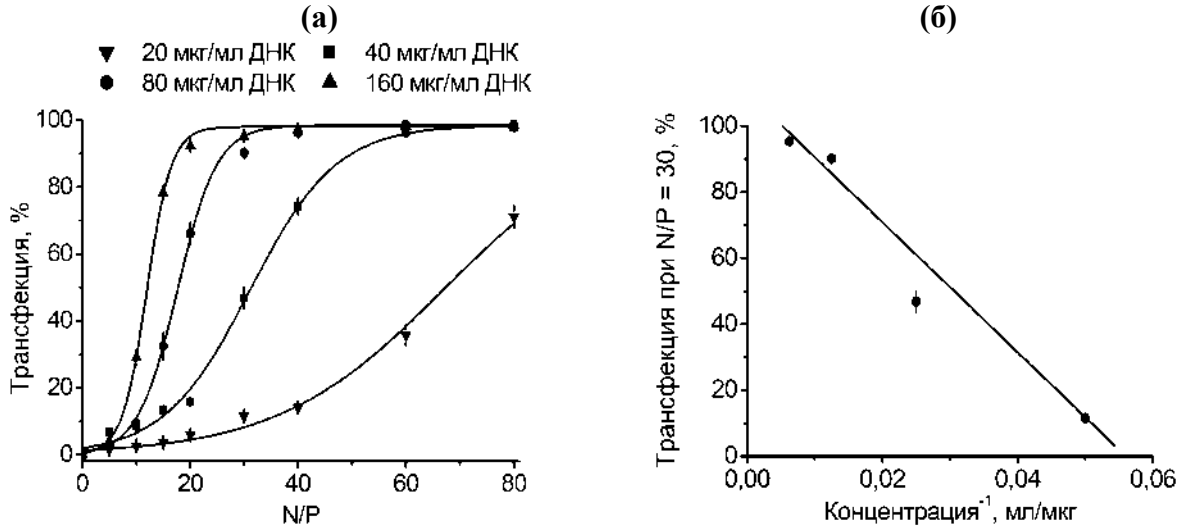


Рисунок 4.1.10. Зависимости эффективности трансфекции полиплексами клеточной линии A549 от соотношений N/P при различных концентрациях плазмидной ДНК в полиплексах (а) и обратной концентрации плазмидной ДНК в полиплексах при N/P = 30 (б). Полиплексы (ПЭГ/ПЭИ = 4,9, ТАТ/ПЭИ = 0,4) содержали ген желтого флуоресцентного белка, TurboYFP, под контролем цитомегаловирусного промотера. Долю клеток, экспрессирующих TurboYFP, определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 8–12).

Результаты раздела 4.1.2 в основном изложены в статьях: 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 // Mol. Ther. – 2011. – V. 19. – P. 103-112 (первые три автора имеют одинаковый экспериментальный вклад, вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как синтез блок-сополимеров и определение их состава, анализ размеров полиплексов по данным динамического светорассеяния и полностью всей работы, связанной с получением и анализом изображений атомно-силовой микроскопии, так и во всем модельном анализе транспорта и распаковки полиплексов, проведенном корреляционном анализе и участии в написании); Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rodichenko N., and Sobolev A.S. Intracellular Transport and Unpacking of Polyplex Nanoparticles // In: Handbook of Clinical Nanomedicine. R. Bawa, G.F. Audette, B. Reese Eds. Taylor & Francis Group. N-Y. 2016 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как синтез блок-сополимеров и определение их состава, так и всем модельном анализе транспорта и распаковки полиплексов, проведенном корреляционном анализе и участии в написании). Автор признателен всем соавторам этих статей, без вклада которых эти работы не могли бы быть осуществлены.

4.2. Модульные нанотранспортеры (МНТ) и их строение

В предыдущем разделе показан пример оптимизации строения модульных молекулярных конструкций – полиплексов для повышения эффективности их доставки в клетки. Однако полиплексы способны доставлять только нуклеиновые кислоты. Для доставки другого типа молекул, где не требуется их компактизация, хорошо подходят предложенные ранее А. С. Соболевым другие модульные молекулярные конструкции – модульные нанотранспортеры (МНТ) (Sobolev, 2008; Sobolev, 2009a; Sobolev, 2009b). Они представляют собой рекомбинантные полипептидные конструкции, состоящие из нескольких модулей, обладающих различными функциями. Для связывания и интернализации в клетки-мишени используется лигандный модуль, способный взаимодействовать с интернализуемым рецептором, сверхэкспрессированным на поверхности клеток-мишеней. После интернализации МНТ оказываются в эндосомах, содержимое которых постепенно закисляется. Чтобы выйти из эндосом, избежав попадания в лизосомы, в МНТ используется эндосомолитический модуль, активирующийся при уменьшении pH среды. Часто необходимо также доставка МНТ в выбранный компартмент клетки-мишени, например, в ядро, для чего тоже существует специальный модуль. Все модули вместе объединяет модуль-носитель, который служит также для присоединения доставляемой молекулы.

Эффективная интернализация МНТ в клетки-мишени достигается выбором подходящего интернализуемого рецептора, который должен быть сверхэкспрессирован на поверхности данных клеток. В большинстве меланом человека увеличена экспрессия рецептора к α-меланоцитстимулирующему гормону (α-МСГ). Учитывая, что последовательность α-МСГ (SYSMEHFRWGKPV) одинакова у человека, мыши и некоторых других млекопитающих, она была выбрана в качестве лигандного модуля у первых разработанных МНТ. Кроме того, во многих опухолевых клетках, таких как рак легких, мочевого пузыря, головы и шей, молочной железы, глиомы и др., наблюдается повышенная экспрессия РЭФР человека. Поэтому были получены МНТ, содержащие в качестве лигандного модуля ЭФР, а также антителоподобную молекулу – аффибоди к РЭФР. Кроме того, были получены МНТ, которые в качестве лигандного модуля содержали низкомолекулярное вещество – фолат. Повышенная экспрессия рецепторов фолата наблюдается на поверхностях клеток карцином легких, почек, молочной и поджелудочной желез, мочевого пузыря, эндометрия, мезотелиомах, а так же, как правило, на клетках карциномы яичника (Parker et al., 2005; Scaranti et al., 2020). Для создания МНТ с фолатом был использован безлигандный МНТ с дополнительным цистеином на С-конце молекулы.

После проведения ряда предварительных экспериментов в качестве эндосомолитического модуля был выбран транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс). Изменение конформации ДТокс при переходе от нейтральной к слабокислой среде способно привести к нарушению целостности липидного бислоя. Это должно способствовать выходу МНТ из эндосом в цитозоль до того, как содержимое эндосом попадет в лизосомы и подвергнется там деградации.

В случае необходимости доставки МНТ в ядро, использовали оптимизированный сигнал ядерной локализации (СЯЛ) большого Т-антигена вируса SV40, где на N-конце был добавлен регуляторный участок, ускоряющий ядерный импорт, и в котором была заменена аминокислота, ингибирующая ядерный импорт (SSDDEATADAQHAAPPKKKRKVEDP).

Объединение модулей в единое целое и их пространственное разнесение для уменьшения их взаимного влияния осуществлялось с помощью модуля-носителя – гемоглобиноподобного белка *E.coli* (HMP). HMP не только позволяет присоединять к МНТ доставляемую молекулу, но и придает МНТ достаточно хорошую растворимость, что способствует получению МНТ из *E.coli* в достаточных для экспериментов количествах.

Показано, что все модули в составе МНТ сохраняют свои функциональные свойства. Для МНТ с ЭФР и α-МСГ в качестве лигандного модуля это было описано в статьях 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 Res. – 2006. – V. 66. – № 21. – P. 10534-10540 (вклад автора состоит в проведении экспериментальных работ по образованию дефектов в липидных с мембранах под влиянием МНТ, проведенных с помощью АСМ, а также в участии в написании); 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 // Int. J. Nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 467-482 (вклад автора состоит в проведении части экспериментальных работ, таких как изучение МНТ в липидном бислое с помощью АСМ и измерение размеров МНТ с помощью динамического светорассеяния, а также в участии в написании); 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. – 1331 (вклад автора состоит в

проведении части экспериментальных работ, таких как изучение биораспределения МНТ в организмах экспериментальных животных, участии в обсуждении и написании); 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. – 2448 (вклад автора состоит в проведении части экспериментальных работ, таких как получение и характеристика с помощью проточной цитофлуориметрии клеток меланомы с РЭФР, участии в обсуждении и написании). А для фолатного рецептора это было показано в статьях 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2017. – V. 473. – P. 85-87 (вклад автора состоит в проведении части экспериментальных работ, таких как изучение связывания и интернализации МНТ с проточной цитометрии, а также в участии в написании) и 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 Des. Dev. Ther. – 2017. – V. 11. – P. 1315-1334 (вклад автора состоит в проведении части экспериментальных работ, таких как изучение связывания и интернализации МНТ с проточной цитометрии, а также в участии в написании). Причем, как установлено в этих работах, МНТ повышает на порядки эффективность доставки цитотоксической молекулы, например, фотосенсибилизатора или радиоизотопа, в ядра клеток-мишеней. Более того, МНТ с цитотоксическим агентом оказывается эффективным не только *in vitro*, но и *in vivo*. Это ясно видно по достоверным данным о задержке роста опухолей и увеличении продолжительности жизни мышей, вплоть до полного излечения экспериментальных животных. Чтобы понять, каким образом можно еще увеличить эффективность воздействия на внутриклеточную мишень доставляемых с помощью МНТ молекул, была изучена трехмерная структура МНТ.

Так как множественные попытки кристаллизовать МНТ были безуспешными, его строение изучили с помощью сочетания методов АСМ, ПЭМ и МРР. Для экспериментов были выбраны два типа МНТ, где в качестве лигандного модуля выступали ЭФР и α-МСГ, заметно отличающиеся по размеру друг от друга. Определенный с помощью динамического светорассеяния гидродинамический диаметр для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР составлял 8,3 ± 0,6 и 10,6 ± 0,5 нм, соответственно.

Форма МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР была исследована автором диссертационной работы с помощью метода АСМ. Измерения проводились в жидкой фазе в 10 мМ

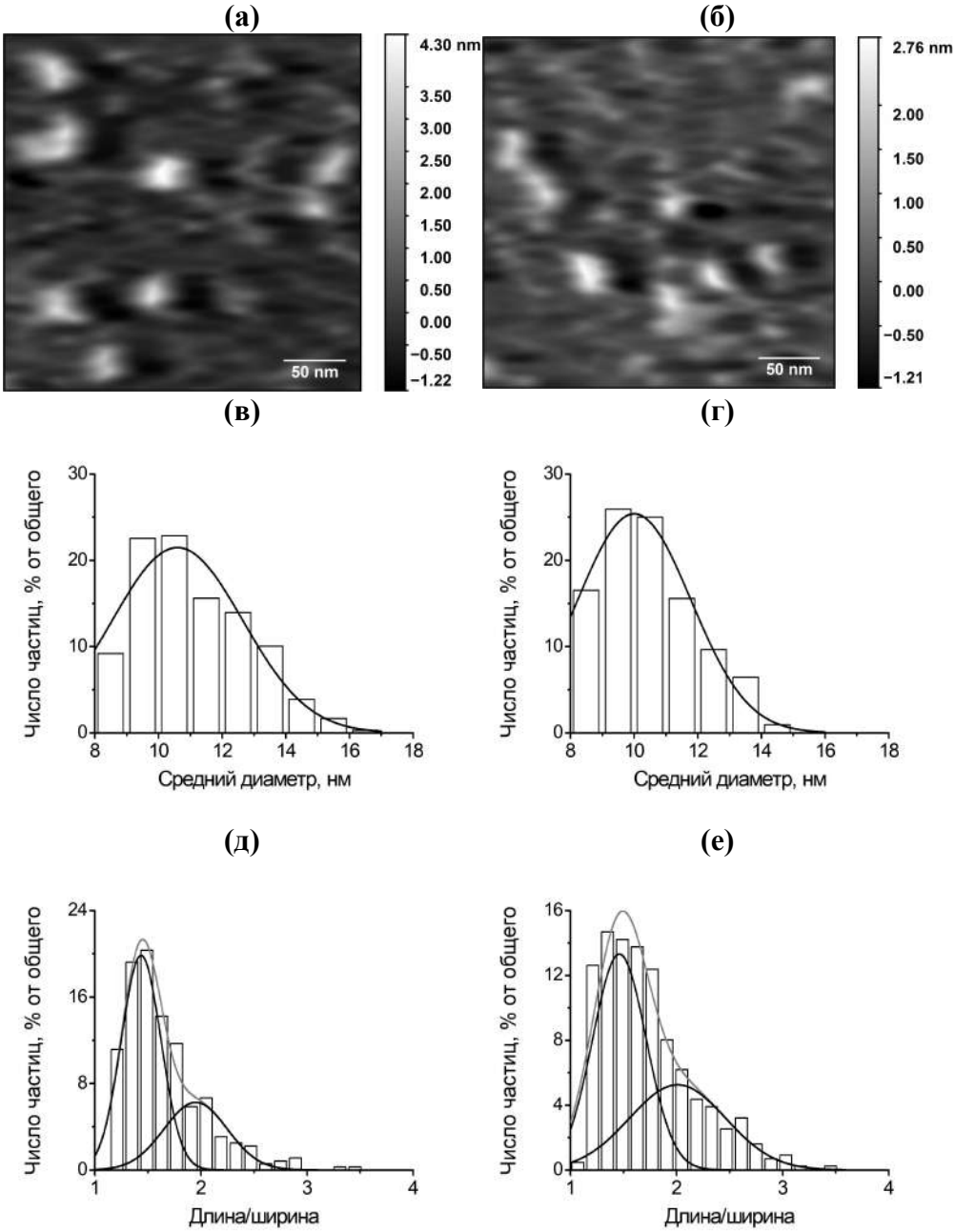


Рисунок 4.2.1. Типичные изображения частиц МНТ-αМСГ (а) и МНТ-ЭФР (б), полученные с помощью АСМ в режиме прерывистого контакта в фосфатном буфере (pH 8). Частотные распределения среднего диаметра частиц МНТ-αМСГ (в) и МНТ-ЭФР (г). Частотные распределения отношения длина/ширина для частиц МНТ-αМСГ (д) и МНТ-ЭФР (е). При построении распределений учитывались только частицы, средний диаметр которых был больше 8,5 нм. 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.

фосфатном буфере при pH 8,0. Характерные АСМ изображения молекул МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР показаны на Рис. 4.2.1а и 4.2.1б, соответственно. Видно, что МНТ имеет немного изогнутую форму, где хорошо видны два отдельных домена – эндосомолитический модуль и модуль носитель, а лигандный модуль благодаря своим небольшим размерам на изображениях АСМ четко не виден. По полученным

изображениям молекул МНТ был определен их средний диаметр и соотношение длина/ширина, которые были построены в виде частотных распределений для МНТ–α-МСГ и МНТ–ЭФР (Рис. 4.2.1в–4.2.1е). Гистограмма для среднего диаметра хорошо описывалась одной кривой Гаусса (χ^2 = 8,36, r^2 = 0,910 и χ^2 = 3,36, r^2 = 0,976 для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно), имеющей максимумы 10,6 ± 0,2 и 10,00 ± 0,13 нм для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. Для МНТ-ЭФР это хорошо совпадает со средним гидродинамическим диаметром 10,6 ± 0,5 нм, в то время как для МНТ-αМСГ этот диаметр несколько выше среднего гидродинамического диаметра (8,3 ± 0,6 нм). Следует отметить, что изображения МНТ получаются на слюде без фиксации на ней. Поэтому возможно кажущееся уширение изображения молекул МНТ за счет их латеральной подвижности. Учитывая, что средняя высота молекул МНТ-αМСГ составляет 2,85 ± 0,02 нм, что достоверно (p < 0,001, t-критерий Стьюдента) выше средней высоты молекул МНТ-ЭФР (2,457 ± 0,016 нм), можно предположить более сильное взаимодействие со слюдой, а значит меньшее уширение за счет латеральной подвижности, для МНТ-ЭФР, по сравнению с МНТ-αМСГ.

Частотные распределения отношения длина/ширина для МНТ-αМСГ (Рис. 4.2.1д) и МНТ-ЭФР (Рис. 4.2.1е) лучше всего описывались двумя кривыми Гаусса. Так, при описании одной кривой Гаусса: χ^2 = 5,15, r^2 = 0,900 и χ^2 = 4,42, r^2 = 0,872, в то время как при описании двумя кривыми Гаусса χ^2 = 1,68, r^2 = 0,973 и χ^2 = 2,88, r^2 = 0,932, для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. Максимумы этих двух пиков составляли 1,436 ± 0,013 и 2,0 ± 0,3 (± стандартная ошибка) для МНТ-αМСГ и 1,46 ± 0,03 и 2,0 ± 0,4 (± стандартная ошибка) для МНТ-ЭФР, соответственно. Таким образом, МНТ при pH 8,0 может принимать две основные конформации – «компактной» и «вытянутой». При этом, частота встречаемости «компактной» конформации составляет 67 ± 7%.

Известно, что при изучении морфологии нанообъектов, наилучший результат получается, если данные АСМ дополнить данными ПЭМ (Bagrov et al., 2023). Поэтому 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. На Рис. 4.2.2а и 4.2.2б показаны характерные изображения частиц МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, полученные этим методом. Применение специальной автоматической маски позволяет лучше различить форму частиц МНТ (Рис. 4.2.2в и 4.2.2г). По полученным изображениям были построены частотные распределения отношения длина/ширина, представленные на Рис. 4.2.3а и 4.2.3б. Чтобы не учитывать возможные загрязнения образца, в анализе учитывались только частицы, длина которых

больше 6 нм. Полученные распределения лучше всего описывались не одной, а двумя кривыми Гаусса (Рис. 4.2.3а и 4.2.3б). Так, при описании одной кривой Гаусса: χ^2 = 1,69, r^2 = 0,885 и χ^2 = 2,60, r^2 = 0,831, в то время как при описании двумя кривыми Гаусса χ^2 = 0,53, r^2 = 0,970 и χ^2 = 1,36, r^2 = 0,925, для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. Максимумы этих двух пиков составили 1,58 ± 0,02 и 2,1 ± 0,2 (± стандартная ошибка) для МНТ-αМСГ и 1,44 ± 0,03 и 2,07 ± 0,09 (± стандартная ошибка) для МНТ-ЭФР, соответственно. Иными словами, также как по данным АСМ, данные ПЭМ указывают на образование двух основных конформаций МНТ – «компактной» и «вытянутой», причем отношения длина/ширина этих конформаций схожие для этих двух методов. Однако, рассчитанная по площадям пиков доля этих конформаций отличалась. Так, определенная с помощью ПЭМ эта доля составляла 38 и 62% для МНТ-αМСГ и 16 и 84% для МНТ-ЭФР, соответственно. Иными словами, по данным ПЭМ преобладает «вытянутая» конформация МНТ, а не «компактная», как в случае АСМ. Вероятно, это связано с тем, что данные

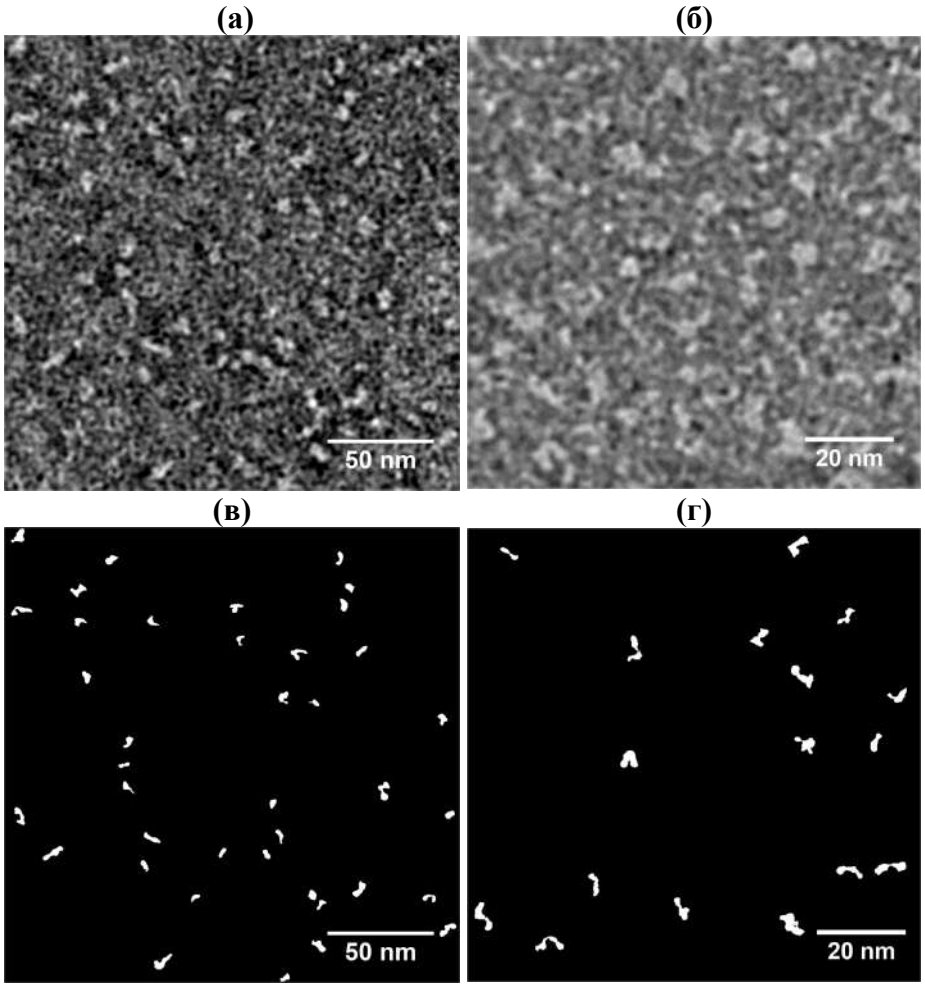


Рисунок 4.2.2. Характерный вид изображений частиц МНТ-αМСГ (а) и МНТ-ЭФР (б), полученных с помощью ПЭМ (pH 5). Изображение частиц МНТ-αМСГ (в) и МНТ-ЭФР (г) после применения автоматической маски. Эксперименты ПЭМ проведены совместно с И.Б. Эйдлиным и А.С. Ореховым из «Научно-исследовательского центра» Курчатовского института.

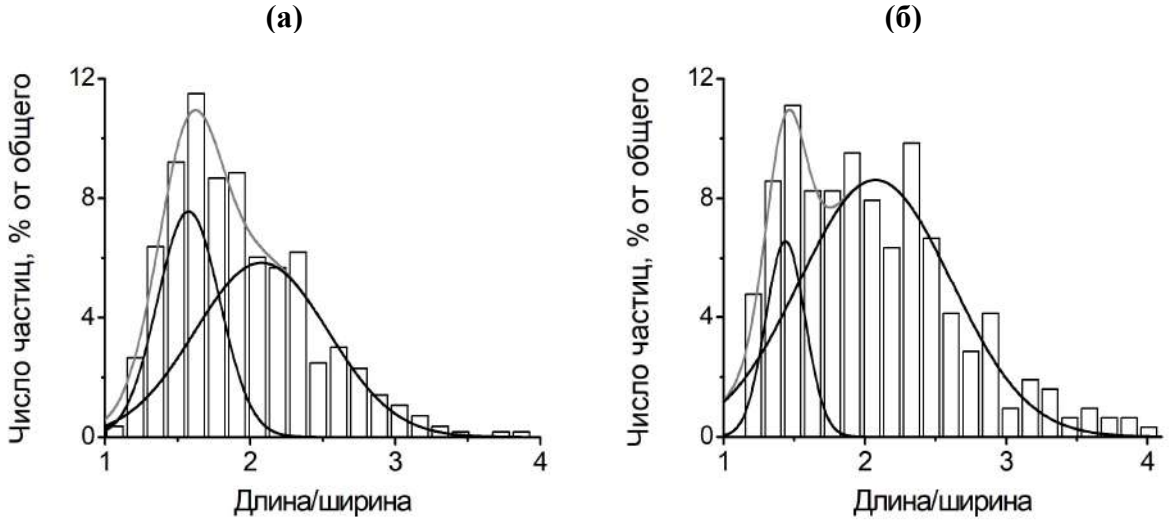


Рисунок 4.2.3. Частотные распределения отношения длина/ширина для частиц МНТ-αМСГ (а) и МНТ-ЭФР (б). Для анализа использовали только частицы длинной больше 6 нм. Кривые Гаусса показаны черным цветом, а их сумма – серым. Общее число частиц, использованных для построения гистограммы, составляет 565 и 315 для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно.

ПЭМ получались при pH 5, а АСМ – при pH 8.

Следует отметить, что лигандный модуль не видим на изображениях ПЭМ в силу своих небольших размеров (1,8 кДа для αМСГ и 6,2 для ЭФР). Поэтому, как и в случае с изображениями АСМ форма молекул МНТ определяется только взаимным расположением модуля-носителя, НМР, и эндосомолитического модуля, ДТокс. Чтобы изучить взаимное расположение этих модулей совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым и А.И. Куклиным из МФТИ была проведена 3D реконструкция с использованием известных из баз данных структур ДТокс и НМР в качестве нулевого приближения. В результате НМР и ДТокс были хорошо вписаны в полученные с помощью ПЭМ изображения с конечным разрешением около 2 нм (Рис. 4.2.4). Причем углы Эйлера распределялись случайным образом, что указывает на отсутствие их предпочтительной ориентации.

Совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым, А.И. Куклиным и В.И. Горделием из МФТИ было проведено изучение строения МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР с помощью МРР при pH 8,0. Полученные в результате трехмерные структуры представлены на Рис. 4.2.5. Максимальный размер, D_{max}, и радиус гирации, R_g, составлял 13,3, 3,7 нм и 16,0, 4,3 нм, для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. Различие данных параметров для разных МНТ может быть связано как с различием в конформации белка, так и с разным размером лигандного модуля. По объему полученных структур был рассчитан средний диаметр МНТ, который составил 6,5 и 7,8 нм для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. Это согласуется с данными динамического светорассеяния (8,3 ± 0,6 и 10,6 ± 0,5 нм,

соответственно), где этот диаметр чуть больше из-за дополнительной гидратной оболочки молекул МНТ. Следует отметить, что полученные диаметры близки к литературным значениям для белков со схожей молекулярной массой. Например, для бычьего сывороточного альбумина этот диаметр составляет 6,8 нм (Gonzalez Flecha and Levi, 2003).

Рисунок 4.2.4. 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. Реконструкция проведена совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым и А.И. Куклиным из МФТИ.

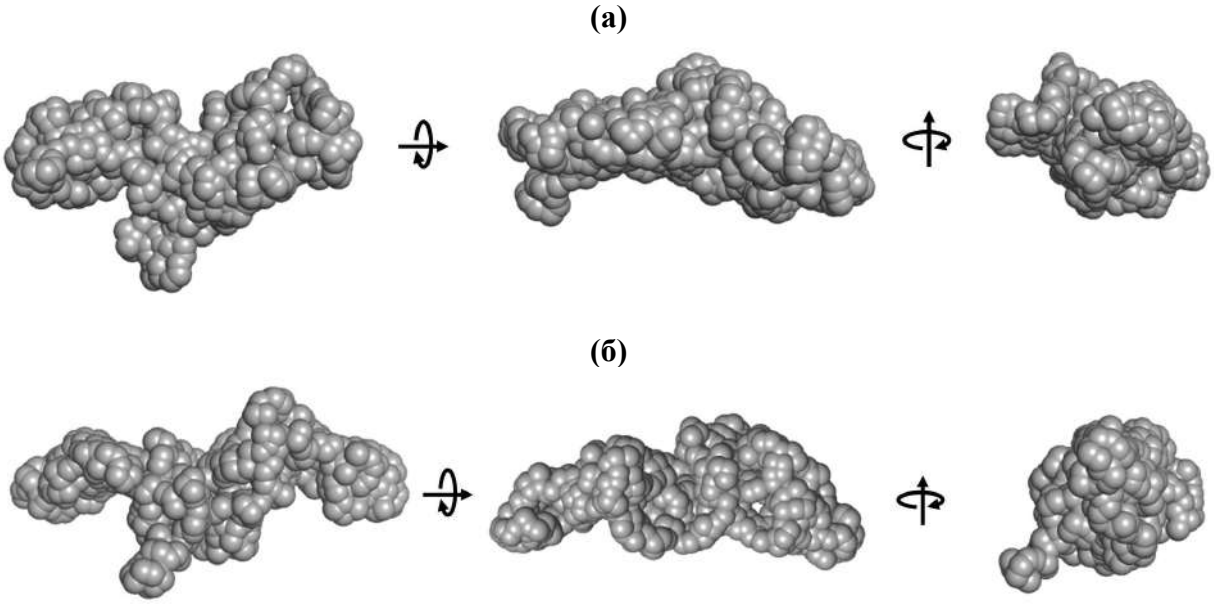


Рисунок 4.2.5. Полученные с помощью МРР 3D структуры низкого разрешения для МНТ-αМСГ (а) и МНТ-ЭФР (б) в фосфатном буфере (pH 8). Структуры получены совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым и А.И. Куклиным из МФТИ.

Данные МРР были обработаны с помощью метода оптимизации ансамбля (Ensemble Optimization Method, EOM), используя полученную 3D реконструкцию молекулы (Рис. 4.2.4) в качестве нулевого приближения (Tria et al., 2015a). В результате с высокой точностью (χ^2 = 1,2) для МНТ-αМСГ (для МНТ-ЭФР EOM не удалось успешно

применить) был получен ансамбль из четырех 3D моделей (Рис. 4.2.6). Причем три модели отличались друг от друга лишь незначительно. Таким образом, МНТ-αМСГ может принимать две основные конформации – «компактную» (встречаемость 71%) и «вытянутую» (встречаемость 29%). При этом если не учитывать лигандный модуль, то отношения длина/ширина для этих конформаций были 1,2–1,5 и 2,2, соответственно. Это хорошо совпадает с данными, полученными с помощью метода АСМ, где эти отношения были 1,436 ± 0,013 и 2,0 ± 0,3, соответственно. Более того, частота встречаемости «компактной» конформации, полученной методами АСМ (67 ± 7%) и МРР (ЕОМ) (71%) сходная. Следует отметить, что эксперименты в этих двух методах проводились при pH 8.

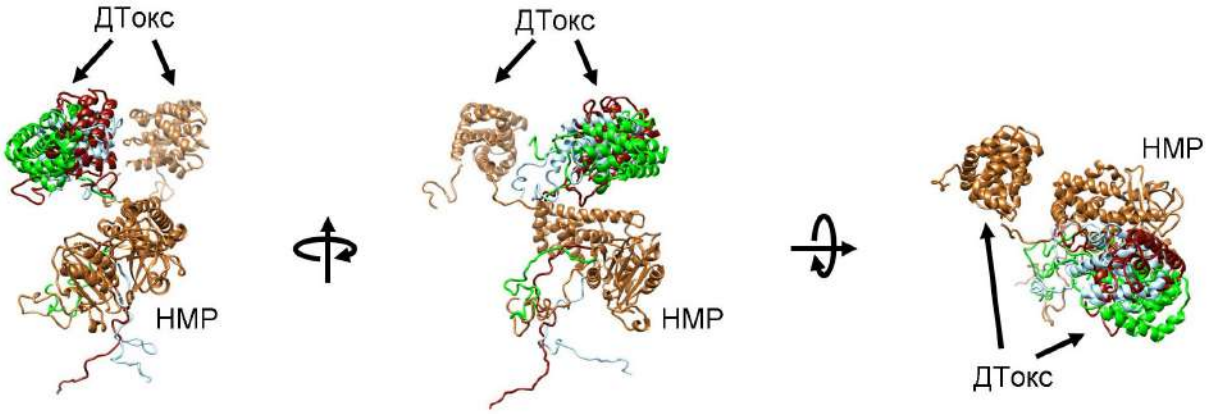


Рисунок 4.2.6. Четыре 3D модели молекулы МНТ-αМСГ, полученные с помощью метода МРР и метода оптимизации ансамбля (pH 8). Во входных данных домен НМР был фиксирован, а ДТокс свободен. Модели получены совместно с А.В. Власовым, Ю.Л. Рижиковым и А.И. Куклиным из МФТИ.

Если рассматривать среднее отношение длина/ширина, полученное по данным АСМ, то для МНТ-ЭФР (1,73 ± 0,02) оно достоверно (p < 0,006, t-критерий Стьюдента) выше, чем для МНТ-αМСГ (1,65 ± 0,02). Аналогичный результат наблюдался и по данным ПЭМ, где это отношение для МНТ-ЭФР (2,06 ± 0,03) достоверно (p < 0,001, t-критерий Стьюдента) выше, чем для МНТ-αМСГ (1,92 ± 0,02). Это можно объяснить увеличением частоты встречаемости «вытянутой» конформации МНТ. И действительно, эта частота встречаемости по данным АСМ (pH 8) составляла 33 и 42% для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. А по данным ПЭМ (pH 5) она была 62 и 84% для МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР, соответственно. Таким образом, больший лигандный модуль способствует более «вытянутой» конформации МНТ.

Средние отношения длина/ширина для изображений МНТ, полученных с помощью ПЭМ (1,92 ± 0,02 для МНТ-αМСГ и 2,06 ± 0,03 для МНТ-ЭФР) достоверно (p < 0,001, t-критерий Стьюдента) выше этих отношений, полученных по данным АСМ (1,65 ±

0,02 для МНТ-αМСГ и 1,73 ± 0,02 для МНТ-ЭФР). При этом частота встречаемости «вытянутой» конформации для изображений МНТ, полученных с помощью ПЭМ и АСМ тоже заметно уменьшается (с 62 до 33% для МНТ-αМСГ и с 84 до 42% для МНТ-ЭФР). Следовательно, уменьшение pH с 8 до 5 приводит к увеличению вдвое частоты встречаемости «вытянутой» конформации МНТ. Эти изменения, скорее всего, связаны с изменением конформации эндосомолитического модуля ДТокс. Известно, что транслокационный домен дифтерийного токсина, ДТокс, при слабокислых pH заметно меняет свою конформацию (Flores-Canales et al., 2019). При этом он становится более гидрофобным, что, как правило, приводит к агрегации МНТ при pH 4–6. Изображения МНТ при этих pH удалось получить только с помощью ПЭМ, т.к. молекулы МНТ были фиксированы на подложке и обработаны специальными кислыми контрастирующими агентами.

Таким образом, при pH 8 преобладала «компактная» конформация МНТ. При такой конформации крупные модули в составе МНТ будут уменьшать сродство доставляемой молекулы к белку-мишени. В качестве такой молекулы может выступать модуль СЯЛ, который способен взаимодействовать с комплексом из импортинов α и β. Для изучения взаимодействия СЯЛ в составе МНТ-ЭФР автором диссертационной работы использовался метод термофореза. Импортин β был мечен флуоресцентным красителем ATTO647, так как это описано в «Материалах и методах». Доля присоединенного флуоресцентного красителя составила 0,8 молекул ATTO647 на одну молекулу МНТ. По 20 повторам была получена усредненная термофоретическая кривая (Рис. 4.2.7), из которой была определена константа диссоциации комплекса МНТ с гетеродимером импортинов. Она составила 140 ± 7 нМ. Это значение в четыре раза выше, чем для свободного СЯЛ (35 нМ (Catimel et al., 2001)). Поэтому можно предположить, что и при включении антителоподобной молекулы в состав МНТ ее сродство к белку-мишени будет уменьшаться. 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.

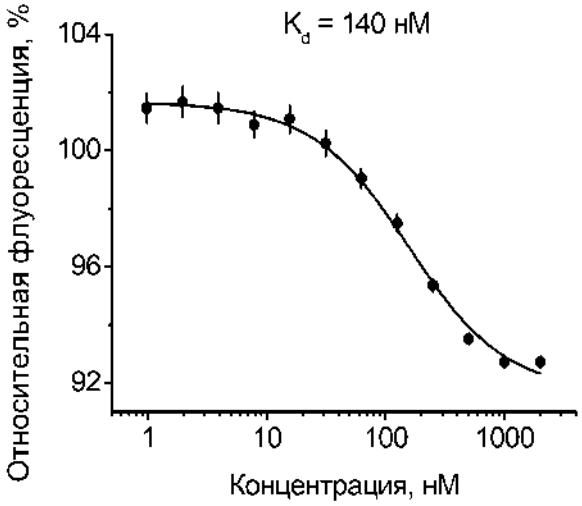


Рисунок 4.2.7. Кривая титрования гетеродимера импортинов возрастающей концентрацией МНТ при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса МНТ с гетеродимером импортинов. Концентрации α- и β-импортина составляли 40 нМ и 80 нМ, соответственно. Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной флуоресценции (n = 19–20). Кривой показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью. Время измерения флуоресценции после начала термофореза – 20 секунд.

Данные о трехмерной структуре МНТ изложены в статье: 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 Cryst. – 2020. – D76. – P. 1270-1279 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как получение и анализ изображений МНТ с помощью АСМ, так и построении и анализе распределений, полученных методами ПЭМ и МРР, также в обсуждениях, участии в написании и в научном руководстве А.Д. Власовой). Автор признателен всем соавторам этой статьи, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.3. Изучение дефектов, которые образуются в липидном бислое на слюде под действием МНТ

Для изучения механизма выхода МНТ из эндосом, прежде всего, была изучена их способность приводить к нарушению целостности липидного бислоя при различных pH. Она исследовалась по выходу флуоресцентного красителя из липосом, нагруженных этим красителем до концентрации самотушения флуоресценции (Nir and Nieva, 2000). На Рис. 4.3.1а показаны pH зависимости выхода кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом под действием полноразмерного МНТ-αМСГ (ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ), МНТ-αМСГ без эндосомолитического модуля (НМР-СЯЛ-αМСГ), отдельно модуля НМР и модуля ДТокс, слитого с αМСГ. Оказалось, что при pH ниже 4,5 мембранолитической активностью обладает не только полноразмерный МНТ, но и отдельно его модуль-носитель НМР. Однако pH эндосом лежит в диапазоне от 5,5 до 6,5 (Ceresa and Schmid, 2000), поэтому для выхода МНТ из эндосом он должен обладать мембранолитической активностью в этом диапазоне. Такой активностью обладает как полноразмерный МНТ, так и модуль ДТокс, слитый с αМСГ (Рис. 4.3.1а). Причем наличие модуля НМР оказывает синергическое воздействие на функцию модуля ДТокс, т.к. с одной стороны увеличивает диапазон pH, в котором наблюдается мембранолитическая активность ДТокс (Рис. 4.3.1а), а, с другой стороны, при pH 5,5 НМР существенно уменьшает концентрацию ДТокс, необходимую для достижения того же мембранолитического эффекта, что и для отдельного ДТокс (Рис. 4.3.1б). Выход кальцеина был изучен совместно с А.А. Розенкранцем.

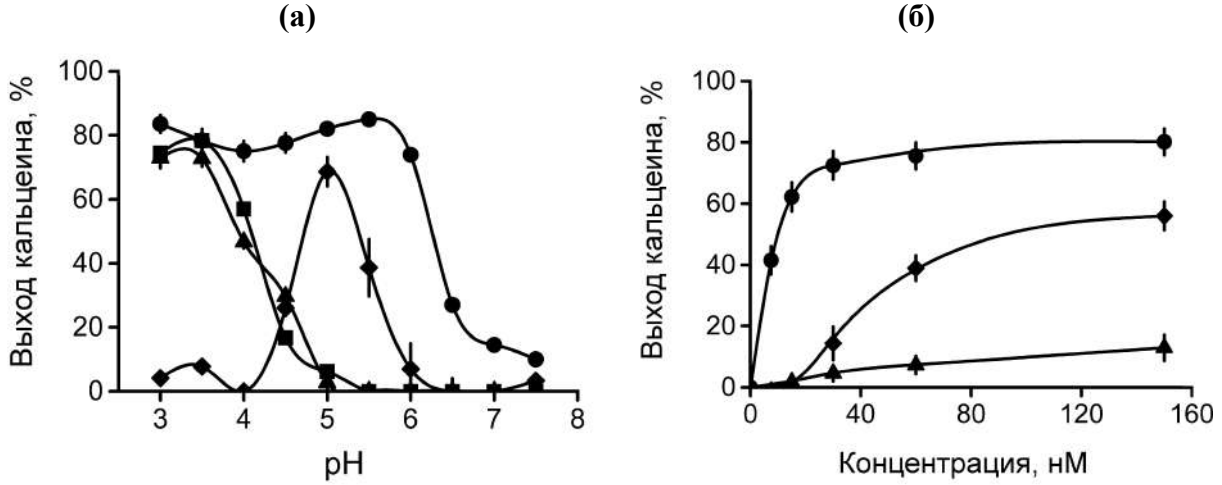


Рисунок 4.3.1. Влияние МНТ на выход кальцеина (% от максимума) в зависимости от pH (а) и от концентрации МНТ при pH 5,5 (б). Показаны МНТ следующего состава: ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ (●), НМР-СЯЛ-αМСГ (▲), ДТокс-αМСГ (♦) и НМР (■). Липосомы из яичного лецитина были нагружены флуоресцентным красителем кальцеином до концентрации самотушения флуоресценции. Образование дефектов в липосомах сопровождалось появлением флуоресценции кальцеина. После инкубации липосом с МНТ при указанных pH, этот pH доводился до 7,5 перед измерением флуоресценции. Выполнено совместно с А.А. Розенкранцем.

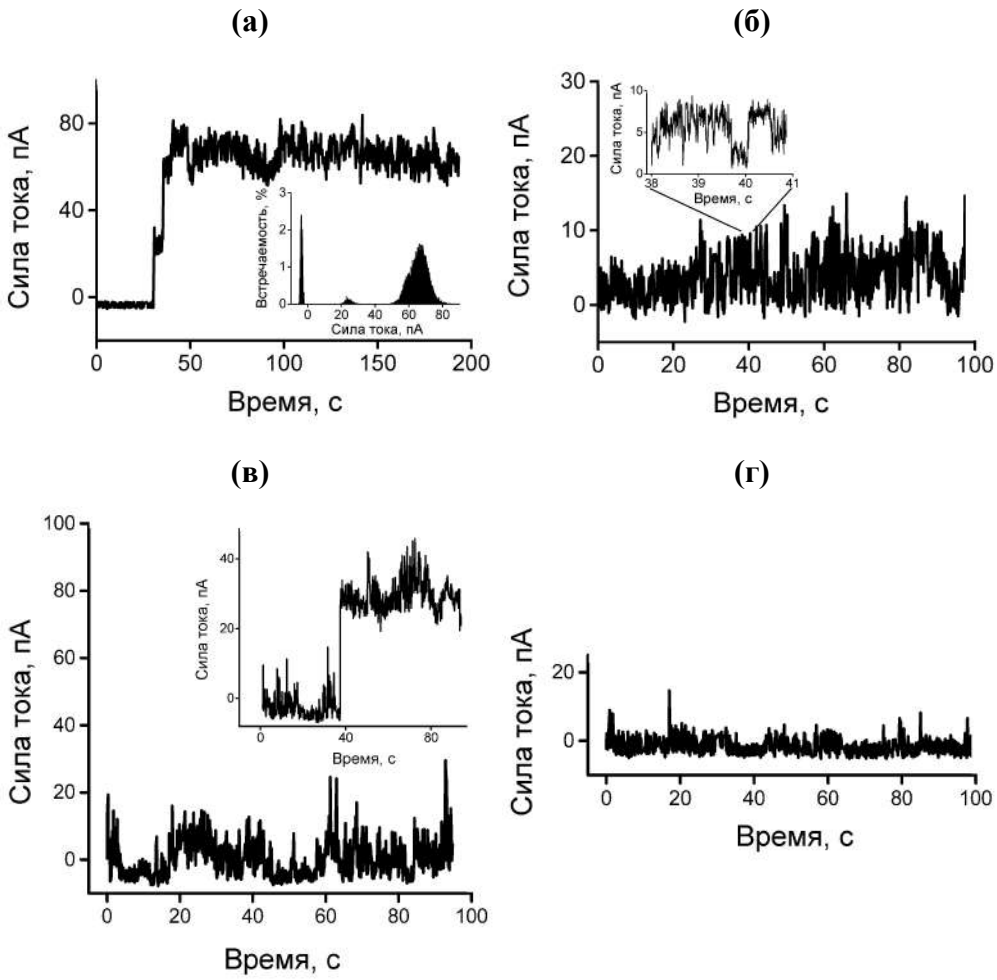


Рисунок 4.3.2. Ток через плоскую липидную мембрану при инкубации с ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ при pH 5,5 (а) и pH 7,5 (б), а также с НМР-СЯЛ-αМСГ при pH 5,5 (в) и pH 7,5 (г). Напряжение на мембране 10 мВ. Вставка в (а): частотное распределение силы тока. Вставка в (б): запись с меньшей временной шкалой. Вставка в (в): пример стабильного открытого ионного канала. Эксперименты проведены совместно с Т.И. Рокицкой и Ю.Н. Антоненко из Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (МГУ).

Совместно с Т.И. Рокицкой и Ю.Н. Антоненко из Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского (МГУ) изучалось образование ионных каналов в плоских липидных мембранах (ПЛМ) под действием ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ и НМР-СЯЛ-αМСГ при pH 5,5 и 7,5. Было установлено, что 10–20 минут инкубации ПЛМ с ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ при pH 5,5 приводит к скачкообразному увеличению ионного тока (типичное изображение на Рис. 4.3.2а) с проводимостью в 2–5 нСм. Так, на Рис. 4.3.2а и его вставке видно образование двух типов каналов с проводимостью 2,8 и 4,2 нСм, которая заметно отличалась от уровня шума. Наблюдалась большая нестабильность, как в числе возникающих каналов, так и их проводимости. Причем закрытия ионных каналов не наблюдалось (4 независимых эксперимента), что указывает на стабильность открытого состояния этих каналов. При pH 7,5 добавление ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ к ПЛМ, напротив, не приводило к образованию стабильных каналов, а наблюдались только

флуктуации тока различной амплитуды (Рис. 4.3.2б) (5 независимых экспериментов). Для МНТ без эндосомолитического модуля, т.е. НМР-СЯЛ-αМСГ, добавление к ПЛМ при pH 5,5 как правило не приводило к образованию стабильных ионных каналов (стабильные ионные каналы с проводимостью около 3,3 нСм наблюдались в 30% случаев (Рис. 4.3.2в, вставка)), однако, могли возникать и пропадать нестабильные ионные каналы (типичное изображение на Рис. 4.3.2в). При добавлении к ПЛМ НМР-СЯЛ-αМСГ при pH 7,5 наблюдались только флуктуации тока (Рис. 4.3.2г).

Образование под действием МНТ дефектов в липидном бислое на слюде изучалось автором диссертационной работы с помощью АСМ в жидкости. Бислой из яичного фосфатидилхолина получался, как описано в «Материалах и методах». Полноразмерный МНТ, ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, добавлялся к липидному бислою при pH 7,5 и не связавшийся с бислоем МНТ удалялся. При уменьшении pH с 7,5 до 5,5 съемка в режиме прерывистого контакта АСМ позволила установить, что в липидном бислое, содержащем полноразмерный МНТ, образуются кольцевые структуры диаметром 30–50 нм (типичное изображение на Рис. 4.3.3а и 4.3.3б). Похожие кольцевые структуры наблюдались и для МНТ, лишенного эндосомолитического модуля, т.е. НМР-СЯЛ-αМСГ (Рис. 4.3.3в). Причем для отдельного ДТокс таких структур не наблюдалось, хотя сам по себе он может агрегировать в липидном бислое (Рис. 4.3.3г). Таким образом, МНТ в липидном бислое склонен к олигомеризации, причем за образование кольцевых структур отвечает модуль-носитель НМР. Автором было оценено количество молекул МНТ, которое образует кольцевую структуру. Средняя толщина этой структуры составляла 20,8 ± 0,8 нм (± стандартная ошибка). Учет кривизны зонда по выражению (3.5.1) дало длину молекулы МНТ в бислое: 12,5 ± 1,9 нм (± стандартная ошибка). Используя средний гидродинамический диаметр МНТ (10,6 ± 0,5 нм) был определен объем молекулы МНТ, а из него, зная высоту кольцевых структур (5,3 ± 0,4) рассчитана ширина молекулы МНТ: 9,0 ± 0,9 нм. Таким образом, кольцевая структура образована 10–17 молекулами МНТ.

Кольцевые структуры хорошо наблюдались только в режиме прерывистого контакта, в то время как контактный режим АСМ приводил к нарушению их строения. Однако именно контактный режим АСМ позволил установить, что через 40–60 минут после закисления среды до pH 5,5 в поддерживаемых лецитиновых бислоях, содержащих МНТ, начинали возникать флуктуирующие поры диаметром от 50 до 200 нм (типичное изображение на Рис. 4.3.4а). Причем их глубина составляла 3,5–5 нм (Рис. 4.3.4б), что отвечает толщине лецитинового липидного бислоя (3,1–4,8 нм (Fettiplace et al., 1971)). Эти поры были частично окружены валиками, которые были как неправильной формы, так и частями полукольца (Рис. 4.3.4а).

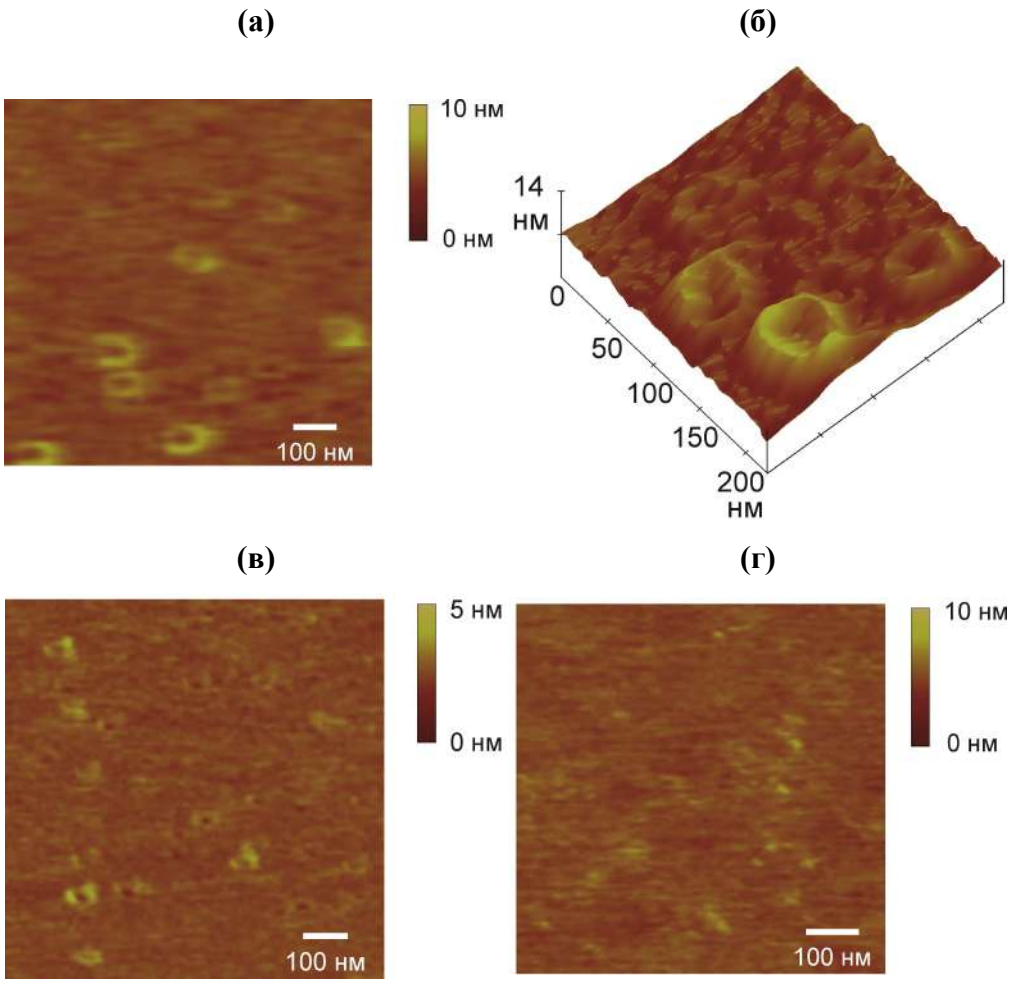


Рисунок 4.3.3. Типичные изображения АСМ, полученные для ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР (а и б), НМР-СЯЛ-αМСГ (в) и ДТокс (г) в бислое, состоящем из яичного фосфатидилхолина, на слюде при pH 5,5. Измерения выполнены в режиме прерывистого контакта АСМ при скорости сканирования 2–3 Гц.

Для доказательства того, что наблюдаемые на липидном бислое возвышенности, представляют собой молекулы МНТ или их агрегаты был использован метод биоспецифической АСМ. Для этого зонд кантилевера был модифицирован аффинно-очищенными кроличьими антителами к МНТ, так как это описано в «Материалах и методах». Далее были получены кривые силы (зависимость отклонения кантилевера от вертикального перемещения зонда) для взаимодействия такого зонда с липидным бислоем, содержащим МНТ. Из этих кривых силы, зная константу жесткости кантилевера, была рассчитана сила взаимодействия между зондом и образцом. В качестве контроля были изучены взаимодействия между зондом, модифицированным неспецифическими антителами (анти-β-галактозидаза), и липидным бислоем с МНТ. Полученная сила специфического взаимодействия МНТ с антителом составляла 192 ± 23 пН. Такая сила характерна для специфических взаимодействий антиген-антитело (Gao et al., 2005; Hinterdorfer et al., 1996).

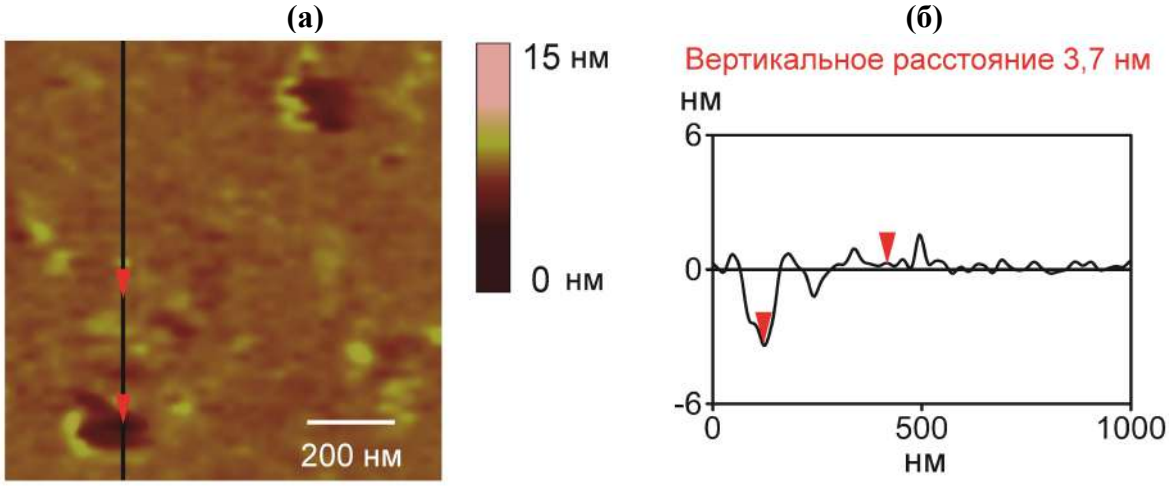


Рисунок 4.3.4. Типичное изображение АСМ, полученное в контактном режиме для ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в бислое, состоящем из яичного фосфатидилхолина, на слюде при pH 5,5 (а) и поперечное сечение этого изображения (б). Скорость сканирования составляла 3 Гц.

Наличие МНТ на поверхности липидного бислоя также доказывалось путем сравнения результатов, полученных в режиме прерывистого контакта АСМ модифицированным и немодифицированным антителами зондом кантилевера. Если между зондом АСМ и образцом есть взаимодействие, например, зонд АСМ модифицирован антителами, а на образце находится антиген, то оно приводит к уменьшению амплитуды колебаний кантилевера в режиме прерывистого контакта. Это уменьшение воспринимается системой обратной связи как возвышенность. Иными словами, при наличии взаимодействия антиген-антитело, кажущаяся высота антигена на образце, полученная в режиме прерывистого контакта, будет выше, чем при отсутствии взаимодействия (Raab et al., 1999). Так, сканирование немодифицированным зондом лецитинового бислоя, содержащего ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, показало наличие трех типов частиц со средними высотами 1,1, 2,2 и 4,4 нм (Рис. 4.3.5а) (анализ около 12000 частиц). Если же сканировать этот бислой зондом, модифицированным антителами к МНТ, то тоже наблюдались три типа частиц, но их кажущиеся высоты были достоверно больше на 1–2 нм: 2,0 ($p < 0{,}001$), 4,3 ($p < 0{,}05$) и 7 нм (Рис. 4.3.5б). Таким образом, все наблюдаемые на поверхности липидного бислоя частицы образованы молекулами МНТ. Если судить по их средней высоте, они представляют собой молекулы МНТ, встроенные в бислой, адсорбированные на поверхности бислоя и образующие агрегаты на поверхности бислоя.

Суммируя все полученные данные, можно предположить следующий механизм образования дефектов в липидном бислое под действием МНТ при слабокислых pH. 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 (диаметром 50–200 нм), 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. И действительно, известно, что химеры, содержащие ДТокс, остаются встроенными в липидный бислой даже после доведения pH до нейтральных значений (Nizard et al., 2001). 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 выхода доставляемых молекул из эндосом.

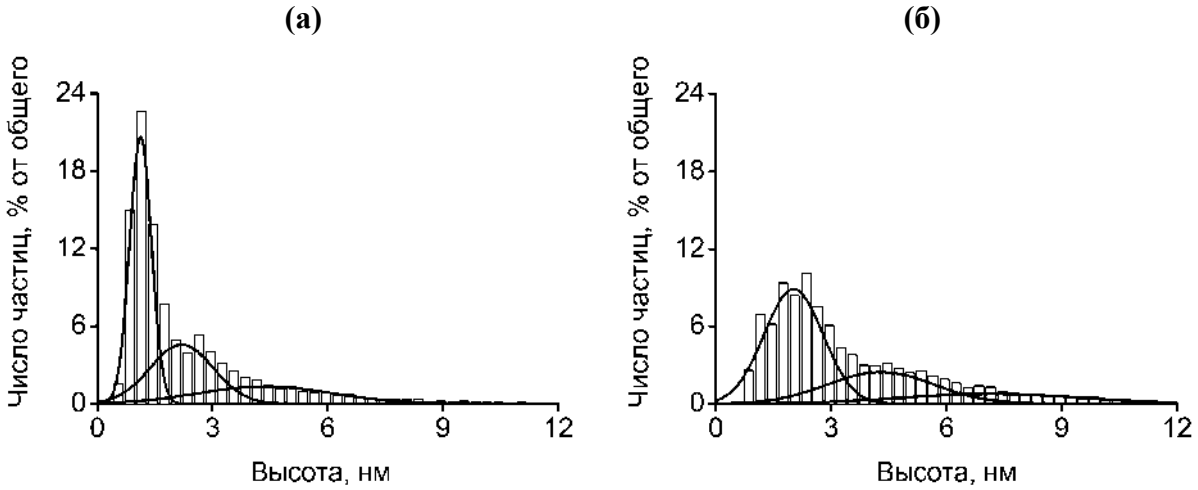


Рисунок 4.3.5. Частотные распределения высоты частиц над поверхностью липидного бислоя, состоящего из яичного фосфатидилхолина, и содержащего ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР при pH 5,5. Сканирование проводилось немодифицированным зондом кантилевера (а) и зондом, модифицированным антителами на МНТ (б). Использовались изображения, полученные в режиме прерывистого контакта. В группу объединены частицы, отличающиеся по высоте не больше 3 Å. Учитывались только частицы вышиной больше 4 Å (уровень шума). Показано разложение кривыми Гаусса. Максимумы пиков: (а) 1,1 ± 0,1, 2,2 ± 0,2 и 4,4 ± 1,9 нм (r = 0,995), соответственно; (б) 2,0 ± 0,1, 4,3 ± 0,6 и 7 ± 2 нм (r = 0,985), соответственно.

Данные о взаимодействии МНТ с липидных бислоем изложены в статьях: 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 // J. Control. Rel. - 2008. - V. 128. - P. 241–247 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как все работы по взаимодействию МНТ с липидных бислоем, проведенные с помощью АСМ, так и анализе полученных результатов, их обсуждении, участии в написании и в научном руководстве

Г.А. Трусовым); 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2008. – Vol. 421. – №. 1. – P. 244-246 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как все работы по взаимодействию МНТ с липидных бислоем, проведенные с помощью АСМ, так и анализе полученных результатов, их обсуждении, участии в написании и в научном руководстве Г.А. Трусовым); 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 Res. - 2006. - V. 66. - № 21. - P. 10534–10540 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как все работы по взаимодействию МНТ с липидных бислоем, проведенные с помощью АСМ, так и участии в написании); 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 multi-purpose *in vivo* working platform for targeted drug delivery. Int. J. Nanomed. - 2012. - V. 7. - P. 467–482 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью АСМ и динамического светорассеяния, так и анализе размеров МНТ и их числа в кольцевых структурах, участии в написании). Автор признателен всем соавторам этих статей, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.4. Доставка антителоподобных молекул с помощью МНТ к внутриклеточному белку-мишени

4.4.1. Взаимодействие МНТ с выбранным внутриклеточным белком-мишенью

Чтобы повысить эффективность доставки молекул с помощью МНТ необходимо, прежде всего, выбрать определенный МНТ для оптимизации и внутриклеточную мишень для его воздействия. В этом отношении весьма перспективным является выбор в качестве мишени какого-нибудь внутриклеточного белка. И действительно, к изучению белок-белковых взаимодействий последние десятилетия прилагаются значительные усилия (Modell et al., 2016; Petta et al., 2016; Bryant et al., 2022). При этом описано множество белков, которые являются потенциальными терапевтическими мишенями (Wells and McClendon, 2007; Scott et al., 2016). Обычно для связывания с внутриклеточными мишенями используют низкомолекулярные ингибиторы (Bakail and Ochsenbein, 2016; Lu et al., 2020a). Однако, они, как правило, обладают низкой специфичностью и зачастую не известен механизм их действия, что сильно ограничивает их применение (Baell and Walters, 2014; Arrowsmith et al., 2015). Поэтому широкое практическое применение находят антитела, которые, в отличие от низкомолекулярных ингибиторов, можно подобрать практически к любому белку-мишени (Bakail and Ochsenbein, 2016; Gebauer and Skerra, 2020; Lu et al., 2020a; Shipunova and Deyev, 2022; Tolmachev et al., 2022). Фактически терапия антителами стала стандартным средством при лечении различных заболеваний и около полутора сотен антител уже одобрено для клинического использования (Kaplon et al., 2023; Kinch et al., 2023). Однако их применение ограничено трансмембранными и секретируемыми белками (Lu et al., 2020b; Cai and Pandit, 2021), а внутриклеточные белки остаются недоступными для них. Учитывая, что две третьих всего протеома составляют именно внутриклеточные белки (Rosenkranz and Slastnikova, 2023), задача доставки к ним различных крупных молекул стоит наиболее остро.

Прежде всего, совместно с Т.Р. Камалетдиновой, А.А. Розенкранцем и другими коллегами нашей лаборатории была показана перспективность доставки МНТ к внутриклеточному белку-мишени на примере МНТ, содержащем клеточный регулятор – белок p21. p21 может связываться с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) и, тем самым, контролировать репликацию ДНК и репарацию одно- и двунитевых разрывов ДНК (Jung et al., 2010; Orzaez et al., 2016). Методами поверхностного плазмонного резонанса и термофореза было показано, что МНТ, содержащий белок p21, может с константой диссоциации порядка 100 нМ взаимодействовать с PCNA. С помощью кометного анализа было показано, что двунитевые разрывы ДНК, вызванные широко используемым противораковым антибиотиком – блеомицином, достоверно хуже

репарируются при добавлении МНТ с p21, чем без него. Результаты по МНТ с p21 опубликованы в статье: 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2018. – V. 479. – P. 95-97 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как изучения взаимодействия между МНТ с p21 и PCNA методом термофореза, так и обсуждении результатов и участии в написании).

Однако для произвольного выбора внутриклеточного белка-мишени желательно доставлять антитела или антителоподобные молекулы. Последние даже часто предпочтительнее антител, т.к. они обладают сходными с природными антителами специфичностью и аффиностью, но имеют значительно меньший размер (Gebauer and Skerra, 2020). Для проверки способности МНТ доставлять антителоподобные молекулы в ядра клеток, был выбран ядерный белок-онкоген c-Myc, активированный в большинстве новообразований человека (Masso-Valles and Soucek, 2020). Избирательное подавление c-Myc низкомолекулярными ингибиторами крайне затруднено, т.к. этот белок не имеет полостей для их нормального связывания. Перспективным является использование антителоподобной молекулы – нанободи CMYCVH-12-321, способной с высоким сродством взаимодействовать с c-Myc (Zeng et al., 2015). Методом термофореза было показано, что МНТ, содержащий нанободи к c-Myc, способен связываться с c-Myc с константой диссоциации комплекса 46 ± 14 нМ. На клетках эпидермоидной карциномы человека A431 после 5 часов инкубации с МНТ, содержащем нанободки к c-Myc, показано достоверное подавление экспрессии нуклеолина (на 1/3) – мишени Myc-индуцируемой активации (Greasley et al., 2000). Кроме того, на клетках аденокарциномы молочной железы MCF7 на шестой день инкубации с МНТ, содержащим нанободи к c-Myc, был показан достоверный антипролиферативный эффект по сравнению с контрольным МНТ. Результаты работ по МНТ с нанободи к c-Myc были опубликованы в статьях: 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2018. – Vol. 479. – №. 1. – P. 62-65 (вклад автора состоит в получении и очистке некоторых МНТ, проведении части экспериментальных работ, таких как изучения взаимодействия между МНТ и c-Myc методом термофореза, обсуждении результатов и участии в написании); Lupanova T.N., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Rozenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Intracellular delivery of an antibody-like molecule capable of inhibiting c-Myc // Dokl. Biochem. Biophys. – 2023. – V. 509. – P. 70-72 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как

изучения взаимодействия между МНТ и c-Myc методом термофореза, так и обсуждении результатов и участии в написании).

Итак, была показана принципиальная возможность доставки антителоподобных молекул к внутриклеточному белку-мишени. Для изучения эффективности этой доставки желательно было выбрать такой белок-мишень, который есть во всех клетках и воздействие на который может приводить к заметному терапевтическому эффекту. Таким белком был выбран основной ингибитор Nrf2 – белок Keap1. Nrf2 представляет собой транскрипционный фактор, регулирующий экспрессию нескольких сотен генов, отвечающих за антиокислительную защиту и регенеративные процессы (Baird and Yamamoto, 2020). При нормальных условиях Nrf2 образует комплекс с белком-ингибитором Keap1 за счет высокоаффинного ETGE-мотива и назкоаффинного DLG-мотива. Взаимодействие с Keap1 приводит к деградации Nrf2 по протеосомному пути. За счет того, что Keap1 богат цистеиновыми остатками, он очень чувствителен к окислительному стрессу. Окисление цистеинов приводит к изменению конформации Keap1 и высвобождению Nrf2 из комплекса с Keap1. Следует отметить, что подавление активности Nrf2 наблюдается при многих заболеваниях, поэтому его активация может привести к заметному терапевтическому эффекту при лечении нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и некоторых вирусных заболеваний (Dodson et al., 2019; Ulasov et al., 2022). Однако использование для активации Nrf2-системы низкомолекулярных электрофильных молекул может привести к заметным побочным эффектам, т.к. эти молекулы способны реагировать и с другими клеточными нуклеофильными белками (Sporn and Liby, 2012; Blewett et al., 2016). Активировать Nrf2-систему можно также с помощью специальных Nrf2-пептидов, способных взаимодействовать с Keap1 в том же участке, где этот белок взаимодействует с Nrf2, тем самым, вызывая высвобождение Nrf2 из комплекса с Keap1. Однако эффективность поступления в клетку таких пептидов весьма ограничена. С более высоким сродством, чем Nrf2-пептиды с Keap1 может взаимодействовать антителоподобная молекула – монободи R1 (антиKeap1), полученная на основе 10-го домена III типа фибронектина человека (Guntas et al., 2016). Поэтому именно эта молекула была выбрана для включения в состав МНТ. Следует отметить, что, связываясь с Keap1, такой МНТ не только потенциально может активировать Nrf2-систему, но и, учитывая, что существенная доля Keap1 находится на поверхности митохондрий (Lo and Hannink, 2008), может быть использован для доставки биологически активных молекул к поверхности митохондрий. Таким образом, МНТ с монободи к Keap1 обладает потенциальным терапевтическим эффектом, как на опухолевых, так и на

нормальных клетках, поэтому является наиболее подходящим кандидатом для проведения процесса оптимизации его строения.

В качестве лигандного модуля у МНТ к Keap1 была выбрана другая антителоподобная молекула – аффиболи к РЭФР (антиРЭФР) (Kim et al., 2012; Stehl et al., 2017). Как было показано ранее, использование ЭФР в качестве лигандного модуля может приводить к ряду дополнительных эффектов, затрудняющих изучение свойств самого МНТ. Например, МНТ с ЭФР при определенных условиях приводил к заметному пролиферативному эффекту раковых клеток. Поэтому чтобы минимизировать такие побочные эффекты в состав МНТ включили не ЭФР, а аффиболи к РЭФР. Сравнение ЭФР и аффиболи к РЭФР было опубликовано в статьях: 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. - V. 11. - 176. - P. 1–15 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как изучение взаимодействия между молекулами методом термофореза и изучение интернализации МНТ с помощью проточной цитофлуориметрии, так и обсуждении результатов и участии в написании); Karyagina T.S., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Khramtsov Y.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. New recombinant carriers binding specifically to the epidermal growth factor receptor // Dokl. Biochem. Biophys. – 2020. – V. 490. – P. 22-24 (вклад автора состоит как в проведении части экспериментальных работ, таких как изучение взаимодействия между молекулами методом термофореза и изучение интернализации МНТ с помощью проточной цитофлуориметрии, так и обсуждении результатов и участии в написании).

Таким образом, для проведения процесса оптимизации строения нами был выбран МНТ следующего состава: антиРЭФР–ДТокс–НМР–антиKeap1. В дальнейшем он сокращенно обозначен как $МНТ_м$. Контрольным к этому МНТ выступал МНТ без монободи к Keap1: антиРЭФР–ДТокс–НМР. Он был обозначен как $МНТ_к$.

Прежде всего, необходимо было выяснить, сохраняют ли модули в составе $МНТ_м$ свои функциональные свойства. Для изучения способности $МНТ_м$ взаимодействовать с РЭФР на поверхности клеток-мишеней автор диссертационной работы использовал метод проточной цитофлуориметрии. Для этого $МНТ_м$ был мечен флуоресцентным красителем AF488 (степень мечения 2,3 молекулы AF488 на молекулу $МНТ_м$). Клетки линии AML-12 инкубировались различные времена с 500 нМ $МНТ_м$–AF488. Уже 15 минут инкубации было достаточно, чтобы средняя флуоресценция клеток была достоверно ($p < 0{,}0001$, t–тест) выше контроля, в который не добавлялся $МНТ_м$–AF488 (Рис. 4.4.1). Для

установления вклада неспецифических взаимодействий (не связанных с взаимодействием с РЭФР) клетки AML12 инкубировали 1 час с МНТ$_м$–AF488 в присутствии избытка ЭФР (2 мкМ). В этом случае, средняя флуоресценция клеток достоверно (p < 0,0001, Т–тест) уменьшалась в три раза, по сравнению со случаем, когда клетки инкубировали только с МНТ$_м$–AF488 (Рис. 4.4.1). Таким образом, было показано, что аффибоди в составе МНТ$_м$ сохраняет свои функциональные свойства, и связывание с клетками происходит преимущественно благодаря взаимодействию с интернализуемым рецептором РЭФР.

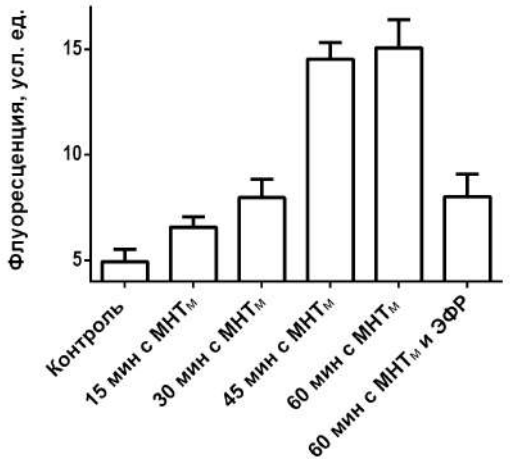


Рисунок 4.4.1. Полученная с помощью проточной цитофлуориметрии средняя флуоресценция клеток AML-12 при их инкубации с МНТ$_м$, меченным флуоресцентным красителем AF488. Показаны группы: без добавления МНТ$_м$-AF488 (контроль), 15, 30, 45 и 60 минут инкубации клеток с 500 нМ МНТ$_м$-AF488, и группа, где клетки инкубировали с 500 нМ МНТ$_м$-AF488 в присутствии 2 мкМ ЭФР. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 9–18).

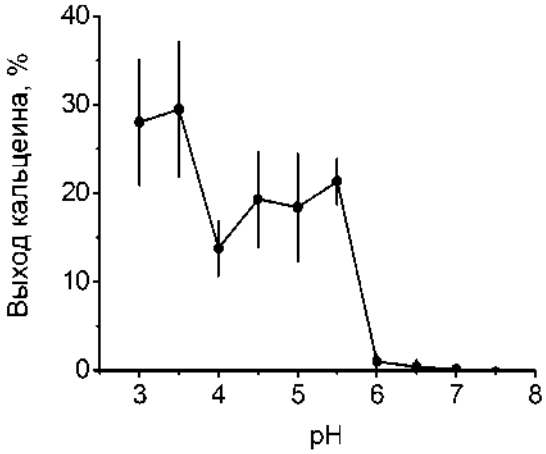


Рисунок 4.4.2. Вызванный МНТ$_м$ выход флуоресцентного красителя кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом, нагруженных этим красителем до концентрации самотушения флуоресценции. Концентрация МНТ$_м$ составляет 100 нМ. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 6).

Проверка функционирования эндосомолитического модуля (ДТокс) в составе МНТ$_м$ была проведена по зависимости выхода флуоресцентного красителя кальцеина из

лецитиновых липосом от pH среды (Рис. 4.4.2). При нейтральных pH $МНТ_м$ не проявлял мембранолитической активности, напротив, при слабокислых pH (меньше 6) наблюдался заметный выход кальцеина (Рис. 4.4.2). Учитывая, что pH = 5,5–6,0 отвечает pH внутренней среде поздних эндосом, можно заключить, что ДТокс сохраняет свою функциональную активность в составе $МНТ_м$.

Способность монободи в составе $МНТ_м$ взаимодействовать в растворе с Keap1 была изучена автором диссертационной работы с помощью метода термофореза. Для этого был получен ответственный за связывание с Nrf2 С-концевой фрагмент Keap1 (аминокислотные остатки 312–624), обозначенный tKeap1. Далее tKeap1 и помечен флуоресцентным красителем Cy3 (степень мечения 3,9 молекул Cy3 на молекулу tKeap1). По полученной при фиксированной концентрации tKeap1 (40 нМ) термофоретической кривой (Рис. 4.4.3а) была определена равновесная константа диссоциации комплекса $МНТ_м$ с tKeap1, которая составила 5,4 ± 0,5 нМ. $МНТ_к$ тоже взаимодействовал с tKeap1 (Рис. 4.4.3б), но с константой диссоциации 93 ± 15 нМ. Было показано, что как свободное аффибоди к РЭФР (Рис. 4.4.3в), так и свободный ДТокс (Рис. 4.4.3г) обладают только низким неспецифическим связыванием с tKeap1 с константой диссоциации больше 1 мкМ. Напротив, для МНТ, содержащего ДТокс и HMP (Рис. 4.4.3д), константа диссоциации была 93 ± 11 нМ. Таким образом, в составе модуля-носителя HMP тоже есть сайт связывания с Keap1, но на порядок с меньшим сродством, чем у монободи. Совместно с Алиевой Р.Т. и Розенкранцем А.А. было уточено местоположение этого сайта в молекуле HMP. Разделение HMP на два фрагмента с помощью метода термофореза показало, что за связывание с Keap1 отвечает N-концевой глобиновый домен HMP. Этот результат был опубликован в статье 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. – V. 16. – 1083 (вклад автора состоит как в участии в экспериментах по связыванию МНТ с Keap1, так и в обсуждении результатов и участии в написании).

Взаимодействие $МНТ_м$ с Keap1 в живой клетке было показано автором диссертационной работы с помощью метода резонансного переноса энергии по Фёрстеру, регистрируемого с помощью визуализации времени жизни флуоресценции (Fluorescence lifetime microscopy-Förster’s resonance energy transfer, FLIM-FRET) (Suhling et al., 2015; Datta et al., 2020). Для этого, клетки AML-12 были временно трансформированы плазмидой, кодирующей белок Keap1, слитый с зеленым флуоресцентным белком hrGFP. $МНТ_м$ был помечен флуоресцентным красителем AF568, как это описано в «Материалах и методах». В случае наличия FRET между этими двумя флуорофорами, время жизни

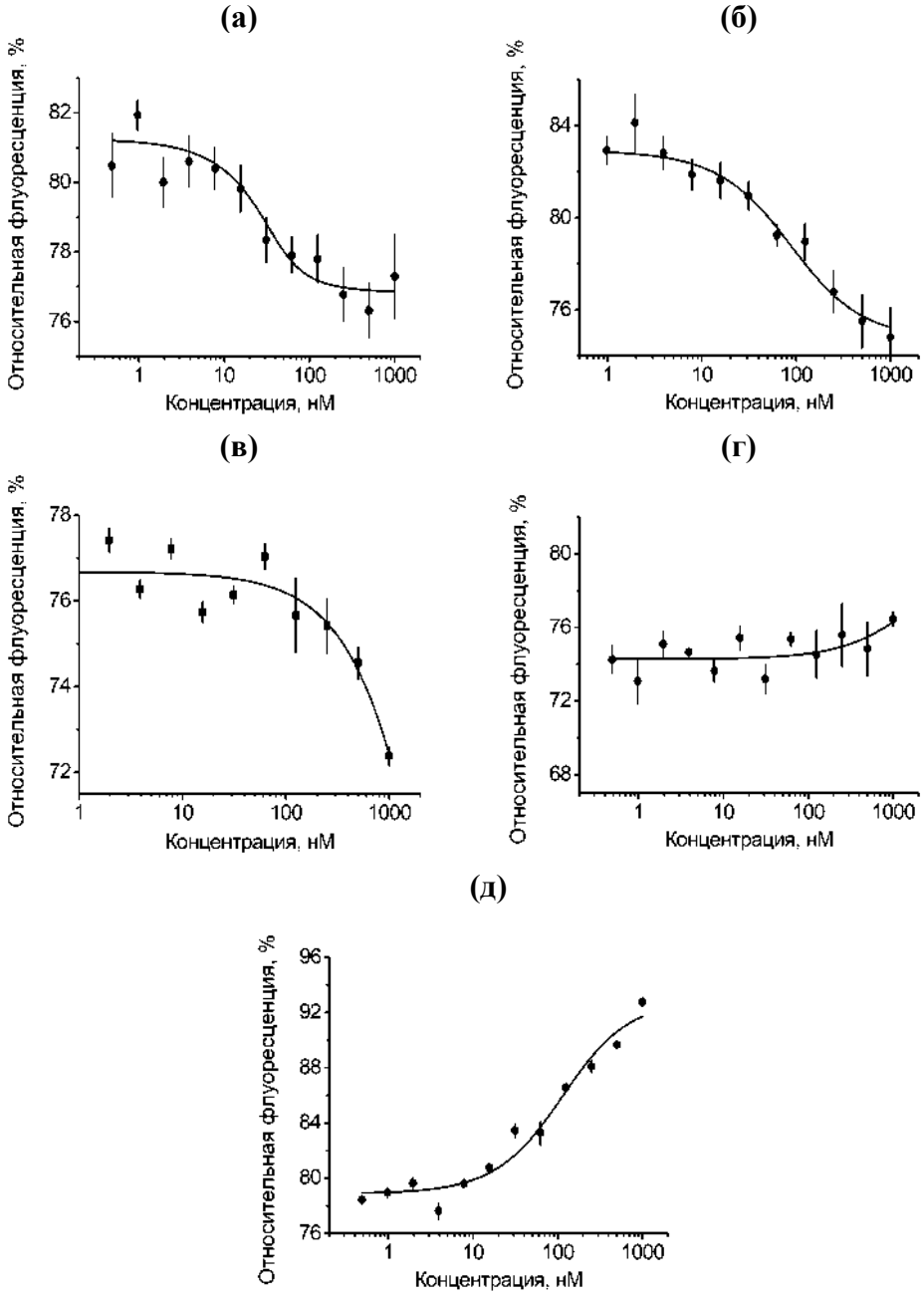


Рисунок 4.4.3. Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (интенсивность флуоресценции до начала термофореза принята за 100%) через 20 секунд после начала термофореза от концентрации МНТ$_м$ (а), МНТ$_к$ (б), аффибоди к РЭФР (в), ДТокс (г) и ДТокс-НМР (д) при постоянной концентрации фрагмента белка Keap1 (40 нМ). Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной флуоресценции (n = 8–12). Кривыми показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью.

флуоресценции донора – hrGFP, должно уменьшаться (Suhling et al., 2015; Datta et al., 2020). Кроме того, в случае FRET падание флуоресценции донора перестает описываться одноэкспоненциальной зависимостью. Иными словами, стандартное отклонение, χ^2, падения флуоресценции от одноэкспоненциальной зависимости должно возрастать. И действительно, инкубация клеток AML12, экспрессирующих Keap1-hrGFP, с 500 нМ МНТ$_м$-AF568 показала в одних и тех же областях клетки как уменьшение времени жизни

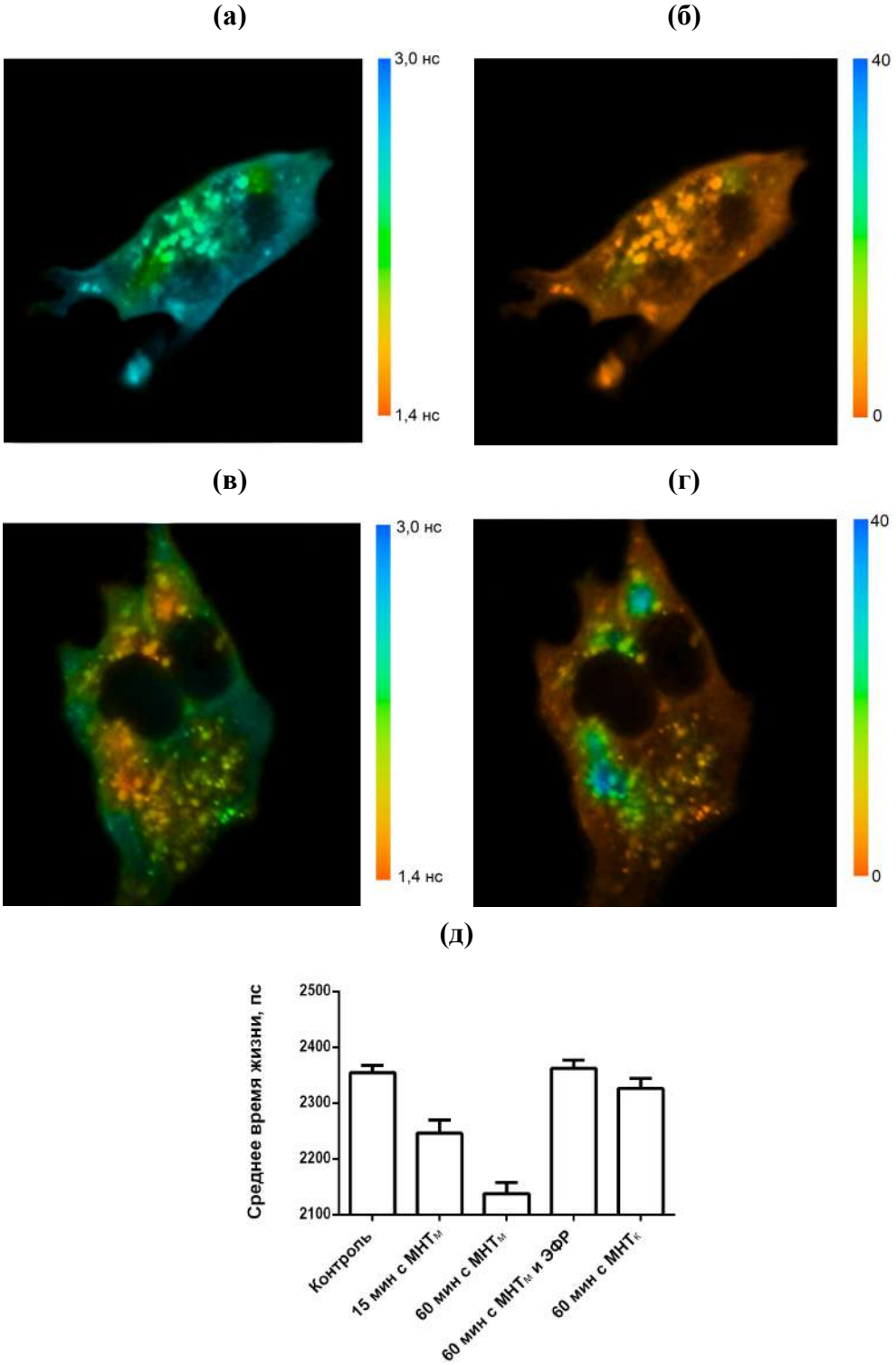


Рисунок 4.4.4. Анализ с помощью метода FLIM-FRET взаимодействия внутриклеточного белка Keap1-hrGFP с МНТ$_м$-AF568, добавленного к клеткам AML-12, экспрессирующим Keap1-hrGFP. Распределение среднего времени жизни флуоресценции hrGFP в клетке, к которой не был добавлен МНТ$_м$-AF568 **(а)** и в клетке, которая инкубировалась 1 час с МНТ$_м$-AF568 **(в)**. Распределение стандартного отклонения, χ^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)**. Чтобы показать только клетку, экспрессирующую Keap1-hrGFP, к изображению была применена специальная маска. Среднее время жизни флуоресценции hrGFP для различных экспериментальных образцов клеток AML-12, экспрессирующих Keap1-hrGFP **(д)**. Концентрации МНТ$_м$-AF568 и ЭФР равны 500 нМ и 2 мкМ, соответственно. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 9–18).

hrGFP, так и возрастание χ^2 (Рис. 4.4.4). Это указывает на наличие FRET, а значит и на взаимодействие между $МНТ_м$ и Keap1 в этих областях клетки. Среднее время жизни hrGFP достоверно ($p < 0{,}01$, тест Даннетта) уменьшалось уже после 15 минут инкубации клеток AML-12 с $МНТ_м$-AF568 (Рис. 4.4.4д). Напротив, инкубация клеток AML12 с 500 нМ $МНТ_к$-AF568 не приводила к достоверному уменьшению времени жизни hrGFP (Рис. 4.4.4д). Когда клетки AML12, экспрессирующие Keap1-hrGFP, инкубировали 1 час с 500 нМ $МНТ_м$-AF568 и 2 мкМ ЭФР, то среднее время жизни hrGFP не отличалось от контроля, к которому не добавлялся $МНТ_м$-AF568. Это указывает на то, что интернализация $МНТ_м$ в клетки происходит за счет связывания с РЭФР.

Таким образом, полученные данные указывают на способность $МНТ_м$ взаимодействовать с Keap1 в цитозоле клеток с РЭФР.

По данным FLIM-FRET автором диссертационной работы было оценено среднее расстояние между донором и акцептором при наличии между ними FRET. Падение флуоресценции hrGFP описывалась двухэкспоненциальной зависимостью с характерными временами t_1 и t_2. Тогда эффективность FRET, E, задается следующим выражением (Suhling et al., 2015; Datta et al., 2020):

$$E = 1 - t_1/t_2 \qquad (4.4.1).$$

Для клеток AML12, экспрессирующих Keap1-hrGFP, строились частотные распределения E в случаях, когда к клеткам не был (Рис. 4.4.5а, черная кривая) и был добавлен $МНТ_м$-AF568 (Рис. 4.4.5а, красная кривая). При значениях E меньше 22 на данной гистограмме наблюдался пик даже без добавления $МНТ_м$-AF568 (Рис. 4.4.5а, черная кривая). Возможно, он связан с наличием в клетке эндогенных акцепторов флуоресценции hrGFP. Чтобы не учитывать эти взаимодействия, при расчетах учитывались только значения $E > 22$. Чтобы получить реальную эффективность FRET, из значений E при добавлении $МНТ_м$-AF568 вычитались значения E без добавления $МНТ_м$-AF568 (Рис. 4.4.5б). Частотное распределение реальной эффективности FRET хорошо описывалось кривой Гаусса, имеющей максимум 59,4 ± 0,6% (Рис. 4.4.5б, красная кривая). Зная эффективность FRET и радиус Фёрстера, r_0, можно рассчитать расстояние между донором и акцептором, r, по следующему выражению (Suhling et al., 2015; Datta et al., 2020):

$$r = r_0 \cdot \sqrt{\frac{1}{E} - 1} \qquad (4.4.2).$$

Для используемой пары флуорофоров, hrGFP и AlexaFluor568, на сайте https://www.fpbase.org/fret/ было определено, что $r_0 = 5{,}4$ нм. Тогда для расстояния между флуорофорами было получено 5,07 ± 0,02 нм. Ошибка определения этого значения была оценена по полуширине пика, представленного на Рис. 4.4.5б. Итак, среднее расстояние

между hrGFP и AF488 в комплексе МНТ$_м$-AF488:Keap1-hrGFP составило 5,1 ± 0,8 нм. Оно меньше характерных размеров МНТ, описанных ранее (8,3–10,6 нм). По площади пика была определена доля области клетки, в которой наблюдался FRET. Она составила 22,5 ± 0,8% и отражает долю молекул Keap1, участвующих в образовании комплекса с МНТ$_м$.

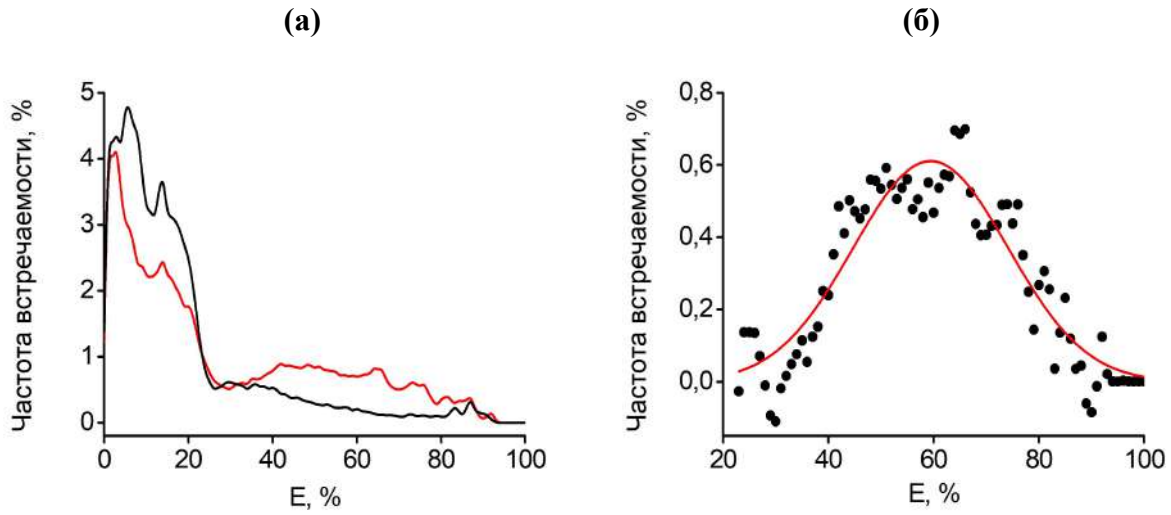


Рисунок 4.4.5. (а) Частота встречаемости эффективности FRET, E, в клетках AML-12, экспрессирующих Keap1-hrGFP, которые инкубировались 1 час с 500 нМ МНТ$_м$-AF568 (красная кривая). Черной кривой показана гистограмма контроля, в котором к клеткам не добавлялся МНТ. (б) Разница между частотными распределениями эффективности FRET для клеток AML12, которые инкубировались и не инкубировались с МНТ$_м$-AF568. Красной кривой показана интерполяция экспериментальных данных кривой Гаусса. Все распределения получены усреднением данных по 10–14 клеткам.

Для более точной оценки доли молекул Keap1, с которыми может взаимодействовать МНТ$_м$, можно воспользоваться частотными распределениями средних времен жизни флуоресценции hrGFP, t_m, усредненными по множеству клеток. Эти распределения были получены для контроля (клетки AML12 без МНТ) (Рис. 4.4.6а) и для клеток AML12, которые инкубировались с 500 нМ МНТ$_м$-AF568 в течение 15 минут (Рис. 4.4.6б) и 1 часа (Рис. 4.4.6в). В программе Origin6.0 эти зависимости описывались кривыми Гаусса, минимальное число которых выбиралось таким образом, чтобы коэффициент детерминации, r^2, был больше 0,98. Для контроля, частотное распределение можно было разложить на две кривые Гаусса, имеющие максимумы 2195 ± 63 и 2427 ± 2 пс, соответственно (Рис. 4.4.6а). После 15 минут инкубации клеток с МНТ$_м$ частотное распределение хорошо описывается четырьмя кривыми Гаусса, имеющими максимумы 284 ± 26, 1962 ± 53, 2289 ± 34 и 2409,4 ± 1,7 пс, соответственно (Рис. 4.4.6б). Аналогично, частотное распределение для 1 часа инкубации клеток с МНТ$_м$ описывается четырьмя кривыми Гаусса, имеющими максимумы 1160 ± 13, 2088 ± 18, 2408 ± 7 и 2509,6 ± 1,1 пс, соответственно (Рис. 4.4.6в). Судя по значениям максимумов, последние два пика

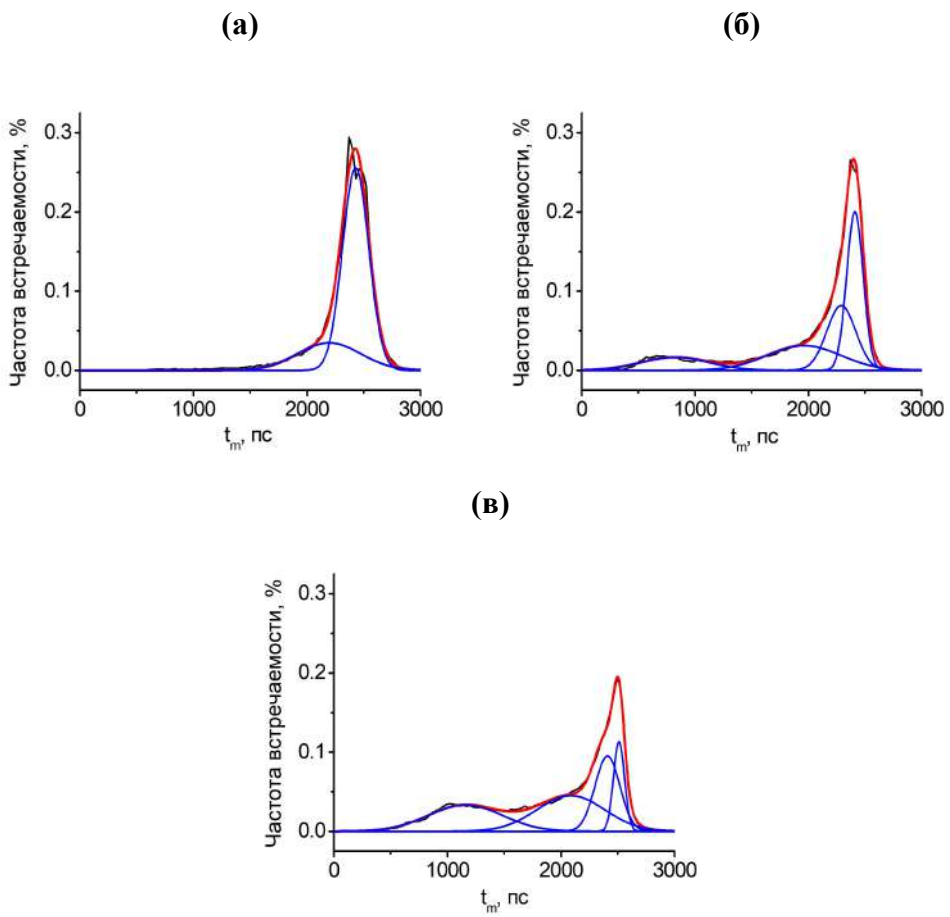


Рисунок 4.4.6. Анализ с помощью метода FLIM-FRET взаимодействия внутриклеточного белка Keap1-hrGFP с МНТ$_м$-AF568, добавленного к клеткам AML-12, экспрессирующим Keap1-hrGFP. Частотное распределение среднего времени жизни флуоресценции hrGFP, t_m, в клетках, к которым не добавлялся МНТ$_м$-AF568 (а), которые инкубировались 15 минут с 500 нМ МНТ$_м$-AF568 (б) и которые инкубировались 1 час с 500 нМ МНТ$_м$-AF568 (в). Кривые были усреднены по 5–15 клеткам. Черной линией показана усредненная кривая, синими кривыми показан результат интерполяции кривыми Гаусса, а красными кривыми показана сумма этих кривых Гаусса.

отвечают флуоресценции hrGFP, для которого не наблюдался FRET. Напротив, первые два пика указывают на наличие FRET или иными словами, комплекса между МНТ$_м$ и Keap1. По эффективности FRET, рассчитанной для первого пика, среднее расстояние между донором и акцептором составляет 5,3 нм, что совпадает с произведенной выше оценкой (5,1 ± 0,8 нм). Следует отметить, что в клетке Keap1 образует димеры (Ogura et al., 2010), наличием которых можно объяснить второй пик на частотном распределении. И действительно, когда димер Keap1 связывается с молекулой МНТ$_м$, то hrGFP на каждой из молекул димера может служить донором для молекулы AF568 на МНТ$_м$. Единственным различием между двумя молекулами Keap1 в димере будет расстояние между донором и акцептором. Второй пик в этом случае отвечает расстоянию 7,3 нм. Иными словами, второй пик предположительно отвечает молекулам Keap1, которые взаимодействуют с МНТ$_м$ не напрямую, а опосредованно через другую молекулу Keap1 в димере. Поэтому

доля молекул Keap1, способных взаимодействовать с молекулами МНТ$_м$, рассчитывалась без учета второго пика. В этом случае эта доля была 16,5 и 40,7% для 15 минут и 1 часа инкубации с МНТ$_м$, соответственно. Если же предположение насчет второго пика не верно, то оценка этой доли вырастет до 30 и 80%, соответственно. Итак, молекулы МНТ$_м$ быстро поступают в клетки AML12 и способны связываться с существенной долей молекул Keap1-hrGFP в этих клетках.

Способность МНТ$_м$ взаимодействовать в клетках AML12 с белком Keap1 была также показана автором диссертационной работы с помощью клеточного анализа теплового сдвига (cellular thermal shift assays, CETSA) (Martinez et al., 2013; Tolvanen, 2022; Caballero and Lundgren, 2023). Этот метод основан на разной термочувствительности белка и комплекса белка с другой молекулой, что сказывается на кривой плавления этого белка – зависимости неагрегированного белка от температуры. Причем эта кривая получается осаждением денатурированного при нагревании и агрегированного белка центрифугированием. Кривые плавления Keap1 получались, как описано в «Материалах и методах», на основании данных иммуноблоттинга с антителами на этот белок (Рис. 4.4.7).

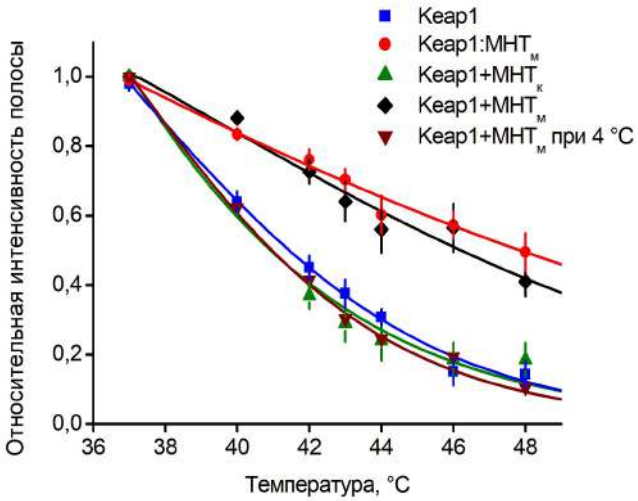


Рисунок 4.4.7. Кривые плавления Keap1 в его естественном белковом окружении (синяя кривая), в комплексе с МНТ$_м$ (красная кривая), после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_м$ (черная кривая), после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_к$ (зеленая кривая) и после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_м$ при 4°C (коричневая кривая). Данные получены путем проведения CETSA и дальнейшего иммуноблоттинга с антителами на Keap1. Зависимости нормированы на среднюю интенсивность полосы, отвечающей Keap1 при 37°C. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 3–9).

На этом рисунке для клеток AML-12, к которым не добавляли МНТ, получена кривая плавления Keap1 в его естественном белковом окружении (синяя кривая). Кривая плавления, отвечающая комплексу Keap1 с МНТ$_м$, была получена для лизата клеток AML-12, к которому был добавлен МНТ$_м$ с конечной концентрацией 1 мкМ (Рис. 4.4.7, красная

кривая). Хорошо заметно отличие кривых плавления для Keap1 и его комплекса с МНТ$_м$. Кривая плавления Keap1 была также получена в случае, когда клетки AML12 инкубировались 15 минут с 500 нМ МНТ$_м$, после чего отмывались от несвязавшегося МНТ$_м$ (Рис. 4.4.7, черная кривая). Эта кривая совпала с кривой плавления комплекса Keap1 с МНТ$_м$ (Рис. 4.4.7, ср. черную и красную кривые). Напротив, кривая плавления Keap1, отвечающая случаю, когда клетки AML12 инкубировались 15 минут с 500 нМ МНТ$_к$ (Рис. 4.4.7, зеленая кривая), совпала с кривой плавления Keap1 в его естественном белковом окружении (Рис. 4.4.7, ср. зеленую и синюю кривые). Если кривая плавления Keap1 была получена для клеток AML-12, которые инкубировались с 500 нМ МНТ$_м$ в течение 15 минут при 4°C, то она тоже совпадала с кривой плавления Keap1 в его естественном белковом окружении (Рис. 4.4.7, ср. коричневую и синюю кривые). Таким образом, метод CETSA показал, что 15 минут инкубации с клетками AML-12 достаточно для того, чтобы МНТ$_м$ за счет монободи R1 в своем составе образовал комплекс с Keap1 в цитозоле. Как показано выше по данным FLIM-FRET, интернализация МНТ$_м$ происходит за счет опосредованного РЭФР эндоцитоза. Это подтверждается данными CETSA, т.к. при 4°C скорость эндоцитоза сильно падает, что приводит к отсутствию взаимодействия МНТ$_м$ с Keap1 в цитозоле.

Итак, полученные данные позволяют заключить, что все модули в составе МНТ$_м$ сохраняют свою функциональную активность и этот МНТ способен взаимодействовать с Keap1 не только в растворе, но и в живой клетке. Проникновение МНТ$_м$ в клетку осуществляется путем рецептор-опосредованного эндоцитоза.

4.4.2. Доставка молекул к митохондриям с помощью МНТ

Известно, что заметная доля молекул Keap1 связана на поверхности митохондрий (Lo and Hannink, 2008). Поэтому потенциально взаимодействие МНТ$_м$ с Keap1 можно использовать для доставки биологически активных молекул к митохондриям. Для проверки митохондриальной локализации МНТ$_м$ была использована флуоресцентная микроскопия с временным разрешением (FLIM). При этом МНТ$_м$ был помечен флуоресцентным красителем AF488 (зеленый), а митохондрии прокрашены красителем MitoTracker RED FM (красный). Преимуществом FLIM микроскопии перед обычной конфокальной микроскопией является то, что флуоресценцию AF488 и MitoTracker RED FM можно хорошо отделить как друг от друга, так и от автофлуоресценции. Дело в том, что их средние времена жизни существенно отличались друг от друга. Так среднее время жизни MitoTracker RED FM было 1203 пс (доверительный интервал 1085–1381 пс), в то время как у AF488 оно было 2140 пс (доверительный интервал 1970–2315 пс). Времена жизни автофлуоресценции в каналах MitoTracker RED FM и AF488 составляли 2473 пс

(доверительный интервал 2108–2899 пс) и 2710 пс (доверительный интервал 2515–2802 пс), соответственно. Более того, даже при оптимальных условиях возбуждения автофлуоресценции, величина ее сигнала составляла не больше 20% сигнала AF488 и не больше 2–3% сигнала MitoTracker RED FM. Все это позволило практически полностью удалить вклад автофлуоресценции из полученных изображений и хорошо отделить флуоресценцию красителей друг от друга.

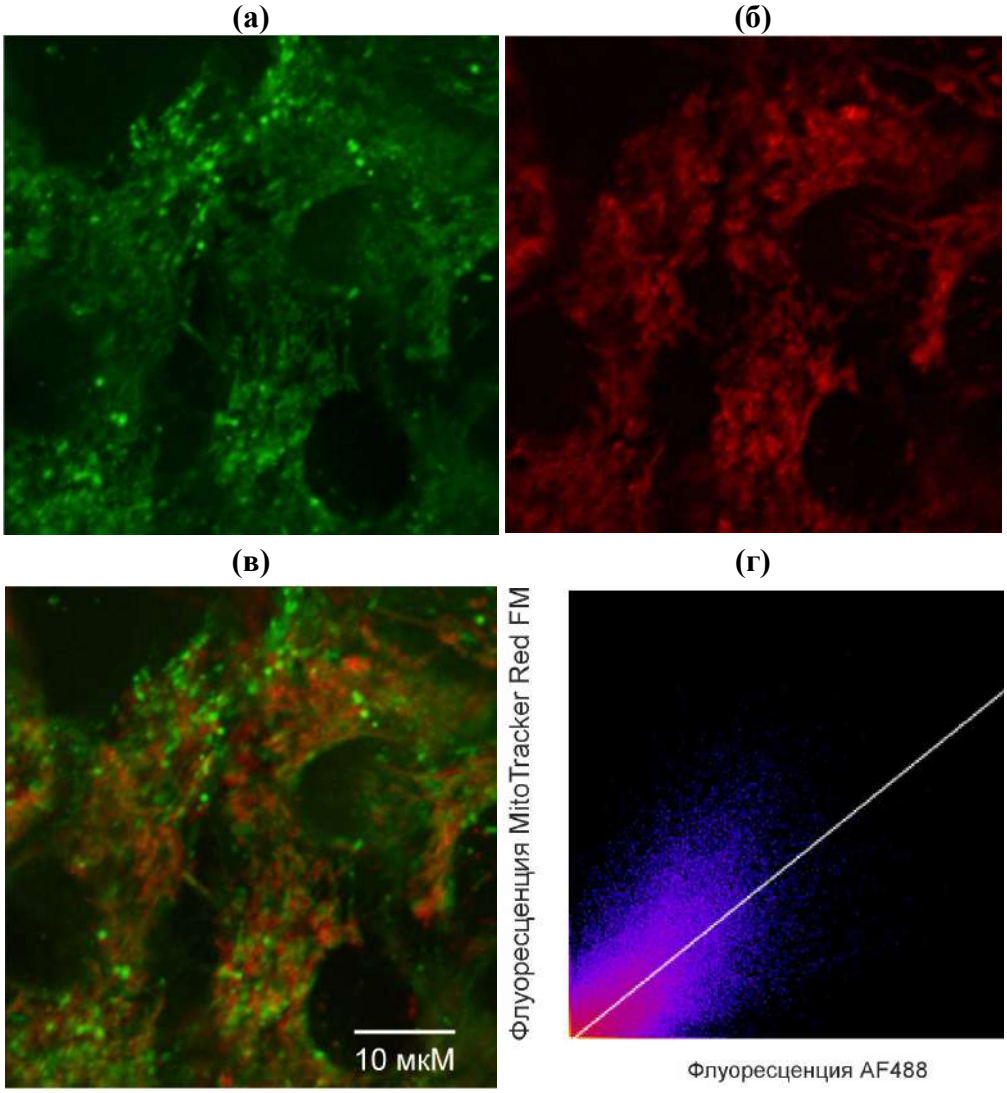


Рисунок 4.4.8. Типичные изображения клеток A431, которые инкубировали 1 час с МНТ$_м$, меченным AF488, и 15 минут с MitoTracker Red FM в канале флуоресценции AF488 (а), MitoTracker Red FM (б) и наложении этих каналов (в). Полученная в клетках A431 корреляция между интенсивностями флуоресценции MitoTracker Red FM и AF488 (г). Флуоресценция возбуждалась мультифотонным лазером с длиной волны 800 нм. Коэффициент корреляции линии регрессии, представленной на рисунке (г), равен 0,77. Данные получены совместно с А.А. Розенкранцем.

Клетки A431 инкубировали 1 час с 500 нМ МНТ$_м$, меченным AF488 (2,3 молекулы AF488 на одну молекулу МНТ$_м$), и 15 минут с красителем MitoTracker Red FM конечной концентрации 100 нМ. С помощью FLIM микроскопии была определена внутриклеточная локализация МНТ$_м$ (типичное изображение на Рис. 4.4.8а) и покрашены

митохондрии (типичное изображение на Рис. 4.4.8б). Области, где наблюдалась колокализация МНТ$_м$-AF488 и митохондрий прокрашены оранжевым цветом (типичное изображение на Рис. 4.4.8в). Наблюдалась сильная корреляция между флуоресценцией специфичного для митохондрий красителя и флуоресценцией красителя, присоединенного к МНТ$_м$ (Рис. 4.4.8г). Так, коэффициент линейной корреляции Пирсона, равный 0,77, указывал на достоверную (p < 0,001) корреляцию между флуоресценциями этих красителей. Коэффициент ранговой корреляции Спирмана, говорящий о монотонности зависимости между переменными, был 0,87, что тоже подтверждает зависимость между интенсивностями флуоресценции обоих красителей. Полученные данные подтверждают предположение о том, что МНТ$_м$ колокализуется с митохондриями.

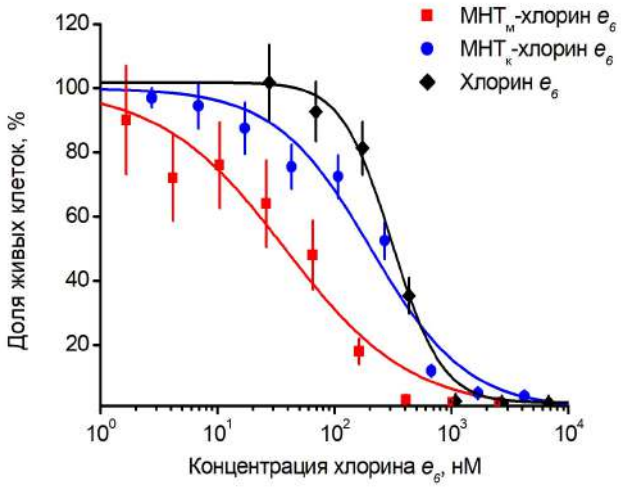


Рисунок 4.4.9. Фотоцитотоксичность на клетках А431 конъюгата МНТ$_м$-хлорин e_6 по сравнению со свободным хлорином e_6 и конъюгатом МНТ$_к$-хлорин e_6. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 6–10). Линии показывают интерполяцию экспериментальных данных логистическими сигмоидными кривыми (четырех параметрическая модель). Данные получены совместно с Т.А. Сластниковой.

Таким образом, МНТ$_м$ можно использовать для доставки цитотоксических агентов к митохондриальной мембране. Это потенциально может привести к нарушению ее целостности и клеточной гибели. Для проверки этого предположения была выбрана таже линия опухолевых клеток, на которой и была показана колокализация МНТ$_м$ с митохондриями – А431 (высокий уровень экспрессии РЭФР). К МНТ$_м$ и МНТ$_к$ был присоединен, как описано в «Материалах и методах», фотосенсибилизатор хлорин e_6 в качестве цитотоксического агента. На Рис. 4.4.9 представлены кривые выживаемости клеток после облучения в случаях, когда фотосенсибилизатор был присоединен к МНТ$_м$, к МНТ$_к$ или оставался свободным. Концентрация 50% эффекта, ЕС$_{50}$, составила 37,7 нМ (доверительный интервал 23,3–59,4 нМ), 204,1 нМ (доверительный интервал 137,8–300,7 нМ) и 324,7 нМ (доверительный интервал 290,1–362,4 нМ), для МНТ$_м$ и МНТ$_к$ с хлорином

e_6 и свободного хлорина e_6, соответственно. Таким образом, наблюдалось достоверное 8,6-кратное усиление фотоцитотоксического эффекта фотосенсибилизатора, присоединенного к $МНТ_м$, по сравнению со свободным фотосенсибилизатором. Напротив, присоединение фотосенсибилизатора к $МНТ_к$ не приводило к достоверному увеличению его фотоцитотоксичности. Данные с фотосенсибилизаторами получены совместно с Т.А. Сластниковой.

Итак, было показано, что существенная доля $МНТ_м$ локализуется в клетке в области митохондрий и $МНТ_м$ способен практически в 9 раз увеличивать фотоцитотоксический эффект доставляемых с помощью него фотосенсибилизаторов.

4.4.3. Активация Nrf2-системы с помощью МНТ

Первым этапом активации Nrf2-системы является нарушение комплекса Nrf2 с Keap1, в котором Nrf2 находится в нормальных условиях. Выше было показано, что $МНТ_м$ способен взаимодействовать с Keap1 в клетках. Чтобы показать, что это взаимодействие может приводить к вытеснению Nrf2 из комплекса с Keap1, автор диссертационной работы использовал метод CETSA, в котором анализировались данные иммуноблоттинга с антителами на Nrf2. Кривые плавления Nrf2 в клетках получались нагреванием клеточных образцов до различных температур в течение трех минут, лизисом клеток, и последующим анализом супернатантов с помощью иммуноблоттинга (Рис. 4.4.10а). В клетках AML12 без добавления $МНТ_м$ весь Nrf2 находился в комплексе с Keap1 (Рис. 4.4.10б, синяя кривая). Свободному Nrf2 отвечает кривая его плавления в клеточном лизате, к которому был добавлен 1 мкМ $МНТ_м$ (Рис. 4.4.10б, красная кривая). Видно, что выход Nrf2 из комплекса существенно сдвигает кривую его плавления в область высоких температур. Если клетки AML-12 15 минут инкубировать с 500 нМ $МНТ_м$, то наблюдался существенный сдвиг кривой плавления Nrf2 (Рис. 4.4.10б, черная кривая) в сторону кривой плавления свободного Nrf2 (Рис. 4.4.10б, красная кривая). Иными словами, взаимодействие $МНТ_м$ с Keap1 приводит к вытеснению Nrf2 из комплекса с Keap1. Напротив, контрольный $МНТ_к$ не вытеснял Nrf2 из комплекса с Keap1 в клетках AML12 (Рис. 4.4.10б, зеленая кривая). Это подтверждает описанные выше данные о том, что в этих условиях не наблюдалось взаимодействия $МНТ_к$ с Keap1 в клетках (Рис. 4.4.7). Если проводить инкубацию $МНТ_м$ при температуре 4°C, которая сильно замедляет процесс эндоцитоза, то вытеснения Nrf2 из комплекса с Keap1 тоже не наблюдалось (Рис. 4.4.10б, ср. коричневую и синюю кривые). Таким образом, $МНТ_м$ не только способен взаимодействовать с Keap1 в клетках, но и приводить к высвобождению транскрипционного фактора Nrf2 из комплекса с Keap1.

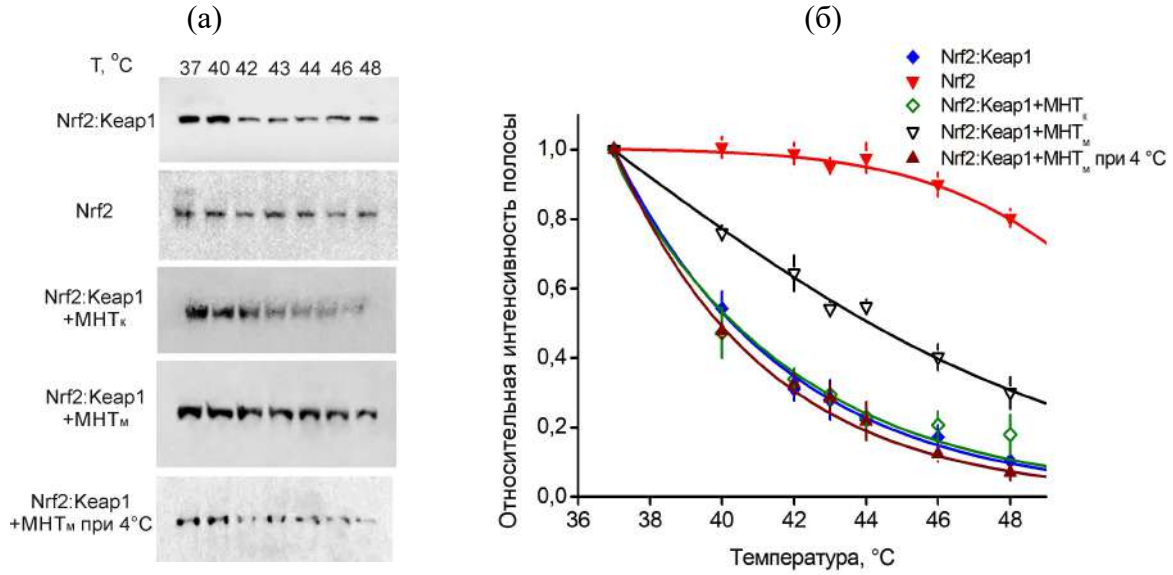


Рисунок 4.4.10. (а) Примеры иммуноблотов с антителами на Nrf2 для комплекса Nrf2:Keap1 (нагревание клеток), свободного Nrf2 (нагревание лизата клеток с избытком МНТ$_м$), для Nrf2 в клетках AML12 после 15 минут инкубации с 500 нМ МНТ$_м$ (нагревание клеток), для Nrf2 в клетках AML12 после 15 минут инкубации с 500 нМ МНТ$_к$ (нагревание клеток) и для Nrf2 в клетках AML12 после 15 минут инкубации с 500 нМ МНТ$_м$ при 4°C (нагревание клеток). Указаны температуры, до которых нагревались образцы клеток в течение 3 минут. **(б) Кривые плавления Nrf2 в комплексе с Keap1 (синяя кривая), свободного Nrf2 (красная кривая), после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_м$ (черная кривая), после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_к$ (зеленая кривая) и после 15 минут инкубации клеток AML-12 с 500 нМ МНТ$_м$ при 4°C (коричневая кривая).** Зависимости нормированы на среднюю интенсивность полосы, отвечающей Nrf2 при 37°C. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 4–14).

Нарушение комплекса Nrf2 с Keap1 при воздействии на него МНТ$_м$ должно приводить к уменьшению скорости деградации Nrf2, возрастанию концентрации Nrf2 в цитоплазме за счет постоянного его синтеза и поступлению новосинтезированного Nrf2 в ядро (Kobayashi et al., 2006). Изучение распределения относительного содержания Nrf2 в клетке проводилось совместно с Т.А. Сластниковой и А.А. Розенкранцем с помощью конфокальной микроскопии так, как это описано в «Материалах и методах». Для этого использовали меченные флуоресцентно вторичные антитела к Nrf2. Полученные зависимости относительной флуоресценции от времени инкубации клеток AML12 с МНТ (500 нМ), указывают на то, что при всех изученных временных точках влияние на уровень Nrf2 как в цитоплазме так и в ядре достоверно больше для МНТ$_м$ по сравнению с МНТ$_к$ (Рис. 4.4.11). Ответ клеток на МНТ$_м$ довольно быстрый и уже после 15 минут инкубации с ним флуоресценция (концентрация Nrf2) в ядре и цитоплазме возрастала в 2,6 и 2,5 раза, соответственно (Рис. 4.4.11). Таким образом, МНТ$_м$ действительно способен приводить к возрастанию концентрации транскрипционного фактора Nrf2 в ядре, что потенциально должно приводить к защите клеток от окислительного стресса.

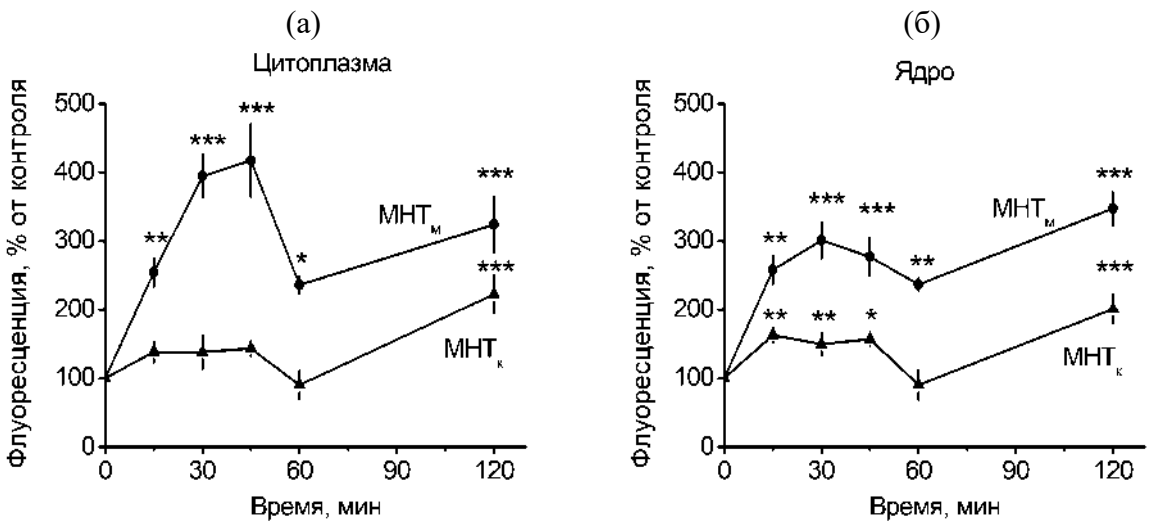


Рисунок 4.4.11. Кинетики изменения уровня Nrf2 в цитоплазме (а) и ядре (б) клеток AML12 после добавления 500 нМ МНТ$_м$ или МНТ$_к$. За 100% принята флуоресценция до добавления МНТ. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 10–12). Достоверность отличия от контроля (до добавления МНТ): * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$. Данные получены совместно с Т.А. Сластниковой и А.А. Розенкранцем.

Для изучения способности МНТ$_м$ влиять на уровень активных форм кислорода в клетке был использован широко распространенный краситель – 6-карбокси-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (cDCFH-DA), который в клетке образует флуоресцентный продукт (cDCF) после дезацитилирования и взаимодействия с активными формами кислорода, например, гидроксильным радикалом (Wrona et al., 2005; Murphy et al., 2022). Клетки AML12 инкубировали с 500 нМ МНТ$_м$ или МНТ$_к$ в течение 15 минут, далее отмывали свежей средой, и инкубировали заданные промежутки времени. За 30 минут до нужного срока среду заменяли раствором Хенкса, содержащим DCFH-DA концентрации 100 мкМ. В заданные промежутки времени клетки отмывали фосфатным буфером и добавляли на 15 минут 10 мМ H_2O_2. С помощью проточной цитофлуориметрии была получена зависимость средней флуоресценция cDCF на клетку при различных временах инкубации с МНТ$_к$ (Рис. 4.4.12а) или МНТ$_м$ (Рис. 4.4.12б). Предварительная инкубация с МНТ$_м$ приводила к достоверному ($p < 0{,}05$, тест Крускала-Уоллиса) уменьшению флуоресценции cDCF в диапазоне от 2 до 4 часов между добавлением МНТ и добавлением перекиси (Рис. 4.4.12б). Напротив, предварительная инкубация с МНТ$_к$ не приводила к достоверному уменьшению средней флуоресценции cDCF на клетку (Рис. 4.4.12а). Таким образом, инкубирование клеток AML12 с МНТ$_м$ приводило к их защите от окислительного стресса, вызванного добавлением перекиси. Работа выполнена совместно с Т.Н. Лупановой.

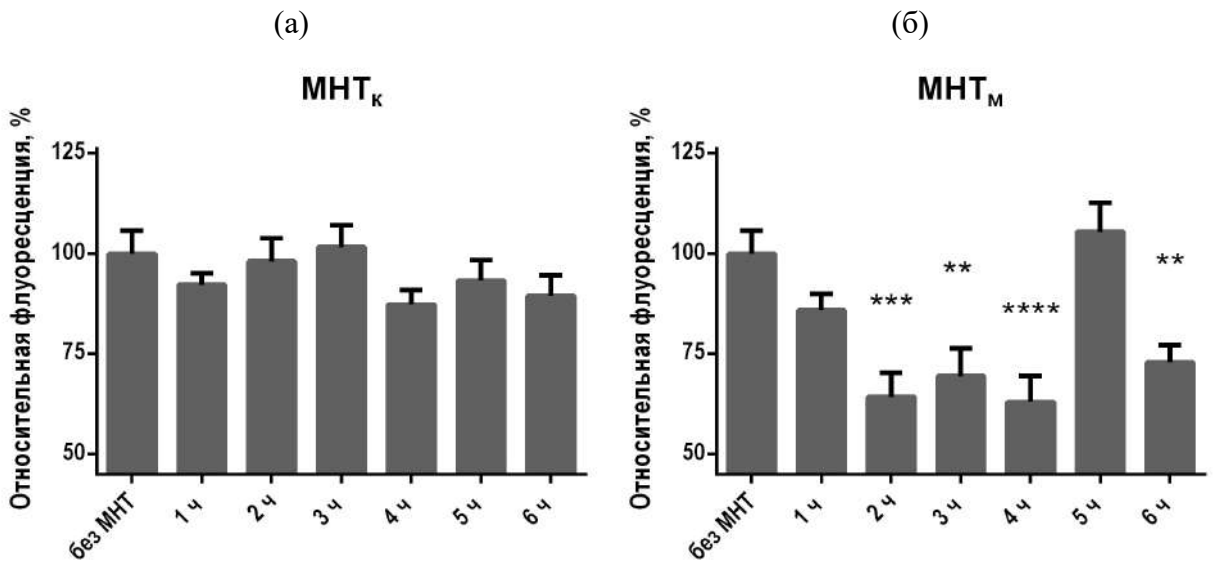


Рисунок 4.4.12. Влияние МНТ на действие перекиси водорода на клетки AML12. (а) Влияние 15 минутной предварительной инкубации 500 нМ МНТ$_к$ на флуоресценцию cDCF от времени после добавления МНТ. (б) Влияние 15 минутной предварительной инкубации 500 нМ МНТ$_м$ на флуоресценцию cDCF от времени после добавления 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. Эксперименты проведены совместно с Т.Н. Лупановой.

Совместно с А.А. Розенкранцем, А.В. Уласовым, Т.А. Сластниковой, Т.Н. Лупановой, Т.С. Карягиной и А.С. Абросимовым было изучено противотоксическое действие МНТ$_м$ *in vivo* на известной мышиной модели (Lee, 2017; Shen et al., 2018) окислительного поражения печени, вызванного большими дозами ацетаминофена, известного также как парацетамол. Данное цитотоксическое воздействие изучалось по уровню сывороточной активности ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) с использованием аналитических наборов. В норме у мышей линии C57bl/6J уровни АЛТ и АСТ составляли 40 Ед/л (95% доверительный интервал, ДИ, 29–52 Ед/л) и 33 Ед/л (95% ДИ, 30–36 Ед/л), соответственно (Таблица 4.4.1). Спустя три часа после внутрибрюшинного введения парацетамола в дозе 300 мг/кг уровни АЛС и АСТ вырастали до 228 Ед/л (95% доверительный интервал: 210–252 Ед/л) и 96 Ед/л (95% доверительный интервал: 91–105 Ед/л) (Таблица 4.4.1). Кроме того, в этих же условиях вес печени увеличивался в 1,5 раза с 4,8% от веса тела (95% ДИ, 4,6–5,1%) до 7,2% от веса тела (95% ДИ, 6,9–7,6%) (Таблица 4.4.1). Спустя сутки после введения парацетамола, уровень АСТ и вес печени отличались от контрольных значений на 1,07 и 1,08, соответственно. Обе этих величины достоверно не отличались от контроля. Уровень АЛТ оставался достоверно (p < 0,0001, тест Манна-Уитни) выше контроля и составлял 98 Ед/л (95% ДИ, 89–106 Ед/л).

Для изучения влияния $МНТ_м$ на цитотоксичность больших доз парацетамола, мышам внутривенно вводился 0,22 мг МНТ (2,7 нмоль) за 1, 2 или 4 часа до введения парацетамола. Достоверное влияние $МНТ_м$ на изучаемые параметры было обнаружено только для веса печени ($p < 0,01$) в случае, когда $МНТ_м$ вводился за 2 часа до введения парацетамола. В этом случае печень при добавлении парацетамола увеличивалась в 1,36 раза, в то время как в контрольной группе это увеличение было в 1,5 раза. Когда $МНТ_м$ вводился в более высокой дозе 0,58 мг (7 нмоль) на мышь за 2 часа до парацетамола, то это приводило к достоверному ингибированию роста активности АЛТ и АСТ, а также увеличения веса печени, вызванного парацетамолом (Таблица 4.4.1). Причем это ингибирование составляло от 25 до 43% от величины эффекта парацетамола (Таблица 4.4.1). Таким образом, $МНТ_м$ способен приводить к защите печени от цитотоксического действия больших доз парацетамола.

Таблица 4.4.1. Влияние $МНТ_м$ на токсические эффекты парацетамола (ПЦМ). Указаны средние значения ± стандартная ошибка.

	Контроль	ПЦМ, 300 мг/кг	$МНТ_м$ 0,58 мг + ПЦМ, 300 мг/кг		*p* $МНТ_м$ + ПЦМ от ПЦМ
			Значение	Влияние на эффект от ПЦМ, %%	
Активность АЛТ, Ед./л	40 ± 5	228 ± 12	159 ± 17	↓37	< 0,0001
Активность АСТ, Ед./л	33 ± 1	96 ± 5	81 ± 5	↓25	< 0,01
Вес печени/Вес мыши, %	4,8 ± 0,1	7,2 ± 0,2	6,2 ± 0,2	↓43	< 0,0001
Число мышей	16	22	15		-

Итак, был получен МНТ, который не только в растворе, но и в клетке способен взаимодействовать с белком Keap1. В зависимости от поставленных задач его можно использовать, например, для доставки цитотоксических агентов к митохондриям с целью лечения онкологических заболеваний или, напротив, можно использовать для защиты клеток от окислительного стресса, как это было показано на примерах защиты клеток AML12 от действия перекиси водорода и защиты печени от цитотоксического действия больших доз парацетамола.

Основные результаты, изложенные в п. 4.4, были опубликованы в статьях автора с соавторами: 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. - V. 15. - 2687 (вклад автора

состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью динамического светорассеяния, термофореза, CETSA, FLIM-FRET и FLIM, так и общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основной части текста); 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. - V. 15. - 324 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии и CETSA, так и в предложенном подходе по оценке концентрации на основании данных CETSA, общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основной части текста); 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. - V. 16. - 1345 (вклад автора состоит как в проведении существенной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии FLIM-FRET, CETSA и проточной цитофлуориметри, так и в оценке концентрации МНТ на основании данных CETSA, участии в планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и в написании основной части текста); Khramtsov Y.V., Rosenkranz A.A., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Lupanova T.N., Alieva R.T., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Modular nanotransporters containing Keap1 monobodies are capable of reducing the toxic effect of acetaminophen on the liver of mice // Dokl. Biochem. Biophys. 2025. - V. 521. - P. 174-177 (вклад автора состоит как в участии в экспериментальных работах, таких как влияние МНТ на эффекты парацетамола на печень мышей, так и участие в планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста). Автор признателен всем соавторам этих статей, а также Т.С. Карягиной, А.С. Абросимову и Е.С. Бунину без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.5. Разработка подхода к сравнению эффективности доставки молекул в цитоплазму с помощью разных МНТ

4.5.1. Модель для бинарных взаимодействий

В предыдущем разделе в качестве доставляемой с помощью МНТ молекулы было выбрано монободи к Keap1, способное не только связываться с этим белком, но и вытеснять Nrf2 из комплекса с Keap1. Этот МНТ был выбран в качестве основы для оптимизации строения с целью увеличения эффективности доставки молекул в клетку. Для этого, прежде всего, необходимо было разработать подход для оценки эффективной концентрации доставляемой молекулы в цитоплазме. Под эффективной концентрацией подразумевается концентрация только тех молекул, которые способны в цитоплазме взаимодействовать с выбранным белком-мишенью. Для этого подхода, автором диссертации была предложена равновесная математическая модель, описывающая взаимодействия между доставляемой молекулой и белком-мишенью в случае бинарных и тройных систем.

Рассмотрим бинарную систему взаимодействий между доставляемой молекулой, M, и белком-мишенью, T. Принимаются во внимание концентрации только тех молекул, которые находятся в одном клеточном компартменте и способны взаимодействовать друг с другом. В модели были введены следующие обозначения: $[M_{tot}]$ – общая концентрация изучаемой молекулы в цитоплазме; $[T_{tot}]$ – общая концентрация белка-мишени в цитоплазме; [M] – концентрация свободных доставляемых молекул в цитоплазме; [T] – концентрация свободных молекул белка-мишени в цитоплазме; [M•T] – концентрация комплекса доставляемых молекул с белком-мишенью, M•T, в цитоплазме; K_d – равновесная константа диссоциации комплекса M•T.

Предполагая, что связывание происходит со стехиометрией 1:1, бинарное взаимодействие можно описать следующей схемой:

$$M + T \Leftrightarrow M \bullet T \qquad (4.5.1).$$

Равновесная константа диссоциации K_d:

$$K_d = \frac{[M]\cdot[T]}{[M \bullet T]} \qquad (4.5.2).$$

Из схемы (4.5.1) и условий материального баланса получили:

$$[M_{tot}] = [M] + [M \bullet T];$$

$$[T_{tot}] = [T] + [M \bullet T] \qquad (4.5.3).$$

Из выражения (4.5.2) и системы уравнений (4.5.3) получается:

$$[M_{tot}] = [M] + \frac{[M]\cdot[T]}{K_d};$$

$$[T_{tot}] = [T] + \frac{[M]\cdot[T]}{K_d} \qquad (4.5.4).$$

Решая систему (4.5.4) получили:

$$[M_{tot}] = \frac{T_{tot} - T}{T}\cdot(K_d + T) \qquad (4.5.5).$$

Обозначим в качестве F(T) отношение:

$$F(T) = \frac{[T]}{[T_{tot}]} \qquad (4.5.6).$$

Тогда выражение (4.5.5) можно переписать в виде:

$$[M_{tot}] = \frac{1 - F(T)}{F(T)}\cdot(K_d + F(T)\cdot[T_{tot}]) \qquad (4.5.7).$$

В клеточном лизате при достаточно большом разбавлении выполняется условие:

$$F(T)\cdot[T_{tot}] << K_d \text{ или } [T_{tot}] << K_d/F(T) \qquad (4.5.8).$$

При условии (4.5.8) выражение (4.5.7) приобретает вид

$$[M_{tot}] \approx \frac{1 - F(T)}{F(T)}\cdot K_d \qquad (4.5.9).$$

Точность оценки $[M_{tot}]$ по выражению (4.5.9) зависит от того, насколько хорошо выполняется условие (4.5.8). Так, если $[T_{tot}]$ в десять раз меньше, чем $K_d/F(T)$, то выражение (4.5.9) приводит к недооценке $[M_{tot}]$ на десять процентов.

4.5.2. Модель тройных конкурентных систем

Для оценки цитоплазматической концентрации изучаемой молекулы, M, способной конкурировать с некоторым белком, C, за связывание с белком-мишенью, T, была предложена следующая модель. Также как в работе Исо и др. (Iso et al., 2016) за объем цитоплазмы принимался объем клетки за вычетом объема ее ядра. В модели были введены следующие обозначения: $[C_{tot}]$ – общая концентрация C в цитоплазме; $[T_{tot}]$ – общая концентрация T в цитоплазме; $[M_{tot}]$ – общая концентрация M в цитоплазме; [T] – концентрация свободных молекул T в цитоплазме; [C] – концентрация свободных молекул C в цитоплазме; [M] – концентрация свободных молекул M в цитоплазме; [C•T] – концентрация комплекса C•T в цитоплазме; [M•T] – концентрация комплекса M•T в цитоплазме; K_{d1} – равновесная константа диссоциации комплекса C•T; K_{d2} – равновесная константа диссоциации комплекса M•T. В модели рассматриваются времена, когда система близка к состоянию равновесия.

Предполагая, что все белки взаимодействуют друг с другом со стехиометрией 1:1, конкурентное взаимодействием можно представить следующей схемой:

$$C + T \Leftrightarrow C \bullet T;$$

$$M + T \Leftrightarrow M \bullet T \qquad (4.5.10).$$

Для равновесных констант диссоциации верны следующие выражения:

$$K_{d1} = \frac{[C]\cdot[T]}{[C \bullet T]};\ K_{d2} = \frac{[M]\cdot[T]}{[M \bullet T]} \qquad (4.5.11).$$

Из схемы (4.5.10) и условий материального баланса получили:

$$[C_{tot}] = [C] + [C \bullet T];$$

$$[M_{tot}] = [M] + [M \bullet T];$$

$$[T_{tot}] = [T] + [C \bullet T] + [M \bullet T] \qquad (4.5.12).$$

Подставляя выражения (4.5.11) в систему (4.5.12) было получено:

$$[C_{tot}] = [C] + \frac{[C]\cdot[T]}{K_{d1}};$$

$$[M_{tot}] = [M] + \frac{[M]\cdot[T]}{K_{d2}};$$

$$[T_{tot}] = [T] + \frac{[C]\cdot[T]}{K_{d1}} + \frac{[M]\cdot[T]}{K_{d2}} \qquad (4.5.13).$$

Решая систему (4.5.13) получили:

$$[M_{tot}] = \left(\frac{[T_{tot}]}{\frac{[C_{tot}]}{[C]} - 1} - K_{d1} - [C] \right) \cdot \frac{K_{d1} \cdot \left(\frac{[C_{tot}]}{[C]} - 1 \right) + K_{d2}}{K_{d1}} \qquad (4.5.14).$$

В случае, когда $[M_{tot}] = 0$, выражение (4.5.14) превращается в выражение:

$$\frac{[T_{tot}]}{\frac{[C_{tot}]}{[C]} - 1} = K_{d1} + [C] \qquad (4.5.15).$$

Если обозначить

$$F(C) = [C]/[C_{tot}] \qquad (4.5.16)$$

то

$$[T_{tot}] = \frac{1 - F(C)}{F(C)} \cdot \left(K_{d1} + F(C) \cdot [C_{tot}]\right) \qquad (4.5.17).$$

Видно, что выражение (4.5.17) аналогично выражению (4.5.7) только с другим обозначением параметров.

4.5.3. Модель для Nrf2 системы

Модель, описанную в разделе 4.5.2., была использована для изучения взаимодействия молекулы M с комплексом Keap1•Nrf2. В этом случае, белок T будет белком Keap1, а белок C – белком Nrf2. В модели также предполагается, что система близка к равновесию и не принимается во внимание ни скорость изменения концентрации молекул, способных взаимодействовать с Keap1, ни последующий транспорт Nrf2 в ядро, приводящий к дополнительной экспрессии Nrf2 (Bryan et al., 2013). Предположение о стехиометрии взаимодействия 1:1 тоже подходит для Nrf2 системы, т.к. хотя у Keap1 есть два сайта связывания с Nrf2, но они очень сильно отличаются по сродству (равновесные константы диссоциации равны 5 нМ и 1 мкМ (Fukutomi et al., 2014)). Поэтому при изучении взаимодействия учитывался только сайт с наибольшим сродством к Nrf2. С новыми обозначениями выражение (4.5.14) приобретает вид:

$$[M_{tot}] = \left(\frac{[Keap1_{tot}]}{\frac{[Nrf2_{tot}]}{[Nrf2]} - 1} - K_{d1} - [Nrf2] \right) \cdot \frac{K_{d1} \cdot \left(\frac{[Nrf2_{tot}]}{[Nrf2]} - 1 \right) + K_{d2}}{K_{d1}} \qquad (4.5.18).$$

Выражение (4.5.15) будет иметь вид:

$$\frac{[Keap1_{tot}]}{\frac{[Nrf2_{tot}]}{[Nrf2]} - 1} = K_{d1} + [Nrf2] \qquad (4.5.19).$$

Если обозначить

$$F(Nrf2) = [Nrf2]/[Nrf2_{tot}] \qquad (4.5.20)$$

то выражение (4.5.19) превращается в

$$\frac{[Keap1_{tot}]}{\frac{1}{F(Nrf2)} - 1} = K_{d1} + F(Nrf2) \cdot [Nrf2_{tot}] \qquad (4.5.21).$$

Уравнение (4.5.21) можно переписать в виде:

$$[Nrf2_{tot}] = \frac{[Keap1_{tot}]}{1 - F(Nrf2)} - \frac{K_{d1}}{F(Nrf2)} \qquad (4.5.22),$$

или в виде:

$$[Keap1_{tot}] = (1 - F(Nrf2)) \cdot \left([Nrf2_{tot}] + \frac{K_{d1}}{F(Nrf2)} \right) \qquad (4.5.23).$$

В случае клеточного лизата при достаточно больших разведениях выполняется условие

$$[Nrf2_{tot}] << K_{d1}/F \qquad (4.5.24).$$

При этом условии зависимость (4.5.23) превращается в

$$[\mathrm{Keap1_{tot}}] \approx \mathrm{K_{d1}} \cdot \frac{1-\mathrm{F(Nrf2)}}{\mathrm{F(Nrf2)}} \qquad (4.5.25).$$

Видно, что выражение (4.5.25) аналогично выражению (4.5.9) только с другим обозначением параметров.

Согласно выражению (4.5.9) если обозначить

$$\mathrm{F(Keap1)} = [\mathrm{Keap1}]/[\mathrm{Keap1_{tot}}] \qquad (4.5.26),$$

то можно получить

$$[\mathrm{Nrf2_{tot}}] \approx \mathrm{K_{d1}} \cdot \frac{1-\mathrm{F(Keap1)}}{\mathrm{F(Keap1)}} \qquad (4.5.27).$$

Следует иметь в виду, что если в клетку попадает молекула, способная вытеснять Nrf2 из комплекса с Keap1, то общая концентрация Nrf2 в клетке будет изменяться, что обычно учитывалось в ранее предложенных моделях поведения Nrf2-системы (Liu et al., 2021; Liu et al., 2022a). Для учета этого в настоящей модели были введены следующие дополнительные обозначения: $[\mathrm{Nrf2_{tot0}}]$ – общая концентрация Nrf2 в цитоплазме без добавления молекул, способных взаимодействовать с Keap1; k_1 – константа скорости деградации Nrf2, когда он находится в комплексе с Keap1; k_2 – константа скорости деградации свободного Nrf2. В нормальных условиях практически весь Nrf2 находится в комплексе с Keap1, поэтому до добавления молекул, способных взаимодействовать с Keap1, скорости синтеза и деградации молекул Nrf2 $k_1 \cdot [\mathrm{Nrf2_{tot0}}]$. После добавления этих молекул скорость деградации молекул Nrf2 изменяется и становится равной $k_1 \cdot [\mathrm{Nrf2 \bullet Keap1}] + k_2 \cdot [\mathrm{Nrf2}]$. При достижении равновесия скорости синтеза и деградации становятся равными, поэтому

$$k_1 \cdot [\mathrm{Nrf2 \bullet Keap1}] + k_2 \cdot [\mathrm{Nrf2}] = k_1 \cdot [\mathrm{Nrf2_{tot0}}] \qquad (4.5.28).$$

Принимая во внимание то, что $[\mathrm{Nrf2_{tot}}] = [\mathrm{Nrf2 \bullet Keap1}] + [\mathrm{Nrf2}]$, из уравнения (4.5.28) получили:

$$\frac{[\mathrm{Nrf2_{tot}}]}{[\mathrm{Nrf2_{tot0}}]} = \frac{1}{1-\mathrm{F(Nrf2)} \cdot \left(1-\frac{k_2}{k_1}\right)} \qquad (4.5.29).$$

Подставляя выражение (4.5.29) в выражение (4.5.18) получили

$$[\mathrm{M_{tot}}] = \left(\frac{\mathrm{F(Nrf2)}}{1-\mathrm{F(Nrf2)}} \cdot [\mathrm{Keap1_{tot}}] - \mathrm{K_{d1}} - \frac{\mathrm{F(Nrf2)} \cdot [\mathrm{Nrf2_{tot0}}]}{1-\mathrm{F(Nrf2)} \cdot \left(1-\frac{k_2}{k_1}\right)} \right) \cdot \frac{\mathrm{K_{d1}} \cdot \frac{1-\mathrm{F(Nrf2)}}{\mathrm{F(Nrf2)}} + \mathrm{K_{d2}}}{\mathrm{K_{d1}}} \qquad (4.5.30).$$

4.5.4. Оценка концентраций Nrf2 и Keap1 предложенным подходом

Для оценки эффективной цитоплазматической концентрации биоактивной молекулы автором диссертации была предложена следующая схема действий (Рис. 4.5.1). С помощью проточной цитофлуориметрии определяется концентрация изучаемых клеток. Для этих клеток с помощью микроскопии измеряются их объемы и объемы их ядер, так, как это описано в «Материалах и методах». За объем цитоплазмы принимается разница между объемом клетки и его ядра. Зная концентрацию клеток и объем их цитоплазмы можно рассчитать коэффициент разбавления изучаемых молекул при лизисе клеток.

Рисунок 4.5.1. Схема подхода по оценке эффективной цитозольной концентрации молекулы, способной взаимодействовать с внутриклеточным белком-мишенью.

Предложенный подход был применен для оценки концентраций Nrf2 и Keap1. Прежде всего, необходимо было верифицировать предложенную математическую модель взаимодействий. Для проверки допущений, касающихся стехиометрии взаимодействия и значения равновесной константы диссоциации комплекса Nrf2 с Keap1, K_{d1}, и лежащих в основе выражения (4.5.14) были использованы литературные данные о разрушении комплекса Nrf2 с Keap1 с помощью некоторых пептидов (Abed et al., 2015). Для этих пептидов известны концентрации полумаксимального действия, IC_{50}, и равновесные

константы диссоциации их комплексов с Keap1, K_{d2} (Табл. 4.5.1). Принимая в выражении (4.5.14), что $[Keap1_{tot}]$ = 100 нМ (Inoyama et al., 2012) и K_{d1} = 5 нМ (Fukutomi et al., 2014), а также считая, что при IC_{50} $[Nrf2]/[Nrf2_{tot}]$ = 0,5 и [Nrf2] = 50 нМ, можно рассчитать теоретические значения константы K_{d2} (Табл. 4.5.1). Для большинства используемых пептидов видно хорошее соответствие экспериментальных данных с теоретическими (Табл. 4.5.1), что подтверждает предположения, лежащие в основе выражения (4.5.14).

Таблица 4.5.1. Ингибирование взаимодействия Nrf2 с Keap1 с помощью Nrf2 пептидов.

Последовательность пептида	IC_{50}, нМ [а]	K_{d2}, нМ Эксперимент [а]	K_{d2}, нМ Расчет [б]
H-LDEETGEFL-OH	3480 ± 920	352	382 ± 102
H-LDEETGEFL-NH_2	3570 ± 2200	355	392 ± 245
Ac-LDEETGEFL-OH	194 ± 49	21,1	16,6 ± 5,5
Ac-LDEETGEFL-NH_2	196 ± 32	21,4	16,8 ± 3,6
H-QLDEETGEFL-OH	272 ± 26	27,3	25,2 ± 2,9
H-LQLDEETGEFL-OH	298 ± 33	31,3	28,1 ± 3,7
H-QLQLDEETGEFL-OH	249 ± 22	23,8	22,7 ± 2,4
H-FAQLQLDEETGEFL-OH	243 ± 20	22,5	22,0 ± 2,2
H-AFFAQLQLDEETGEFL-OH	163 ± 11	23,9	13,1 ± 1,2

[а] (Abed et al., 2015); [б] рассчитано по выражению (4.5.18). Указаны стандартные ошибки величин.

Для количественного описания выбранной клеточной линии был использован описанный выше метод CETSA. Получение кривых плавления по данным иммуноблоттинга описано в «Материалах и методах». Также как описано выше (Рис. 4.4.9), были определены кривые плавления для Nrf2 в комплексе с Keap1 и свободного Nrf2 (Рис. 4.5.2а). В норме, для большинства клеточных линий Nrf2 находится в комплексе с Keap1 и кривые плавления для разных клеточных линий совпадают (усредненная кривая для линий Hepa1, MEF и RAW264.7, а также кривая для линии AML12 представлена на Рис. 4.5.2а). Однако в некоторых клеточных линиях Nrf2 система может быть изначально активирована. Судя по кривой плавления Nrf2, заметно отличающейся от кривой для комплекса Nrf2 с Keap1, это можно предположить для клеточной линии 3LL (Рис. 4.5.2а). В данном случае кривая плавления существенно сдвинута по направлению к кривой плавления свободного Nrf2 (Рис. 4.5.2а).

В предложенном подходе использовались кривые плавления Nrf2 для определения доли свободного Nrf2 в клетках или лизате клеток, F(Nrf2) (выражение (4.5.20)). Для этого при фиксированной температуре, T_i, определялась разность ординат

кривых, отвечающих изучаемому образцу, и Nrf2 в комплексе с Keap1, $\Delta_i(T_i)$ (Рис. 4.5.2а). При этой же температуре определялась разность ординат кривых, отвечающих свободному Nrf2 и Nrf2 в комплексе с Keap1, $\Delta_{max}(T_i)$ (Рис. 4.5.2а). Доля свободного Nrf2 при выбранной температуре T_i, $F(T_i)$, будет равна $F(T_i) = \Delta_i(T_i)/ \Delta_{max}(T_i)$. Для определения F(Nrf2) при физиологических температурах была проведена линейная экстраполяция зависимости $F = F(T_i)$ до температуры 37 °C (Рис. 4.5.2б). Для этой экстраполяции использовалась часть кривой, лежащей выше 42 °C.

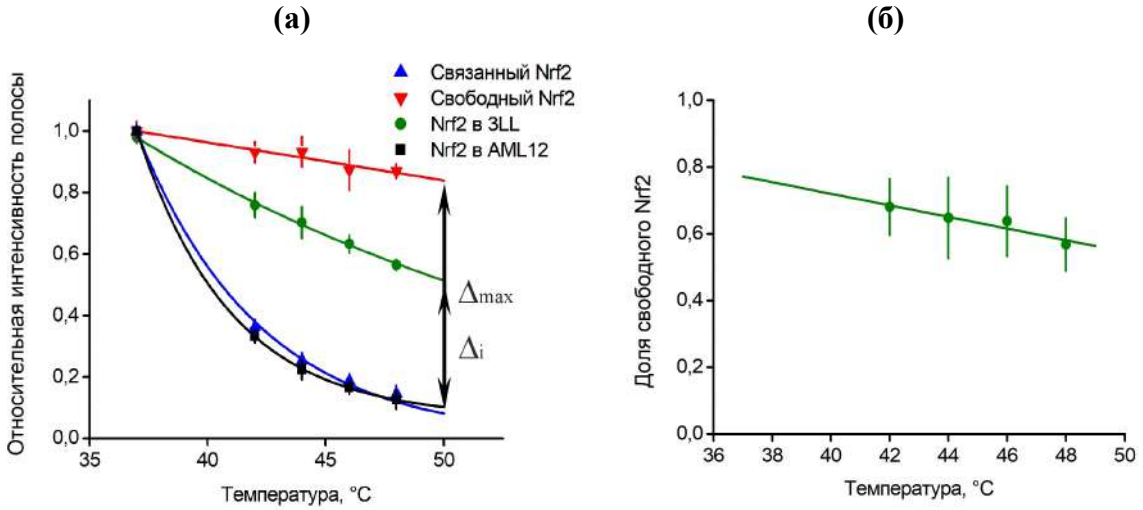


Рисунок 4.5.2. (а) Кривые плавления свободного и связанного Nrf2, усредненные для линий клеток Hepa1, MEF и RAW264.7, а также общего Nrf2 в клетках 3LL и AML12. Зависимости нормированы на интенсивность полосы иммуноблоттинга при 37°C**; (б) Зависимость между долей свободного Nrf2 (Δ_i/Δ_{max}) в клетках 3LL и температурой.** Зеленой линией показана экстраполяция экспериментальных данных до температуры 37°C. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 4–12).

Ранее Исо и др. оценили число молекул Nrf2 и Keap1 на клетку в нескольких линиях клеток (Iso et al., 2016). Чтобы определить их концентрацию, мы определили объемы клеток и их ядер (Табл. 4.5.2). Согласно литературным данным, Nrf2 приблизительно равномерно распределен в ядре и цитоплазме, а Keap1, напротив, в основном находится в цитоплазме (Iso et al., 2016). Поэтому средняя концентрация Nrf2 в клетке получалась делением его количества на объем клетки, а средняя концентрация Keap1 – делением его количества на объем цитоплазмы (Табл. 4.5.2).

Концентрация Keap1 была определена не только на основании литературных данных, но и с помощью предложенного автором подхода. Для этого определялся параметр F(Nrf2) в лизате выбранной линии клеток, а затем, по выражению (4.5.25) оценивалась концентрация Keap1 в этом лизате. В свою очередь, зная коэффициент разбавления молекул при лизисе, из этой концентрации рассчитывалась концентрация Keap1 в цитоплазме (Табл. 4.5.2, правая колонка). Видно, что полученные с помощью предложенного подхода концентрации Keap1 хорошо согласуются с концентрациями,

рассчитанными на основании литературных данных (Табл. 4.5.2, ср. правую колонку и третью колонку справа). Это подтверждает применимость предложенного автором подхода для оценки эффективной внутриклеточной концентрации выбранной молекулы. Следует отметить, что за исключением линии клеток 3LL, где предполагалась изначальная активация Nrf2-системы, концентрации Keap1 в клетках разного типа были близки и в среднем составляли 269 ± 4 нМ.

Таблица 4.5.2. Общие концентрации Nrf2 и Keap1 в клетках, полученные как предложенным подходом, так и с использованием литературных данных. Указаны определенные объемы клеток и их ядер. В последних двух колонках указаны средние ± стандартная ошибка (n = 4–6).

Линия клеток	Объем клетки, мкм^3	Объем ядра, мкм^3	[Nrf2$_{tot}$]*, нМ	[Keap1$_{tot}$]*, нМ	[Nrf2$_{tot}$], Подход, нМ	[Keap1$_{tot}$], Подход, нМ
RAW264.7	1360 ± 70	222 ± 18	56 ± 4	256 ± 85	52 ± 16	276 ± 26
Hepa-1	1600 ± 50	410 ± 20	78 ± 4	276 ± 48	77 ± 17	259 ± 44
3LL	1410 ± 40	174 ± 10	227 ± 17	67 ± 22	259 ± 95[a] 220 ± 21	69 ± 15
MEF	2270 ± 100	400 ± 20	61 ± 3	260 ± 119	59 ± 14	265 ± 38
AML12	1400 ± 40	200 ± 10	-	-	59 ± 16	274 ± 22

* Получено на основе данных о количествах Nrf2 и Keap1 на клетку из статьи (Iso et al., 2016). [a] Получено с помощью CETSA с антителами на Nrf2 и выражения (4.5.22).

Для клеток 3LL с помощью предложенного автором подхода была определена доля свободных молекул Nrf2, а далее по выражению (4.5.22) и уже определенной концентрации Keap1 была оценена средняя концентрация общего Nrf2 в цитоплазме. В пределах ошибок эксперимента эта концентрация совпадала с концентрацией Nrf2, рассчитанной на основании литературных данных о количествах Nrf2 в клетках 3LL (Табл. 4.5.2). Выражение (4.5.22) можно было применить только для клеток 3LL, т.к. в клетках других линий практически весь Nrf2 находится в комплексе с Keap1 и параметр F(Nrf2) близок к нулю.

Среднюю концентрацию общего Nrf2 можно оценить по выражению (4.5.27), если определить в лизате клеток F(Keap1) (выражение (4.5.26)) с помощью иммуноблоттинга с антителами на Keap1. Для этого необходимо знать кривые плавления свободного и связанного Keap1. Усредненная кривая плавления для связанного Keap1 была получена на интактных клетках линий Hepa1, MEF и RAW264.7 (Рис. 4.5.3а). Однако кривую плавления свободного Keap1 нельзя так просто получить, как для Nrf2, т.к. существует множество эндогенных конкурентов за связывание с Keap1 (Hayes and Dinkova-Kostova, 2017; Silva-Islas and Maldonado, 2018). Добавление избытка белка, способного

взаимодействовать с Keap1, к клеточному лизату приведило бы к получению кривой плавления комплекса Keap1 с этим белком, а не кривой плавления свободного Keap1. Однако на основании полученных данных, была проведена реконструкция кривой плавления свободного Keap1. Для этого, зная концентрацию Nrf2 в клетках 3LL (Табл. 4.5.2) и коэффициент разбавления при лизисе по выражению (4.5.27) было определено F(Keap1) в клеточном лизате (три независимых эксперимента). Затем, предполажили, что F(Keap1) линейно зависимосит от температуры, а также то, что при 42 °C свободный Keap1 еще не денатурирует. Последнее предположение было сделано на основании литературных данных о том, что комплекс Keap1 с низкомолекулярным ингибитором не плавился при температуре 42 °C (Dayalan et al., 2022). Эти предположения позволили оценить значения F(Keap1) при различных температурах в диапазоне 42–48 °C для каждого образца лизата. Затем, используя кривые плавления Keap1 в клеточном лизате для линии 3LL и интактных клеток других линий, была проведена реконструкция кривой плавления свободного Keap1. Такая кривая, усредненная по нескольким повторам, представлена на Рис. 4.5.3а (красная кривая).

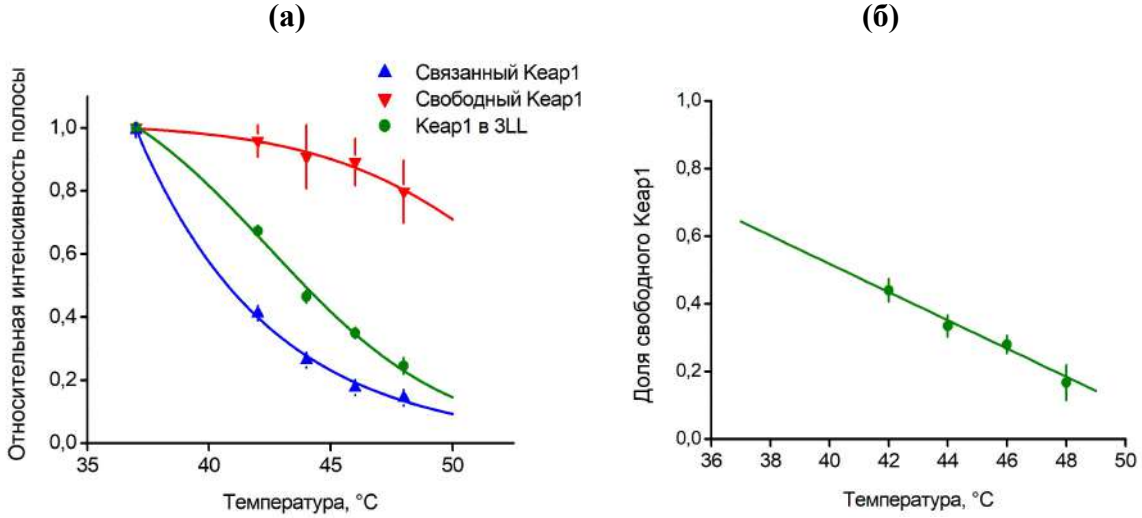


Рисунок 4.5.3. (а) Кривые плавления свободного (реконструированная кривая) и связанного Keap1, усредненные для линий клеток Hepa1, MEF и RAW264.7, а также общего Keap1 в клетках 3LL. Зависимости нормированы на интенсивность полосы иммуноблоттинга при 37 °C**; (б) Зависимость между долей свободного Keap1 в лизате клеток 3LL и температурой.** Зеленой линией показана экстраполяция экспериментальных данных до температуры 37 °C. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 4–12).

Используя кривые плавления свободного и связанного Keap1, можно для лизата любой клеточной линии определить F(Keap1, T_i) = $\Delta_i(T_i)/\Delta_{max}(T_i)$ при различных температурах (например, зеленая кривая на Рис. 4.5.3а) и провести ее линейную экстраполяцию до температуры 37 °C (Рис. 4.5.3б). Используя полученные параметры F(Keap1) для лизата клеток различного типа, а также определенные коэффициенты

разбавления при лизисе, были оценены средние концентрации общего Nrf2 в клетке (Табл. 4.5.2, второй столбец справа). Видно, что полученные концентрации хорошо совпадают с концентрациями Nrf2, рассчитанными на основании литературных данных (Табл. 4.5.2, ср. четвертый и второй столбец справа). Это указывает на то, что реконструкция кривой плавления свободного Keap1 была осуществлена правильно. Кроме того, это позволило оценить концентрацию Nrf2 в любой случайно выбранной линии клеток. В качестве примера это было сделано для клеток линии AML12 (Табл. 4.5.2). За исключением клеточной линии 3LL во всех остальных четырех изученных линиях клеток практически весь Nrf2 находился в комплексе с Keap1, и средняя концентрация общего Nrf2 была практически одной и той же, равной в среднем 62 ± 5 нМ (Табл. 4.5.2).

Таким образом, предложенный автором диссертационной работы подход позволил оценить концентрации Nrf2 и Keap1 в нескольких линиях клеток. 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. Иными словами, наблюдаемые в литературе отличия количеств Nrf2 или Keap1 для клеток разных типов, скорее всего, связаны с разными размерами клеток. В дальнейшем предложенный нами подход и определенные средние концентрации Nrf2 и Keap1 использовались для оценки эффективной концентрации монободи к Keap1 в цитоплазме.

4.5.5. Оценка концентрации МНТ предложенным подходом

Предложенный автором диссертационной работы подход был применен им для оценки концентрации $МНТ_м$ в клетках AML12. Прежде всего, по кривым плавления Nrf2 (Рис. 4.4.9) была определена доля свободного Nrf2 при заданных температурах и различных временах инкубации клеток с $МНТ_м$, $F(T_i) = \Delta_i(T_i)/ \Delta_{max}(T_i)$ (определение доли см. Рис. 4.5.2а). Было установлено, что в диапазоне температур 40-44 °C эта доля не зависит от температуры. Например, при 15 минут инкубации $МНТ_м$ с клетками AML12, эта доля составляла 0,45 ± 0,04, 0,45 ± 0,05 и 0,43 ± 0,03 при температурах 40, 42 и 44 °C, соответственно. Поэтому можно предположить, что при физиологических температурах, т.е. при 37 °C, доля F будет точно такая же, как при этих температурах. Поэтому для повышения точности оценки доли F(37 °C), она определялась как среднее значение соответствующих долей $F(T_i)$ в интервале температур 40–44 °C. Зависимость F(37 °C) от времени инкубации клеток AML12 с $МНТ_м$ представлена на Рис. 4.5.4. Используя эту зависимость можно оценить по выражению (4.5.30) концентрацию $МНТ_м$ при этих временах инкубации. Однако для этого в выражении (4.5.30) необходимо еще знать

отношение скоростей деградации свободного Nrf2 и Nrf2 в комплексе с Keap1, k_2/k_1. В клетке Nrf2 постоянно нарабатывается и деградирует, причем в нормальных условиях этот белок находится в комплексе с белком Keap1, что сильно увеличивает скорость его деградации. Иными словами, константа k_1 значительно больше, чем k_2. Поэтому высвобождение Nrf2 из комплекса с Keap1 будет приводить к уменьшению скорости деградации Nrf2, а значит к увеличению его общей концентрации в клетке. Относительные количества Nrf2 в ядре, цитоплазме и всей клетке были определены совместно с Т.А. Сластниковой и А.А. Розенкранцем с помощью иммунофлуоресценции с антителами на Nrf2 так, как это описано в «Материалах и методах» (Рис. 4.4.10). По этим зависимостям было определено отношение количеств Nrf2 при инкубации клеток с $МНТ_м$ или $МНТ_к$. Оно описывает способность монободи в составе $МНТ_м$ высвобождать Nrf2 из комплекса с Keap1. При 15 минутах инкубации клеток AML12 с $МНТ_м$ это отношение было равно 1,75 ± 0,33. А, используя выражение (4.5.29), в котором считалось, что F(37 °C) = 0,44 и $k_2/k_1 \approx 0$, было получено пракически тоже значение данного отношения (1,79). Поэтому для дальнейших оценок автор пренебрег величиной отношения k_2/k_1 и считал его равным нулю.

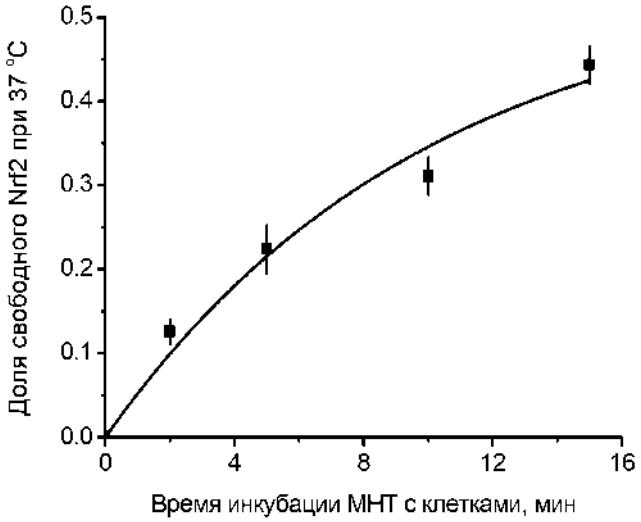


Рисунок 4.5.4. Зависимость доли свободного Nrf2 при 37 °C от времени инкубации 500 нМ $МНТ_м$ с клетками AML12. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 8-19).

В выражении (4.5.30) равновесная константа диссоциации комплекса Nrf2 с Keap1, K_{d1}, была принята равной 5 нМ (Fukutomi et al., 2014), а K_{d2} = 5,4 ± 0,5 нМ (определена нами выше). Используя эти параметры и зависимость F(Nrf2) от времени инкубации с $МНТ_м$ (Рис. 4.5.4), были рассчитаны концентрации $МНТ_м$ в клетке при различных временах инкубации клеток с этим МНТ. Для 5, 10 и 15 минут инкубации с $МНТ_м$ они оказались равны 249 ± 14, 291 ± 12 и 373 ± 17 нМ, соответственно. Для

верификации предложенного подхода оценку концентрации $МНТ_м$ в цитоплазме автор проводил еще по данным иммуноблоттинга с антителами на МНТ. Для этого определял концентрацию $МНТ_м$ в лизате клеток с помощью построения калибровочных зависимостей с известными концентрациями $МНТ_м$. А потом, зная размеры клеток и их ядер, а также концентрацию клеток, оценивал концентрации $МНТ_м$ в изучаемых клетках AML12. Эти концентрации оказались равны 264 ± 30, 286 ± 21 и 420 ± 47 нМ для времен инкубации 5, 10 и 15 минут, соответственно. Видно совпадение в пределах ошибки эксперимента концентраций, полученными двумя различными подходами (по критерию Манна-Уитни достоверных отличий не наблюдалось), в одном из которых использовались антитела на Nrf2, а в другом – на МНТ. Это указывает на применимость предложенного автором подхода. Отметим, что в отличие от существующих методов, этот подход позволяет оценить эффективную концентрацию доставляемой молекулы, например, монободи к Keap1, вне зависимости от того, находится ли она в составе МНТ или нет. Причем оценивается концентрация этой молекулы уже в цитозоле, т.е. после выхода ее из эндосом.

Основные результаты, изложенные в п. 4.5, были опубликованы в статьях автора с соавторами: 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. - V. 15. - 324 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии и CETSA, так и в предложенном подходе по оценке концентрации на основании данных CETSA, общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста); 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. - V. 16. - 1345 (вклад автора состоит как в проведении существенной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии FLIM-FRET, CETSA и проточной цитофлуориметри, так и в оценке концентрации МНТ на основании данных CETSA, участии в планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и в написании части текста). Автор признателен всем соавторам этой статьи, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.6. Оптимизация строения МНТ путем отщепления доставляемой молекулы в закисляемых компартментах

Предложенный автором подход по оценке внутриклеточной концентрации молекул позволяет сравнивать изменение эффективности доставки с помощью МНТ молекул в цитозоль при проведении процесса оптимизации строения МНТ. Оптимизацию нужно проводить таким образом, чтобы, с одной стороны, сохранить положительные взаимодействия между модулями МНТ, такие как влияние НМР на мембранолитические свойства ДТокс, а с другой стороны, снизить их взаимные стерические взаимодействия. Для этого автором настоящей работы была предложена идея отщепления доставляемой молекулы, например, монободи к Keap1, кислыми протеазами, находящимися в эндосомах. Причем сайт отщепления предполагалось расположить таким образом, чтобы лигандный модуль, ДТокс и НМР отщеплялись слитыми вместе. При этом должна сохраниться мембранолитическая активность МНТ, а эффективность выхода доставляемых молекул из эндосом может увеличиться за счет уменьшения их потерь из-за связывания части молекул МНТ с мембраной эндосом. Отщепленные доставляемые молекулы, выходя из эндосом, будут взаимодействовать с выбранным цитозольным белком-мишенью с большим сродством, чем когда эти молекулы находятся в составе МНТ.

Для реализации предложенной идеи, прежде всего, автор осуществил выбор подходящей эндосомной протеазы. Известно, что большинство эндосомных протеаз присутствуют также и в лизосомах, где они, как правило, обладают значительно большей активностью, чем в эндосомах (Chapman, 2006). Следует также учесть, что зачастую эндосомные протеазы секретируются во внеклеточное пространство, где они тоже могут проявлять функциональную активность. Если отщепление доставляемых молекул будет начинаться во внеклеточном пространстве, то это может привести к нежелательному снижению числа этих молекул, поступающих в клетку. Иными словами, желательно, чтобы выбранная протеаза не только была активна при значениях pH, характерных для эндосом (5,5–6), но и имела минимальную активность вне клетки (pH 7,0–7,5). Примером подходящей под указанные критерии протеазы является катепсин B, который зачастую используют вирусы для активации вирусных поверхностных белков с целью выхода вирусов из эндосом (Bottcher-Friebertshauser et al., 2013). Данная протеза очень активно применялась вплоть до клинических исследований в различных системах доставки лекарств и для активации различных предшественников лекарств (Dheer et al., 2019). Следует отметить, что активность и специфичность катепсина B во многом определяется

pH среды. Так, при нейтральных pH (7,0–7,5) эта активность минимальна, в то время как в лизосомах (pH 5,0) она достигает максимума, однако, при этом протеаза обладает низкой специфичностью. При pH 6 (эндосомы) не только заметно увеличивается специфичность этой протеазы, но и наблюдается существенное ее отличие от специфичностей при pH 5 и pH 7. Известно, например, что эта протеаза расщепляла белок по сайту EGEF при pH 6,0, в то время как при pH 5,0 и 7,0 расщепления по этому сайту не наблюдалось (Jordans et al., 2009). Следует отметить, что при лечении раковых заболеваний отщепление доставляемых молекул от МНТ в эндосомах с помощью катепсина B будет особенно эффективным, т.к. в опухолевых клетках наблюдается сверхэкспрессия этой протеазы (Aggarwal and Sloane, 2014).

После выбора протеазы – катепсина B, автор диссертационной работы выбрал наилучшие варианты сайта расщепления этой протеазой. В литературе существует множество различных сайтов расщепления катепсином B, один из которых это упомянутый выше сайт EGEF (Jordans et al., 2009). Кроме того, при pH 6,0 и 7,5 был проведен сравнительный анализ эффективности расщепления аминокислотных последовательностей разного состава несколькими катепсинами, в том числе катепсином B (Biniossek et al., 2011). После трех часов инкубации с протеазой одним из самых оптимальных сайтов расщепления как катепсином B, так и катепсином L являлся сайт AVGGAG (Biniossek et al., 2011). Учитывая, что специфичности катепсина B и катепсина L очень близки (Biniossek et al., 2011), для сравнения эффективности расщепления различных сайтов был также выбран сайт HRFR, который может быстро расщепляться катепсином L (Poreba et al., 2018). Для активации пролекарств, а также в различных системах доставки лекарств в качестве сайта расщепления катепсином B использовали сайт GFLG (Dheer et al., 2019; Jin et al., 2020). Причем, в ряде случаев показана довольно быстрая кинетика расщепления данного сайта. Другим примером сайта расщепления катепсином B, используемого в системах доставки лекарств, является FRRG. Примером этому являются наночастицы, конъюгированные через этот сайт с доксорубицином (Shim et al., 2019). Расщепление этих наночастиц размером около 200 нм катепсином B, который в опухолях вырабатывается лучше, чем в окружающих тканях, приводило к высвобождению доксорубицина и цитотоксическому эффекту (Shim et al., 2019). Интересной системой доставки, несколько похожей по принципу действия на используемый МНТ, является система, состоящая из полимерного pH чувствительного мембранолитического блока – N,N-диэтиламиноэтилметакрилата (DEAEMA), и полимеров бутил метакрилата (BMA) и полиэтиленгликоля метакрилата (PEGMA) для увеличения времени жизни в крови (Kern et al., 2017). В этой системе к PEGMA через сайт

FKFL, расщепляемый катепсином B, присоединен проапоптотический BIM пептид (Kern et al., 2017). Было показано, что размер полимерных мицелл при уменьшении pH с 7,4 до 6,6 уменьшался с 25 до 6 нм, при этом существенно возрастала мембранолитическая активность этих мицелл (с <1 % лизиса до 95%) (Kern et al., 2017). Важно, что скорость расщепления сайта FKFL катепсином B была довольно высокой. Так, за 30–40 минут расщеплялась половина всех полимерных мицелл (Kern et al., 2017). Известно, что катепсин B потенциально способен расщеплять связь G-G (Biniossek et al., 2011). А в состав используемых МНТ между модулями часто входят линкерные последовательности полиглицин и полиглицин-серин. Поэтому необходимо было установить эффективность расщепления сайтов GGGG и GSGS катепсином B. Таким образом, для последующего сравнения эффективности расщепления катепсином B автором диссертационной работы были выбраны следующие сайты: FKFL, GFLG, FRRG, HRFR, EGEF, AVGGAG, GGGG и GSGS.

Для сравнения кинетики расщепления выбранных пептидных последовательностей, они были мечены с обоих концов флуоресцентными красителями sulfo-Cyanine3 и sulfo-Cyanine5, между которыми может происходить резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET). Для мечения на C-конце к этим пептидам был добавлен цистеиновый остаток. Мечение пептидов, получение кинетик расщепления и определение констант скоростей расщепления, k, проводилось, как описано в «Материалах и метода». Кинетики расщепления пептидов FKFLC, FRRGC, GFLGC, GSGSC, HRFRC, GGGGC, EGEFC и AVGGAGC катепсином B при pH 6,0 и 7,5 (отвечают pH эндосом и внеклеточного пространства (Biniossek et al., 2011)), полученные по убыванию сигнала FRET, представлены на Рис. 4.6.1. При pH 6,0 расщепления пептидов GGGGC, EGEFC и AVGGAGC в данном временном интервале не наблюдалось (Рис. 4.6.1а). А для пептидов FKFLC, FRRGC, GFLGC, GSGSC и HRFRC константы скорости расщепления k составили 0,057 ± 0,004 мин$^{-1}$, 0,0173 ± 0,0016 мин$^{-1}$, 0,00198 ± 0,00012 мин$^{-1}$, 0,00081 ± 0,00011 мин$^{-1}$ и 0,00073 ± 0,00005 мин$^{-1}$, соответственно. При pH 7,5 для всех изучаемых пептидов доля расщепленного пептида была в несколько раз меньше, чем при pH 6,0 (ср. Рис. 4.6.1б и 4.6.1а). Причем при pH 7,5 для пептидов FKFLC, FRRGC и HRFRC k составили 0,0068 ± 0,0007 мин$^{-1}$, 0,0031 ± 0,0004 мин$^{-1}$ и 0,00026 ± 0,00013 мин$^{-1}$, соответственно. Для остальных пептидов при этом pH расщепления не наблюдалось (Рис. 4.6.1б). Таким образом, при pH, характерных для эндосом, лучше всего расщеплялись катепсином B пептиды FKFLC и FRRGC. Для этих пептидов на Рис. 4.6.2 представлены зависимости константы скорости расщепления k от pH буфера. По этим зависимостям видно, что эффективность расщепления данных пептидов возрастает по мере уменьшения

pH буфера. Иными словами, данные сайты будут эффективнее расщепляться в поздних эндосомах (pH 5,5), чем в ранних эндосомах (pH 6,0).

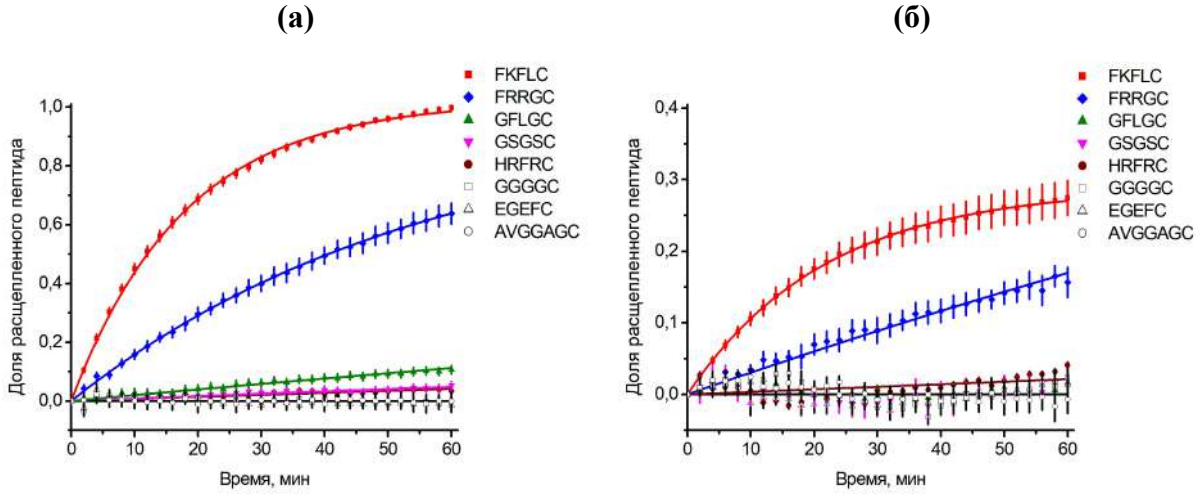


Рисунок 4.6.1. Кинетика расщепления различных пептидов (20 мкМ) активированным катепсином B (1 мкг/мл) при pH 6,0 (а) и 7,5 (б). Указаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 3–9).

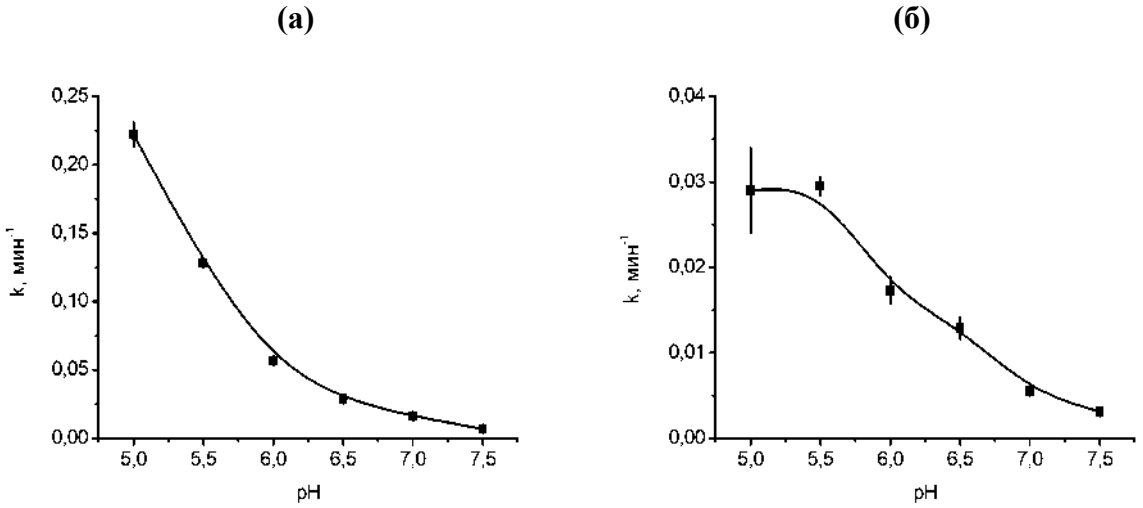


Рисунок 4.6.2. Зависимость константы скорости расщепления, k, пептида (20 мкМ) FKFLC (а) и FRRGC (б) активированным катепсином B (1 мкг/мл) от pH буфера. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 3–9).

Таким образом, из восьми изученных потенциальных сайтов расщепления катепсином B наиболее перспективными для расщепления в эндосомах являются сайты FKFL и FRRG. Эффективность их расщепления возрастает по мере уменьшения pH с 7,5 до 5. Наиболее перспективным по скорости отщепления при pH эндосом является сайт FKFL. Его можно использовать как в опухолевых, так и в нормальных клетках. В опухолевых клетках перспективным также может быть сайт FRRG. Это связано со сверхэкспрессией катепсина B в этих клетках (Aggarwal and Sloane, 2014), а также тем фактом, что в опухолях часто происходит закисление внеклеточной среды плоть до pH 6,8 (Zhang et al., 2010). В этих условиях отщепление доставляемой молекулы от МНТ может

происходить раньше времени, тем самым, снижая концентрацию этой молекулы в клетке-мишени. В настоящей работе предполагалось использовать сайт отщепления катепсином B как для доставки МНТ в нормальные, так и в опухолевые клетки. Поэтому было принято решение о включении в состав МНТ сайта FKFL.

Прежде чем включать в состав $МНТ_м$ сайт отщепления катепсином B, необходимо было проверить способна ли данная протеаза расщеплять исходный $МНТ_м$. Катепсин B наиболее активен в эндосомах/лизосомах. Поэтому для изучения возможного отщепления был выбран буфер 10 мМ Na_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 5,5. Однако при этих pH модуль ДТокс в составе МНТ изменяет свою конформацию и экспонирует гидрофобную часть, которой он взаимодействует с липидной мембраной. В отсутствии липидной мембраны МНТ при данных pH начинает агрегировать и выпадать в осадок. Чтобы хотя бы частично избежать этого к МНТ добавлялся додецилсульфат натрия (SDS) в конечной концентрации 0,001%. Концентрация $МНТ_м$ была 1,6 мкМ, а катепсина B – 4 мкг/мл. Перед применением катепсин B активировался, как описано Керном с соавторами (Kern et al., 2017). $МНТ_м$ с катепсином B инкубировался при 37 °C в течении 22 часов. Данные электрофореза в полиакриламидном геле показали, что существенного расщепления исходного $МНТ_м$ в этих условиях не наблюдалось (Рис. 4.6.3). Иными словами, если и есть расщепление исходного $МНТ_м$ катепсином B, то оно слишком медленно, чтобы влиять на эффективность выхода монободи к Keap1 из эндосом.

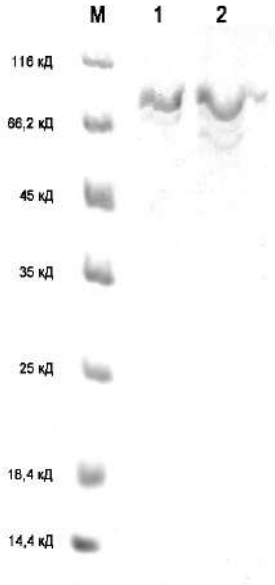


Рисунок 4.6.3. Электрофорез в полиакриламидном геле для исходного $МНТ_м$ (без специально введенного сайта отщепления). Образцы: 1 – $МНТ_м$ (1,6 мкМ) без добавления активированного катепсина B; 2 – 22 часа инкубации $МНТ_м$ (1,6 мкМ) с активированным катепсином B (4 мкг/мл); M – белковый стандарты молекулярных масс.

Сайт FKFL был добавлен в $МНТ_м$ между модулем HMP и монободи к Keap1. МНТ с данным сайтом был обозначен $МНТ_{мр}$. Получение генетической конструкции, кодирующей $МНТ_{мр}$, а также трансформация этой конструкцией клеток *E.coli* штамм BL21(DE3) были проведены А.В. Уласовым. Наработка и очистка $МНТ_{мр}$ проводилась А.С. Сабуровым. Оцененная по результатам денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли чистота полученного $МНТ_{мр}$ составила 95%.

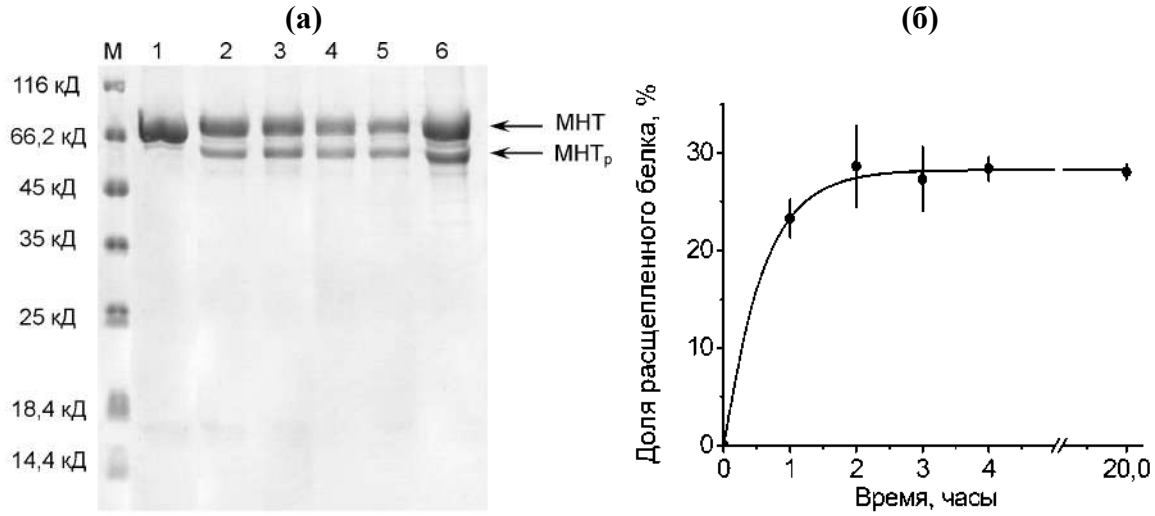


Рисунок 4.6.4. Изучение кинетики расщепления $МНТ_{мр}$ (4 мкМ) активированным катепсином B (4 мкг/мл) при pH 5,5. (а) Электрофорез в полиакриламидном геле. Образцы: $МНТ_{мр}$ без добавления катепсина B (**1**); инкубация $МНТ_{мр}$ с катепсином B 1 час (**2**); 2 часа (**3**); 3 часа (**4**), 4 часа (**5**) и 20 часов (**6**). M – белковые стандарты. МНТ – исходный $МНТ_{мр}$, $МНТ_р$ – $МНТ_{мр}$ с отщепленным монободи к Keap1. **(б) Зависимость доли расщепленного МНТ от времени.**

Изучение кинетики расщепления $МНТ_{мр}$ (4 мкМ) активированным катепсином B (4 мкг/мл) проводилось в буфере 10 мМ Na_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 5,5, содержащем 0,001% SDS. Следует отметить, что увеличение концентрации SDS приводило к уменьшению активности катепсина B, поэтому полностью избавиться от агрегатов белка не удалось. Поэтому часть сайтов FKFL были недоступны для действия катепсина B и полного расщепления изучаемого $МНТ_{мр}$ этой протеазой не наблюдалось. На Рис. 4.6.4 показана кинетика расщепления сайта FKFL в изучаемом $МНТ_{мр}$ катепсином B. Видно, что на электрофорезе в полиакриламидном геле доля полосы, отвечающей нерасщепленному МНТ, уменьшалась, а расщепленному МНТ, $МНТ_р$, наоборот, увеличивалась (Рис. 4.6.4а). По данным электрофореза рассчитывалась доля расщепленного $МНТ_{мр}$. Зависимость этой доли от времени показана на Рис. 4.6.4б. Интерполяция этой кинетической кривой зависимостью $D_{max}\times(1–\exp(–k\times t))$, где D_{max} – конечная доля расщепленного $МНТ_{мр}$, показала, что константа скорости расщепления k равна 1,80 ± 0,17 $ч^{-1}$ или 0,030 ± 0,003 $мин^{-1}$. По кинетической кривой также видно, что

двух часов инкубации с катепсином B достаточно для того, чтобы процесс расщепления практически завершился.

Взаимодействие монободи к Keap1 в составе $МНТ_{мр}$ и отщепленного монободи с фрагментом белка Keap1 (аминокислотные остатки 312–624), Keap1t, изучалось автором диссертации методом термофореза в фостфатном буфере (10 мМ NaH_2PO_4, 150 мМ NaCl, pH 8,0). Чтобы исключить адсорбцию белков на используемых в термофорезе капиллярах, в буфер был добавлен 0,01% SDS. Белок Keap1t был помечен флуоресцентным красителем ATTO647, как это описано в «Материалах и методах». Эффективность присоединения ATTO647 к Keap1t составила 0,5 остатка красителя на молекулу Keap1t. МНТ (4 мкМ), который инкубировали 20 часов с катепсином B (4 мкг/мл), считался максимально расщепленным при данных условиях. Методом термофореза были получены кривые титрования Keap1t (0,12 нМ) возрастающей концентрацией $МНТ_{мр}$ (Рис. 4.6.5а) или расщепленного $МНТ_{мр}$ (Рис. 4.6.5б). Определенные по этим кривым константы диссоциации комплексов $МНТ_{мр}$ или монободи с Keap1t составили 4,9 ± 1,3 и 0,27 ± 0,05 нМ, соответственно. Для свободного монободи это совпадает с известной из литературных данных константой диссоциации – 0,3 нМ (Guntas et al., 2016), а для нерасщепленного $МНТ_{мр}$ это совпадает с константой диссоциации комплекса $МНТ_{м}$ с Keap1t (5,4 ± 0,5 нМ). Таким образом, сродство к Keap1t отщепленного монободи минимум на порядок выше, чем монободи в составе $МНТ_{мр}$.

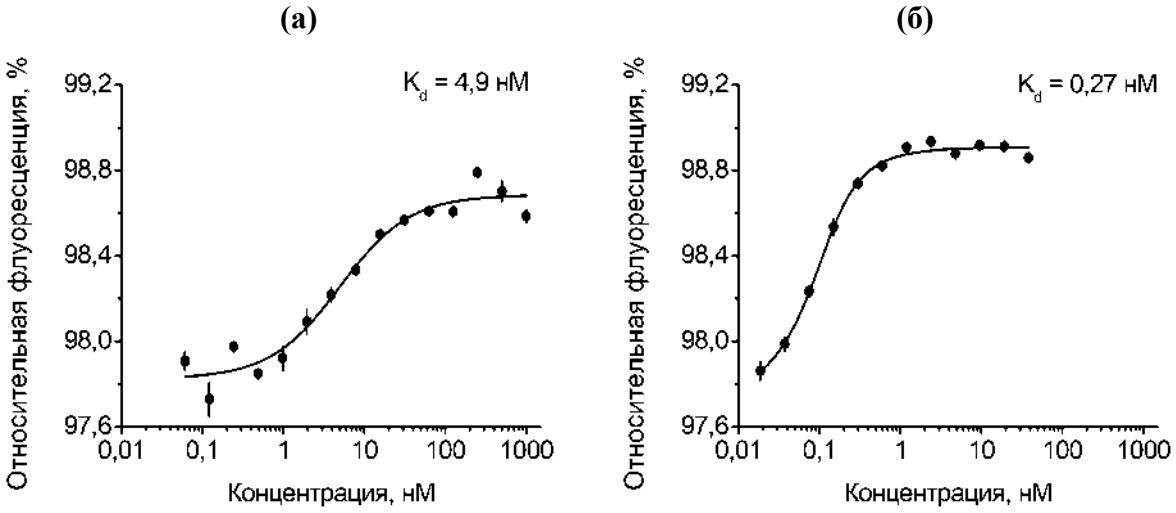


Рисунок 4.6.5. Кривая титрования Keap1t (0,12 нМ) возрастающей концентрацией $МНТ_{мр}$ (а) или расщепленного $МНТ_{мр}$ (б) при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса Keap1t с $МНТ_{мр}$ или монободи. Черными кривыми показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью. Время измерения флуоресценции после начала термофореза – 2,5 сек. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 8–16).

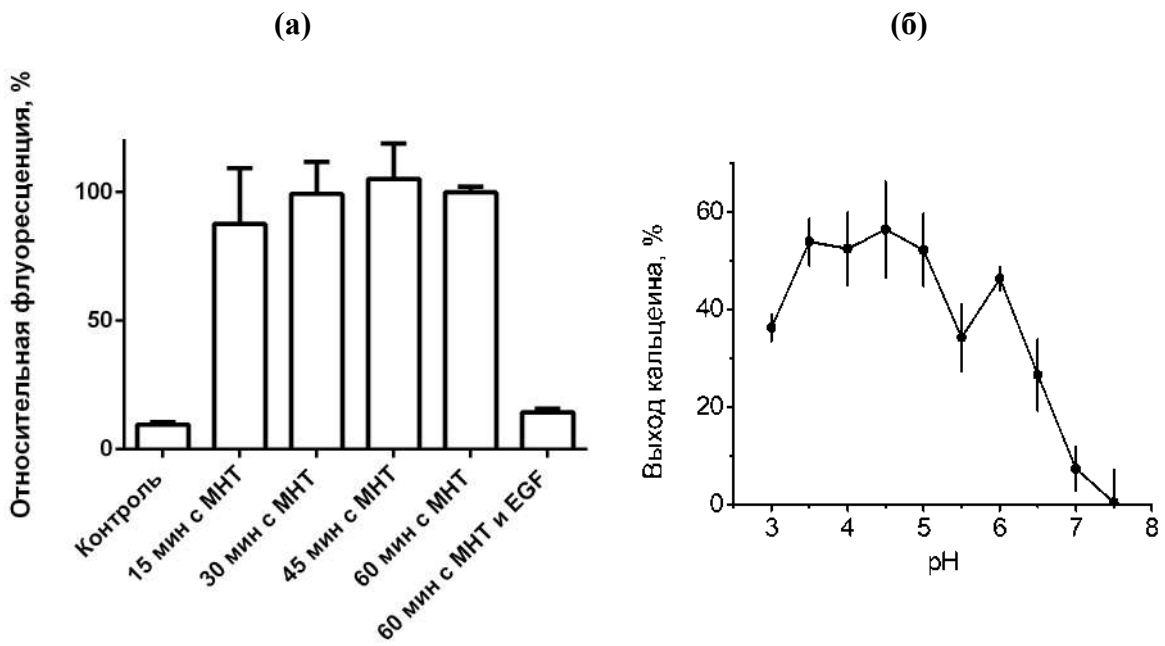


Рисунок 4.6.6. Изучение сохранения функциональной активности лигандного (а) и эндосомолитического (б) модулей МНТ$_{мр}$. (а) Влияние добавления МНТ$_{мр}$-AF488 на флуоресценцию клеток А431 (за 100% принята флуоресценция клеток, инкубированных с МНТ$_{мр}$-AF488 в течение 60 минут). Показана контрольная группа без добавления МНТ-AF488, группы, в которых 150 нМ МНТ$_{мр}$-AF488 инкубировали с клетками 15, 30, 45 и 60 мин, а также группа, где 150 нМ МНТ$_{мр}$-AF488 инкубировали вместе с 2 мкМ ЭФР. Приведены средние значения ± 95% доверительный интервал (n = 7-13). **(б) Зависимость выхода кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом под действием МНТ$_{мр}$ от pH.** Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 4).

Сохранение функциональных свойств лигандного модуля в составе МНТ$_{мр}$ было проверено автором диссертации на линии клеток А431. МНТ$_{мр}$ был помечен флуоресцентным красителем AF488 так, как это описано в «Материалах и методах». В результате эффективность присоединения AF488 к МНТ$_{мр}$ составила 1,9 остатка красителя на молекулу МНТ$_{мр}$. С помощью проточной цитофлуориметрии были определены средние значения флуоресценции на клетку по 7-13 повторам при различных временах инкубации клеток с МНТ$_{мр}$-AF488 (Рис. 4.6.6а). Проведенные эксперименты показали, что уже 15 минут инкубации МНТ$_{мр}$-AF488 с клетками А431 достаточно, чтобы средняя флуоресценция достоверно ($p < 0,05$, ANOVA) выросла по сравнению с контролем, в который не добавляли МНТ$_{мр}$-AF488 (Рис. 4.6.6а). Иными словами МНТ$_{мр}$-AF488 быстро интернализовался в клетки-мишени. Полученный МНТ$_{мр}$ имеет в своем составе аффибоди к РЭФР, поэтому для изучения доли неспецифической интернализации эти рецепторы были заблокированы избытком ЭФР. Чтобы заметно уменьшить количество рецепторов на поверхности клеток клетки А431 сначала инкубировали 1 час с 1 мкМ ЭФР. А затем эти клетки инкубировали с 150 нМ МНТ$_{мр}$-AF488, к которому был добавлен 2 мкМ ЭФР. В этом случае средняя флуоресценция была достоверно ($p < 0,05$, тест Манна-Уитни) ниже, чем в случае, когда МНТ$_{мр}$-AF488 инкубировался такое же время без ЭФР (Рис. 4.6.6а) и

достоверно не отличалась от контроля (тест Крускала-Уоллиса). Таким образом, связывание $МНТ_{мр}$-AF488 с поверхностью клеток A431 в основном обусловлено взаимодействием $МНТ_{мр}$ с РЭФР, а не другими вероятными неспецифическими взаимодействиями. Итак, аффиболи в составе $МНТ_{мр}$ сохраняет свои функциональные свойства.

Для $МНТ_{мр}$ способность эндосомолитического модуля – транслокационного домена дифтерийного токсина, ДТокс, вызывать pH-зависимое нарушение целостности липидных мембран исследовали по выходу флуоресцентного красителя кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом, нагруженных кальцеином в концентрации, приводящей к самотушению флуоресценции. Инкубацию $МНТ_{мр}$ (110 нМ) с липосомами производили при pH 3–7,5 в течение 30 минут при комнатной температуре. На полученной зависимости наблюдались два пика выхода кальцеина – при pH 3,5–5 и при pH ~ 6 (Рис. 4.6.6б). Как указывалось выше, первый пик относится к эндосомолитической активности НМР в составе МНТ, в то время как второй пик как раз обусловлен эндосомолитической активностью ДТокс. Таким образом, эндосомолитический модуль в составе $МНТ_{мр}$ сохраняет свою функциональную активность и позволяет образовывать дефекты в липидных мембранах при pH, характерных для эндосом.

Выше был описан предложенный автором диссертации подход для оценки внутриклеточной концентрации молекул, доставляемых с помощью МНТ. Причем, этим подходом можно оценить эффективную внутриклеточную концентрацию доставляемых молекул вне зависимости от того, находятся ли они в составе МНТ или нет. Иными словами, в случае отщепления монободи в эндосомах будет оцениваться именно цитозольная концентрация монободи, а не всего оставшегося МНТ. Ранее, была определена доля свободного Nrf2 (при 37 °C) для $МНТ_{м}$, т.е. для транспортера без возможности отщепления монободи к Keap1, при различных временах инкубации клеток AML12 с этим транспортером (Рис. 4.6.7, квадраты). Аналогичным образом была получена схожая кривая для $МНТ_{мр}$, т.е. для транспортера с возможностью отщепления монободи к Keap1 в эндосомах (Рис. 4.6.7, полые ромбы). Оказалось, что в последнем случае доля свободного Nrf2 возрастает значительно быстрее и достигаемые максимальные значения заметно больше, чем для варианта без возможности отщепления (Рис. 4.6.7). По этим зависимостям с помощью предложенного подхода были оценены концентрации монободи для транспортеров с и без возможности отщепления. Эти концентрации оказались равны 214,9 ± 1,3 и 251 ± 9 нМ для 2 и 5 минут инкубации $МНТ_{мр}$ с клетками AML12, соответственно. Полученные значения достоверно не отличаются (критерий Манна-Уитни) от соответствующих значений для $МНТ_{м}$: 195 ± 10 и 240 ± 21

нМ. Таким образом, введение сайта отщепления монободи R1 от МНТ в эндосомах приводило к существенному (более чем на порядок) возрастанию сродства этого монободи к Keap1, но не оказывало заметного влияния на эффективность выхода монободи из эндосом.

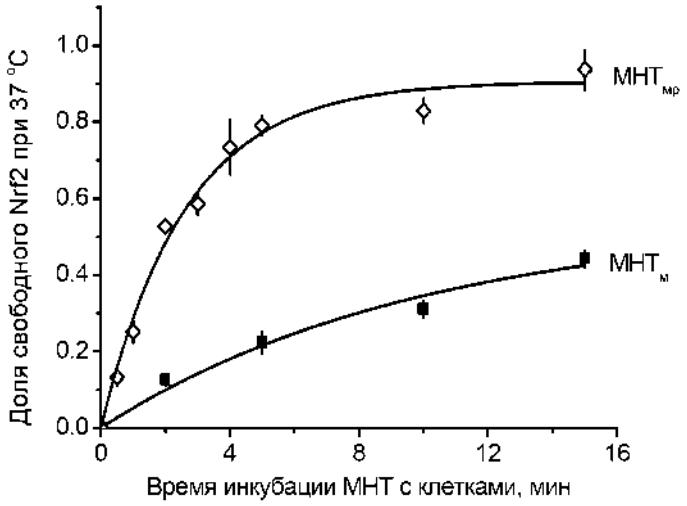


Рисунок 4.6.7. Зависимости доли свободного Nrf2 при 37 °C от времени инкубации МНТ (500 нМ) с клетками для монободи R1 в составе МНТ$_{м}$ и МНТ$_{мр}$ с возможностью отщепления монободи R1 в эндосомах. Показаны средние значения ± стандартная ошибка экспериментальных данных (n = 4–19).

Значительно больший эффект МНТ$_{мр}$ на Nrf2 по сравнению с МНТ$_{м}$ приводил к возрастанию защиты клеток от действия перекиси водорода. Так, предварительная инкубация клеток AML12 с 500 нМ МНТ$_{мр}$ в течение 5 минут и последующая отмывка средой приводила к достоверному (критерий Манна-Уитни) уменьшению влияния перекиси на флуоресценцию cDCF в клетках в диапазоне от 2 до 6 часов между добавлением МНТ$_{мр}$ и добавлением перекиси водорода (Рис. 4.6.8а). Напротив, в тех же условиях инкубация клеток с МНТ$_{м}$ не приводила к заметному эффекту (Рис. 4.6.8б). Итак, возможность отщепления монободи от МНТ в эндосомах приводила к существенному возрастанию эффективности МНТ по защите клеток от действия перекиси водорода.

Таким образом, было показано, что отщепление монободи R1 от МНТ в эндосомах способно существенно повысить его сродство к Keap1, в то время как практически не сказывается на эффективности его доставки в цитозоль. Введение сайта отщепления в МНТ позволяет не только повысить эффективность доставляемых с помощью МНТ антителоподобных молекул, но и открывает новое направление в применении функциональных молекул, которые плохо работают или даже не работают в составе химерных конструкций.

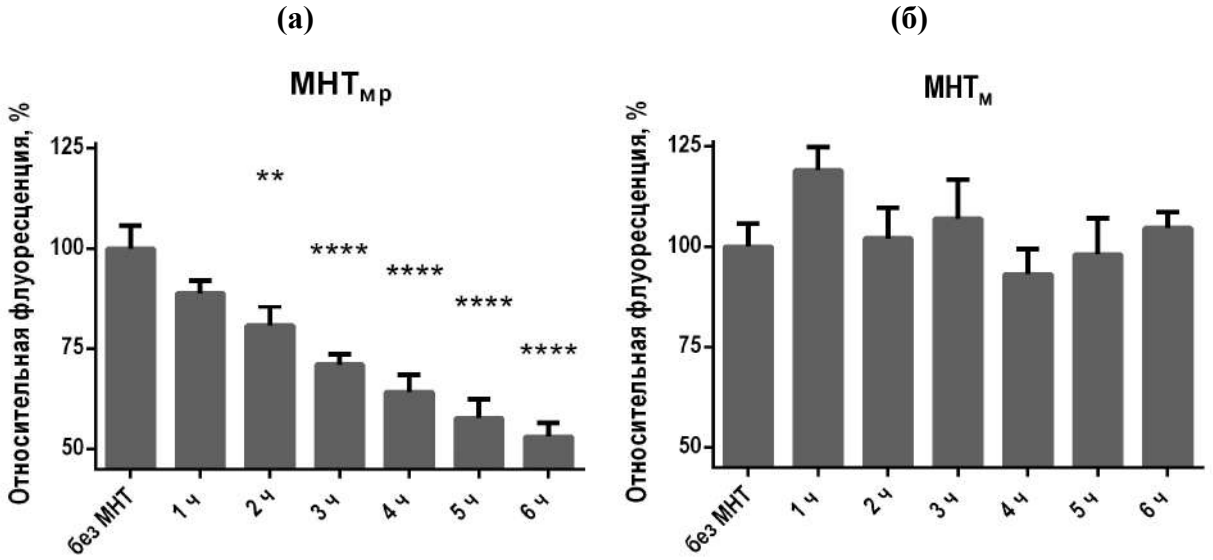


Рисунок 4.6.8. Действие МНТ на образование активных форм кислорода. (а) Влияние 5 минутной предварительной инкубации 500 нМ МНТ$_{мр}$ на флуоресценцию cDCF от времени после добавления МНТ$_{мр}$. (б) Влияние 5 минутной предварительной инкубации 500 нМ МНТ$_{м}$ на флуоресценцию cDCF от времени после добавления МНТ$_{м}$. 10 мМ H_2O_2 добавлялась за 15 минут до снятия клеток с подложки. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 7–18). Достоверность отличий группы от контрольной (без добавления МНТ) по критерию Манна-Уитни: ** $p < 0{,}01$, **** $p < 0{,}0001$. Эксперименты проведены совместно с Т.Н. Лупановой.

Основные результаты, изложенные в п. 4.6, были опубликованы в статьях автора с соавторами: Khramtsov Y.V., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Selection of an amino acid site with one of the fastest cleavage kinetics by the endosomal protease cathepsin B for potential use in drug delivery systems // Dokl. Biochem. Biophys. – 2023. – V. 509. – P. 78-80 (вклад автора состоит как в проведении всех экспериментальных работ, так и планировании всех экспериментов, анализе полученных результатов и написании всего текста); 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. - V. 15. - 324 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии и CETSA, так и в предложенном подходе по оценке концентрации на основании данных CETSA, общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста); 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. - V. 16. - 1345 (вклад автора состоит как в проведении существенной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза,

микроскопии FLIM-FRET, CETSA и проточной цитофлуориметрии, так и в оценке концентрации МНТ на основании данных CETSA, участии в планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и в написании части текста). Автор признателен всем соавторам этих статей, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.7. МНТ, нацеленные на нуклеокапсидный белок (N-белок) вируса SARS-CoV-2

4.7.1. МНТ, способные взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2

Идея об отщеплении антителоподобных молекул от МНТ в эндосомах с целью увеличения эффективности этих молекул была применена для МНТ, нацеленных на лечение коронавируса SARS-CoV-2. Актуальность создания этого МНТ как никогда продемонстрировала пандемия этого вирусного заболевания. Прежде всего, необходимо было выбрать вирусный белок-мишень, воздействие на который будет существенно влиять на репликацию данного вируса. Ранее в качестве такого белка коронавируса, на который было создано множество антител и антителоподобных молекул, рассматривали преимущественно находящийся на поверхности вирусного капсида S-белок (Шилова и др, 2024). Однако технология МНТ позволяет воздействовать и на другие белки этого вируса на стадиях, когда капсид еще не собран. Таким белком может быть, например, нуклеокапсидный белок (N-белок), который 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 (Zhang et al., 2007; Karwaciak et al., 2021; ul Haq et al., 2022; Wu et al., 2023). Кроме того, среди коронавирусов N-белок является относительно высоко консервативным. Так, для вируса SARS-CoV-2 этот белок обладает 90% гомологии аминокислотной последовательности со схожим белком вируса SARS-CoV (ul Haq et al., 2022; Wu et al., 2023). Это позволяет предположить, что если получить МНТ, способный взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2, то есть существенная вероятность того, что он будет взаимодействовать с N-белками и других коронавирусов.

Ранее в литературе на основе десятого домена фибронектина 3 типа человека был получен ряд антителоподобных молекул – монободи (Fn-N) к N-белку вируса SARS-CoV. Методом термофореза мы провели проверку способности семи из этих монободи (Fn-N6, Fn-N10, Fn-N11, Fn-N15, Fn-N17, Fn-N20 и Fn-N22) взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Для Fn-N10 не наблюдалось заметного связывания с этим белком. Для трех монободи (Fn-N11, Fn-N17 и Fn-N22) константы диссоциации их комплекса с N-белком составили 2,7 ± 0,6, 3,0 ± 0,5 и 2,9 ± 0,9 мкМ, соответственно. Величины этих констант указывают на неспецифическое взаимодействие данных монободи с N-белком. Напротив, высокоаффинное взаимодействие с N-белком наблюдалось для Fn-N6, Fn-N15 и Fn-N20, для которых соответствующие константы диссоциации были 31 ± 7, 24 ± 4 и 66 ± 12 нМ, соответственно. Итак, из семи монободи, способных взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV, три монободи способны взаимодействовать также с N-белком вируса SARS-CoV-2. Данные результаты были опубликованы в статье автора с соавторами:

Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Among antibody-like molecules, monobodies, able to interact with nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 virus, there are monobodies with high affinity to nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 virus // Dokl. Biochem. Biophys. – 2022. – V. 503. – P. 90-92 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как определение с помощью термофореза констант взаимодействия монободи с N-белком, так общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста).

Следует отметить, что присоединение к выбранным монободи даже небольших пептидов существенно уменьшало их сродство к N-белку. Так, к Fn-N15 и Fn-N20 для доставки их в клетки был присоединен по N- или по C-концу TAT-пептид. Исходно, константа диссоциации комплекса монободи Fn-N15 с N-белком составляла 24 ± 4 нМ, а для конструкций TAT-Fn-N15 и Fn-N15-TAT определенная методом термофореза константа диссоциации составляла 46 ± 5 и 710 ± 260 нМ, соответственно. Аналогично, константа диссоциации комплекса монободи Fn-N20 с N-белком составляла 66 ± 12 нМ, а для конструкций TAT-Fn-N20 и Fn-N20-TAT она была 350 ± 8 и 190 ± 90 нМ, соответственно. Результаты по монободи к N-белку, слитым с проникающими в клетку пептидами, были опубликованы в статье автора с соавторами: Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Delivery of antibody-like molecules, monobodies, capable of binding with SARS-CoV-2 virus nucleocapsid protein, into target cells // Dokl. Biochem. Biophys. – 2022. – V. 506. – P. 220-222 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как определение с помощью термофореза констант взаимодействия конструкций с N-белком и получении кривых CETSA, так общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста).

Итак, для создания МНТ, способного взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2, мы решили с одной стороны включить в состав МНТ монободи к N-белку, а, с другой стороны, сайт отщепления этого монободи от МНТ в эндосомах. В качестве монободи нами было выбрано монободи NC2, которое имеет наилучшее сродство к N-белку вируса SARS-CoV-2 (константа диссоциации комплекса монободи с N-белком равна 6,7 нМ (Du et al., 2020)). Для доставки этого монободи был выбран МНТ сходного с $МНТ_{мр}$ строения, только монободи к Keap1 было поменяно на монободи NC2. Иными словами было выбрано МНТ следующего строения: антиРЭФР-His tag-ДТокс-HMP-FKFL-NC2, где His tag – пептид из шести гистидинов, необходимый для выделения и очистки МНТ. В дальнейшем данный МНТ был обозначен $МНТ_{N1}$.

Прежде всего, автором диссертации была изучена кинетика расщепления $МНТ_{N1}$ (1,6 мкМ) активированной эндосомной протеазой катепсином B (4 мкг/мл) (Рис. 4.7.1). Данное расщепление проводилось в буфере 10 мМ Na_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 5,5 с добавлением 0,001% SDS, чтобы избежать агрегации $МНТ_{N1}$ при этих pH. На электрофорезе в полиакриламидном геле видно, что доля полосы, отвечающей нерасщепленному $МНТ_{N1}$, уменьшалась, а расщепленному $МНТ_{N1}$, $МНТ_p$, наоборот, увеличивалась (Рис. 4.7.1а). Установлено также, что 23 часа инкубации $МНТ_{N1}$ с катепсином B достаточно, чтобы практически все монободи NC2 отщепилось от $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.1а) и данный образец можно рассматривать как свободное монободи NC2. Анализируя интенсивность полосы, отвечающей расщепленному $МНТ_{N1}$, была получена кинетическая кривая данного расщепления (Рис. 4.7.1б). Интерполируя данную кривую зависимостью 1–exp(–k×t) была рассчитана константа скорости расщепления, k = 0,31 ± 0,03 $ч^{-1}$. Таким образом, сайт FKFL в составе $МНТ_{N1}$ доступен для действия протеазы катепсин B.

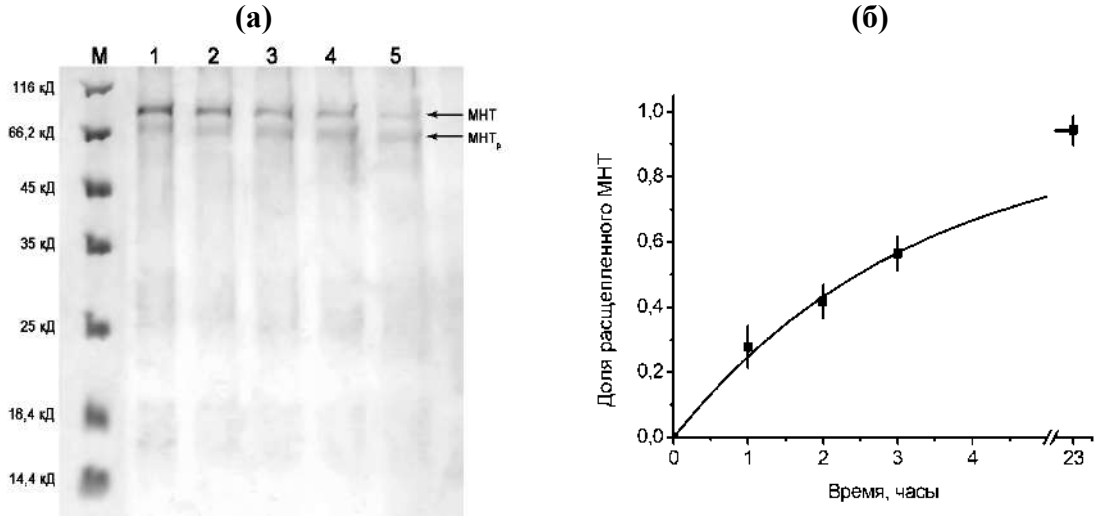


Рисунок 4.7.1. Изучение кинетики расщепления $МНТ_{N1}$ (1,6 мкМ) активированным катепсином B (4 мкг/мл) при pH 5,5. (а) Электрофорез в полиакриламидном геле. Образцы: $МНТ_{N1}$ без добавления катепсина B (**1**); инкубация $МНТ_{N1}$ с катепсином B 1 час (**2**); 2 часа (**3**); 3 часа (**4**) и 23 часа (**5**). M – белковые стандарты. МНТ – исходный $МНТ_{N1}$, $МНТ_p$ – $МНТ_{N1}$ с отщепленным монободи NC2. **(б) Зависимость доли расщепленного $МНТ_{N1}$ от времени.**

Методом термофореза автором диссертации были получены кривые титрования N-белка (10 нМ) возрастающей концентрацией $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.2а) или расщепленного $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.2б). Определенные по этим кривым константы диссоциации комплексов $МНТ_{N1}$ или NC2 с N-белком составили 116 ± 20 и 10 ± 3 нМ, соответственно. Для свободного NC2 это близко к литературным значениям данной константы – 6,7 нМ (Du et al., 2020). Таким образом, сродство к N-белку свободного монободи NC2 на порядок выше, чем монободи NC2 в составе $МНТ_{N1}$. Итак, полученный $МНТ_{N1}$ с высоким

сродством может взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2 в растворе. Причем, вероятное отщепление монободи NC2 от $МНТ_{N1}$ в эндосомах больше чем на порядок увеличивает его сродство к N-белку.

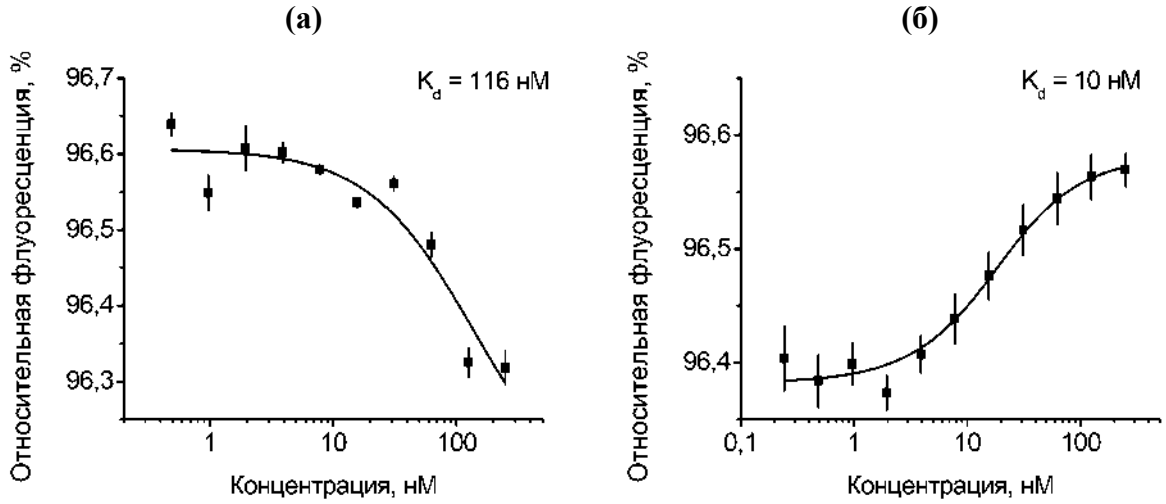


Рисунок 4.7.2. Кривая титрования N-AF488 (10 нМ) возрастающей концентрацией $МНТ_{N1}$ (а) или расщепленного $МНТ_{N1}$ (б) при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса N-белка с $МНТ_{N1}$ или монободи NC2. Черными кривыми показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью. Время измерения флуоресценции после начала термофореза – 2,5 сек. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 8–16).

Для проверки способности аффибоди в составе $МНТ_{N1}$ связываться с рецепторами РЭФР этот транспортер был помечен флуоресцентным красителем sulfo-Cyanine3 так, как это описано в «Материалах и метода». Эффективность присоединения sCy3 к $МНТ_{N1}$ составила 0,79 остатков красителя на молекулу $МНТ_{N1}$. С помощью проточной цитофлуориметрии автором диссертации была определена средняя флуоресценция клеток A431, которые инкубировались с $МНТ_{N1}$ (100 нМ) заданные промежутки времени (Рис. 4.7.3а). Проведенные эксперименты показали, что уже 30 минут инкубации $МНТ_{N1}$-sCy3 с клетками A431 достаточно, чтобы средняя флуоресценция достоверно ($p < 0,05$, тест Крускала-Уоллиса) выросла по сравнению с контролем, в который не добавляли $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.3а). Иными словами, $МНТ_{N1}$ способен связываться с поверхностью клеток A431. Чтобы установить, обусловлено ли это связывание взаимодействием с рецепторами РЭФР или неспецифическими взаимодействиями, был поставлен контроль, в котором $МНТ_{N1}$ (100 нМ) один час инкубировали вместе с избытком эпидермального фактора роста, ЭФР (2 мкМ). В этом случае средняя флуоресценция была достоверно ($p < 0,05$, тест Крускала-Уоллиса) ниже, чем в случае, когда $МНТ_{N1}$ инкубировали такое же время без ЭФР (Рис. 4.7.3а) и достоверно не отличалась от контроля, в который не добавляли $МНТ_{N1}$ (тест Крускала-Уоллиса). Таким образом, аффибоди в составе $МНТ_{N1}$ сохраняет способность

связываться с рецепторами РЭФР, за счет чего этот транспортер может интернализоваться в клетки-мишени.

Для $МНТ_{N1}$ способность эндосомолитического модуля – ДТокс, вызывать pH-зависимое нарушение целостности липидных мембран исследовали по выходу флуоресцентного красителя кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом, нагруженных кальцеином в концентрации, приводящей к самотушению флуоресценции. Инкубацию $МНТ_{N1}$ (100 нМ) с липосомами производили при pH 3–7,5 в течение 30 минут при комнатной температуре. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что эндосомолитический модуль сохраняет свою активность в полученном $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.3б), что видно по наличию пика, максимум которого находится при pH 5,5.

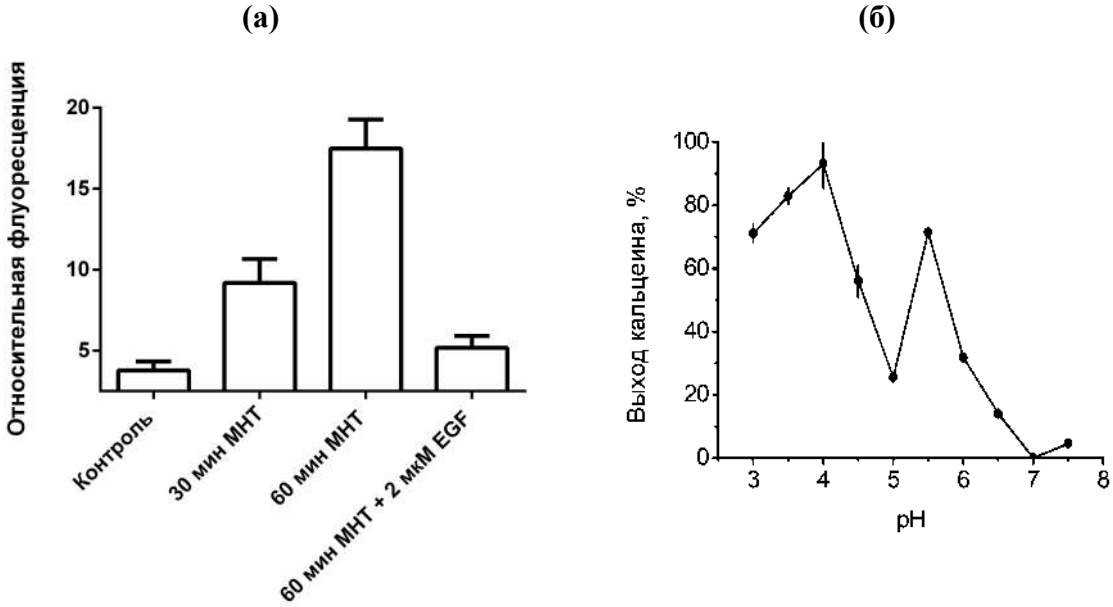


Рисунок 4.7.3. Изучение сохранения функциональной активности лигандного (а) и эндосомолитического (б) модулей $МНТ_{N1}$. (а) Влияние добавления $МНТ_{N1}$-sCy3 на флуоресценцию клеток A431. Показана контрольная группа без добавления $МНТ_{N1}$-sCy3, группы, в которых 100 нМ $МНТ_{N1}$-sCy3 инкубировали с клетками 30 и 60 мин, а также группа, где 100 нМ $МНТ_{N1}$-sCy3 инкубировали вместе с 2 мкМ ЭФР. Приведены средние значения ± стандартная ошибка (n = 4-6). **(б) Зависимость выхода кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом под действием $МНТ_{N1}$ от pH.** Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 3). Данные получены совместно с Т.А. Сластниковой.

Для изучения способности $МНТ_{N1}$ связываться с N-белком в клетках автором диссертации был использован метод CETSA. Для этого с помощью трансфекции полиплексами, содержащими соответствующую плазмиду, были получены клетки A431, временно экспрессирующие N-белок вируса SARS-CoV-2. Иммуноблоттинг для CETSA ставился с антителами на N-белок. Для интактных клеток, к которым не добавлялся $МНТ_{N1}$, была получена кривая плавления свободного N-белка (Рис. 4.7.4, синяя кривая). Для получения кривой плавления N-белка в комплексе с $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.4, красная

кривая) клетки A431 сначала лизировались четырьмя циклами замораживания в жидком азоте-оттаивания при 37°C, к ним добавлялся избыток $МНТ_{N1}$ (1 мкМ), и затем проводился CETSA. Кроме того, были получены кривые плавления N-белка в клетках A431, которые инкубировались с $МНТ_{N1}$ (500 нМ) в течение 30 или 60 минут (Рис. 4.7.4, черная и зеленая кривые). Эти кривые хорошо совпадали с кривой плавления для комплекса N-белка с $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.4). Эти данные указывают на то, что уже при 30 минутах инкубации $МНТ_{N1}$ с клетками этот транспортер не просто проникает в эти клетки, но и связывает весь находящийся в них N-белок. Таким образом, $МНТ_{N1}$ способен взаимодействовать с N-белком на только в растворе, но и в клетках-мишенях.

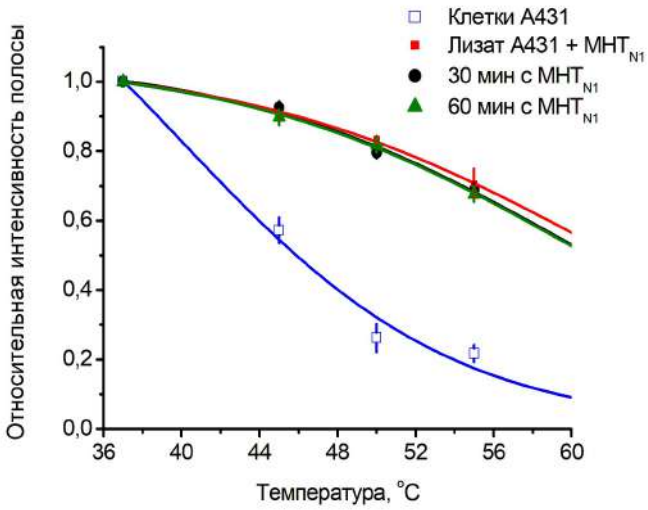


Рисунок 4.7.4. Кривые плавления свободного N-белка (синяя кривая), в комплексе с $МНТ_{N1}$ (красная кривая), после 30 (черная кривая) или 60 минут (зеленая кривая) инкубации клеток A431, временно экспрессирующих N-белок с 500 нМ $МНТ_{N1}$. Данные получены путем проведения CETSA и дальнейшего иммуноблоттинга с антителами на N-белок. Зависимости нормированы на среднюю интенсивность полосы, отвечающей N-белку при 37 °C. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 8–9).

Известно, что в клетках N-белок может вызывать разделение фаз жидкость-жидкость с образованием так называемых биоконденсатов (Wang et al., 2021; Zheng and Gao, 2023). Они представляют собой каплевидные структуры, в которых концентрация белка, ответственного за их образование, существенно выше, чем в окружающем растворе (Semerdzhiev et al., 2022). Для вирусов биоконденсаты часто играют очень важную роль, служа так называемыми вирусными фабриками, которые являются основой для образования вирусных капсидов (Wang et al., 2021; Zheng and Gao, 2023). Кроме того, в биоконденсатах вирусные белки во многом защищены от деградации. Как было показано в литературе ранее, некоторые молекулы, способные взаимодействовать с вирусным белком, отвечающим за образование биоконденсатов, могут вызывать разрушение этих биоконденсатов, что, в свою очередь, блокирует производство вируса в клетке (Wang et

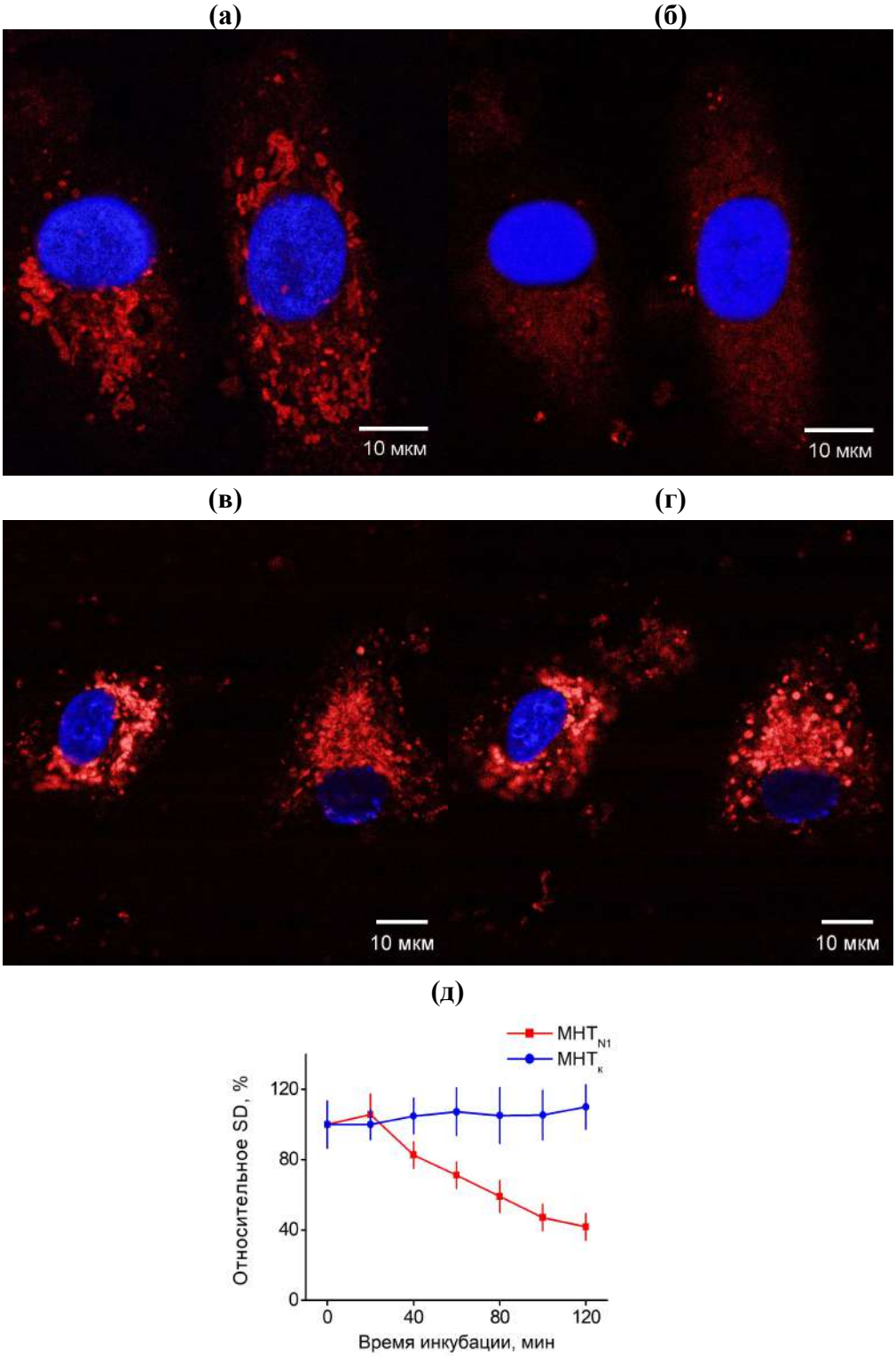


Рисунок 4.7.5. Полученные с помощью конфокальной микроскопии изображения клеток A549, временно экспрессирующих N-белок, слитый с флуоресцентным белком mRuby3, инкубированных с 500 нМ МНТ$_{N1}$ в течение 0 мин (а) и 80 мин (б) или с 500 нМ МНТ$_{к}$ в течение 0 мин (в) и 80 мин (г). Синим показана прокраска ядер флуоресцентным красителем Hoechst 33342. **(д) Зависимость относительного стандартного отклонения интенсивности флуоресценции в цитоплазме, SD, от времени инкубации клеток A549 с 500 нМ МНТ$_{N1}$ или 500 нМ МНТ$_{к}$.** Из полученных данных был вычтен фоновый SD. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 3–5).

al., 2021). Следует отметить, что похожие на биоконденсаты структуры наблюдались для клеток A549, временно экспрессирующих N-белок, слитый с флуоресцентным белком mRuby3 (типичное изображение на Рис. 4.7.5). Инкубация этих клеток с 500 нМ $МНТ_{N1}$ приводила к постепенному разрушению этих структур и более однородному распределению флуоресценции по клетке (ср. Рис. 4.7.5а и 4.7.5б). Напротив, МНТ без монободи к N-белку, $МНТ_к$, не вызывал разрушения этих структур (пример ср. Рис. 4.7.5в и 4.7.5г). Для количественного описания данного процесса можно использовать стандартное отклонение интенсивности флуоресценции в цитоплазме (Puthenveedu et al., 2006). На Рис. 4.7.5д видно, что инкубация клеток A431 с $МНТ_{N1}$ приводила к уменьшению стандартного отклонения, в то время как инкубация с $МНТ_к$ не сказывалась на его величине. Начиная с 100 минут инкубации отличие данных для $МНТ_{N1}$ и $МНТ_к$ является достоверным ($p < 0,05$, тест Манна-Уитни). Таким образом, $МНТ_{N1}$ может взаимодействовать с N-белком в клетках-мишенях и вызывать разрушение образуемых N-белком биоконденсатов. Потенциально это способно привести к ингибированию производства вируса SARS-CoV-2 в клетке.

Основные результаты, изложенные в п. 4.7.1, были опубликованы в статьях автора с соавторами: Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Modular nanotransporters capable of binding to SARS-CoV-2 virus nucleocapsid protein in target cells // Dokl. Biochem. Biophys. – 2023. – V. 510. – P. 87-90 (вклад автора состоит как в проведении экспериментальных работ, таких как изучение связывания между белками методом термофореза, CETSA, изучение взаимодействия МНТ с рецепторами методом проточной цитофлуориметрии, так и планировании всех экспериментов, анализе полученных результатов и написании всего текста); 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. - V. 16. - 4 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии, проточной цитофлуориметрии и иммуноблоттинга, так и в общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста). Автор признателен всем соавторам этих статей, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.7.2. МНТ, способные вызывать деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2

В предыдущем параграфе был описан МНТ, способный взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Данное взаимодействие за счет разрушения биоконденсатов, образуемых N-белком, может привести к ингибированию репликации этого вируса. Однако еще большей эффективностью должен обладать МНТ, способный не только взаимодействовать с N-белком, но и приводить к его деградации. В литературе известны молекулярные конструкции, способные вызывать деградацию выбранных внутриклеточных белков по протеосомному или аутофагосомному пути (Verma et al., 2020; Zhao et al., 2022). С одной стороны, они позволяют осуществить длительное воздействие на выбранный белок-мишень, а с другой стороны, благодаря каталитическому механизму действия клеточных белков, с помощью них можно деградировать выбранный белок-мишень в довольно высокой концентрации. Наиболее распространенной технологией при этом является создание химер, вызывающих направленный протеолиз (PROTACs, PROteolysis-TArgeting Chimeras), некоторые из которых уже дошли до клинических испытаний (Mullard, 2021; Song et al., 2023). Однако, при этом используются, как правило, низкомолекулярные лиганды, которые существенно ограничивают круг возможных белков-мишеней. Антителоподобные молекулы тоже использовались для направленной деградации белков (Portnoff et al., 2014; Shin et al., 2015; Fulcher et al., 2017; Ibrahim et al., 2020; Lim et al., 2020), однако, терапевтическое применение таких конструкций весьма ограничено из-за проблем с доставкой в клетку самих антителоподобных молекул (Niamsuphap et al., 2020; Tolmachev et al., 2022). Эти проблемы можно преодолеть с помощью технологии МНТ.

Для деградации N-белка в состав $МНТ_{N1}$ была включена последовательность DPETGEYL (Keap1_E3PB), которая способна взаимодействовать с убиквитинлигазой Keap1 с наномолярной аффиностью (Lu et al., 2018). Эта последовательность была добавлена сразу после сайта отщепления монободи NC2 в эндосомах. Иными словами, в эндосомах данная последовательность может отщепляться слитой вместе с этим монободи. Прежде всего, было изучено сохранение функциональных свойств модулей полученного $МНТ_{N2}$. Для этого он был помечен флуоресцентным красителем AF488, так, как это описано в «Материалах и методах». Степень мечения составила две молекулы AF488 на одну молекулу $МНТ_{N2}$. На Рис. 4.7.6а показана зависимость средней флуоресценции на клетку от времени инкубации клеток A431 с 200 нМ $МНТ_{N2}$-AF488. Уже 15 минут инкубации $МНТ_{N2}$-AF488 с клетками достаточно, чтобы средняя флуоресценция была достоверно ($p < 0,05$, тест Крускала-Уоллиса) выше контроля, в который не добавлялся $МНТ_{N2}$-AF488. Чтобы показать, что связывание с клетками

происходит преимущественно за счет взаимодействия с рецепторами РЭФР, был поставлен контроль, в котором клетки А431 сначала инкубировались 1 час с 1 мкМ ЭФР, а затем 1 час с 200 нМ $МНТ_{N2}$-AF488, к которому был добавлен ЭФР в конечной концентрации 2 мкМ. При таком контроле сильно уменьшалось количество рецепторов РЭФР на поверхности клетки, а те которые оставались на этой поверхности, были заблокированы для взаимодействия. В этом случае средняя флуоресценция на клетку достоверно ($p < 0,05$, тест Крускала-Уоллиса) уменьшалась, по сравнению с вариантом, когда клетки инкубировались только с $МНТ_{N2}$-AF488 без ЭФР (Рис. 4.7.6а) и приближалась к уровню контроля. Иными словами, взаимодействие $МНТ_{N2}$ с клетками в основном обусловлено связыванием с РЭФР, т.е. аффибоди в составе $МНТ_{N2}$ сохранял свои функциональные свойства.

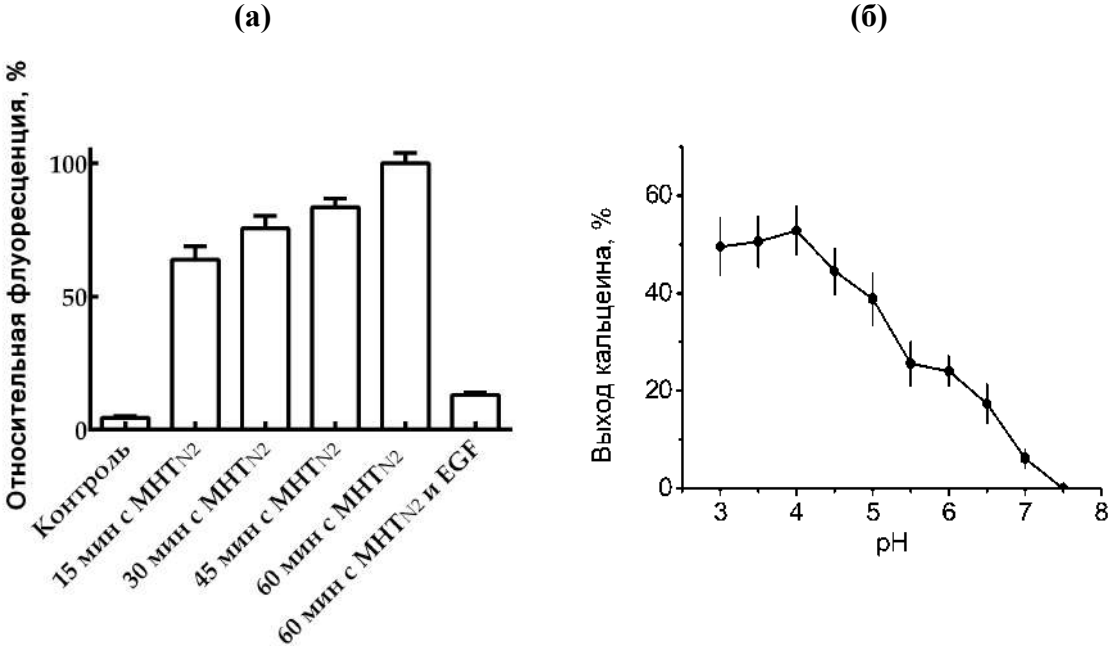


Рисунок 4.7.6. Изучение сохранения функциональной активности лигандного (а) и эндосомолитического (б) модулей $МНТ_{N2}$. (а) Влияние добавления $МНТ_{N2}$-AF488 на относительную флуоресценцию клеток А431 (за 100% была взята флуоресценция клеток, которые инкубировались один час с $МНТ_{N2}$-AF488). Показана контрольная группа без добавления $МНТ_{N2}$-AF488, группы, в которых 200 нМ $МНТ_{N2}$-AF488 инкубировали с клетками 15, 30, 45 и 60 мин, а также группа, где 200 нМ $МНТ_{N2}$-AF488 инкубировали вместе с 2 мкМ ЭФР. Приведены средние значения ± стандартная ошибка (n = 7-13). **(б) Зависимость выхода кальцеина из фосфатидилхолиновых липосом под действием $МНТ_{N2}$ от pH.** Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 3). Данные получены совместно с Т.А. Сластниковой.

Сохранение функциональных свойств эндосомолитического модуля в составе $МНТ_{N2}$ было изучено по выходу кальцеина из нагруженных им липосом при различных pH (Рис. 4.7.6б). При нейтральных значениях pH практически не наблюдался выход кальцеина, а он происходил при кислых pH, включая значения pH, характерные для

эндосом (pH 5–6) (Рис. 4.7.6б). Итак, эндосомолитический модуль ДТокс в составе $МНТ_{N2}$ сохранял свою функциональную активность.

Способность монободи NC2 в составе $МНТ_{N2}$ взаимодействовать с N-белком в растворе была изучена автором диссертации методом термофореза. По полученной термофоретической кривой (Рис. 4.7.7а) была определена равновесная константа диссоциации комплекса $МНТ_{N2}$ с N-белком, которая составила 47,2 ± 2,5 нМ (± стандартная ошибка). Таким образом, монободи NC2 в составе $МНТ_{N2}$ сохраняет свою функциональную активность.

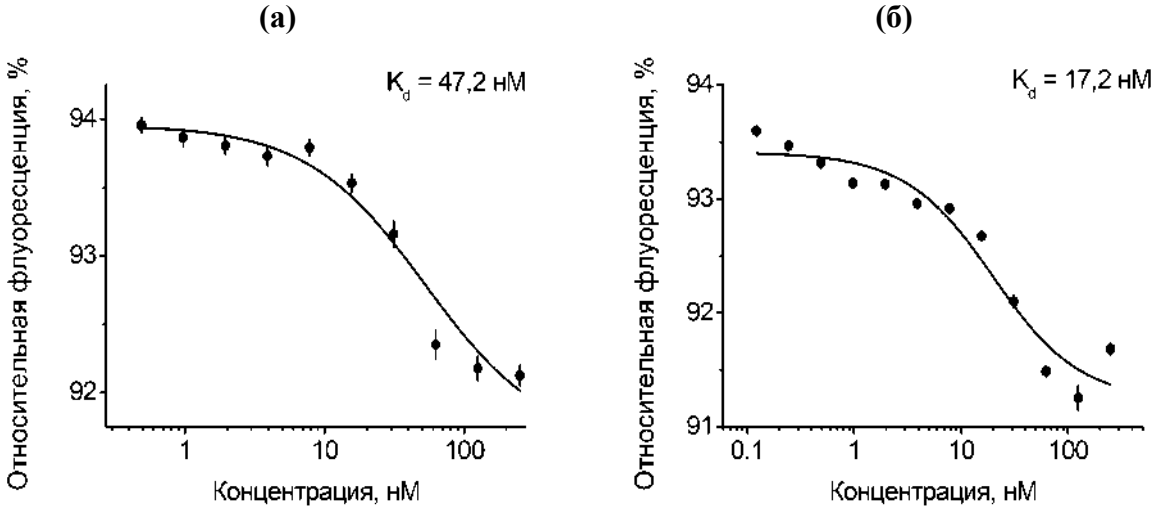


Рисунок 4.7.7. Кривая титрования N-белка-AF488 (5 нМ) возрастающей концентрацией $МНТ_{N2}$ (а) или расщепленного $МНТ_{N2}$ (б) при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса N-белка с $МНТ_{N2}$ или монободи NC2. Черными кривыми показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью. Время измерения флуоресценции после начала термофореза – 20 сек. Указана равновесная константа диссоциации комплекса МНТ с N-белком, K_d. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 14–17).

Автором диссертации было также изучено расщепление $МНТ_{N2}$ по сайту FKFL активированным катепсином B. На Рис. 4.7.8а показана кинетика этого расщепления, а на Рис. 4.7.8б соответствующая кинетическая кривая, полученная из анализа интенсивности полосы, отвечающей расщепленному $МНТ_{N2}$. После четырех часов инкубации $МНТ_{N2}$ с катепсином B кинетическая кривая достигает плато (Рис. 4.7.8б). Константа скорости расщепления k была определена путем интерполяции данной кривой зависимостью $y = a\cdot(1-\exp(-k\cdot t))$, где a – максимальная доля расщепленного $МНТ_{N2}$. Было получено, что k = 0,89 ± 0,07 $ч^{-1}$. Таким образом, сайт FKFL в составе $МНТ_{N2}$ являлся доступным для эндосомной протеазы катепсина B.

После инкубации 20 часов 4 мкМ $МНТ_{N2}$ с 4 мкг/мл катепсином B, этот МНТ считался подвергнутым максимально возможному расщеплению. По полученной термофоретической кривой для $МНТ_{N2}$ (Рис. 4.7.7б) была определена равновесная

константа диссоциации комплекса монободи NC2 с Keap1, которая составила 17,2 ± 4,4 нМ (± стандартная ошибка), что почти в три раза меньше, чем для нерасщепленного $МНТ_{N2}$ (47,2 ± 2,5 нМ). Таким образом, если монободи с присоединенной Keap1_E3PB будет отщепляться от $МНТ_{N2}$ в эндосомах, то его сродство к N-белку будет существенно возрастать.

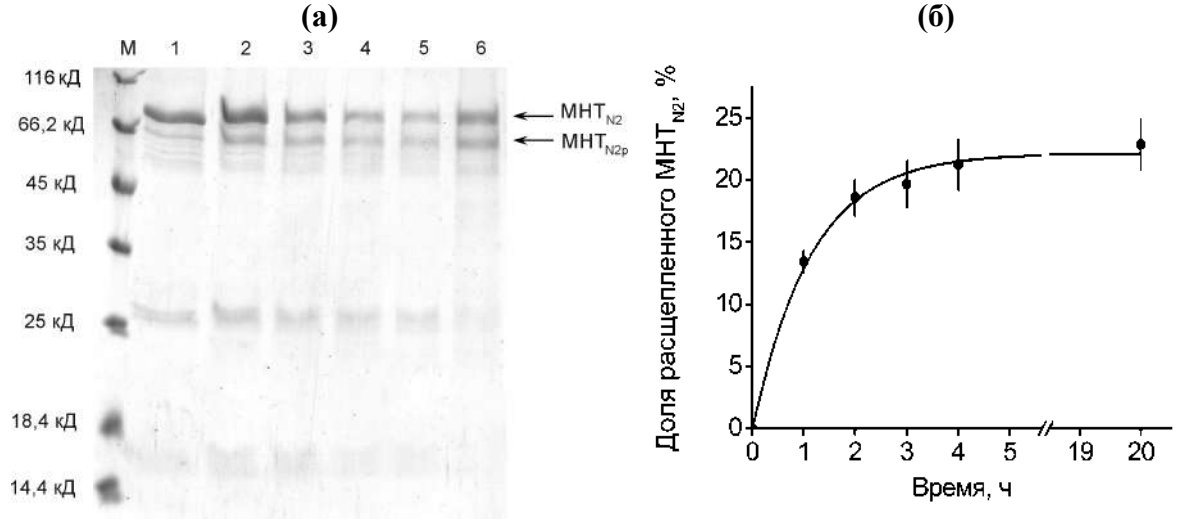


Рисунок 4.7.8. (а) Изучение расщепления сайта FKFL в $МНТ_{N2}$ (4 мкМ) катепсином B (4 мкг/мл) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Показаны образцы: 1 – $МНТ_{N2}$ без катепсина B; 2 – 1 час инкубации $МНТ_{N2}$ с катепсином B; 3 – 2 часа инкубации $МНТ_{N2}$ с катепсином B; 4 – 3 часа инкубации $МНТ_{N2}$ с катепсином B; 5 – 4 часа инкубации $МНТ_{N2}$ с катепсином B; 6 – 20 часов инкубации $МНТ_{N2}$ с катепсином B. M – белковые стандарты. $МНТ_{N2}$ – исходный $МНТ_{N2}$, $МНТ_{N2p}$ – расщепленный $МНТ_{N2}$. **(б) Кинетика расщепления $МНТ_{N2}$ (4 мкМ) эндосомной протеазой катепсином B (4 мкг/мл) при pH 5,5.** Показаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 4-5).

За деградацией N-белка удобно наблюдать по флуоресценции слитого с ним красного флуоресцентного белка mRuby3. Были получены линии клеток A549 и A431, стабильно трансфицированные плазмидой, кодирующей данный слитый белок. Эти клетки инкубировались с $МНТ_{N2}$ или $МНТ_{N1}$ различные промежутки времени, отмывались и с помощью проточной цитофлуориметрии автором определялась средняя флуоресценция mRuby3 на клетку. Зависимость данной флуоресценции от времени инкубации представлена на Рис. 4.7.9. Начиная с 15 часов инкубации, флуоресценция клеток была достоверно ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни) ниже в случае инкубации с $МНТ_{N2}$, чем с $МНТ_{N1}$ (Рис. 4.7.9). Таким образом, наличие в $МНТ_{N2}$ последовательности Keap1_E3PB, способной привлекать E3 лигазу Keap1, приводило к существенному уменьшению флуоресценции белка mRuby3, слитого с N-белком, что может указывать на деградацию N-белка.

Так как уменьшение флуоресценции mRuby3, слитого с N-белком, лишь косвенно указывает на его деградацию, относительное количество N-белка в клетках при их

инкубации с $МНТ_{N2}$ было также оценено по данным иммуноблоттинга (Рис. 4.7.10а и 4.7.10б). Интенсивности соответствующих полос были нормированы на концентрацию клеток и на интенсивность полосы, отвечающей клеткам, к которым не добавлялся $МНТ_{N2}$ (контроль). На Рис. 4.7.10в и 4.7.10г показано сравнение данных флуоресценции и иммуноблоттинга для клеток A549 и A431, соответственно. Видно, что относительные количества N-белка действительно сильно уменьшаются, особенно для линии клеток A431 (Рис. 4.7.10г), причем заметно быстрее, чем флуоресценция клеток. При 48 часах инкубации $МНТ_{N2}$ с клетками A549 и начиная с 15 часов его инкубации с клетками A431 данные иммуноблоттинга достоверно ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни) отличаются от данных флуоресценции. Таким образом, $МНТ_{N2}$ вызывает деградацию N-белка в клетках A549 и A431, стабильно трансфицированных плазмидой, кодирующей N-белок, слитый с mRuby3. Флуоресценция клеток также уменьшается, но не отражает всю долю N-белка, который подвергается деградации.

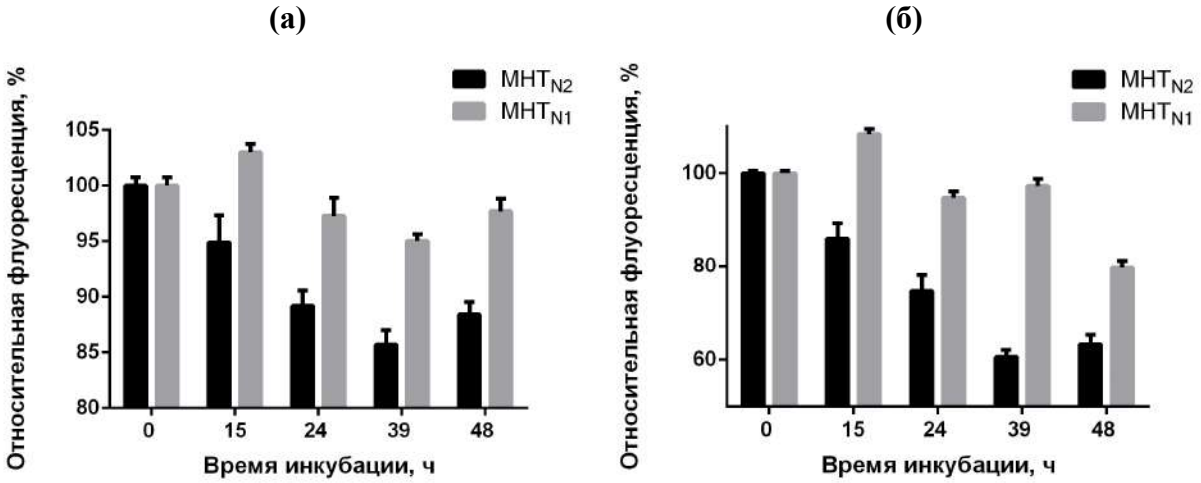


Рисунок 4.7.9. Относительная флуоресценция клеток A549 (а) и A431 (б) (за 100% принималась флуоресценция клеток, к которым не добавлялся МНТ) после того, как они инкубировались различные времена с 500 нМ $МНТ_{N2}$ или 500 нМ $МНТ_{N1}$. Показаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 5-19).

Чтобы понять, с чем связано отличие данных, полученных по флуоресценции клеток и с помощью иммуноблоттинга, был изучен возможный путь деградации N-белка. Для этого были выбраны известные ингибиторы протеосомной деградации, MG132 (Guo and Peng, 2013), и автофагии, Бафиломицин A1 (Li et al., 2016). На Рис. 4.7.11 видно, что для клеток A431 добавление MG132 вместе с $МНТ_{N2}$ не приводило к достоверному ингибированию деградации N-белка ($p > 0,05$, критерий Манна-Уитни). Напротив, добавление Бафиломицина A1 вместе с $МНТ_{N2}$ вызывало достоверное ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни) ингибирование деградации слитого белка N-mRuby3 (Рис. 4.7.11). Это указывает на то, что деградация N-mRuby3 протекает преимущественно по пути автофагии, а не по протеосомному пути. Известно, что убиквитинилирование белков

может приводить не только к их протеосомной деградации, но и к автофагии (Shaid et al., 2013; Takahashi and Arimoto, 2021; Jee and Cheong, 2023). Причем в результате автофагии флуоресцентные белки могут не подвергаться полной деградации (Matveenko et al., 2022). Наблюдаемые различия между данными флуоресценции и иммуноблоттинга (Рис. 4.7.10в и 4.7.10г) тогда можно объяснить сохранением флуоресценции у получающегося в результате деградации фрагмента mRuby3.

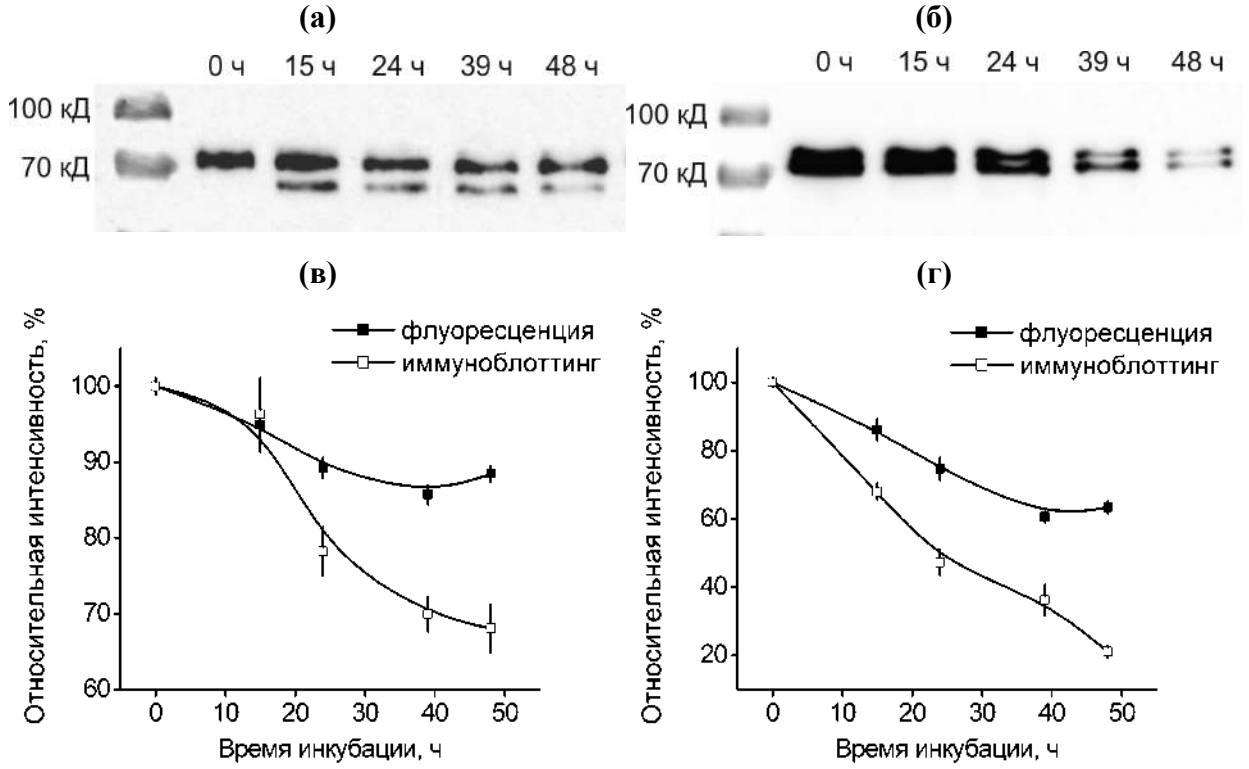


Рисунок 4.7.10. Иммуноблоттинг с антителами на N-белок для клеток A549 (а) и A431 (б), стабильно трансформированных плазмидой, кодирующей N-белок, слитый с mRuby3. Указаны времена инкубации клеток с 500 нМ $МНТ_{N2}$. **Относительная интенсивность флуоресценции или полосы иммуноблоттинга для N-белка в клетках A549 (в) и A431 (г) (за 100% принималась интенсивность флуоресценции или полосы иммуноблоттинга для клеток, к которым не добавлялся МНТ) после того, как они инкубировались различные времена с 500 нМ $МНТ_{N2}$.** Данные иммуноблоттинга были нормированы на концентрацию клеток в образце. Показаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 6-19).

Объемы клеток A549 и A431 и их ядер определялись, как это описано в «Материалах и методах». По 69-87 изображений открепленных от подложки клеток были получены следующие значения: объёмы клеток – 1814 ± 87 и 1450 ± 37 мкм^3, объемы ядер – 374 ± 28 и 160 ± 7 мкм^3, для клеток A549 и A431, соответственно. Слитый белок N-mRuby3 находился преимущественно в цитоплазме, объемы которой составляли 1439 ± 91 и 1289 ± 38 мкм^3, для клеток A549 и A431, соответственно. Эти данные использовались в дальнейшем для оценки концентрации N-mRuby3 в цитоплазме.

Клетки A549 и A431 снимались с подложки, центрифугировались и суспендировались в фосфатном буфере (pH 8,0), содержащем коктейль ингибиторов протеаз cOmplete. На проточном цитофлуориметре MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec GmbH, Франция) измерялись концентрации клеток в изучаемых образцах. Клетки были лизированы тремя циклами замораживания в жидком азоте-оттаивания при 37ºC. При этом N-белок выходил из клеток и распределялся по всему объему образца. По полученным концентрациям клеток и объемам их цитоплазмы было получено отношение объема образца к суммарному объему цитоплазмы всех клеток, названное коэффициентом разбавления. Этот коэффициент, полученный по 3-4 образцам с разной концентрацией клеток, составлял 126–280 и 197–371 для клеток A549 и A431, соответственно.

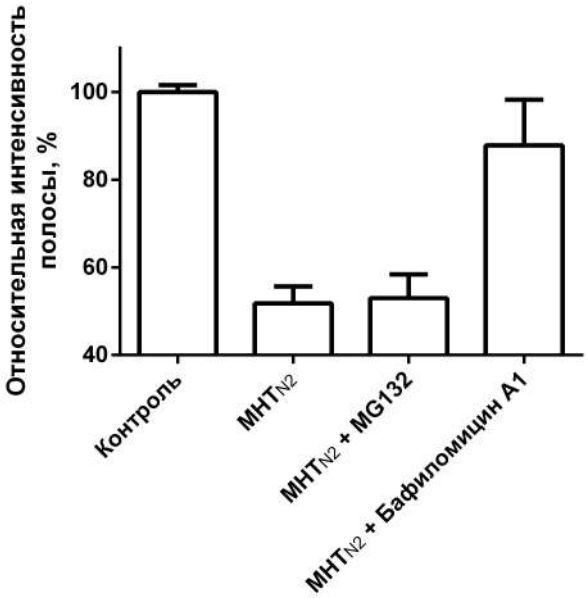


Рисунок 4.7.11. Влияние MG132 и Бафиломицина A1 на вызванную $МНТ_{N2}$ деградацию N-белка. Указана относительная интенсивность полосы иммуноблоттинга для N-белка для клеток A431 (за 100 % была принята интенсивность полосы иммуноблоттинга для N-белка в клетках, к которым добавлялся только соответствующий ингибитор, но не добавлялся МНТ), которые инкубировались 24 часа с 500 нМ $МНТ_{N2}$, 500 нМ $МНТ_{N2}$ с 5 мкМ MG132 или 500 нМ $МНТ_{N2}$ с 100 нМ Бафиломицина A1. Данные иммуноблоттинга нормированы на концентрацию клеток в образце. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 8–15).

Оценка концентрации белка N-mRuby3 в лизатах клеток A549 и A431 проводилась автором диссертации с использованием растворов N-белка с заданными концентрациями. Тогда с помощью иммуноблоттинга по калибровочным зависимостям определялась концентрация N-белка в лизатах изучаемых клеток. Зная эти концентрации и коэффициенты разбавления N-mRuby3 при лизисе, были оценены концентрации N-mRuby3 в цитоплазме данных клеток. Они составили 19,0 ± 1,3 и 9,0 ± 1,8 мкМ, для клеток A549 и A431, соответственно.

Используя данные иммуноблоттинга, представленные на Рис. 4.7.10в и 4.7.10г, а также оцененные концентрации белка N-mRuby3 в цитоплазме, были построены зависимости уменьшения концентрации N-белка в результате его деградации, от времени инкубации $МНТ_{N2}$ с клетками A431 и A549 (Рис. 4.7.12). Оказалось, что полученнные для этих двух клеточных линий зависимости практически одинаковы. Иными словами, скорость деградации N-белка для клеток A431 и A549 была приблизительно одной и той же и составляла 130-160 нМ в час.

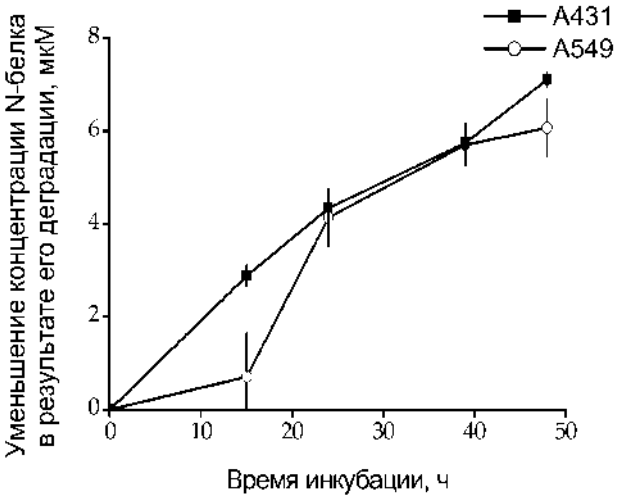


Рисунок 4.7.12. Зависимость уменьшения концентрации N-белка в клетках в результате его деградации от времени инкубации $МНТ_{N2}$ (500 нМ) с клетками A549 и A431, стабильно трансформированными плазмидой, кодирующей N-белок, слитый с mRuby3. Доля деградированного N-белка вычислялась по данным иммуноблоттинга. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 6–19).

Итак, были получены МНТ, содержащие последовательность, привлекающую E3 лигазу Keap1, а также антителоподобную молекулу, монободи NC2, к N-белку вируса SARS-CoV-2. Все модули в составе полученного МНТ сохраняли свою функциональную активность. Данный МНТ содержит сайт отщепления монободи с последовательностью для E3 лигазы от МНТ эндосомальной протеазой катепсином B, что в клетках может существенно повышать сродство этого монободи к N-белку. Разработанные МНТ показали способность индуцировать деградацию выбранного вирусного белка в клетках со стабильной экспрессией этого белка. Предполагается, что в будущем подобные МНТ могут быть использованы не только для лечения SARS-CoV-2, но и других родственных вирусных заболеваний. Выбирая антителоподобную молекулу к нужному вирусному белку, а также желаемый интернализуемый лиганд для связывания с клетками-мишенями, применение подобных МНТ может быть распространено на широкий спектр вирусных заболеваний.

Основные результаты, изложенные в п. 4.7.2, были опубликованы в статьях автора с соавторами: 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. – V. 16. – №. 4 (вклад автора состоит как в проведении основной части экспериментальных работ, таких как работы, проведенные с помощью термофореза, микроскопии, проточной цитофлуориметрии и иммуноблоттинга, так и в общем планировании работы, анализе полученных результатов, их обсуждении и участии в написании основного текста); Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Modular nanotransporters capable of causing intracellular degradation of the N-protein of the SARS-CoV-2 virus in A549 cells with temporary expression of this protein fused with a fluorescent protein mRuby3 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2023. – V. 513. – Suppl. 1. – P. S60–S62 (вклад автора состоит как в проведении экспериментальных работ, таких как изучение связывание методом термофореза и изучении деградации методом проточной цитофлуориметрии, так и планировании всех экспериментов, анализе полученных результатов и написании всего текста); Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Quantitative description of the N-protein of the SARS-CoV-2 virus degradation in cells stably expressing it under the influence of new modular nanotransporters // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2023. – V. 513. – Suppl. 1. – P. S63–S66 (вклад автора состоит как в проведении экспериментальных работ, таких как оценка концентрации белка методом иммуноблоттинга и изучение скорости его деградации методом проточной цитофлуориметрии, так и планировании всех экспериментов, анализе полученных результатов и написании всего текста). Автор признателен всем соавторам этих статей, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.7.3. МНТ, способные вызывать деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2 независимо от типа клеток

МНТ, описанный в предыдущем параграфе, способен вызывать деградацию N-белка вируса SARS-CoV-2 только в клетках, имеющих на своей поверхности РЭФР. Однако далеко не все типы клеток, подверженные инфицированию данным вирусом, имеют эти рецепторы. Поэтому возникла задача создать МНТ, способные неспецифически, т.е. не зависимо от конкретных рецепторов, проникать в клетки. Для этого автором диссертационной работы было предложено заменить лигандный модуль и эндосомолитический модуль на проникающий в клетку пептид, CPP, и эндосомолитический пептид. В этом плане весьма привлекательным является так называемый шаттл-пептид S10, который включает в себя CPP и катионный эндосомолитический пептид для выхода доставляемых конструкций из эндосом (Krishnamurthy et al., 2019). Было показано, что данные шаттл-пептиды способны доставлять крупные (десятки кДа) белки в клетки в случае их одновременного введения с этими белками.

Прежде всего, стояла задача проверить способность S10 доставлять монободи к N-белку вируса SARS-CoV-2 в случае, когда они находятся в составе одного МНТ. Для этого было выбрано монободи Fn-N15, описанное в пункте 4.7.1. МНТ состава S10-Fn-N15 сравнивали с МНТ состава TAT-Fn-N15, где TAT – широко применяемый CPP TAT-пептид. Определенные с помощью метода термофореза равновесные константы диссоциации комплексов S10-Fn-N15 и TAT-Fn-N15 с N-белком вируса SARS-CoV-2 составили 700 ± 270 и 46 ± 5 нМ, соответственно. Для свободного Fn-N15 аналогичная константа диссоциации составляла 24 ± 4 нМ. Таким образом, как присоединение TAT-пептида, так и присоединение S10-пептида приводит к уменьшению сродства монободи к N-белку, причем это ухудшение наиболее выражено для катионного пептида S10.

Взаимодействие полученных МНТ с N-белком автор диссертации изучал методом CETSA на клетках HEK293T, временно трансформированных N-белком, слитым с флуоресцентным белком mRuby3, так, как это описано в «Материалах и методах». При этом использовался вариант метода CETSA, в котором фиксируется температура, до которой нагреваются образцы клеток, а варьируется концентрация добавляемого белка. Образцы клеток с различной концентрацией изучаемого МНТ делились на четыре аликвоты, одну из которых не грели, а остальные нагревали до температур 45, 50 или 55 °C в течение 3 минут. Все аликвоты клеток лизировали, центрифугировали для отделения от клеточных остатков и денатурированных белков, а затем измеряли флуоресценцию каждого из супернатантов с помощью прибора для термофореза Monolith NT.115 Series

(«NanoTemper Technologies GmbH», Германия). Последняя позволяла определить относительную концентрацию неденатурированного N-белка, слитого с mRuby3. Типичный пример зависимости относительной флуоресценции от концентрации добавленного МНТ представлен на Рисунке 4.7.13а. Интерполяция данной зависимости сигмовидной кривой позволила при любой концентрации МНТ и выбранной температуре определить долю комплекса МНТ с N-белком: Δ/Δ_t, где Δ_t – амплитуда перехода (Рис. 4.7.13а). Эту долю линейно экстраполировали до температуры 37 °C (Рис. 4.7.13б), а затем получали зависимость доли комплекса МНТ с N-белком от концентрации МНТ вне клеток при физиологических температурах (Рис. 4.7.13в). Данные кривые позволили определить, что EC_{50} = 10,1 ± 0,8 и 3,5 ± 0,8 мкМ для TAT-Fn-N15 и S10-Fn-N15, соответственно.

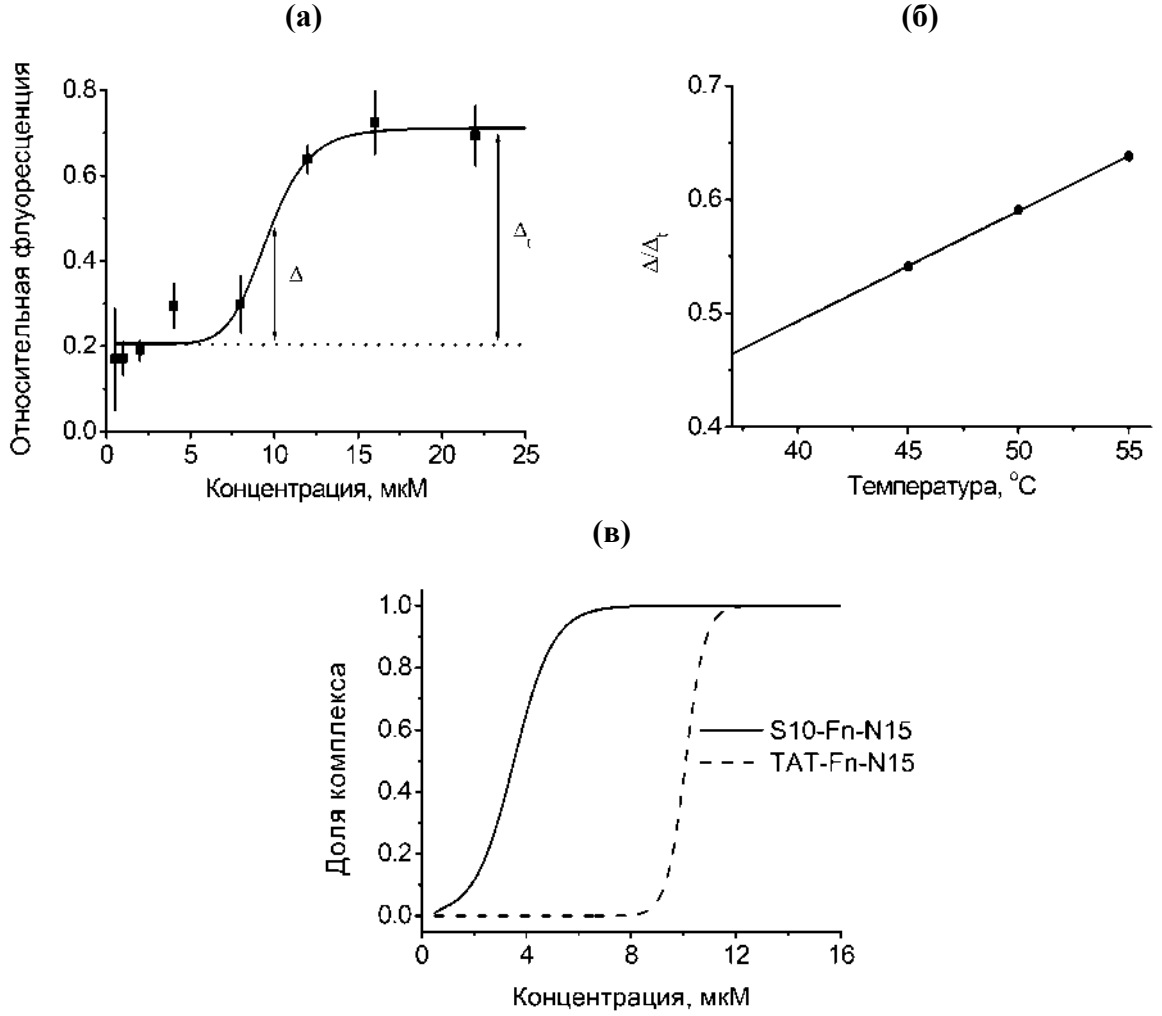


Рисунок 4.7.13. (а) Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (по отношению к флуоресценции образца, не подвергающегося нагреванию) клеток HEK293T, временно трансформированных N-белком, слитым с mRuby3, от концентрации TAT-Fn-N15, полученная при нагревании образцов 3 минуты до 50 °C. (б) Зависимость отношения доли комплекса TAT-Fn-N15 с N-белком, Δ, к амплитуде перехода, Δ_t, от температуры при 10 мкМ TAT-Fn-N15. (в) Зависимости доли комплекса S10-Fn-N15 или TAT-Fn-N15 с N-белком от концентрации МНТ вне клеток при физиологических температурах.

Таким образом, не смотря на то, что сродство S10-Fn-N15 к N-белку в 15 раз ниже, чем TAT-Fn-N15, в клетках эффективность конструкции S10-Fn-N15 втрое выше, чем TAT-Fn-N15. Иными словами, S10 способен осуществлять внутриклеточную доставку слитых конструкций более чем на порядок эффективнее, чем TAT-пептид.

Для деградации N-белка автором диссертации был выбран МНТ, в состав которого кроме S10 входило монободи NC2, используемое в пункте 4.7.2. Оно обладает наибольшим сродством к данному белку среди всех изученных нами монободи. Чтобы уменьшить негативное влияние S10 на сродство данного монободи к N-белку, между ними был введен сайт FKFL для расщепления эндосомной протеазой катепсином B. Для деградации N-белка в состав этого МНТ была включена привлекающая E3-лигазу Keap1 последовательность DPETGEYL (Keap1_E3PB). Таким образом, изучался МНТ следующего состава: S10-FKFL-Keap1_E3PB-NC2, который был назван $МНТ_{S10}$.

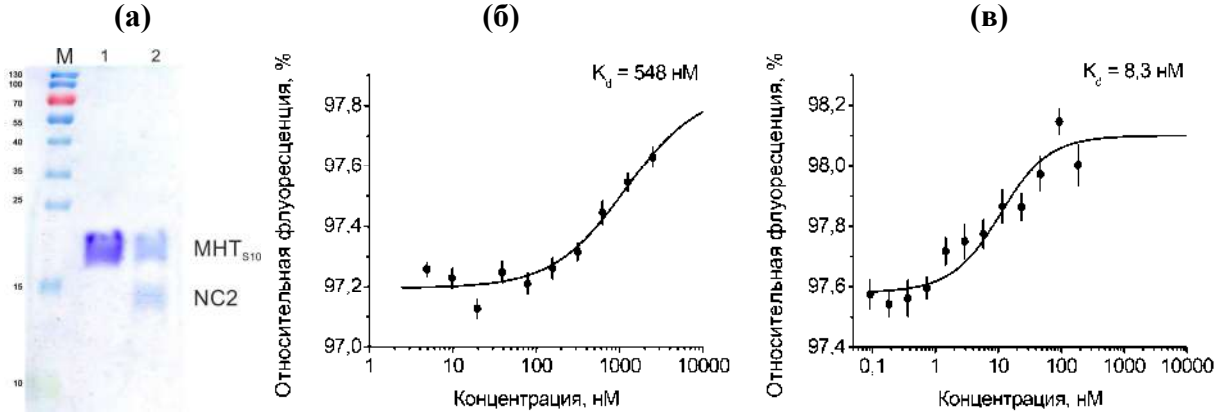


Рисунок 4.7.14. Изучение расщепления сайта FKFL в $МНТ_{S10}$ (22,6 мкМ) катепсином B (4 мкг/мл) с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Показаны образцы: 1 – $МНТ_{S10}$ без катепсина B; 2 – 2,5 часа инкубации $МНТ_{S10}$ с катепсином B; M – белковые стандарты (значения приведены в кДа). $МНТ_{S10}$ – исходный $МНТ_{S10}$, NC2 – отщепленное от $МНТ_{S10}$ монободи NC2. **Кривая титрования N-белка-ATTO647 (5 нМ) возрастающей концентрацией $МНТ_{S10}$ (б) или отщепленного от $МНТ_{S10}$ монободи NC2 (в) при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса N-белка с $МНТ_{S10}$ или монободи NC2.** Черными кривыми показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью. Время измерения флуоресценции после начала термофореза – 20 сек. Указана равновесная константа диссоциации комплекса МНТ с N-белком, K_d. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 10–25).

Способность монободи NC2 в составе $МНТ_{S10}$ взаимодействовать с N-белком в растворе была изучена автором диссертации методом термофореза. По полученной термофоретической кривой (Рис. 4.7.14б) была определена равновесная константа диссоциации комплекса $МНТ_{S10}$ с N-белком, которая составила 548 ± 48 нМ (± стандартная ошибка). Инкубация $МНТ_{S10}$ (22,6 мкМ) с активированным катепсином B (4 мкг/мл) в течении 2,5 часов приводила к ращеплению 30 ± 4 % данного МНТ (Рис. 4.7.14а). Используя эту долю для определения реальной концентрации монободи NC2 в

растворе, была определена соответствующая константа диссоциации: 8,3 ± 3,7 нМ (± стандартная ошибка) (Рис. 4.7.14в). Таким образом, монободи NC2 в составе $МНТ_{S10}$ сохраняла свою функциональную активность и его отщепление от $МНТ_{S10}$ в 66 раз увеличивало его сродство к N-белку.

Известно, что S10 при достаточно высоких концентрациях (десятки микромолей на литр) является токсичным (Greschner et al., 2023). Это связано с тем, что он способен разрушать не только эндосомы, но и лизосомы, вызывая при этом апоптоз. Поэтому, прежде всего, с помощью проточной цитофлуориметрии были изучены доля живых клеток (не прокрашенных пропидий иодидом и красителем на апаптоз – анексином V) и относительная концентрация живых клеток линии Vero при различных концентрациях $МНТ_{S10}$ (Рис. 4.7.15). Первая указывает на токсичность данного МНТ, а вторая – на антипролиферативную активность. При концентрациях $МНТ_{S10}$ 5 мкМ и ниже заметного токсического эффекта не наблюдалось (доля клеток, прокрашенных пропидий иодидом и анексином V меньше 1%). Концентрация $МНТ_{S10}$ 1 мкМ была выбрана в качестве рабочей, т.к. при ней не наблюдалось заметного антипролиферативного действия (Рис. 4.7.15).

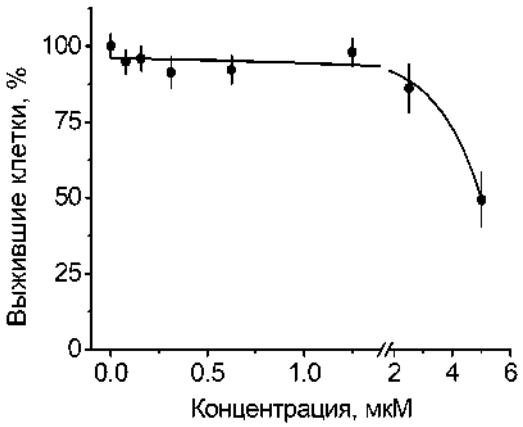


Рисунок 4.7.15. Зависимость концентрации живых клеток Vero от концентрации добавленного $МНТ_{S10}$ (за 100% принималась концентрация клеток, к которым не добавлялся МНТ). $МНТ_{S10}$ добавляли за 48 часов до измерения. Показаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 6-12). Показана интерполяция экспериментальных данных сигмовидной кривой.

За деградацией N-белка наблюдали как по данным флуоресценции слитого с ним красного флуоресцентного белка mRuby3, так и по данным иммуноблоттинга (Рис. 4.7.16). Была получена линия клеток Vero, стабильно экспрессирующая данный слитый белок. Эти клетки инкубировались с $МНТ_{S10}$ различные промежутки времени, отмывались и с помощью проточной цитофлуориметрии, определялась средняя флуоресценция mRuby3 на клетку и нормированная на концентрацию клеток интенсивность соответствующей полосы иммуноблоттинга. Зависимости флуоресценции и относительной полосы

иммуноблоттинга от времени инкубации представлены на Рисунке 4.7.16. Для ряда временных точек по критерию Краскела-Уоллиса наблюдалось достоверное падение, как флуоресценции клеток, так и относительной интенсивности полосы иммуноблоттинга (Рис. 4.7.16), что указывает на деградацию N-белка, слитого с mRuby3.

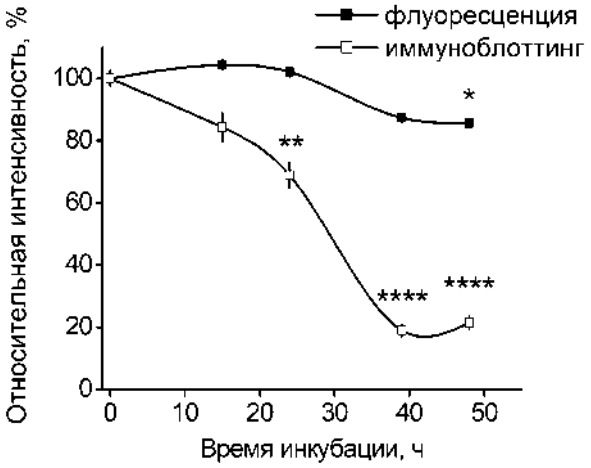


Рисунок 4.7.16. Относительная интенсивность флуоресценции или полосы иммуноблоттинга для N-белка в клетках Vero, постоянно экспрессирующих N-белок слитый с флуоресцентным белком mRuby3 (за 100% принималась интенсивность флуоресценции или полосы иммуноблоттинга для клеток, к которым не добавлялся МНТ) после того, как они инкубировались различные времена с 1 мкМ $МНТ_{S10}$. Данные иммуноблоттинга были нормированы на концентрацию клеток в образце. Показаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 6-11). Показана достоверность отличия от контроля по критерию Краскела-Уоллиса (*p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001). Эксперименты проведены совместно с Т.Н. Лупановой.

Объемы клеток Vero и их ядер определялись автором диссертации, как это описано в пункте 4.7.2 и «Материалах и методах». Было получено, что объём этих клеток составлял 1467 ± 18 мкм^3, а объем ядер – 258 ± 18 мкм^3. Оцененная с помощью иммуноблоттинга и калибровочных растворов N-белка концентрация N-mRuby3 в цитоплазме клеток Vero составила 9,7 ± 0,6 мкМ. Это совпадает с концентрацией N-mRuby3 в цитоплазме клеток A431 (9,0 ± 1,8 мкМ). Оцененная по данным рисунка 4.7.16 средняя скорость деградации N-белка в клетках Vero составляла 167 ± 15 нМ/ч (ДИ, 126–207 нМ/ч). Для клеток A431 эта скорость деградации была 154 ± 7 нМ/ч (ДИ, 135–173 нМ/ч). Совпадение скоростей деградации для различных клеток и МНТ разного строения указывает на то, что при добавлении к клеткам 1 мкМ $МНТ_{S10}$ его эффективная цитозольная концентрация выше концентрации Keap1, т.е. данный МНТ достаточно хорошо проникает в клетку и выходит из эндосом.

Используя эти данные, совместно с лабораторией экспериментальной вирусологии (заведующая И. А. Ленева) Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН были проведены эксперименты по изучению влияния

$МНТ_{S10}$ на репродукцию вируса SARS-CoV-2 (штамм Wuhan 2019) в клетках линии Vero. Учитывая, что после 1,5 суток деградация под действием $МНТ_{S10}$ больше не наблюдалось (Рис. 4.7.16) был сделан вывод об отстутсвии $МНТ_{S10}$ в клетках к этому времени. Поэтому эксперимент ставился следующим образом. К клеткам Vero за два часа до добавления вируса добавлялся 1 мкМ $МНТ_{S10}$. Спустя одни, двое и трое суток после заражения клеток вирусом делали без отмывки повторные добавления $МНТ_{S10}$ в конечной концентрации 1 мкМ. Спустя четверо суток смотрели выживаемость клеток с помощью МТТ теста. Противовирусное действие препарата часто смотрят по увеличению тканевой цитопатической дозы вируса, вызывающей 50% гибель клеток, $ТЦД_{50}$ (Миронов и др., 2012). Было показано, что при воздействии $МНТ_{S10}$ на клетки Vero, зараженные SARS-CoV-2, Δ lg $ТЦД_{50}$ = 5,6 ± 0,4. Иными словами, наблюдалось ингибирование репродукции вируса в 407 ± 29 тысяч раз. Однократное применение 1 мкМ $МНТ_{S10}$ приводило к ингибированию репродукции вируса в 188 ± 38 раз.

Таким образом, получен МНТ, способный не только приводить к деградации нуклеокапсидного белка вируса SARS-CoV-2 вне зависимости от наличия определенного типа рецепторов на поверхности выбранных клеток-мишеней, но и вызывать подавление репродукции данного вируса в сотни тысяч раз.

Основные результаты, касающиеся доставки с помощью S10, были опубликованы в статье автора с соавторами: Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Delivery of antibody-like molecules, monobodies, capable of binding with SARS-CoV-2 virus nucleocapsid protein, into target cells // Dokl. Biochem. Biophys. - 2022. - V. 506. - P. 220–222 (вклад автора состоит как в проведении экспериментальных работ, таких как изучение связывание методом термофореза и изучении взаимодействия методом CETSA, так и планировании всех экспериментов, анализе полученных результатов и написании всего текста). Автор признателен всем соавторам этой статьи, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.8. Способы повышения эффективности доставки МНТ *in vivo*

4.8.1. Подходы к увеличению накопления МНТ в опухоли

Для направленной доставки молекул в клетки опухоли кроме клеточных барьеров этим молекулам необходимо еще преодолеть целый ряд барьеров на уровне организма. В первую очередь это касается поступления данных молекул из кровотока в опухоль. Непосредственно улучшения накопления молекул в опухоли можно достигнуть с помощью различных подходов. Так, например, для этого можно воспользоваться нитроглицериновой мазью, наносимой на поверхность опухоли (Durymanov et al., 2016). Это не только уменьшает скорость кровотока в опухоли за счет расширения сосудов, но и непосредственно увеличивает проницаемость сосудов опухоли (Thibeault et al., 2010; Durymanov et al., 2016). Оба этих фактора улучшают накопление доставляемых молекул в опухоли. Доставляемые молекулы теоретически могут связываться с компонентами крови и в не целевых органах/тканях, что сильно может сказываться на времени их циркуляции в кровотоке. В то время как, известно, что для увеличения накопления молекул в целевых органах и тканях необходимо увеличить их время циркуляции в кровотоке (Roberts et al., 2002; Kontermann, 2011; Thurber and Dane, 2012; Pfister and Morbidelli, 2014). Одним из способов увеличения этого времени является присоединение к этим молекулам молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые с одной стороны, уменьшают взаимодействие доставляемых молекул с компонентами крови, а с другой стороны увеличивают их молекулярную массу, тем самым, способствуя уменьшению скорости их выведения из кровотока (Roberts et al., 2002; Pfister and Morbidelli, 2014).

Для оптимизации накопления МНТ в опухоли нами было использовано несколько различных подходов: присоединение к МНТ молекул ПЭГ с разной молекулярной массой, добавление нитроглицерина, а также уменьшение неспецифических взаимодействий за счет одновременного введения МНТ с более чем 1000 кратным избытком МНТ без лиганда. Все используемые МНТ были помечены радиоактивным изотопом ^{111}In, и изучение распределения их в органах и тканях мышей производилось с помощью некропсии, как это описано в «Материалах и методах», п. 3.24. Накопление МНТ в опухолях и органах лабораторных животных изучалось через час после введения МНТ и получалось в процентах от введенной дозы на грамм ткани (Рис. 4.8.1). Видно, что по мере увеличения молекулярной массы присоединенного к МНТ ПЭГ увеличивалось накопление МНТ в опухоли (меланома Клаудмана S91, клон M3) (Рис. 4.8.1а). Причем, для МНТ-ПЭГ 40 кДа увеличение накопления в опухоли по сравнению с МНТ без ПЭГ статистически достоверно (p = 0,0152, критерий Колмогорова-Смирнова). Применение нитроглицерина не оказывало достоверного эффекта на накопление в опухоли (p = 0,586,

критерий Колмогорова-Смирнова). Напротив, использование избытка МНТ без лиганда достоверно увеличивало накопление МНТ-ПЭГ 10 кДа в опухоли (p = 0,0041, критерий Колмогорова-Смирнова).

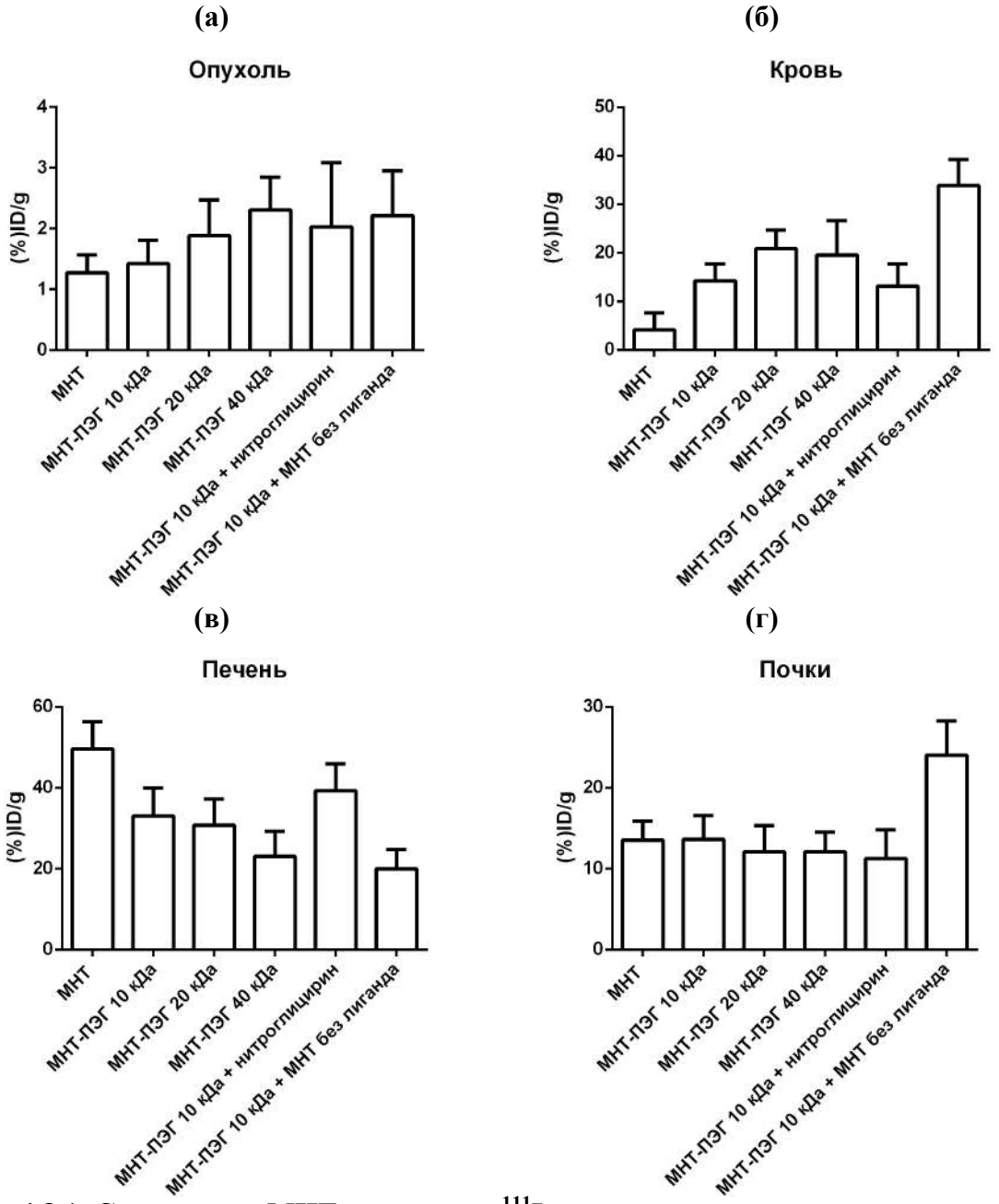


Рисунок 4.8.1. Содержание МНТ, меченного ^{111}In, в опухолях и органах мышей через 1 ч после введения в процентах от введенной дозы на грамм ткани (ID/g). Объем опухоли не превышал 0,6 мл. Указаны средние значения ± среднеквадратичное отклонение. Данные получены совместно с Уласовым А.В.

Пришивка ПЭГ к МНТ заметно увеличивала время жизни МНТ в крови, что выражалось увеличением ID/g на 1 час после введения (Рис. 4.8.1б). Причем это увеличение для МНТ с ПЭГ различной молекулярной массы статистически достоверно отличается от МНТ без ПЭГ (p < 0,01, критерий Колмогорова-Смирнова). Применение нитроглицерина не оказывало достоверного эффекта на содержание МНТ-ПЭГ 10 кДа в

крови (p = 0,302, критерий Колмогорова-Смирнова). В то время как использование избытка МНТ без лиганда достоверно увеличивало содержание МНТ-ПЭГ 10 кДа в крови (p < 0,0001, критерий Колмогорова-Смирнова).

Возрастание времени жизни в крови при пришивке ПЭГ к МНТ сопровождалось уменьшением накопления МНТ в печени (Рис. 4.8.1в). При этом данное уменьшение накопления МНТ-ПЭГ статистически достоверно отличалось от накопления МНТ без ПЭГ (p < 0,01, критерий Колмогорова-Смирнова). Использование избытка МНТ без лиганда тоже достоверно (p < 0,01, критерий Колмогорова-Смирнова) уменьшало накопление МНТ-ПЭГ 10 кДа в печени. Напротив, применение нитроглицерина не оказывало достоверного эффекта на накопление МНТ-ПЭГ 10 кДа в печени (p = 0,5131, критерий Колмогорова-Смирнова).

Пришивка ПЭГ к МНТ не сказывалось на накоплении МНТ в почках (Рис. 4.8.1г). Аналогично, нитроглицерин тоже не влиял на это накопление. Однако, по не установленной пока причине, при использовании избытка МНТ без лиганда наблюдалось достоверное (p < 0,005, критерий Колмогорова-Смирнова) увеличение накопления МНТ-ПЭГ 10 кДа в почках.

Таким образом, установлено, что наиболее перспективными из всех изученных способов увеличения накопления МНТ в опухоли являются присоединение к МНТ ПЭГ молекулярной массой 40 кДа, а также совместное введение МНТ с 1000 кратным избытком МНТ без лиганда. Эти способы позволяют заметно уменьшить накопление в нецелевом органе – печени, а также существенно увеличить время жизни МНТ в крови. В присутствии избытка МНТ без лиганда вероятно уменьшаются неспецифические взаимодействия изучаемого МНТ в нецелевых огранах и тканях. В то время как ПЭГ, в силу своих размеров, может лучше всего экранировать от этих взаимодействий только часть молекулы МНТ, находящейся рядом с ПЭГ, т.е. модуль ДТокс. Наиболее полно это экранирование осуществлялось 40 кДа ПЭГ. При этом накопление в печени МНТ-ПЭГ 40 кДа не отличалось достоверно (p = 0,468, критерий Колмогорова-Смирнова) от МНТ-10 кДа с избытком МНТ без лиганда (Рис. 4.8.1в). Таким образом, можно предположить, что именно ДТокс отвечает за неспецифические взаимодействия МНТ в печени. Поэтому одними из возможных способов уменьшения накопления МНТ в печени и увеличения его времени жизни в крови являются либо экранирование ДТокс с помощью ПЭГ, либо замена этого модуля на другой со сходными мембранолитическими функциями, но не обладающий данными неспецифическими взаимодействиями.

Основные результаты, изложенные в п. 4.8.1, были опубликованы в статье автора с соавторами: 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2018. – V. 478. – P. 55-57 (вклад автора состоит как в проведении экспериментальных работ, таких как анализ распределения МНТ в органах и тканях мышей, так и планировании экспериментов, анализе полученных результатов и написании всего текста). Автор признателен всем соавторам этой статьи, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.8.2. Математическая модель, описывающая накопление МНТ в опухоли

Кинетику накопления МНТ в крови и опухолях мышей изучали с помощью метода однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) на приборе, предназначенном для измерения мелких лабораторных животных (Рис. 4.8.2). Получение и обработка данных проводились, как описано в «Материалах и методах», п. 3.25. В качестве МНТ выступали МНТ без ПЭГ (состав ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ) и МНТ с присоединенным ПЭГ молекулярной массой 40 кДа с возможностью (МНТ-ПЭГ) и без возможности отщепления ПЭГ (МНТ-ПЭГ$_н$) опухолеспецифичными протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA). Для отщепления ПЭГ между этой молекулой и модулем ДТокс в МНТ вводился сайт LSGRSDNH (Desnoyers et al., 2013). Анатомическая привязка биораспределения МНТ, меченного ^{111}In, в организме мыши осуществлялась с помощью рентгеновской компьютерной томографии (КТ) (Рис. 4.8.2).

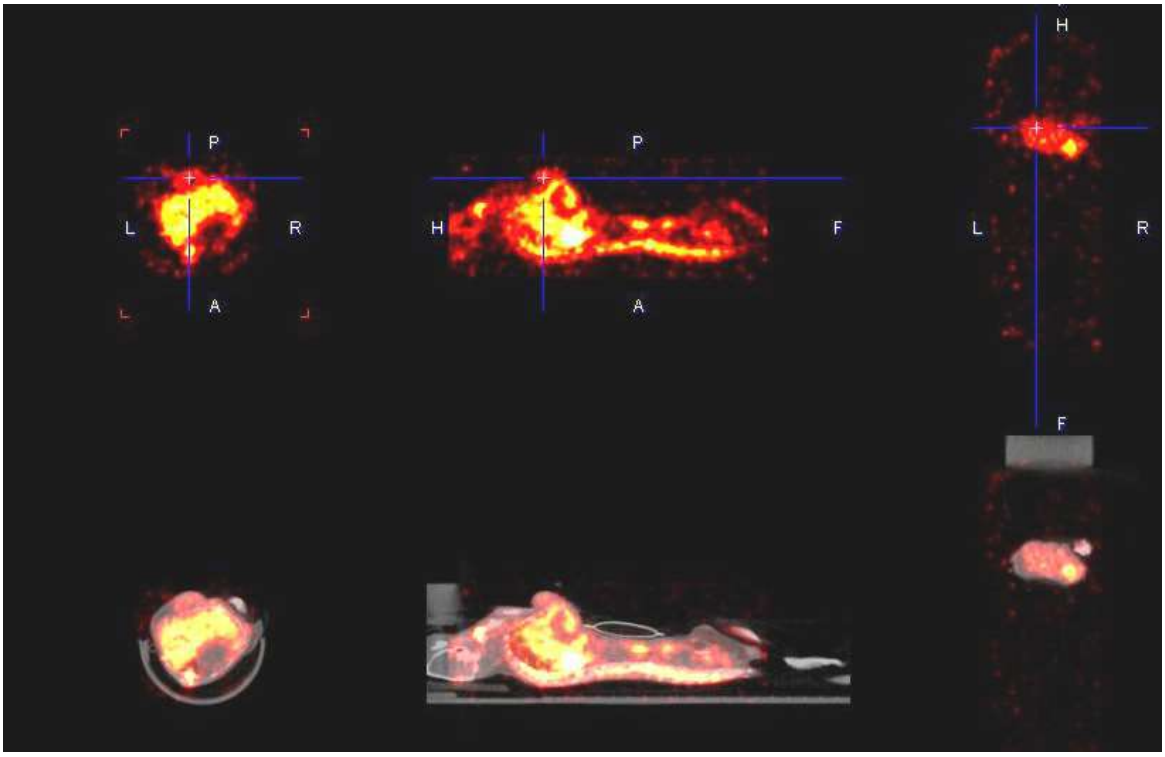
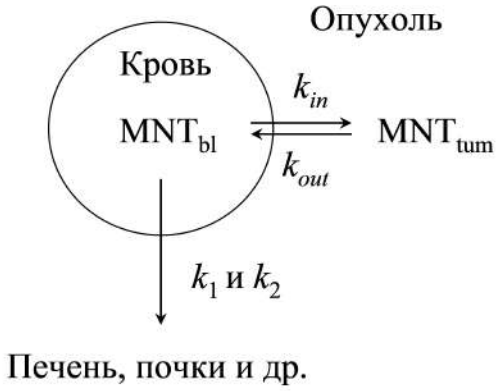


Рисунок 4.8.2. Пример полученного методом ОФЭКТ биораспределения МНТ, меченного ^{111}In, в органах и тканях мышей при системном применении МНТ. Внизу рисунка показано наложение распределения МНТ на данные компьютерной томографии. Синим крестиком указано расположение опухоли. Получено совместно с Уласовым А.В. и Сластниковой Т.А.

Известно, что накопление молекул в органах и тканях в зависимости от их содержания в крови удобно описывать простыми компартментными моделями, где каждый орган, ткань или кровь рассматриваются как отдельный компартмент, в который молекулы поступают и выходят с определенными константами скоростей (Thurber and Dane, 2012). Модель сходного типа была использована автором диссертации для описания

процесса поступления МНТ (МНТ без ПЭГ, МНТ-ПЭГ и МНТ-ПЭГ$_н$) из кровотока в опухоль (Рис. 4.8.3). Концентрация МНТ в крови была обозначена MNT_{bl} (Рис. 4.8.3). Эта модель описывает стандартные процессы обмена между кровью и опухолью. Обычно концентрация белка в крови хорошо описывается суммой двух экспонент (Thurber and Dane, 2012), где 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 (Рис. 4.8.3). Концентрация МНТ в опухоли была обозначена MNT_{tum} (Рис. 4.8.3). Константы скорости входа МНТ в опухоль и выхода из опухоли обозначены k_{in} и k_{out}, соответственно (Рис. 4.8.3).



$$MNT_{bl} = MNT_{bl01} \cdot e^{-k_1 \cdot t} + MNT_{bl02} \cdot e^{-k_2 \cdot t}$$

Рисунок 4.8.3. Математическая модель, описывающая накопление МНТ, МНТ-ПЭГ и МНТ-ПЭГ$_н$ в опухолях мышей. Описание модели и используемых параметров дано в тексте.

Для данной модели изменение концентрации МНТ в опухоли описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{dMNT_{tum}}{dt} = k_{in} \cdot MNT_{bl} - k_{out} \cdot MNT_{tum} \qquad (4.8.1),$$

где концентрация МНТ в крови задается выражением:

$$MNT_{bl} = MNT_{bl01} \cdot e^{-k_1 \cdot t} + MNT_{bl02} \cdot e^{-k_2 \cdot t} \qquad (4.8.2),$$

где MNT_{bl01} и MNT_{bl02} – соответствующие вклады экспонент.

Из выражений (4.8.1) и (4.8.2), принимая во внимание начальные условия, мы получили, что концентрация МНТ в опухоли описывается следующим выражением:

$$MNT_{tum} = \frac{MNT_{bl01} \cdot k_{in}}{k_{out} - k_1} \cdot \left(e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_{out} \cdot t}\right) + \frac{MNT_{bl02} \cdot k_{in}}{k_{out} - k_2} \cdot \left(e^{-k_2 \cdot t} - e^{-k_{out} \cdot t}\right) \qquad (4.8.3).$$

При обработке данных, полученных по методу ОФЭКТ, следует иметь в виду, что получаемое значение измеряемого содержания МНТ в опухоли отражает не только накопление МНТ в ткани опухоли, но и в кровеносных сосудах опухоли. Для учета вклада

крови введен параметр α – объемная доля крови в опухоли. Тогда накопление в опухоли, полученное методом ОФЭКТ, $MNT_{tum\ SPECT}$, будет задаваться выражением:

$$MNT_{tum\,SPECT} = (1-\alpha)\cdot MNT_{tum} + \alpha \cdot MNT_{bl} \quad (4.8.4),$$

где MNT_{tum} и MNT_{bl} задаются выражениями (4.8.3) и (4.8.2), соответственно. Интерполяция выражениями (4.8.2), (4.8.3) и (4.8.5) полученных кинетических зависимостей накопления МНТ в крови и опухолях изученных животных показала, что в среднем $\alpha = 8{,}8 \pm 1{,}7$ %. При этом следует отметить, что в течение нескольких часов после введения МНТ основной вклад от всего сигнала опухоли вносили именно меченные ^{111}In молекулы МНТ, находящиеся в кровеносных сосудах опухоли.

Полученные кинетики накопления МНТ в крови и опухолях (меланома Клаудмана S91, клон M3) мышей показаны на Рисунке 4.8.4. По ним видно, что присоединение ПЭГ приводило как к увеличению времени жизни МНТ в крови, так и к существенному увеличению накопления в опухоли. Изменение концентрации МНТ в крови (Рис. 4.8.4а) хорошо описывалось зависимостью (4.8.2) ($r^2 = 0{,}999$, $\chi^2 = 0{,}072$, $r^2 = 0{,}996$, $\chi^2 = 0{,}39$, $r^2 = 0{,}993$, $\chi^2 = 0{,}613$ для МНТ, МНТ-ПЭГ$_н$ и МНТ-ПЭГ, соответственно). В свою очередь, накопление МНТ в опухоли (Рис. 4.8.4б) достаточно хорошо интерполировалось зависимостью (4.8.4), где в качестве компонентов используются зависимости (4.8.2) и (4.8.3) ($r^2 = 0{,}955$, $\chi^2 = 0{,}040$, $r^2 = 0{,}761$, $\chi^2 = 0{,}084$, $r^2 = 0{,}985$, $\chi^2 = 0{,}164$ для МНТ, МНТ-ПЭГ$_н$ и МНТ-ПЭГ, соответственно). Параметры, полученные в результате такой интерполяции, представлены в Таблице 4.8.1. Из Рисунка 4.8.4а и Таблицы 4.8.1 видно, что присоединение ПЭГ существенно увеличивало время жизни МНТ в крови, причем, в большей мере не за счет констант выведения, а за счет уменьшения вклада компоненты с наибольшей скоростью выведения, MNT_{bl01}. Предположительно это может быть связано с уменьшением накопления МНТ-ПЭГ в печени по сравнению МНТ без ПЭГ (Рис. 4.8.1в), т.к. печень играет одну из основных функций по выведению молекул из кровотока. Накопление МНТ в почках – другом органе, отвечающем за выведение МНТ, не изменялось (Рис. 4.8.1г). Иными словами можно предположить, что быстрее всего МНТ из крови выводится именно печенью, а присоединение ПЭГ сильно уменьшает это выведение.

Из литературы известно, что в случае, когда молекула не задерживается в ткани, соотношение k_{in}/k_{out} дает долю межклеточного пространства в данной ткани (Thurber and Dane, 2012). Для разных типов тканей эта доля составляет от 0,05 до 0,5 (Thurber and Dane, 2012). Для МНТ и МНТ-ПЭГ$_н$ соотношение k_{in}/k_{out} составляло около 1,5 (см. Таблица 4.8.1), что, по меньшей мере, в три раза больше, чем доля межклеточного пространства в

опухоли. Это отличие указывает на существенную задержку МНТ и МНТ-ПЭГ$_н$ в опухоли (уменьшение k_{out}), которая вероятно связана с взаимодействием МНТ с клетками опухоли. Причем, вероятно за счет увеличения размера молекулы, k_{in} в три с половиной раза меньше для МНТ-ПЭГ$_н$, чем для МНТ (Таблица 4.8.1). По сходному соотношению k_{in}/k_{out} для МНТ и МНТ-ПЭГ$_н$ можно предположить, что присоединение ПЭГ к МНТ не препятствует лигандному модулю – α-меланоцитстимулирующему гормону взаимодействовать в опухоли со своим рецептором.

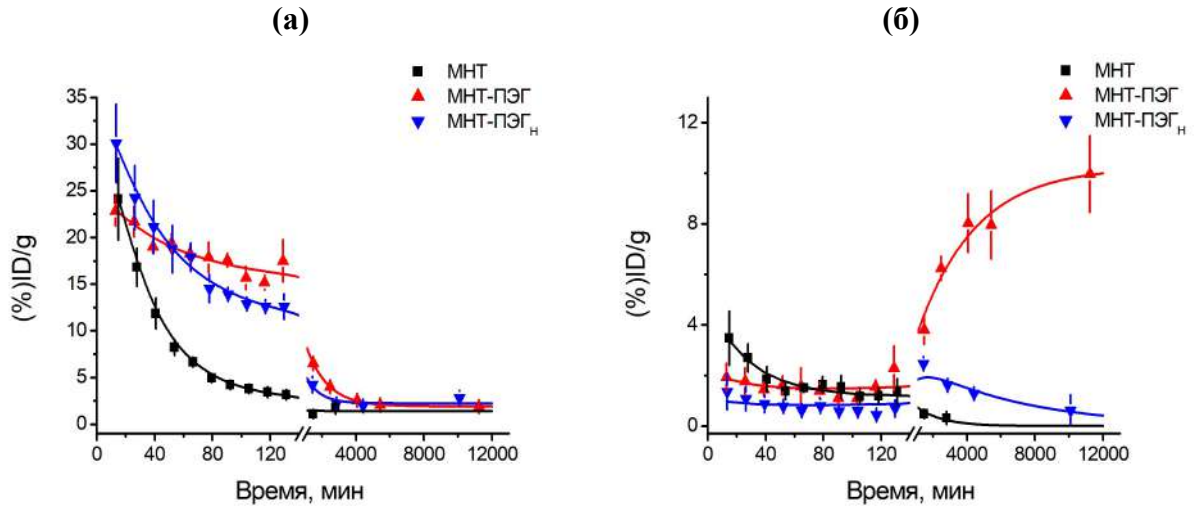


Рисунок 4.8.4. Изменение содержания МНТ, меченного ^{111}In, в крови (а) и опухолях (б) мышей при внутривенном введении МНТ. Содержание указано в % от введенной дозы на грамм ткани (%ID/g). Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 2-3). Линиями показаны результаты интерполяции в соответствии с зависимостями (4.8.2), (4.8.3) и (4.8.5). Указаны МНТ без ПЭГ (МНТ), МНТ с 40 кДа ПЭГ с возможностью отщепления опухолеспецифическими протеазами (МНТ-ПЭГ) и МНТ с 40 кДа ПЭГ без возможности его отщепления (МНТ-ПЭГ$_н$). Данные получены совместно с Уласовым А.В. и Сластниковой Т.А.

Таблица 4.8.1. Параметры, полученные в результате интерполяции экспериментальных данных в соответствии с зависимостями (4.8.2), (4.8.3) и (4.8.5). Описание параметров дано в тексте.

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.

Для МНТ-ПЭГ, где есть сайт отщепления ПЭГ опухолеспецифичными протеазами, k_{in} такая же, как и для МНТ-ПЭГ$_н$ (Таблица 4.8.1). Напротив, k_{out} для МНТ-ПЭГ стремится к нулю (Таблица 4.8.1). Иными словами, в изучаемый промежуток времени (7 суток) заметного выхода МНТ-ПЭГ из опухоли не наблюдалось. В то время,

как МНТ-ПЭГ$_н$, отличающийся от МНТ-ПЭГ только отсутствием сайта отщепления ПЭГ опухолеспецифичными протеазами, вполне способен выходить из опухоли (Таблица 4.8.1 и Рис. 4.8.4б, синяя кривая). Кроме проникновения МНТ в клетки опухоли данная задержка может также объясняться следующей причиной. Известно, что опухолеспецифичные протеазы, такие как uPA, могут находиться в опухоли в не активном состоянии, причем, образовывать при этом довольно крупные агрегаты (Ellis et al., 1991; Al-Ejeh et al., 2004; Sinharay et al., 2017). Если предположить, что в этом состоянии они сохраняют сродство к введенному нами сайту uPA, то взаимодействием с этими агрегатами можно объяснить задержку МНТ-ПЭГ в опухоли.

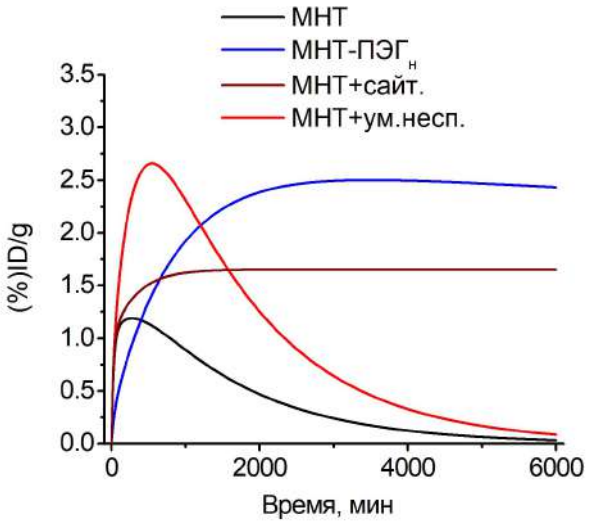


Рисунок 4.8.5. Предполагаемое накопление МНТ в опухоли мышей при системном введении в случае МНТ без ПЭГ, МНТ-ПЭГ$_н$, МНТ с сайтом расщепления опухолеспецифическими протеазами типа uPA (МНТ+сайт) и уменьшения неспецифических взаимодействий в исходном МНТ (МНТ+ум.несп.). Накопление указано в (%)ID/g без вклада сигнала от МНТ в кровеносных сосудах опухоли.

Таким образом, увеличивая время жизни МНТ в крови можно улучшить накопление МНТ в опухоли. Используя предложенную модель и данные Таблицы 4.8.1, можно оценить, сколько МНТ будет накапливаться в ткани опухоли без учета вклада сигнала от МНТ в кровеносных сосудах опухоли (Рис. 4.8.5). Иными словами моделируется ситуация, когда мышке была проведена перфузия. Тогда для МНТ без ПЭГ максимум накопления в опухоли будет наблюдаться на 4-5 часов и составлять 1,2 (%)ID/g (Рис. 4.8.5, черная кривая). Если к МНТ с N-конца, где находится ДТокс, пришить 40 кДа ПЭГ (МНТ-ПЭГ$_н$), то максимум накопления в опухоли будет наблюдаться на 45-80 часов и составлять 2,5 (%)ID/g (Рис. 4.8.5, синяя кривая). Иными словами, присоединением ПЭГ можно повысить накопление в опухоли вдвое. Несколько увеличить накопление исходного МНТ в опухоли можно путем введения в него сайта расщепления опухолеспецифичными протеазами (Рис. 4.8.5, коричневая кривая). Однако данный сайт

больше будет сказываться не на скорости накопления МНТ в опухоли, а на времени его удержания в данной опухоли. Для увеличения же самого накопления в опухоли необходимо увеличивать время жизни МНТ в крови, что можно осуществить не только присоединением ПЭГ, но и как сказано в пункте 4.8.1, заменой модуля ДТокс на аналогичный по функциям модуль, но обладающий меньшим набором неспецифических взаимодействий. Можно предположить, что такой модифицированный МНТ будет обладать сходными с исходным МНТ кинетическими константами ухода их крови и накопления в опухоли, за тем исключением, что вклад наиболее быстрой экспоненты будет такой же, как у МНТ-ПЭГ$_н$ (Таблица 4.8.1). У такого модифицированного МНТ предполагается, что максимум накопления будет 2,7 (%)ID/g на 9 часов от начала введения МНТ (Рис. 4.8.5, красная кривая). Иными словами, правильно подбирая эндосомолитический модуль можно ожидать увеличения накопления в опухоли более чем в два раза.

Основные результаты, изложенные в п. 4.8.2, были опубликованы в статье автора с соавторами: Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Increasing the accumulation of modular nanotransporters in mouse tumors by attaching polyethylene glycol to these nanotransporters with the possibility of its release into the tumors // Dokl. Biochem. Biophys. – 2025. – Vol. 521. – №. 1. – P. 165-168 (вклад автора состоит в планировании работ, проведении заметной части экспериментальных работ, в частности, участие в получении биораспределения МНТ в организме мыши, теоретическом анализе этого биораспределения с помощью предложенной им модели, анализе и обсуждении полученных результатов, написании основного текста). Автор признателен всем соавторам этой статьи, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.8.3. Замена эндосомолитического модуля МНТ

Как было сказано выше, одним из основных способов увеличения накопления МНТ в опухоли является увеличение времени его циркуляции в крови. В предыдущем пункте нами было высказано предположение о том, что ДТокс, эндосомолитический модуль МНТ, ответственен за неспецифические взаимодействия МНТ в печени, приводящие к резкому сокращению времени их циркуляции в крови. Поэтому одним из способов увеличения этого времени является замена эндосомолитического модуля на аналогичный по мембранолитическим свойствам модуль. Для этих целей автором диссертационной работы был выбран синтетический эндосомолитический пептид GALA3, LAEALAEALEALAA (Li et al., 2020). Среди GALA пептидов он обладает значительно меньшей гидрофобностью и кардинально улучшает проникновение связанных с ним конструкций в цитозоль (Li et al., 2020). Кроме того, GALA3 не является цитотоксическим для клеток (Li et al., 2020) и ввиду своей низкой гидрофобности и небольшого размера предположительно обладает меньшими неспецифическими взаимодействиями в печени, чем ДТокс.

Для проверки увеличения времени жизни в крови были выбраны два МНТ: 1) $МНТ_к$ состава антиРЭФР-ДТокс-НМР и 2) $МНТ_{гк}$ состава антиРЭФР-GALA3-НМР. Для измерения времени жизни в крови эти транспортеры были помечены флуоресцентным красителем AF488. Пришивка составила 0,4-1,3 молекулы AF488 на одну молекулу МНТ. Измерение времени жизни в крови проведено по флуоресценции МНТ-AF488, как это описано в «Материалах и методах». На Рисунке 4.8.6а представлены зависимости относительного содержания двух данных МНТ в крови от времени после внутривенного введения мышам линии BALB/c 1 мкМ МНТ в объеме 300 мкл. За 100% принята концентрация МНТ сразу после внутривенного введения МНТ. Интерполяция полученных данных проводилась двухэкспоненциальной зависимостью (4.8.2). Однако, согласно Таблице 4.8.1, данные для $МНТ_к$ можно описывать одноэкспоненциальной зависимостью. И действительно, для $МНТ_к$ эта зависимость хорошо описывалась этой функцией (r^2 = 0,997, χ^2 = 3,98 и Рис. 4.8.6а) и константа скорости выведения из крови была равна k = 0,0367 ± 0,0012 $мин^{-1}$ (95% доверительный интервал: 0,0337–0,0402). Для МНТ, описанного в предыдущем разделе, имеющего состав ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ, изменение концентрации в крови тоже можно хорошо описать одноэкспоненциальной функцией (r^2 = 0,996, χ^2 = 0,21) и k = 0,0305 ± 0,0014 $мин^{-1}$ (95% доверительный интервал: 0,0273–0,0340), что достоверно не отличается от k для $МНТ_к$. Интерполяция данных для $МНТ_{гк}$ зависимостью (4.8.2) позволило получить следующие параметры: MNT_{bl01} = 63 ± 9 %, MNT_{bl02} = 37 ± 9 %, k_1 = 0,026 ± 0,006 $мин^{-1}$ и k_2 = 0,0025 ± 0,0009 $мин^{-1}$ (r^2 = 0,9988, χ^2 = 2,4

и Рис. 4.8.6а). Таким образом, скорость быстрой экспоненты осталась той же самой, но появилась медленная экспонента, отвечающая удалению одной третьей всего МНТ из кровотока. Быстрая экспонента предположительно отвечает неспецифическому связыванию МНТ в печени. Замена ДТокс на GALA3 привела к уменьшению этого неспецифического взаимодействия.

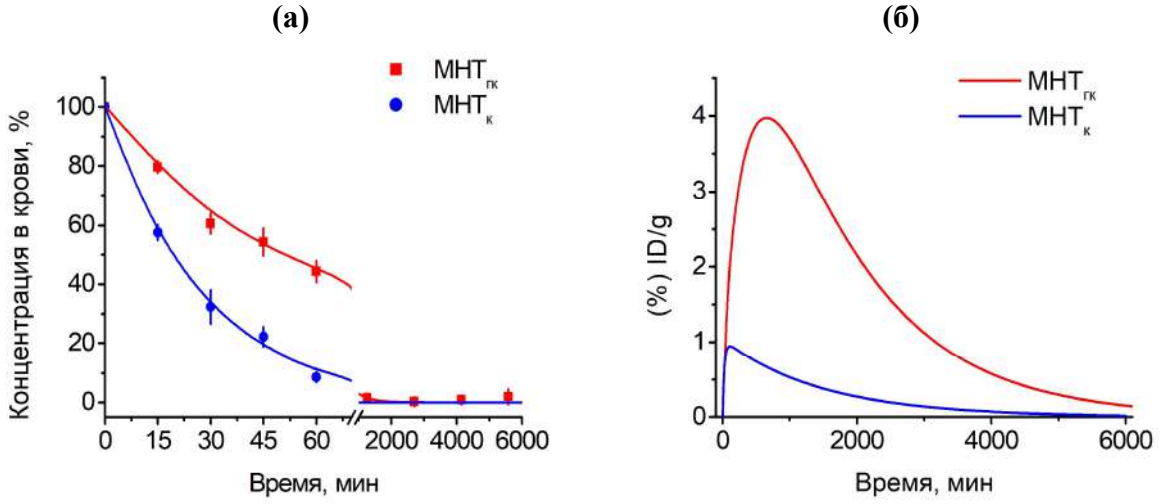


Рисунок 4.8.6. (а) Зависимость концентрации МНТ в крови (за 100% принята концентрация сразу после внутривенного введения) мышей BALB/c от времени. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 4-5); **(б) Предполагаемое накопление МНТ в опухоли мышей при системном введении в случае МНТ$_{гк}$ и МНТ$_{к}$.** Накопление указано в (%)ID/g в предположении, что начальная доза МНТ в крови составляет 37(%)ID/g. Состав МНТ$_{гк}$: аффиболи к РЭФР-ДТокс-НМР, а МНТ$_{к}$: аффиболи к РЭФР-GALA3-НМР.

Используя выражение (4.8.3), данные Таблицы 4.8.1, а также полученные значения MNT_{bl01}, MNT_{bl02}, k_1 и k_2, были построены теоретические кривые накопления в опухоли для МНТ$_{к}$ и МНТ$_{гк}$ (Рис. 4.8.6б). Видно, что предполагаемое максимальное накопление в опухоли для МНТ с GALA3 пептидом превышает в четыре раза аналогичное накопление МНТ с ДТокс (Рис. 4.8.6б). Таким образом, замена ДТокс на GALA3 в МНТ приводило к увеличению времени циркуляции МНТ в крови точно так же, как и ПЭГилирование МНТ. Это, в свою очередь, должно приводить к такому же накоплению МНТ с GALA3 в опухоли, как и в случае с ПЭГилированным вариантом МНТ с ДТокс. Полученные данные подтверждают предположение о том, что ДТокс за счет неспецифических взаимодействий в печени приводит к быстрой фильтрации МНТ из кровотока и возможно его заменой уменьшить эти неспецифические взаимодействия.

Кроме увеличения времени жизни МНТ, необходимо также, чтобы замена эндосомолитического модуля не сказывалась на способности МНТ доставлять молекулы в цитозоль. Для проверки этого был взят аналог ДТокс содержащего МНТ$_{мр}$ следующего состава: антиРЭФР-GALA3-НМР-FKFL-антиKeap1. Эта конструкция, названная МНТ$_{г}$,

отличается от МНТ$_{гк}$ только наличием монободи к Keap1 с возможностью отщепления в эндосомах. Для изучения интернализации МНТ$_{г}$ и МНТ$_{гк}$ эти транспортеры были конъюгированы с флуоресцентным красителем ATTO647, как это описано в «Материалах и методах». Пришивка составила 0,5-1,9 молекул ATTO647 на одну молекулу МНТ.

(а) **(б)**

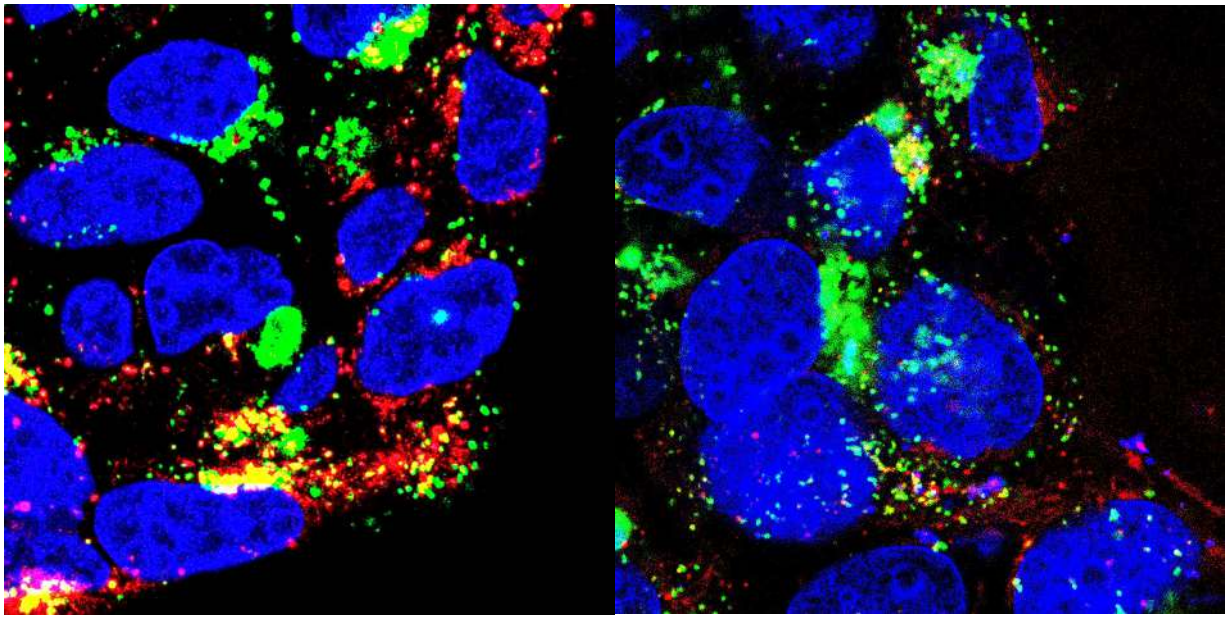


Рисунок 4.8.7. Полученные с помощью конфокальной микроскопии изображения клеток AML12, инкубированных с 150 нМ МНТ$_{г}$-ATTO647 (а) и с 150 нМ МНТ$_{г}$-ATTO647 и 1 мкМ ЭФР (б). Красным показана прокраска ATTO647, зеленым – прокраска эндосом/лизосом флуоресцентным красителем Lysotracker Green, а синим – прокраска ядер флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Эксперименты проведены совместно с А.А. Розенкранцем и Е.С. Буниным.

Клетки линии A431 инкубировались с 150 нМ МНТ$_{г}$-ATTO647 в течение часа, далее отмывались раствором Хенкса, и для прокраски эндосом/лизосом добавлялся зеленый флуоресцентный краситель Lysotracker Green, а ядер – синий краситель Hoechst 33342. Полученные с помощью конфокального микроскопа STELLARIS 5 («Leica», Германия) типичные изображения клеток AML12 с добавленным МНТ$_{г}$-ATTO647 представлены на Рисунке 4.8.7а. Видно, что заметное количество данного МНТ наблюдалось в цитоплазме данных клеток. Более того, только 12 ± 6 % данного МНТ колокализовалось с эндосомами/лизосомами (Рис. 4.8.7а, показаны желтым цветом), иными словами, основная доля МНТ вышла из эндосом в цитозоль. Это указывает на корректную работу эндосомолитического модуля GALA3 в составе МНТ$_{г}$. Чтобы доказать, что данный МНТ проникает в клетки рецептор-опосредованным эндоцитозом, был поставлен контрольный эксперимент в котором клетки AML12 инкубировались 1 час с 150 нМ МНТ$_{г}$-ATTO647 и избытком ЭФР (1 мкМ) (Рис. 4.8.7б). В данном случае все рецепторы эпидермального фактора роста оказывались заблокированы ЭФР и

поступление МНТ$_г$-ATTO647 в клетки было возможно только за счет неспецифических взаимодействий. Если сравнить среднюю интенсивность флуоресценции (за вычитом автофлуоресценции) МНТ$_г$-ATTO647 в клетках в отсутствии (5,6 ± 2,1 усл.ед.) и присутствии избытка ЭФР (1,4 ± 0,4 усл.ед.), то по критерию Колмогорова-Смирнова видно достоверное ($p < 0,01$) уменьшение в четыре раза количества поступающего в клетки МНТ$_г$. Иными словами, МНТ$_г$ интернализуется в клетки преимущественно за счет связывания с рецептором РЭФР, а не за счет неспецифических взаимодействий.

(а) **(б)**

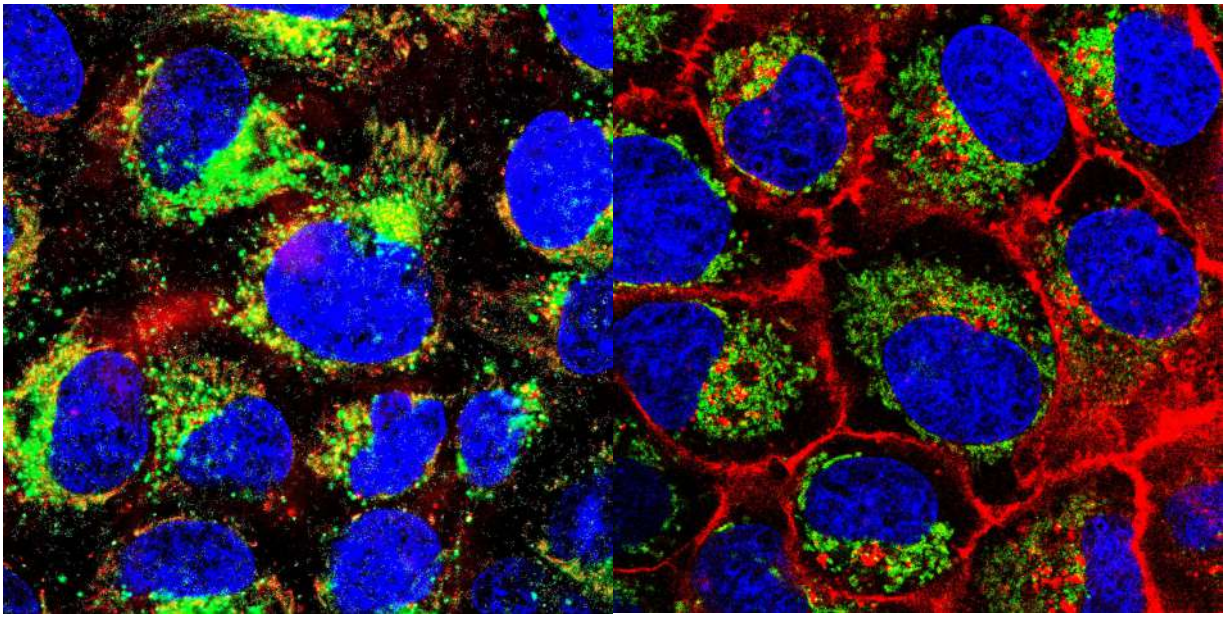


Рисунок 4.8.8. Полученные с помощью конфокальной микроскопии изображения клеток AML12, инкубированных с 150 нМ МНТ$_г$-ATTO647 (а) и с 150 нМ МНТ$_{гк}$-ATTO647 (б). Красным показана прокраска ATTO647, зеленым – прокраска флуоресцентным красителем Mytotracker Green, а синим – прокраска ядер флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Эксперименты проведены совместно с А.А. Розенкранцем и Е.С. Буниным.

Ранее в пункте 4.4 было показано, что МНТ$_м$, содержащий монободи к Keap1, может связываться с Keap1, заметная доля которого находится на поверхности митохондрий. Таким образом, МНТ$_г$, который тоже содержит монободи к Keap1, при выходе из эндосом тоже должен в заметной мере накапливаться в области митохондрий. Для этого был поставлен эксперимент, где клетки линии A431 инкубировались с 150 нМ МНТ$_г$-ATTO647 или МНТ$_{гк}$ в течение часа, далее отмывались раствором Хенкса, и для прокраски митохондрий добавлялся зеленый флуоресцентный краситель Mytotracker Green, а ядер – синий краситель Hoechst 33342. На Рисунке 4.8.8а по желтому цвету видно, что заметная доля МНТ$_г$-ATTO647 колокализовалась с митохондриями, в то время как желтого цвета заметно меньше для МНТ$_{гк}$-ATTO647 (Рис. 4.8.8б). Количественная обработка показала, что в среднем с митохондриями колокализуется 31 ± 6 % МНТ$_г$, в то

время как для $МНТ_{гк}$ всего 14 ± 6 %. Следует отметить, что и $МНТ_{гк}$ теоретически тоже может локализоваться с митохондриями, т.к. выше мы показали, что модуль носитель НМР может взаимодействовать с Keap1, но с заметно меньшим, чем монободи, сродством. Однако наличие монободи к Keap1 в МНТ привело к тому, что локализация этого МНТ с митохондриями оказалась заметно выше.

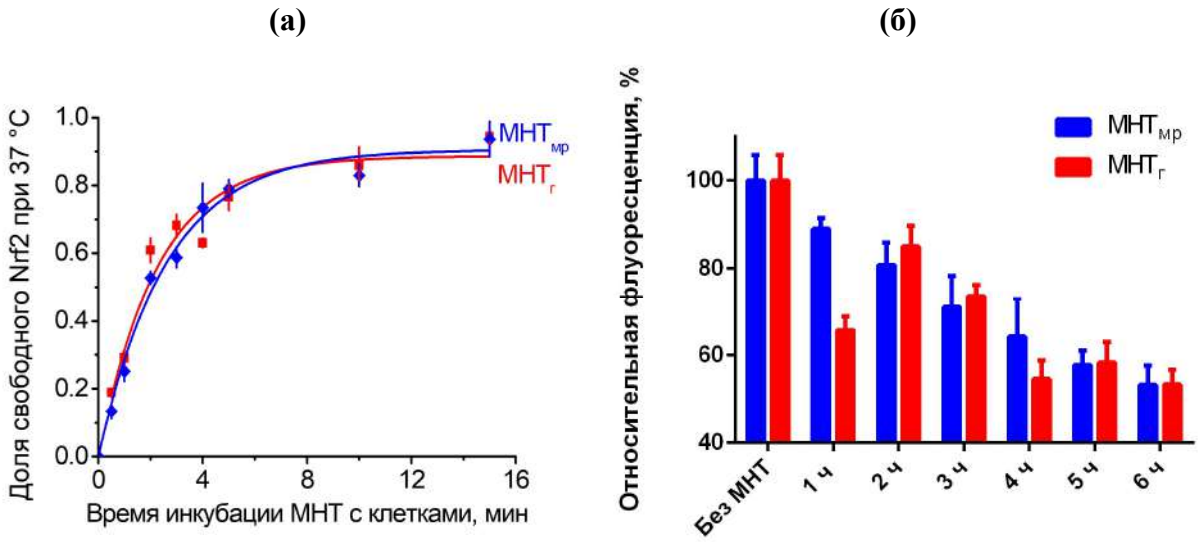


Рисунок 4.8.9. Сравнение эффективности доставки монободи R1 с помощью $МНТ_г$ и $МНТ_{мр}$ в клетки AML12. (а) Зависимость доли свободного Nrf2 при физиологических температурах от времени инкубации $МНТ_г$ или $МНТ_{мр}$ с клетками AML12. (б) Эффект предварительной инкубации клеток AML12 с 500 нМ $МНТ_г$ или $МНТ_{мр}$ в течение 5 минут на флуоресценцию cDCF, вызванную добавлением к клеткам 10 мкМ перекиси водорода в течение 15 минут. Указано время между добавлением МНТ и измерением флуоресценции. Данные на панелях (а) и (б) представлены как средние значения ± стандартная ошибка (n = 6-18). Эксперименты проведены совместно с Т.Н. Лупановой и Е.С. Буниным.

$МНТ_г$ отличается от $МНТ_{мр}$ только заменой модуля ДТокс на GALA3. Выше автором диссертации был описан новый подход для количественного сравнения разных МНТ, содержащих монободи к Keap1, по эффективности доставки этого монободи в цитозоль. Для этого необходимо с помощью метода CETSA получить долю свободного Nrf2 при физиологических температурах при различных временах инкубации клеток с данным МНТ (Рис. 4.6.7). Аналогичная зависимость была получена методом CETSA для клеток AML12, которые инкубировали с 500 нМ $МНТ_г$ различные заданные времена (Рис. 4.8.9а, красная кривая). Эта зависимость хорошо совпала с подобной зависимостью для $МНТ_{мр}$ (Рис. 4.8.9а, синяя кривая). Если оценивать предложенным подходом эффективные концентрации монободи в цитоплазме, то они составили 223 ± 3 нМ, 214,9 ± 1,3 нМ и 261 ± 16 нМ, 251 ± 9 нМ для 2 и 5 минут инкубации клеток с $МНТ_г$ и $МНТ_{мр}$, соответственно. По критерию Манна-Уитни они достоверно не отличались для этих двух МНТ. Таким

образом, замена ДТокс на GALA3 в МНТ не приводила к снижению эффективности доставки монободи в цитозоль.

Кроме доставки монободи к Keap1 в цитозоль, было проведено также сравнение способностей $МНТ_г$ и $МНТ_{мр}$ защищать клетки AML12 от действия перекиси водорода. Как описано в «Материалах и методах» для этого использовался реактив cDCFH-DA, который превращается во флуоресцентный cDCF при окислении. Клетки AML12 инкубировали 5 минут с 500 нМ $МНТ_г$ или $МНТ_{мр}$, отмывали и инкубировали при 37 °C некоторые заданные времена. Перед съемкой к клеткам добавляли на 15 минут перекись водорода в конечной концентрации 10 мкМ. На Рисунке 4.8.9б показана относительная флуоресценция таких клеток в зависимости от времени инкубации. За 100% принята разница флуоресценции клеток, к которым была добавлена перекись водорода, и контрольных клеток, без добавления перекиси. На каждое изученное время, кроме 1 часа, по критерию Манна-Уитни достоверных различий между флуоресценциями клеток, к которым были добавлены $МНТ_г$ или $МНТ_{мр}$, не наблюдалось. По критерию Краскела-Уоллиса достоверное ($p < 0,01$) уменьшение флуоресценции cDCF наблюдалось начиная с четырех часов между добавлением $МНТ_г$ и регистрацией флуоресценции (Рис. 4.8.9б). Полученные данные указывают на то, что замена ДТокс на GALA3 в МНТ не влияет на доставку молекул в цитозоль клетки.

Итак, замена эндосомолитического модуля в МНТ с ДТокс на GALA3 с одной стороны вдвое увеличивает время циркуляции данного МНТ в крови, а с другой стороны не влияет на эффективность доставки молекул с помощью МНТ в клетки-мишени. Согласно существующим представлениям увеличение времени циркуляции молекулы в крови будет приводить к большему накоплению этой молекулы в нужном органе или ткани, в частности, в опухоли. Таким образом, МНТ с GALA3, а также возможностью отщепления монободи к Keap1 в эндосомах представляет собой пример системы доставки молекул, оптимизированной как на уровне отдельных клеток, так и на уровне всего организма.

Основные результаты, изложенные в п. 4.8.3, были опубликованы в статье автора с соавторами: Khramtsov Y.V., Bunin E.S., Ulasov A.V., Lupanova T.N., Georgiev G.P., Sobolev A.S. GALA3-containing modular nanotransporters are capable of delivering Keap1 monobody to target cells and inhibiting the formation of reactive oxygen species in the cells // Dokl. Biochem. Biophys. 2025. – V. 520 – P. 148-151 (вклад автора состоит как в планировании работ, проведении заметной части экспериментальных работ, в частности, в изучении времени жизни МНТ в крови, в участии в получении распределения МНТ в клетках, изучении с помощью проточной цитофлуориметрии ингибирования образования

активных форм кислорода, анализе и обсуждении полученных результатов, написании основного текста). Автор признателен всем соавторам этой статьи, без вклада которых эта работа не могла бы быть осуществлена.

4.8.4. МНТ, способные связываться с альбумином

Мы также предложили увеличить время циркуляции МНТ в крови за счет включения в их состав модуля, способного взаимодействовать с одним из основных компонентов крови – альбумином. Для этого был выбран альбуминсвязывающий домен белка G Streptococcus, G148 (АСД) (Kontermann, 2012; Binder and Skerra, 2025), имеющий последовательность: AEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP (5 кДа). АСД не является иммуногенным и способен с высоким сродством связываться с альбуминами разных видов млекопитающих, в частности человека, мыши, крысы и кролика (Kontermann, 2012; Binder and Skerra, 2025). Известно, что благодаря свойству альбумина возвращаться из клеток в кровоток, включение АСД в белки приводит к сильному увеличению времени их жизни в крови (Kontermann, 2012; Binder and Skerra, 2025). Некоторые антителоподобные молекулы с АСД уже проходят клинические испытания. Так, изокибеп – аффибоди к интерлейкину 17А, недавно завершил 2 фазу клинических испытаний на взрослых людях, страдающих бляшечным псориазом (Gerdes et al., 2023).

Чтобы исключить влияние альбумина, связавшегося с МНТ с АСД, на интернализацию данного МНТ в его состав был включен сайт расщепления опухолеспецифичными протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA site). Таким образом, изучали МНТ следующего состава: АСД-uPA site-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, обозначенный как (АСД)$МНТ_{EGF}$. Методом термофореза автором диссертации было определено, что равновесная константа диссоциации комплекса, K_d, (АСД)$МНТ_{EGF}$ с бычьим сывороточным альбумином (БСА) составляла 21 ± 11 нМ, а с человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) – 57 ± 33 нМ. Известно, что K_d АСД с ЧСА составляет 11 ± 4 нМ (Hopp et al., 2010), т.е. того же порядка, что и (АСД)$МНТ_{EGF}$ с ЧСА. Таким образом, АСД в составе (АСД)$МНТ_{EGF}$ сохранял свою способность связываться с альбумином.

Для изучения доступности uPA site в составе (АСД)$МНТ_{EGF}$ автор диссертации использовал протеазу huPA («R&D Systems», США). Аликвоты изучаемого МНТ инкубировались с этой протеазой при 37 °C в течение 1, 2, 4, 6 и 21-го часа, а затем изучались с помощью денатурирующего электрофореза по Лэммли. По уменьшению интегральной интенсивности полосы, отвечающей (АСД)$МНТ_{EGF}$, была получена константа скорости расщепления этого МНТ. Она составила 23500 ± 1400 $мин^{-1}М^{-1}$. Если

сначала получить комплекс (АСД)МНТ$_{EGF}$ с БСА, то соответствующая константа скорости расщепления была 13000 ± 2000 мин$^{-1}$М$^{-1}$. Таким образом даже в связанном с альбумином состоянии uPA site в составе (АСД)МНТ$_{EGF}$ являлся доступным для действия опухолеспецифичных протеаз.

Связывание альбумина с (АСД)МНТ$_{EGF}$ никак не влияло на его взаимодействие со своими рецепторами (РЭФР). Так, в среде с сывороткой, определенные методом радиолигандного анализа константы диссоциации (АСД)МНТ$_{EGF}$ и МНТ$_{EGF}$ с РЭФР составили 50 и 60 нМ, соответственно (эксперименты проведены А.А. Розенкранцем). Изучение внутриклеточной локализации (АСД)МНТ$_{EGF}$ с помощью прокраски МНТ анти-His tag-антителами, конъюгированными с Alexa647, показало, что эти МНТ спустя 1 час после добавления к клеткам преимущественно локализуются в области их ядер. Таким образом, АСД не влиял на функциональные свойства и других модулей МНТ.

Проведенные с помощью ОФЭКТ предварительные эксперименты на мышах, которым внутривенно вводился (АСД)МНТ$_{EGF}$, меченный радиоактивным изотопом ^{111}In, показали, что АСД лишь незначительно увеличивал время циркуляции МНТ в крови. Как было показано в пп 4.8.2 и 4.8.3 это может быть связано с высоким неспецифическим связыванием ДТокс в печени. Поэтому замена ДТокс на GALA3 и добавление АСД теоретически может увеличить время жизни МНТ в крови. Для подтверждения этого предположения автором диссертации был выбран МНТ следующего состава: АСД-uPA site-антиРЭФР-GALA3-HMP-FKFL-антиKeap1. Так как за основу в данном МНТ был выбран МНТ$_г$, то в дальнейшем этот МНТ был обозначен (АСД)МНТ$_г$. Его строение выбрано таким образом, чтобы связывание с альбумином могло экранировать аффиболи к РЭФР, что уменьшило бы поглощение этого МНТ клетками печени, где тоже есть эти рецепторы. В опухоли это экранирование предположительно должно сниматься за счет отщепления АСД вместе со связавшимся альбумином.

Прежде всего автор диссертации изучил способность (АСД)МНТ$_г$ взаимодействовать с альбумином. Полученная методом термофореза K_d для комплекса (АСД)МНТ$_г$ с БСА составила K_d = 54 ± 9 нМ (Рис. 4.8.10). Иными словами, АСД в составе (АСД)МНТ$_г$ сохранял свою способность взаимодействовать с альбумином.

Изучение связывания (АСД)МНТ$_г$ с РЭФР проводилось автором с помощью метода проточной цитофлуориметрии на клетках А431 (несколько миллионов РЭФР на клетку). (АСД)МНТ$_г$ был помечен флуоресцентным красителем AF488, так, как это описано в «Материалах и методах». В результате пришилось 2,1 молекул AF488 на одну молекулу (АСД)МНТ$_г$. Клетки А431 инкубировали различные времена с 200 нМ (АСД)МНТ$_г$-AF488 в растворе Хенкса с 0,75% БСА и без БСА (Рис. 4.8.11). В первом

случае (АСД)МНТ$_г$ взаимодействует с клетками в составе комплекса с альбумином, а во втором – без этого комплекса. В обоих случаях при добавлении МНТ видно достоверное возрастание флуоресценции на клетку, которое практически полностью подавляется в присутствии избытка ЭФР (Рис. 4.8.11). Иными словами, лигандный модуль в составе (АСД)МНТ$_г$ сохранял способность связываться с РЭФР на поверхности клеток-мишеней. Связывание с альбумином достоверно ($p < 0,0001$, t-критерий Стьюдента) уменьшало флуоресценцию отдельной клетки при 1 часе инкубации (АСД)МНТ$_г$-AF488 с клетками, но данный эффект был небольшим (Рис. 4.8.11). Таким образом, присутствие альбумина не оказывало значительного экранирующего эффекта на аффибоди к РЭФР в составе (АСД)МНТ$_г$.

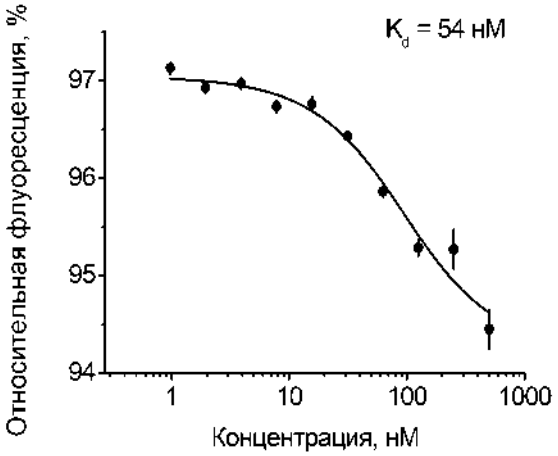


Рисунок 4.8.10. Кривая титрования МНТ$_{АСД}$-AF488 (40 нМ) возрастающей концентрацией бычьего сывороточного альбумина, БСА, при определении методом термофореза константы диссоциации комплекса МНТ$_{АСД}$ с БСА. Черной кривой показана интерполяция экспериментальных данных в соответствии с теоретической зависимостью. Время измерения флуоресценции после начала термофореза – 20 сек. Указана равновесная константа диссоциации комплекса МНТ$_{АСД}$ с БСА, K_d. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (n = 14–17).

Чтобы проверить, что в (АСД)МНТ$_г$ помимо лигандного модуля все остальные модули функционируют нормально, была изучена способность этих МНТ защищать клетки AML12 от действия перекиси водорода, так, как это описано в предыдущем пункте и «Материалах и методах». Клетки AML12 инкубировали 5 минут с 500 нМ (АСД)МНТ$_г$ или МНТ$_г$, отмывали и инкубировали при 37 °С некоторые заданные времена. На Рисунке 4.8.12 показана относительная флуоресценция таких клеток в зависимости от времени инкубации. По критерию Краскела-Уоллиса наблюдалось достоверное уменьшение по сравнению с контролем флуоресценции cDCF спустя 5 часов ($p < 0,01$) или 6 часов ($p < 0,001$) между добавлением МНТ и регистрацией флуоресценции (Рис. 4.8.12). Сравнение эффектов на клетки AML12 (АСД)МНТ$_г$ или МНТ$_г$ не выявило достоверных отличий по

критерию Манна-Уитни. Таким образом, добавление сайтов АСД и uPA заметно не сказывалось на функциональных свойствах отдельных модулей МНТ$_г$.

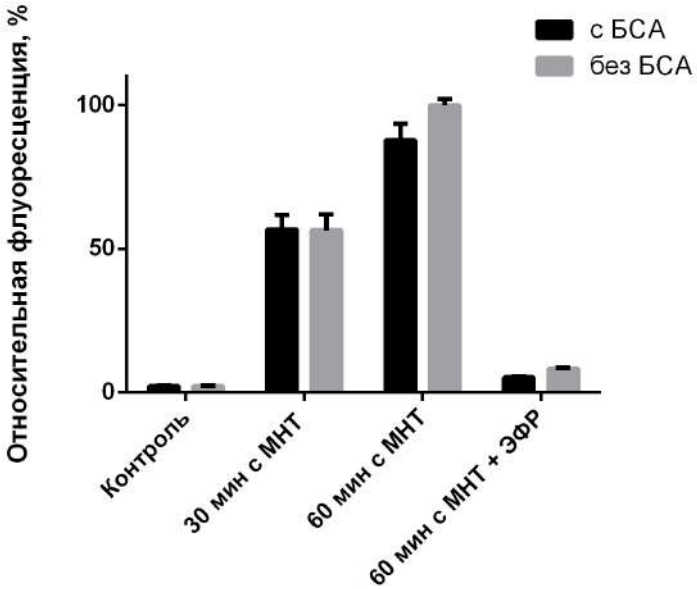


Рисунок 4.8.11. Влияние добавления 200 нМ (АСД)МНТ$_г$-AF488 в растворе Хенкса с 0,75% БСА и без БСА на относительную флуоресценцию клеток A431 (в % от максимальной флуоресценции). Показана контрольная группа без добавления (АСД)МНТ$_г$-AF488, группы, в которых 200 нМ (АСД)МНТ$_г$-AF488 инкубировали с клетками 30 и 60 мин, а также группа, где 200 нМ (АСД)МНТ$_г$-AF488 инкубировали вместе с 1 мкМ ЭФР. Приведены средние значения ± стандартное отклонение.

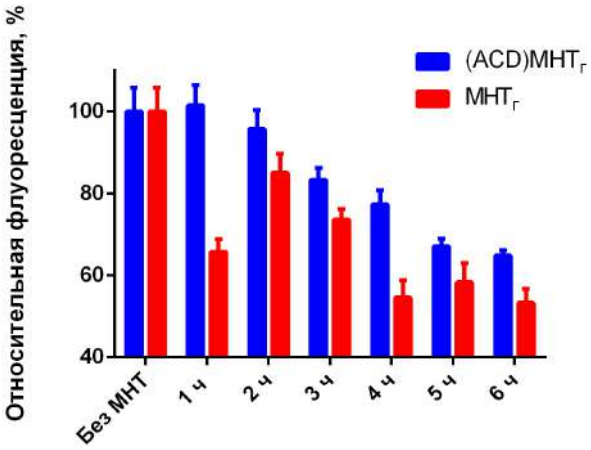


Рисунок 4.8.12. Эффект предварительной инкубации клеток AML12 с 500 нМ (АСД)МНТ$_г$ или МНТ$_г$ в течение 5 минут на флуоресценцию cDCF, вызванную добавлением к клеткам 10 мкМ перекиси водорода в течение 15 минут. Указано время между добавлением МНТ и измерением флуоресценции. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка (n = 6-9). Эксперименты проведены совместно с Т.Н. Лупановой и Е.С. Буниным.

Измерение времени жизни в крови мышей проведено по флуоресценции (АСД)МНТ$_г$-AF488, как это описано в «Материалах и методах». На Рисунке 4.8.13а представлены зависимости относительного содержания МНТ$_{гк}$ и (АСД)МНТ$_г$ в крови от времени после внутривенного введения мышам линии BALB/c 1 мкМ МНТ в объеме 300

мкл. За 100% принята концентрация МНТ сразу после внутривенного введения МНТ. Полученные кинетики хорошо описывались (r^2 = 0,9988, χ^2 = 2,41 и r^2 = 0,9973, χ^2 = 3,97 для $МНТ_{гк}$ и (АСД)$МНТ_г$, соответственно) двухэкспоненциальной зависимостью (4.8.2). При этом, как было показано в п. 4.8.3, первая экспонента отвечает за неспецифическое связывание МНТ в печени, а вторая – за все остальные взаимодействия, за счет которых МНТ выводится из кровотока. Эти взаимодействия включают, в том числе специфическое связывание с клетками печени. Вклад второй экспоненты (MNT_{bl02} в зависимости (4.8.2)) для $МНТ_{гк}$ и (АСД)$МНТ_г$ приблизительно одинаков (37 ± 9 и 28,7 ± 2,4 % для $МНТ_{гк}$ и (АСД)$МНТ_г$, соответственно). Однако добавление АСД с возможностью его отщепления в опухоли приводило к уменьшению k_2 в двадцать раз. Так, k_2 = (25,2 ± 9)·10^{-4} и (1,4 ± 0,2)·10^{-4} $мин^{-1}$ для $МНТ_{гк}$ и (АСД)$МНТ_г$, соответственно. Таким образом, за счет связывания с альбумином около трети $МНТ_г$ существенно увеличивало свое время циркуляции в кровотоке.

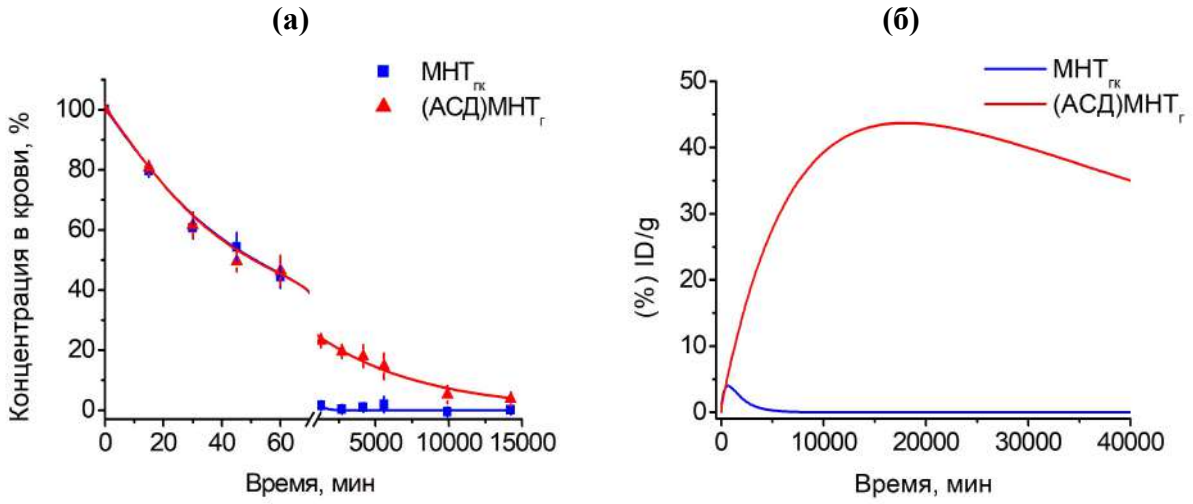


Рисунок 4.8.13. (а) Зависимость концентрации МНТ в крови (за 100% принята концентрация сразу после внутривенного введения) мышей BALB/c от времени. Указаны средние значения ± стандартная ошибка (*n* = 3-7); **(б) Предполагаемое накопление МНТ в опухоли мышей при системном введении в случае $МНТ_{гк}$ и (АСД)$МНТ_г$.** Накопление указано в (%)ID/g в предположении, что начальная доза МНТ в крови составляет 37(%)ID/g.

Используя выражение (4.8.3), данные Таблицы 4.8.1, а также полученные значения MNT_{bl01}, MNT_{bl02}, k_1 и k_2, были построены теоретические кривые накопления в опухоли для $МНТ_{гк}$ и (АСД)$МНТ_г$ (Рис. 4.8.13б). При этом, константа скорости входа в опухоль k_{in} для комплекса (АСД)$МНТ_г$ с альбумином мыши оценивалась следующим образом. Для МНТ из Таблицы 4.8.1, имеющего молекулярную массу 73,1 кДа, эта константа равна 10,1·10^{-4} $мин^{-1}$. Молекулярная масса комплекса (АСД)$МНТ_г$ с альбумином мыши составляет 139 кДа. Известно, что константа скорости выхода крупных молекул из кровеносных сосудов обратно пропорциональна корню квадратному из

молекулярной массы (Mittapalli et al., 2017). Тогда для комплекса (АСД)МНТ$_г$ с альбумином было оценено, что k_{in} = 7,3·10^{-4} мин$^{-1}$. Скорость выхода из опухоли для МНТ с uPA site была близка к нулю (МНТ-ПЭГ в Таблице 4.8.1). Для оценки взяли максимально возможное ее значение, k_{out} = 0,15·10^{-4} мин$^{-1}$ (Таблица 4.8.1). На рисунке 4.8.13б видно, что при добавлении АСД модуля с возможностью его отщепления в опухоли максимальное предполагаемое накопление МНТ в этой опухоли увеличивается с 4 до 44 (%) ID/g, т.е. в 11 раз.

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

При увеличении времени циркуляции МНТ в крови следует иметь ввиду, что НМР в составе МНТ склонен к олигомеризации. И действительно, с помощью метода динамического светорассеяния автором диссертационной работы было показано, что в растворе кроме мономерных молекул МНТ присутствуют и агрегаты этих молекул. Известно, что агрегаты белков обладают повышенной иммуногенностью (Ratanji et al., 2014), поэтому агрегация МНТ будет отрицательно сказываться на времени его циркулярции в крови. Для решения данной проблемы автором диссертации было предложено повысить включение гема в гидрофобный корман НМР путем наработки МНТ в специальном штамме *E.coli*, который способен поглощать гем из среды. Автором было показано, что включение гема не только увеличивало термостабильность МНТ, но и приводило к исчезновению агрегатов молекул МНТ. Это улучшение потенциально позволяет не только увеличить время циркуляции МНТ в крови, но и дает возможность многократного его применения. Данные результаты были опубликованы в статье: Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Stabilization of modular nanotransporters by embedding hemin in them in a new strain with heme receptor expression // Dokl. Biochem. Biophys. – 2020. – Vol. 490. – №. 1. – P. 47-49 (вклад автора состоит как в планировании работ, проведении основной части экспериментальных работ, в частности, в изучении термостобильности МНТ и образовании агрегатов МНТ, анализе и обсуждении полученных результатов, написании основного текста).

Основные результаты, касающиеся (АСД)МНТ$_{EGF}$, были опубликованы в статье автора с соавторами: 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 // Dokl. Biochem. Biophys. – 2017. – V. 472. – P. 81-83 (вклад автора состоит как в планировании работ, проведении заметной части экспериментальных

работ, в частности, в изучении констант взаимодействия между МНТ и альбумином, анализе и обсуждении полученных результатов, написании основного текста). Автор признателен всем соавторам этой статьи, а также Лупановой Т.Н. и Бунину Е.С. без вклада которых работа, представленная в настоящем разделе, не могла бы быть осуществлена.

5. Обсуждение результатов

В настоящее время довольно широкий круг социально-значимых заболеваний плохо поддается или даже не поддается эффективному лечению с помощью традиционных терапевтических подходов. Ограничения данных подходов часто связаны с узким эффективным диапазоном доз применяемых средств. При этом низкие дозы не оказывают необходимого терапевтического воздействия, а высокие дозы часто приводят к заметным побочным эффектам, т.е. оказываются токсичными для организма. Наиболее широкая группа традиционных лекарственных средств представлена низкомолекулярными веществами. Часто такие вещества благодаря пассивной диффузии способны поступать в клетки, где они и оказывают свое терапевтическое воздействие. Данные вещества не всегда обладают клеточной специфичностью, поэтому их применяют либо локально, либо насыщают ими весь организм, чтобы достигнуть эффективной локальной концентрации в необходимом месте воздействия. Нужной специфичностью обладают многие высокомолекулярные вещества, однако они не способны самостоятельно проникать в клетки. Для их доставки в клетки часто используют различные конструкции, называемые системами доставки молекул. Особенно они необходимы для доставки локально действующих веществ, т.е. веществ, максимальное действие которых распространяется на малые расстояния и проявляется в нужном клеточном компартменте. Примерами таких веществ могут служить белки и пептиды, способные связываться с заданными внутриклеточными мишенями, или ДНК, которая эффективна в клеточном ядре. Учитывая, что системам доставки до поступления в нужный компартмент клетки нужно преодолеть несколько барьеров на уровне организма, ткани и клетки, зачастую встает задача оптимизации их строения с целью повышения эффективности доставки. В решении этой задачи большую помощь оказывают биофизические методы и подходы, позволяющие как оценить строение используемых систем доставки, так и изучать транспорт этих систем доставки в заданный клеточный компартмент. Для выявления ключевых параметров этого транспорта удобно использовать различные математические модели. Тогда процесс оптимизации структуры систем доставки можно проводить путем целенаправленного воздействия на один или несколько ключевых параметров транспорта, а полученную в результате эффективность доставки оценивать по общему действию, оказываемому доставляемой молекулой.

Процесс оптимизации был проведен, прежде всего, для модульных молекулярных конструкций, способных неспецифически доставлять молекулы ДНК в клетки и тем самым нарабатывать в этих клетках нужный белок. В качестве таких конструкций были выбраны широко распространенные невирусные системы доставки ДНК на основе

полиплексов, представляющих собой комплексы ДНК с различными блок-сополимерами с поликатионами. Полиплексы обладают целым рядом преимуществ перед вирусными векторами, такими как простота получения, низкая иммуногенность и неограниченный размер переносимой ДНК (Cho et al., 2001; He et al., 2010; Alavi et al., 2024; Khan, 2024). Однако их широкому клиническому применению препятствует один их существенный недостаток – низкая эффективность трансфекции (He et al., 2010). Поэтому основная задача оптимизации строения полиплексов – это такой выбор их компонентов и их соотношений, чтобы полученная эффективность трансфекции клеток ДНК, переносимой этими полиплексами, была максимальной. В качестве модуля, отвечающего как за компактизацию доставляемой ДНК, так и за проникновение ее в клетки был выбран полимер полиэтиленимин (ПЭИ) (He et al., 2010). ПЭИ довольно часто используется в полиплексах, т.к. за счет своего положительного заряда он не только хорошо компактизует ДНК, но и наночастицы полиплексов на основе ПЭИ хорошо связываются с отрицательно заряженной поверхностью клетки и довольно успешно проникают внутрь клетки (Hillaireau and Couvreur, 2009). С другой стороны, положительный заряд полиплексов может препятствовать достижению ими нужного органа или ткани в случае системного применения. Неспецифические взаимодействия полиплексов со стенками кровеносных сосудов, а также с компонентами крови, включающими в себя клетки иммунной системы, приводит к тому, что время циркуляции полиплексов в крови сильно сокращается, что сказывается на доставке в целевой орган или ткань. Одним из наиболее распространенных способов увеличения времени циркуляции молекул в крови является присоединение к ним молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ) (Binder and Skerra, 2025). В случае полиплексов добавление в их состав ПЭГ в качестве модуля, уменьшающего нежелательные взаимодействия в крови, приводит к тому, что ядро полиплексов, состоящее из ПЭИ и ДНК, оказывается окруженной гидрофильной оболочкой из молекул ПЭГ, которая и ограничивает нежелательные контакты полиплексов с компонентами крови и стенками кровеносных сосудов. Улучшить проникновение полиплексов в клетки, тем самым, повысив эффективность их трансфекции переносимой ДНК, можно путем включения в состав блок-сополимера ПЭИ-ПЭГ дополнительного модуля – проникающего в клетку TAT-пептида (Kleemann et al., 2005). Ранее в литературе комплексы блок-сополимеров ПЭИ-ПЭГ-TAT с ДНК показали довольно хорошую эффективность трансфекции не только *in vitro*, но и *in vivo* (Kleemann et al., 2005), однако, не было изучено влияние состава этих полиплексов на данную эффективность. Поэтому такого типа полиплексы и были выбраны нами для проведения процесса оптимизации их состава с целью улучшения эффективности трансфекции.

Мы выбрали ПЭИ и ПЭГ определенного строения, а в процессе оптимизации варьировали только соотношение компонентов в полиплексах. В качестве ПЭИ был выбран линейный полимер с молекулярной массой 25 кДа, а в качестве ПЭГ выступал бифункциональный ПЭГ, состоящий из 24 звеньев. Основными варьируемыми параметрами были соотношения ПЭГ/ПЭИ, ТАТ/ПЭИ в блок-сополимерах и N/P (азота блок-сополимера к фосфату ДНК в полиплексах). Далее на восьми клеточных линиях было изучено, как эффективность трансфекции клеток полиплексами, содержащими плазмиду с геном зеленого флуоресцентного белка, eGFP, зависит от данных параметров (Рис. 4.1.1). Полученные зависимости хорошо коррелировали друг с другом для различных клеточных линий ($r = 0,64–0,96$) и на них наблюдался, по меньшей мере, один широкий пик при ПЭГ/ПЭИ = 0,5-5 и N/P $\geq$ 20. Иными словами, максимальную эффективность трансфекции в произвольной клеточной линии можно получить, если трансфицировать их полиплексами, с соотношениями ПЭГ/ПЭИ и N/P, лежащими в данных диапазонах оптимальных значений. Однако мы столкнулись с тем, что значение максимальной эффективности трансфекции сильно зависило от выбранной клеточной линии.

Проведение частных корреляций первого порядка в случае, когда один из ключевых параметров был фиксирован, показало, что для большинства изученных клеточных линий существует положительная корреляция эффективности трансфекции с соотношением ТАТ/ПЭИ и отрицательная – с соотношением ПЭГ/ПЭИ (без учета точки ПЭГ/ПЭИ = 0). Таким образом, чем больше молекул ТАТ на блок-сополимере ПЭИ-ПЭГ-ТАТ, тем выше эффективность трансфекции, хотя это влияние было небольшим. Напротив, для эффективной трансфекции клеток полиплексами достаточно лишь небольшого числа молекул ПЭГ на блок-сополимере ПЭИ-ПЭГ-ТАТ (ПЭГ/ПЭИ = 1,2) и дальнейшее увеличение их количества заметно не улучшает эффективность трансфекции.

Чтобы понять, существует ли какая-нибудь связь между составом полиплексов (N/P и ПЭГ/ПЭИ), их строением и эффективностью трансфекции, были охарактеризованы размеры полиплексов и их поверхностные потенциалы. Рассчитанный из электрофоретической подвижности ζ-потенциал полиплексов оказался равным $+21,2 \pm 1,5$ мВ и не зависел от ПЭГ/ПЭИ и N/P. Определенный с помощью динамического светорассеяния средний гидродинамический диаметр полиплексов не зависел от N/P, но возрастал при увеличении ПЭГ/ПЭИ (Рис. 4.1.2б). Было показано, что средний диаметр полиплексов не коррелирует с эффективностью трансфекции клеток данными полиплексами. И действительно, эффективность трансфекции сильно зависела от соотношения N/P (Рис. 4.1.1), а гидродинамический диаметр полиплексов – нет. Однако

строение полиплексов можно описать не только их средним диаметром, но и распределением полиплексов по размеру. Для изучения этого распределения метод динамического светорассеяния подходит плохо, т.к. он предназначен для получения средних значений гидродинамических диаметров, а их распределение описывается лишь приблизительно (Mailer et al., 2015). Поэтому в данном случае использовался метод АСМ. После учета уширения латеральных размеров полиплексов за счет конечных размеров зонда АСМ, а также изменения их формы на слюде, была выявлена достоверная линейная корреляция между долей фракции полиплексов диаметром 50–75 нм и эффективностью трансфекции (Таблица 4.1.3). Таким образом, можно заключить, что, варьируя состав полиплексов (соотношения ПЭГ/ПЭИ и N/P), можно изменять долю наиболее эффективно трансфицирующей клетки фракции полиплексов со средним диаметром 50–75 нм и, тем самым, влиять на общую эффективность трансфекции клеток полиплексами.

Следует отметить, что, несмотря на общее сходство зависимостей эффективности трансфекции от ПЭГ/ПЭИ и N/P, максимально достигаемая эффективность трансфекции для различных клеточных линий сильно отличалась и лежала в диапазоне 17,7–100% (Табл. 4.1.4). Сравнение эффективности трансфекции плазмидой, содержащих два разных сильных промотера, показало, что отличия в максимальной трансфекции связаны не с различием уровня экспрессии гена, а с различием транспорта полиплексов в клетки. За транспортом полиплексов наблюдали с помощью КЛСМ, используя метод FRET. Для этого блок-сополимер ПЭИ-ПЭГ-ТАТ был помечен флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647, а ДНК было биотинилирована, что позволило присоединить к ней стрептавидин, меченный квантовыми точками QD605. В этом случае, за процессом распаковки полиплексов в отдельных компартментах клетки можно наблюдать по исчезновению резонансного переноса энергии между AF647 и QD605 (Breunig et al., 2006; Chen et al., 2008; Ho et al., 2006), а по локализации флуоресценции QD605 следить за транспортом распакованных молекул ДНК (условия были подобраны так, что свободных квантовых точек в исходном препарате не наблюдалось). Прокраска клеточных ядер и эндосом/лизосом специфическими флуоресцентными красителями позволила получить целый массив кинетических данных, касающийся относительного содержания (объем в вокселях – трехмерных пикселях) упакованных и распакованных полиплексов в эндосомах/лизосомах, цитозоле и ядрах клеток карциномы легких человека A549, Calu-1 и мышиной меланомы Клаудмана S91 (клон M3). Эти клеточные линии были специально подобраны так, чтобы включить линию, максимально эффектно трансфицируемую (меланома Клаудмана S91, клон M3), минимально трансфицируемую (A549) и линию клеток с промежуточной эффективностью трансфекции (Calu-1) (Табл. 4.1.4), чтобы

установить, какие параметры транспорта полиплексов оказывают наибольшее влияние на эффективность трансфекции клеток этими полиплексами.

Полученный массив экспериментальных кинетических данных был проанализирован с помощью четырех предложенных компартментных моделей транспорта полиплексов (Рис. 4.1.6а, 4.1.7а, 4.1.8а и 4.1.9). Эти модели, которые шли от простой к более сложной, позволили получить константы скоростей поступления запакованных и распакованных полиплексов в эндосомы/лизосомы, их выхода в цитозоль и дальнейшего поступления в ядра клеток, а также константы скоростей распаковки полиплексов в отдельных клеточных компартментах (Табл. 4.1.5). Далее определяли, от каких параметров максимально достижимая эффективность трансфекции (TE_{max}) зависит монотонно. Этими параметрами оказались только скорости входа полиплексов в клетку (v, v_0 или v_1) или константа скорости распаковки полиплексов в эндосомах/лизосомах (k_{unL}). Более того, оказалось, что при различных временах инкубации полиплексов с клетками существует статистически значимая отрицательная линейная корреляция между TE_{max} и $1/v$, а также между TE_{max} и k_{unL}. Иными словами, чем больше скорость поступления полиплексов в клетки или чем ниже скорость распаковки полиплексов в эндосомах/лизосомах, тем выше максимально достижимая эффективность трансфекции клеток данными полиплексами. Если полиплексы распаковываются в эндосомах или лизосомах, то возрастает вероятность нежелательной деградации ДНК и меньшая доля интактной ДНК доходит до целевого компартмента – ядра. Поэтому обе обнаруженных корреляции связаны с процессом транспорта неповрежденной ДНК в ядра клеток. Полученными корреляциями можно объяснить наличие оптимального диапазона размеров полиплексов (50–75 нм) для эффективной трансфекции. Вероятно, слишком крупные полиплексы (больше 75 нм диаметром) плохо интернализуются в клетки, а небольшие полиплексы (меньше 50 нм диаметром) лучше распаковываются в эндосомах с последующей деградацией переносимой ДНК в лизосомах. Этим можно объяснить низкую эффективность трансфекции клеток как слишком крупными, так и слишком мелкими полиплексами и наличие диапазона оптимальных для трансфекции размеров полиплексов.

Таким образом, анализ транспорта полиплексов выявил два основных его параметра, влияющих на эффективность трансфекции клеток этими полиплексами. Такими параметрами являются интернализация полиплексов, а также их распаковка в эндосомах/лизосомах (деградация ДНК в лизосомах). Скорость интернализации можно повысить, увеличивая концентрацию полиплексов (см. п. 4.1.2, описание модели 1) или, иными словами, концентрацию переносимой плазмидной ДНК. А уменьшения распаковки

полиплексов в эндосомах/лизосомах можно достичь увеличением соотношения N/P. При этом молекулы блок-сополимеров находятся в сильном избытке по отношению к плазмидной ДНК, поэтому значительная их доля находится не в полиплексах, а в свободном состоянии. Увеличение N/P приводит к увеличению этой доли. В слабокислых условиях поздних эндосом (pH < 6) фосфатные группы ДНК начинают протонироваться, что приводит к распаковке полиплексов. Однако присутствие свободных молекул блок-сополимеров препятствует этому процессу. Таким образом, чтобы увеличить эффективность трансфекции нужно повысить концентрацию переносимой плазмидной ДНК и значение соотношения N/P в полиплексах. Для проверки этих теоретических выводов была использована линия клеток A549, которая хуже всех изученных нами линий трансфицировалась полиплексами. Для нее было показано, что увеличением как концентрации плазмидной ДНК, так и соотношения N/P можно достичь возрастания эффективности трансфекции вплоть до 100% (Рис. 4.1.10а). Итак, проведение процесса оптимизации состава полиплексов и их концентрации позволило повысить эффективность трансфекции клеток переносимой данными полиплексами ДНК с нескольких процентов до 100 процентов.

Кроме задачи синтеза новых белков в клетке, стаяла задача воздействия на выбранный внутриклеточный белок с помощью антителоподобной молекулы. Для доставки этих молекул в клетку были выбраны предложенные А.С. Соболевым модульные полипептидные конструкции – МНТ (Sobolev, 2008; Sobolev, 2009a; Sobolev, 2009b). Эти конструкции способны путем специфической интернализации, т.е. за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза, доставлять различные билогически активные вещества в выбранный компартмент клеток мишеней. Для связывания и интернализации в клетки-мишени МНТ используют лигандный модуль, который способен взаимодействовать с интернализуемым рецептором, сверхэкспрессированным на поверхности клеток-мишеней. Примерами лигандного модуля являются эпидермальный фактор роста (ЭФР) и α-меланоцитстимулирующий гормон (α-МСГ). После интернализации МНТ оказываются в эндосомах, содержимое которых постепенно закисляется. Чтобы избежать попадания в лизосомы и деградации, в состав МНТ входит эндосомолитический модуль, который способен активироваться при уменьшении pH среды. Обычно в качестве этого модуля в МНТ использовался транслокационный домен дифтерийного токсина (ДТокс). Для доставки МНТ в выбранный компартмент клетки-мишени тоже существует специальный модуль. Так, например, для доставки в ядро в МНТ использовался оптимизированный сигнал ядерной локализации (СЯЛ) большого Т-антигена вируса SV40, где на N-конце был добавлен регуляторный участок, ускоряющий ядерный импорт, и в котором была

заменена одна аминокислота, ингибирующая ядерный импорт. Все модули вместе объединяет модуль-носитель, который служит также для присоединения доставляемой молекулы. Как правило, таким модулем являлся гемоглобиноподобный белок *E.coli* (HMP), который не только позволяет довольно хорошо пространственно разнести все другие модули с целью уменьшения их нежелательного взаимного влияния друг на друга, но и придает всей конструкции достаточно хорошую растворимость, что способствует получению МНТ из *E.coli* в необходимых количествах. В целом цикле работ, проведенных с участием автора диссертационной работы, было показано, что все модули в составе МНТ сохраняют свои функциональные свойства. В качестве лигандного модуля в этих МНТ выступали ЭФР, α-МСГ или фолат. Цитотоксическое действие доставляемых с помощью данных МНТ в ядра клеток-мишеней фотосенсибилизаторов или радиоизотопов увеличивалось на порядки, а в экспериментах *in vivo* наблюдались достоверная задержка роста опухолей и увеличение продолжительности жизни мышей, вплоть до полного их излечения. Таким образом, еще до процесса оптимизации, МНТ являются довольно эффективной системой доставки молекул в заданный компартмент клеток-мишеней. Для проведения процесса оптимизации МНТ, прежде всего, была изучена его трехмерная структура.

Множественные попытки кристаллизовать МНТ не удались, поэтому его трехмерная структура получалось с помощью методов АСМ, ПЭМ и МРР. Прежде всего были получены изображения молекул МНТ-αМСГ и МНТ-ЭФР на слюде с помощью метода АСМ в жидкой фазе при pH 8,0. Данные молекулы имеют немного изогнутую форму, где хорошо различимы два отдельных домена – эндосомолитический модуль и модуль-носитель. Лигандный модуль имеет небольшие размеры, поэтому на изображениях АСМ не виден. Статистический анализ полученных изображений позволил установить, что существуют две основных конформации МНТ – «компактная» и «вытянутая», характеризующиеся отношениями длина/ширина равными 1,4 и 2,0, соответственно. Причем при pH 8,0 преобладает «компактная» МНТ (частота встречаемости 67% для МНТ-αМСГ и 58% для МНТ-ЭФР, соответственно). По данным ПЭМ тоже наблюдались две основные конформации МНТ, со сходными с АСМ соотношениями длина/ширина, однако в данном случае преобладала «вытянутая» конформация МНТ (частота встречаемости 62% для МНТ-αМСГ и 84% для МНТ-ЭФР, соответственно). Вероятно, это связано с тем, что данные ПЭМ получали при pH 5, а АСМ – при pH 8. По данным ПЭМ, используя известные из баз данных структуры ДТокс и HMP, была проведена 3D реконструкция молекулы МНТ (Рис. 4.2.3). Используя полученную 3D структуру МНТ, данные МРР (pH 8) и применяя для моделирования

метод оптимизации ансамбля (EOM) (Tria et al., 2015a), нами были получены четыре 3D модели МНТ-αМСГ (Рис. 4.2.5). Однако три модели отличались друг от друга лишь незначительно, поэтому их можно считать за одну конформацию МНТ. Без учета лигандного модуля по этим данным получилось, что МНТ-αМСГ может принимать две основные конформации, отношения длина/ширина для которых были равны 1,2–1,5 и 2,2, соответственно. Эти значения хорошо совпадают со значениями, полученными методами АСМ и ПЭМ. Причем, частота встречаемости «компактной» конформации, полученной методами АСМ (67 ± 7%) и MPP (EOM) (71%) сходная. Если доставляемая антитилоподобная молекула будет распологаться на одном из концов МНТ, то «компактная» конформация может накладывать определенные стерические ограничения на ее взаимодействие с внутриклеточным белком-мишенью. Поэтому автором диссертационной работы в качестве оптимизации строения МНТ было предложено ввести сайт отщепления протеазами антителоподобной молекулы от МНТ. При этом это отщепление должно совершаться до взаимодействия этой молекулы с белком-мишенью, т.е. когда МНТ находится еще в эндосомах. Однако механизм выхода из эндосом, как описано в п. 2.3, для различных систем доставки может сильно отличаться. Так для дифтерийного токсина часто предполагается, что ДТокс приводит к транслокации других частей молекулы через липидную мембрану, причем больших пор в мембране при этом не образуется (см. п. 2.3.4). В этом случае, отщепление от МНТ антителоподобных молекул в эндосомах будет приводить к тому, что они не смогут выйти из эндосом и, в конечном счете, деградируют в лизосомах. Напротив, если ДТокс приводит к образованию крупных пор, то отщепление антителоподобных молекул от МНТ в эндосомах не будет препятствовать выходу этих молекул из эндосом. Более того, можно ожидать, что эффективность выхода только повыситься, т.к. уменьшаться потери этих молекул за счет связывания МНТ с мембраной эндосом. Для понимания механизма выхода МНТ из эндосом были изучены дефекты, которые образуются в липидных мембранах под действием МНТ.

За выход МНТ из эндосом отвечает его эндосомолитический модуль ДТокс. Однако модуль-носитель, HMP, может оказывать положительное влияние на мембранолитическую активность ДТокс. Так HMP, который сам обладает мембранолитической активностью при pH ниже 4,5, увеличивал диапазон pH (pH 3–6,5), в котором наблюдается мембранолитическая активность ДТокс (pH 4–6). Кроме того, при pH 5,5 (поздние эндосомы) HMP способствовал существенному уменьшению концентрацию ДТокс, необходимой для достижения того же мембранолитического эффекта, что и для отдельного ДТокс (Рис. 4.3.2). Дефекты, которые образуются в

мембранах под действием МНТ, помогают установить возможные молекулярные механизмы такой кооперативности. При pH 5,5 ДТокс в МНТ-αМСГ изменяет свою конформацию, экспонируя наружу свою гидрофобную часть, что приводит к образованию стабильных ионных каналов в плоских бислойных мембранах (Рис. 4.3.3). С помощью метода АСМ было установлено, что при уменьшении pH с 7,5 до 5,5 в поддерживаемом липидном бислое, содержащем полноразмерный МНТ, образуются кольцевые структуры из 10–17 молекул МНТ. Для МНТ, лишенного ДТокс, похожие кольцевые структуры тоже наблюдались, в то время как отдельный ДТокс был неспособен их образовывать, хотя мог агрегировать в липидном бислое. Поэтому был сделан вывод о том, что за образование кольцевых структур отвечает модуль НМР. Следует отметить, что подобного вида олигомеризация, по-видимому, является свойством самой молекулы НМР, т.к. она наблюдалась и при его кристаллизации (Ilari et al., 2002a). На месте кольцевых структур в липидных бислоях далее начинали возникать крупные флуктуирующие поры. Их размер был достаточен для того, чтобы через них спокойно проходили молекулы МНТ, которые не связались с липидным бислоем. Таким образом, предполагаемый механизм выхода МНТ из эндосом следующий. Часть молекул МНТ при закислении содержимого эндосом связывается с их мембраной, где данные молекулы олигомеризуются за счет модуля НМР. Это приводит к повышению локальной концентрации ДТокс в мембране эндосом, что вызывает в дальнейшем образование крупных пор, через которые могут выходить из эндосом не связавшиеся с их мембраной молекулы МНТ и благодаря которым pH эндосом возвращается к нейтральным значениям. Такой механизм не мешает антителоподобным молекулам, отщепившимся в эндосомах от МНТ, выходить из эндосом в цитозоль. Более того, предположительно, что молекулы МНТ, встроившиеся в липидный бислой, остаются в нем даже при нейтральных значениях pH. Такое поведение характерно для химер, содержащих ДТокс (Nizard et al., 2001). Поэтому можно предположить, что отщепление антителоподобных молекул от МНТ будет только увеличивать эффективность их выхода из эндосом.

Учитывая, что МНТ можно направить практически на любую внутриклеточную мишень, для начала процесса оптимизации нужно определить тип используемой мишени и, соответственно, какой МНТ для этого выбрать. Такой мишенью может быть, например, внутриклеточный белок, взаимодействие с которым будет приводить к заметному терапевтическому ответу (Wells and McClendon, 2007; Scott et al., 2016). Как правило, для связывания с такими внутриклеточными мишенями используются низкомолекулярные ингибиторы (Bakail and Ochsenbein, 2016; Lu et al., 2020a). Однако их практическое применение часто сильно ограничено из-за наличия нежелательных взаимодействий с

другими внутриклеточными молекулами (Baell and Walters, 2014; Arrowsmith et al., 2015). Высокоспецифического взаимодействия можно достигнуть, используя антитела или антителоподобные молекулы, которые, в отличие от низкомолекулярных ингибиторов, можно подобрать практически к любому белку-мишени (Bakail and Ochsenbein, 2016; Gebauer and Skerra, 2020; Lu et al., 2020a; Shipunova and Deyev, 2022; Tolmachev et al., 2022). Однако их применяют, как правило, для трансмембранных или секретируемых белков (Lu et al., 2020b; Cai and Pandit, 2021), в то время как внутриклеточные белки, составляющие две третьих всего протеома (Rosenkranz and Slastnikova, 2023), остаются недоступными для них. Совместно с коллегами из нашей лаборатории была показана возможность доставки высокоспецифичных молекул к выбранной внутриклеточной белковой мишени. Так, например, МНТ, содержащий клеточный регулятор – белок p21, может с константой диссоциации 100 нМ взаимодействовать с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) и, тем самым, приводить к достоверно худшей репарации двунитевых разрывов ДНК, вызванных антибиотиком блеомицином. Кроме того, МНТ, содержащий антителоподобную молекулу, нанободи, к ядерному белку-онкогену c-Myc, способен взаимодействовать с ней с высоким сродством (K_d = 46 нМ) и достоверно подавлять индуцируемую cMyc экспрессию нуклеолина, а также вызывать достоверный антипролиферативный эффект на клетках аденокарциномы молочной железы MCF7. Однако для сравнения эффективности доставки в клетки антителоподобной молекулы с помощью МНТ желательно было выбрать более универсальный белок-мишень, взаимодействие с которым приводило бы к заметному терапевтическому эффекту не только в раковых, но и нормальных клетках. Таким белком был выбран Keap1, который является ингибитором транскрипционного фактора Nrf2.

Транскрипционный фактор Nrf2 регулирует экспрессию нескольких сотен генов, отвечающих за антиокислительную защиту и регенеративные процессы (Baird and Yamamoto, 2020). В норме Nrf2 образует комплекс с Keap1 за счет высокоаффинного ETGE-мотива и назкоаффинного DLG-мотива, что приводит к протеосомной деградации Nrf2. Активация Nrf2-системы происходит, когда комплекс Nrf2 с Keap1 нарушается. Обычно это наблюдается при окислении цистеинов Keap1 в условиях окислительного стресса. Однако, учитывая, что подавление активности Nrf2 происходит при многих заболеваниях, принудительная его активация может вызвать заметный терапевтический эффект при лечении нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и некоторых вирусных заболеваний, сахарного диабета, воспаления и интоксикации (Dodson et al., 2019; Ulasov et al., 2022). Для этой активации можно использовать низкомолекулярные электрофильные молекулы. Однако эти молекулы могут реагировать с другими клеточными

нулеофильными белками, поэтому часто приводят к заметным побочным эффектам (Sporn and Liby, 2012; Blewett et al., 2016). Альтернативным способом активации Nrf2-системы может быть использование специальных Nrf2-пептидов или антителоподобных молекул (Guntas et al., 2016), способных взаимодействовать с Keap1 в том же участке, где этот белок взаимодействует с Nrf2, тем самым, приводя к нарушению комплекса Nrf2 с Keap1. Для включения в состав МНТ была выбрана одна из таких антителоподобных молекул – монободи к Keap1. Планировалось, что такие МНТ, с одной стороны, будут обладать потенциальным антиокислительным терапевтическим эффектом, а с другой стороны, учитывая, что существенная доля Keap1 находится на поверхности митохондрий (Lo and Hannink, 2008), могут доставлять различные молекулы к митохондриям. Именно такие МНТ и были выбраны как отправная точка для процесса оптимизации эффективности доставки ими различных молекул.

В качестве лигандного модуля у МНТ к Keap1 выбрана антителоподобная молекула – аффибоди к РЭФР. Нами было показано, что МНТ с ЭФР может приводить к заметному пролиферативному эффекту, а для МНТ с аффидоби к РЭФР такого эффекта обнаружено не было. Поэтому для выделения чистого эффекта самого МНТ к Keap1, а не последствий активации РЭФР, у этого МНТ в качестве лигандного модуля было выбрано аффибоди к РЭФР, а не ЭФР. Было показано, что все модули в составе МНТ к Keap1 сохраняют свои функциональные свойства. Так, МНТ за счет лигандного модуля связывался с РЭФР на поверхности клеток AML12, причем избыток ЭФР эффективно ингибировал это связывание. За счет эндосомолитического модуля данный МНТ проявлял заметную мембранолитическую активность при pH среды, характерной для поздних эндосом (pH 5,5). В растворе методом термофореза было показано, что монободи в составе этого МНТ было способно с высоким сродством взаимодействовать с Keap1 (Kd = 5,4 нМ). Взаимодействие МНТ с Keap1 было также показано в живых клетках с помощью методов FLIM-FRET и CETSA. На клетках AML12, временно экспрессирующих белок Keap1 слитый с флуоресцентным белком hrGFP, наблюдались области, где происходит FRET между этим флуоресцентным белком и красителем AF568, которым был помечен МНТ (Рис. 4.4.4). Оцененное по эффективности FRET среднее расстояние между донором и акцептором составило 5,3 нм. По методу CETSA было определено, что данный МНТ в клетках приводит к заметному сдвигу кривой плавления Keap1, указывающему на взаимодействие между этими белками (Рис. 4.4.7).

На основании известных литературных данных о том, что заметная доля Keap1 находится на поверхности митохондрий (Lo and Hannink, 2008), было высказано предположение, что МНТ к Keap1 можно использовать для доставки биологически

активных молекул к митохондриям. С помощью конфокальной микроскопии с использованием FLIM было показана хорошая колокализация красителей, одним из которых был прокрашен МНТ, а другим – митохондрии (коэффициент линейной корреляции Пирсона равен 0,77) (Рис. 4.4.8). Поэтому существенная часть МНТ к Keap1 действительно локализуется в области митохондрий. Это было использовано для доставки фотосенсибилизатора хлорина e_6 к митохондриям опухолевых клеток A431. Наблюдалось достоверное 8,6-кратное усиление фотоцитотоксического эффекта фотосенсибилизатора, присоединенного к МНТ к Keap1, по сравнению со свободным фотосенсибилизатором (Рис. 4.4.9). Таким образом, данный МНТ может также использоваться и как противораковое средство.

Методом CETSA с прокраской антителами на Nrf2 было показано, что МНТ к Keap1 не только способен взаимодействовать в клетках AML12 с этим белком, но и вытеснять Nrf2 из комплекса с Keap1 (Рис. 4.4.10). Разрушение комплексов Nrf2 с Keap1 должно существенно уменьшить скорость деградации Nrf2, а значит увеличить его концентрацию в цитоплазме и ядре (Kobayashi et al., 2006). Нами было показано, что ответ клеток на МНТ очень быстрый и уже после 15 минут инкубации с этим МНТ концентрация Nrf2 в ядре и цитоплазме возрастала в 2,6 и 2,5 раза, соответственно. Такое возрастание концентрации транскрипционного фактора Nrf2 может приводить к заметной антиокислительной защите клеток. И действительно, используя чувствительный к активным формам кислорода краситель cDCFH-DA, было показано, что 15 минут инкубации с 500 нМ МНТ к Keap1 приводят к достоверной защите клеток AML12 от окислительного стресса, вызванного добавлением к ним перекиси водорода. Антиокислительная защита данного МНТ была показана не только *in vitro*, но и *in vivo*. Для этого использовалась известная мышиная модель окислительного поражения печени, вызванного большими дозами ацетаминофена, известного также как парацетамол (Lee, 2017; Shen et al., 2018). Известно, что высокий уровень парацетамола в печени приводит к появлению N-ацетил-р-бензохинонимина, реагирующего с глутатионом, резкое уменьшение уровня которого в клетке вызывает окислительный стресс и последующую гибель гепатоцитов (Lee, 2017; Shen et al., 2018). Степень поражения обычно характеризуют по уровню сывороточной активности ферментов АЛТ и АСТ, а также по увеличению веса печени за счет ее отека. Спустя три часа после введения парацетамола (доза 300 мг/кг), активности АЛТ и АСТ увеличивались в 3–5 раз, а вес печени увеличивался в 1,5 раза. Если за 2 часа до введения парацетамола ввести МНТ к Keap1 (7 нмоль на мышь), то это приводило к достоверному ингибированию (на 25–43 % от величины эффекта парацетамола) роста активности АЛТ и АСТ, а также увеличения веса

печени, вызванного парацетамолом (Таблица 4.4.1). Таким образом, данный МНТ способен не только защищать клетки от действия перекиси водорода, но и приводить к защите печени *in vivo* от цитотоксического действия больших доз парацетамола. Таким образом, данный подход открывает перспективы для его потенциального применения не только для возможного лечения онкологических заболеваний (при доставке цитотоксических агентов к митохондриям), но и патологий, связанных с окислительным стрессом, например, таких как нейродегенеративные заболевания.

Для оптимизации строения выбранного МНТ нужно иметь возможность оценивать эффективность доставки с помощью него молекул в выбранный клеточный компартмент. Если МНТ доставляет некоторую молекулу, которая потенциально может взаимодействовать в клетке с выбранным белком-мишенью, то желательно не только оценить среднюю концентрацию этой молекулы в выбранном клеточном компартменте, но и эффективную ее концентрацию, т.е. концентрацию молекул, сохраняющих в условиях клетки способность взаимодействовать с выбранным белком-мишенью. В случае МНТ к Keap1, в качестве доставляемой молекулы выступало монободи к Keap1, а клеточным компартментом, куда необходимо было ее доставить являлся цитозоль. С помощью ныне существующих подходов можно, например, оценить концентрацию выбранного белка в цитоплазме. Это можно сделать, например, с помощью иммуноблоттинга с антителами на этот белок и используя калибровочные растворы этого белка (Iso et al., 2016). Однако существующие подходы не позволяют определить, какая доля этого белка взаимодействует с выбранным белком-мишенью, а какая находится в других клеточных компартментах, например, в эндосомах, или какая часть этого белка за счет частичной деградации теряет возможность связываться с белком-мишенью. Поэтому необходимо было разработать подход по оценке эффективной концентрации выбранной молекулы в заданном компартменте.

Предложенный автором диссертационной работы подход основывается с одной стороны на методе CETSA, а с другой стороны на равновесной модели, описывающей взаимодействие между выбранной молекулой и белком-мишенью в заданном компартменте клетки, в качестве которого была выбрана вся цитоплазма. Иными словами, эффективная концентрация изучаемой молекулы в цитоплазме оценивается по ее способности образовывать комплекс с белком-мишенью. Обычно CETSA использовался для качественного описания наличия взаимодействия между изучаемой молекулой и различными белками (Martinez et al., 2013; Tolvanen, 2022; Caballero and Lundgren, 2023). Мы предложили количественное использование этого метода, когда при разных температурах получается доля свободного белка-мишени (не участвующая во

взаимодействии с изучаемой молекулой), которая затем экстраполируется до температуры 37 °C. Полученная доля свободного белка-мишени при физиологических температурах использовалась в предложенной равновесной модели связывания между этим белком и изучаемой молекулой. При этом предполагалось, что изучаемая молекула и белок-мишень распределены относительно равномерно в цитоплазме клеток и между ними успевает установиться локальное равновесие. За объем цитоплазмы принималась разница между объемом клетки и объемом ее ядра. Эти объемы были оценены с помощью оптической микроскопии открепленных от подложки клеток. Используя эти объемы и определенную с помощью проточной цитофлуориметрии концентрацию клеток, было рассчитано, насколько будет уменьшаться концентрация изучаемых молекул за счет их разбавления при лизисе. А, зная это, по полученной с помощью CETSA концентрации изучаемых молекул в лизате была оценена их эффективная концентрация в клетках.

В случае МНТ к Keap1 в предложенном подходе рассматривалась не двойная, а тройная система: МНТ, Keap1 и Nrf2. Взаимодействие МНТ с Keap1 приводило к высвобождению Nrf2 из комплекса с Keap1, что сильно сказывалось на кривой плавления Nrf2. Для модели необходимо знать равновесные константы диссоциации комплексов МНТ с Keap1 и Keap1 с Nrf2. Первая была измерена с помощью метода термофореза (K_d = 5,4 ± 0,5 нМ), а вторая – взята из литературных данных (K_d = 5 нМ (Fukutomi et al., 2014)). Чтобы верифицировать предложенный подход, с помощью него была оценена концентрация Nrf2 в четырех различных клеточных линиях (Табл. 4.5.2). Ранее, Исо и др. с помощью калибровочных зависимостей получили количества молекул Nrf2 на клетку для этих клеточных линий (Iso et al., 2016), которые мы, зная объемы клеток и их ядер, пересчитали в концентрации. Наблюдалось очень хорошее соответствие между литературными данными и данными, полученными с помощью предложенного автором диссертационной работы подхода (Табл. 4.5.2). Кроме концентраций Nrf2 этот подход позволил оценить и концентрации Keap1 в нескольких линиях клеток. Было показано, что если Nrf2-система в клетках не активирована, то средние концентрации Nrf2 и Keap1 не зависят от типа клеток и составляют 62 ± 5 и 269 ± 4 нМ, соответственно. Пользуясь этими концентрациями и предложенным подходом, были оценены концентрации МНТ к Keap1 в клетках AML12, при 5, 10 и 15 минутах их инкубации с данными клетками. Они оказались равны 249 ± 14, 291 ± 12 и 373 ± 17 нМ для 5, 10 и 15 минут инкубации, соответственно. С целью дополнительной верификации предложенного подхода эти концентрации также были оценены стандартным способом, с использованием калибровочных растворов с известными концентрациями МНТ и иммуноблоттингом с антителами на МНТ. Полученные таким способом концентрации оказались равны 264 ±

30, 286 ± 21 и 420 ± 47 нМ для времен инкубации 5, 10 и 15 минут, соответственно. Следует отметить, что в одном из этих способов использовались антитела на Nrf2, а в другом – на МНТ. По критерию Манна-Уитни достоверных отличий между концентрациями МНТ, полученными двумя разными способами, не наблюдалось, что указывает на применимость предложенного автором диссертации подхода. Данный подход позволяет оценивать эффективную концентрацию доставляемых с помощью МНТ молекул в цитоплазме вне зависимости от того, находятся ли они в составе МНТ или нет.

Для повышения эффективности взаимодействия доставляемой молекулы, например, монободи к Keap1, с белком-мишенью, автором настоящей работы было предложено включить в состав МНТ последовательность для отщепления фрагмента с монободи кислыми протеазами, преимущественно находящимися в эндосомах. При таком отщеплении модули ДТокс и НМР будут оставаться вместе, что позволит сохранить положительное влияние НМР на мембранолитическую функцию ДТокс. В результате данной оптимизации можно ожидать как улучшения сродства доставляемой молекулы к внутриклеточному белку-мишени, так и увеличения эффективной концентрации доставляемых молекул в цитоплазме.

Для осуществления данной идеи, была, прежде всего, выбрана подходящая эндосомная протеаза. Основными требованиями для нее являются высокая активность при pH, характерных для эндосом (5,5–6), и в случае, когда она секретируется во внеклеточное пространство, минимальная активность вне клетки (pH 7,0–7,5). В качестве подходящей под эти критерии протеазы был выбран катепсин B, который многие вирусы используют для активации вирусных поверхностных белков с целью выхода вирусов из эндосом (Bottcher-Friebertshauser et al., 2013). Сайты для этой протеазы также успешно применялись в различных системах доставки лекарств и для активации некоторых предшественников лекарств (Kern et al., 2017; Dheer et al., 2019). Однако какой из известных из литературы сайтов обладает наибольшей скоростью расщепления при pH, характерных для эндосом, известно не было. Поэтому мы выбрали восемь различных пептидов, которые теоретически могут расщепляться катепсином B, и пометили их с обеих концов флуоресцентными красителями, между которыми может наблюдаться FRET. Расщепление этих пептидов приводило к исчезновению FRET, что позволило получить кинетики этого расщепления при pH 6,0 и 7,5 (отвечают pH эндосом и внеклеточного пространства (Biniossek et al., 2011)). Наилучшую скорость расщепления при pH 6,0 показала аминокислотная последовательность FKFL, причем при pH 7,5 константа скорости расщепления была в 8 раз ниже. Именно эта последовательность была выбрана в

качестве сайта расщепления протеазой катепсином B в оптимизированных вариантах МНТ.

МНТ к Keap1, в который между модулем НМР и монободи к Keap1 был добавлен сайт FKFL был обозначен $МНТ_{мр}$. Изучение с помощью электрофореза в ПААГ кинетики расщепления $МНТ_{мр}$ активированным катепсином B показало, что сайт FKFL в составе $МНТ_{мр}$ доступен для действия протеазы. С помощью метода термофореза было показано, что отщепление монободи от $МНТ_{мр}$ увеличивало его сродство к Keap1 более чем на порядок (уменьшало K_d с 4,9 до 0,27 нМ). Было показано, что лигандный и эндосомолитический модули в составе $МНТ_{мр}$ сохраняют свои функциональные свойства. Для МНТ без возможности отщепления монободи к Keap1 и для $МНТ_{мр}$ были получены зависимости доли свободного Nrf2 при 37°C от времени инкубации МНТ с клетками AML12 (Рис. 4.6.7). В последнем случае скорость возрастания доли свободного Nrf2 и максимально возможные значения этой доли заметно больше, чем для варианта без возможности отщепления. С помощью предложенного подхода, были оценены концентрации монободи к Keap1 для МНТ с и без возможности его отщепления при 2 и 5 минутах инкубации этих МНТ с клетками AML12. Они для этих двух случаев составили 214,9 ± 1,3, 251 ± 9 нМ и 195 ± 10, 240 ± 21 нМ для 2 и 5 минут инкубации, соответственно. Хоть и кажущаяся концентрация для случая с расщеплением на 5-10% выше концентрации в случае МНТ без возможности расщепления, но по критерию Манна-Уитни эта разница не достоверная. Таким образом, введение сайта FKFL в МНТ не оказывает заметного влияния на эффективность выхода монободи к Keap1 из эндосом. А сильные отличия в зависимостях доли свободного Nrf2 от времени инкубации клеток с МНТ преимущественно обусловлены увеличением сродства монободи к Keap1 при его отщеплении от МНТ. МНТ с возможностью отщепления монободи к эндосомах также достоверно лучше защищает клетки от действия перекиси водорода, чем МНТ без возможности этого отщепления (Рис. 4.6.8). Таким образом, введение в МНТ сайта отщепления антителоподобной молекулы в эндосомах существенно повышает ответ клетки на воздействие этой молекулы. Это отщепление применялось в дальнейшей нашей работе для повышения эффективности разных типов МНТ, в частности при создании МНТ, нацеленных на нуклеокапсидный белок вируса SARS-CoV-2.

МНТ можно нацелить и, например, на лечение вирусных заболеваний. Для этого в качестве белка-мишени целесообразно выбрать необходимый для функционирования вируса белок. Таким белком для коронавируса SARS-CoV-2 является нуклеокапсидный белок (N-белок), который не только принимает активное участие в сборке и упаковке этого вируса, но и участвует в репликации и транскрипции вирусной РНК и задействован

в подавлении клеточного иммунитета (Karwaciak et al., 2021; ul Haq et al., 2022; Wu et al., 2023). Учитывая высокую консервативность отдельных частей этого белка, есть существенная вероятность, что МНТ, нацеленный на эти части N-белка вируса SARS-CoV-2, будет взаимодействовать с N-белками и других коронавирусов. Так, например, с помощью метода термофореза нами было показано, что из семи антителоподобных молекул, монободи, к N-белку вируса SARS-CoV, три монободи с высоким сродством взаимодействуют и с N-белком вируса SARS-CoV-2. Однако в составе слитых конструкций аффиность этих монободи к N-белку может падать в несколько раз по сравнению со свободным монободи, что было показано нами на примере конструкций, где к данным монободи присоединяли TAT-пептид или шаттл-пептид S10. Поэтому введение в эти конструкции сайта отщепления монободи в эндосомах может существенно повысить эффективность их взаимодействия с N-белком в клетках.

Для взаимодействия с N-белком вируса SARS-CoV-2 был выбран МНТ, который содержал монободи NC2, с возможностью его отщепления по сайту FKFL. Этот МНТ был обозначен $МНТ_{N1}$. Согласно литературным данным константа диссоциации комплекса монободи NC2 с N-белком равна 6,7 нМ (Du et al., 2020). Для $МНТ_{N1}$ было показано, что сайт FKFL доступен для действия протеазы катепсина B. С помощью метода термофореза было показано, что отщепление этого монободи на порядок увеличивает его сродство к N-белку (K_d = 116 ± 20 и 10 ± 3 нМ до и после отщепления, соответственно). Было показано, что лигандный и эндосомолитический модули в составе $МНТ_{N1}$ сохраняют свои функциональные свойства. С помощью метода CETSA продемонстрировано, что $МНТ_{N1}$ способен взаимодействовать с N-белком не только в растворе, но и в клетках-мишенях. Эти МНТ могут также влиять на образование N-белком биоконденсатов. Эти каплевидные структуры, вызванные разделением фаз жидкость-жидкость, имеют повышенную концентрацию белка, ответственного за их образование (Semerdzhiev et al., 2022). Считается, что для вирусов они являются основой для образования вирусного капсида, служа так называемыми «вирусными фабриками», а также защищают вирусные белки от деградации протеазами (Wang et al., 2021; Zheng and Gao, 2023). Для N-белка их образование в клетках тоже установлено (Wang et al., 2021; Zheng and Gao, 2023). Известно, что молекулы, способные взаимодействовать с вирусным белком, отвечающим за образование биоконденсатов, могут вызывать их разрушение, что, в свою очередь, блокирует производство вируса в клетке (Wang et al., 2021). Похожие на биоконденсаты структуры наблюдались нами для клеток A549, временно экспрессирующих N-белок, слитый с флуоресцентным белком mRuby3 (Рис. 4.7.5). Эти структуры разрушались под действием $МНТ_{N1}$, в то время как, МНТ без монободи к N-белку не вызывал их

разрушения (Рис. 4.7.5). Таким образом, МНТ с отщепляемым в эндосомах монободи NC2 потенциально способен ингибировать производство вируса SARS-CoV-2.

Чтобы усилить биологический эффект от взаимодействия доставляемой МНТ антителоподобной молекулы с белком-мишенью можно не только добиться образования их комплекса, но и вызвать деградацию белка-мишени. Из литературных данных известны способы привлечения клеточных убиквитинлигаз E3, способных вызывать деградацию выбранных белков по протеосомному или аутофагосомному пути (Verma et al., 2020; Zhao et al., 2022). Причем эти способы благодаря каталитическому механизму позволяют деградировать белок-мишень в довольно высокой концентрации. Одним из таких наиболее распространенных способов является использование химер, вызывающих направленный протеолиз (PROTACs, PROteolysis-TArgeting Chimeras). Некоторые из таких химер, в которых, как правило, используются низкомолекулярные лиганды, уже дошли до клинических испытаний (Mullard, 2021; Song et al., 2023). Однако низкомолекулярные лиганды можно подобрать только к довольно ограниченному кругу белков-мишеней. Известны случаи использования и антителоподобных молекул для направленной деградации белков (Portnoff et al., 2014; Shin et al., 2015; Fulcher et al., 2017; Ibrahim et al., 2020; Lim et al., 2020), однако, их терапевтическое применение весьма ограничено из-за проблем с доставкой в клетку самих антителоподобных молекул (Niamsuphap et al., 2020; Tolmachev et al., 2022). Эти проблемы мы предложили решить с использованием технологии МНТ и тем самым получить теоретическую возможность деградировать широкий спектр внутриклеточных белковых мишеней.

Для отработки данной технологии в качестве убиквитинлигазы E3 был выбран белок Keap1, а в качестве белка-мишени – N-белок вируса SARS-CoV-2. Для деградации этого белка в состав $МНТ_{N1}$ между сайтом отщепления в эндосомах (FKFL) и монободи NC2 была включена последовательность DPETGEYL (Keap1_E3PB), способная взаимодействовать с Keap1 с наномолярной аффиностью (Lu et al., 2018). Иными словами, в эндосомах эта последовательность будет отщепляться слитой с монободи. Было показано, что в полученном белке, обозначенном $МНТ_{N2}$, все модули сохраняют свои функциональные свойства. А именно, за счет лигандного модуля данный МНТ способен связываться с РЭФР на поверхности клеток-мишеней, а за счет эндосомолитического модуля – приводить к образованию дефектов в липидных мембранах при pH 5,5. Кроме того, сайт FKFL в составе $МНТ_{N2}$ является доступным для эндосомной протеазы катепсина B. Сродство расщепленного катепсином B $МНТ_{N2}$ приблизительно в три раза больше, чем не расщепленного (K_d = 17,2 и 47,2 нМ, соответственно). Деградацию N-белка наблюдали на клетках A549 и A431, стабильно экспрессирующих данный белок,

слитый с флуоресцентным белком mRuby3. Достоверная деградация спустя 15-24 часа инкубации с $МНТ_{N2}$ была обнаружена как по уменьшению флуоресценции белка mRuby3, так и по уменьшению интенсивности полосы иммуноблоттинга с антителами на N-белок (Рис. 4.7.10). Причем МНТ без последовательности Keap1_E3PB показывал достоверно меньший эффект, чем МНТ с этой последовательностью (Рис. 4.7.9). Иными словами, деградация в значительной мере происходит за счет привлечения убиквитинлигазы Keap1. Использование известных ингибиторов протеосомной деградации, MG132 (Guo and Peng, 2013), и автофагии, Бафиломицина A1 (Li et al., 2016), показало, что деградация N-mRuby3 протекает преимущественно по пути автофагии, а не по протеосомному пути. Определив объемы клеток A549 и A431 и их ядер, по известным калибровочных растворам N-белка была оценена его концентрация в данных клетках. Она составила 19,0 ± 1,3 и 9,0 ± 1,8 мкМ, для клеток A549 и A431, соответственно. Используя данные иммуноблоттинга (Рис. 4.7.10), были получены зависимости уменьшения концентрации N-белка в этих клетках в результате его деградации от времени инкубации клеток с $МНТ_{N2}$ (Рис. 4.7.12). По ним было установлено, что скорость деградации N-белка в клетках A431 и A549 приблизительно одна и та же и составляет 130-160 нМ в час. У этих клеток количество РЭФР отличается больше, чем на порядок. Поэтому данная скорость ограничена не концентрацией МНТ, а концентрацией Keap1 в клетке. Ранее мы оценили, что общая концентрация Keap1 в клетке составляет около 270 нМ. Однако не обязательно все это количество будет взаимодействовать с МНТ, т.к. Keap1 может взаимодействовать со множеством разных белков в клетке. Поэтому только концентрация Keap1, способного взаимодействовать с МНТ, будет определять скорость деградации N-белка в клетках.

Несмотря на эффективность деградации N-белка в клетках с помощью $МНТ_{N2}$, данный МНТ является только демонстрацией возможности нашего подхода направленной деградации выбранного белка в клетке. Дело в том, что этот МНТ способен поступать только в клетки, имеющие определенный тип рецепторов (РЭФР), что зачастую не выполняется для клеток, подверженных данному вирусу. Чтобы приблизиться к созданию потенциального лекарственного средства желательно было получить МНТ, способный независимо от конкретных рецепторов проникать в клетки. Для этого автором диссертации было предложено заменить лигандный модуль и эндосомолитический модуль МНТ на так называемый шаттл-пептид S10. Этот пептид в качестве CPP содержит улучшенный TAT-пептид, а в качестве эндосомолитического модуля – катионный эндосомолитический пептид (Krishnamurthy et al., 2019). Согласно литературным данным, S10 способен доставлять крупные (десятки кДа) белки в клетки в случае его одновременного введения с этими белками (Krishnamurthy et al., 2019). Причем S10

оказался эффективным и при доставке нужных молекул в легкие лабораторных мышей (Auger et al., 2024). Нами было показано, что S10 также работает в составе слитых конструкций. Так S10, слитый с монободи к N-белку, способен осуществлять доставку этого МНТ в цитозоль на порядок эффективнее, чем TAT-пептид. Сильное уменьшение сродства монободи при его соединении с S10 указывает на необходимость использования в данной конструкции сайта отщепления монободи в эндосомах. Таким образом, изучался МНТ следующего состава: S10-FKFL-Keap1_E3PB-NC2, который был назван $МНТ_{S10}$.

Была подобрана максимальная рабочая концентрация $МНТ_{S10}$ (1 мкМ), которая является не только нетоксичной для клеток линии Vero, но и слабо влияет на скорость деления клеток этой линии. В клетках Vero, с постоянной его экспрессией слитого белка N-mRuby3 наблюдалось достоверное уменьшение как флуоресценции mRuby3, так и относительной концентрации N-белка, определенной с помощью иммуноблоттинга с антителами на этот белок (Рис. 4.7.15). Определив объемы клеток Vero и их ядер, а также используя калибровочные растворы N-белка, была оценена концентрация этого слитого белка в цитоплазме (9,7 ± 0,6 мкМ). Она хорошо совпала с аналогичной концентрацией в клетках A431 (9,0 ± 1,8 мкМ). Причем, оцененные скорости деградации N-белка в клетках Vero, к которым был добавлен $МНТ_{S10}$, и клетках A431, к которым был добавлен $МНТ_{N2}$, в пределах 95% доверительного интервала совпали друг с другом. Это указывает на то, что при 1 мкМ $МНТ_{S10}$ его концентрация в цитозоле выше концентрации Keap1, т.е. данный МНТ достаточно хорошо проникает в клетку и выходит из эндосом. Деградация N-белка прекращалась спустя 1,5 суток после добавления $МНТ_{S10}$. Вероятно, это связано с тем, что $МНТ_{S10}$, привлекая Keap1, приводил к убиквитинилированию не только N-белка, но и самого $МНТ_{S10}$. Иными словами, $МНТ_{S10}$ постоянно сам деградировал в клетке. Можно провести оценку числа деградировавших молекул N-белка на одну деградировавшую молекулу $МНТ_{S10}$. Как мы уже установили выше, концентрация $МНТ_{S10}$ в цитозоле превышает концентрацию Keap1, т.е. 269 нМ (см. п. 4.5.4). С другой стороны, т.к. $МНТ_{S10}$ проникает в клетку неспецифически, то его концентрация в клетке не может превышать концентрацию вне клетки, т.е. 1 мкМ. Оцененная выше скорость деградации N-белка в клетках Vero составляет 167 нМ/ч. Таким образом, за 39 часов будет деградировано 6,5 мкМ N-белка. Таким образом, одна молекула $МНТ_{S10}$, прежде чем деградировать самой, будет способствовать деградации 7-24 молекул N-белка. Учитывая постоянный расход $МНТ_{S10}$, наибольшую противовирусную эффективность эта конструкция будет оказывать, если ее добавлять к клеткам через сутки в конечной концентрации 1 мкМ. И действительно, поставленные совместно с лабораторией экспериментальной вирусологии (заведующая И.А. Ленева) Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им.

И.И. Мечникова РАН эксперименты показали, что однократное добавление 1 мкМ $МНТ_{S10}$ к клеткам Vero приводит к изменению $ТЦД_{50}$ для вируса SARS-CoV-2 в 30 раз, а четырехкратное добавление 1 мкМ $МНТ_{S10}$ (через сутки) – в 407 тысяч раз. Причем, эффект $МНТ_{S10}$ может быть связан не только с деградацией N-белка, но и с разрушением биоконденсатов, образованных этим белком, которые служат фабриками для производства данного вируса. Следует отметить, что в соответствии с Рекомендациями Фармакологического комитета РФ противовирусный препарат считается перспективным для дальнейшей разработки и доклинического исследования на животных, если $ТЦД_{50}$ увеличивается больше, чем в 100 раз (Миронов и др., 2012).

Итак, нами предложено два основных способа повышения эффективности МНТ *in vitro* за счет изменения их состава. Прежде всего, это введение в состав МНТ сайта отщепления эффекторного модуля в эндосомах. Хотя это заметно не улучшает эффективность доставки этого модуля в цитозоль, однако сильно увеличивает его сродство к белку-мишени. Вторым способом усилить эффект от МНТ является введение в его состав последовательности, привлекающей убиквитинлигазу E3, например, Keap1. Этот способ позволяет вызывать деградацию белка-мишени, что обеспечивает более сильный и продолжительный биологический эффект, чем обычное взаимодействие с этим белком. Однако на уровне организма, чтобы достичь клеток, МНТ нужно еще преодолеть ряд других барьеров. Прежде всего, это выйти из кровотока в нужном органе или ткани, например, в опухоли. Поэтому далее мы изучили, каким образом надо изменить состав МНТ, чтобы повысить его накопление в опухоли.

В литературе известно множество подходов к улучшению накопления молекул в опухоли (Durymanov et al., 2016). Например, его можно достичь, нанося нитроглицериновую мазь на поверхность опухоли, что за счет расширения сосудов уменьшает скорость кровотока в опухоли, а также непосредственно увеличивает проницаемость сосудов опухоли, и, в конечном итоге, приводит к увеличению накопления молекул в опухоли (Thibeault et al., 2010; Durymanov et al., 2016). Известно, что для увеличения накопления молекул в целевых органах и тканях необходимо увеличить их время циркуляции в кровотоке (Roberts et al., 2002; Kontermann, 2011; Thurber and Dane, 2012; Pfister and Morbidelli, 2014). На это время сильно влияют связывания молекул в органах выведения – печени и почках, возможные неспецифические связывания в других нецелевых органах, а также поглощение молекул клетками иммунной системы. Одним из хорошо известных способов увеличения этого времени является присоединение к ним молекул ПЭГ, которые с одной стороны, уменьшают взаимодействие доставляемых молекул с компонентами крови, а с другой стороны, увеличивают их молекулярную

массу, тем самым, способствуя уменьшению скорости их выведения из кровотока (Roberts et al., 2002; Pfister and Morbidelli, 2014). Для МНТ была изучена возможность увеличения как времени циркуляции МНТ в крови, так и накопления в опухоли, за счет присоединения к ним молекул ПЭГ с разной молекулярной массой, а также использования нитроглицериновой мази. Кроме того, с целью уменьшить неспецифические взаимодействия МНТ в нецелевых органах и тканях, одновременно с МНТ вводили 1000 кратный избыток МНТ без лиганда. Распределение МНТ, меченного радиоактивным изотопом ^{111}In, в органах и тканях мышей изучалось спустя 1 час после его внутривенного введения. Было показано, что наиболее перспективными из всех изученных способов увеличения накопления МНТ в опухоли является присоединение к МНТ ПЭГ молекулярной массы 40 кДа и совместное введение МНТ с избытком МНТ без лиганда. Оба этих способа по отдельности позволяют заметно уменьшить накопление в основном органе выведения для МНТ – печени, а также существенно увеличить время циркуляции МНТ в крови. Интересно отметить, что размер ПЭГ слабо сказывался на времени циркуляции МНТ в крови (Рис. 4.8.1б). Более того, не наблюдалось достоверных отличий накопления в печени для МНТ-ПЭГ 40 кДа и МНТ-ПЭГ 10 кДа. Понятно, что чем меньше молекула ПЭГ, тем хуже она экранирует МНТ от возможных неспецифических взаимодействий. Поэтому автором диссертации было высказано предположение, что экранируется не вся молекула МНТ, а ее часть, непосредственно контактирующая с ПЭГ. А этой частью является эндосомолитический модуль – ДТокс. Наименьшее накопление МНТ в печени в случае использования избытка МНТ без лиганда (Рис. 4.8.1в) указывает на то, что неспецифические взаимодействия играют в этом накоплении ключевую роль. Причем, предположительно, в основном они обусловлены наличием в МНТ ДТокс. Поэтому, автор предположил, что альтернативой ПЭГилированю МНТ для увеличения времени его циркуляции в крови является замена ДТокс на другой модуль со сходными мембранолитическими функциями, но не обладающим данными неспецифическими взаимодействиями. Поиск альтернативы ПЭГ особенно важен, т.к. из-за широкого применения различных препаратов, содержащих ПЭГ, время циркуляции новых ПЭГилированных лекарств в крови человека, как правило, невелико. Это обусловлено их удалением из кровотока как антиПЭГ антителами, так и за счет активации системы комплимента (Hamad et al., 2008; Zhang et al., 2016; Binder and Skerra, 2025). Кроме того, ПЭГилированные лекарственные препараты могут накапливаться в вакуолях в цитоплазме, что отрицательно сказывается на безопасности их применения (Rudmann et al., 2013; Fletcher et al., 2019; Binder and Skerra, 2025).

Кинетика изменения относительных концентраций МНТ или МНТ-ПЭГ 40 кДа, меченных ^{111}In, в крови и опухолях лабораторных мышей изучалась нами с помощью метода ОФЭКТ/КТ. Причем в одном случае (МНТ-ПЭГ), ПЭГ присоединялся через сайт, способный расщепляться опухолеспецифичными протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), а в другом случае этого сайта не было (МНТ-ПЭГ$_н$). Полученные кинетические кривые (Рис. 4.8.4) интерполировались в соответствии с моделью (Рис. 4.8.3), сходной с описанной ранее в пункте 2.4 «Обзора литературы» (Рис. 2.4.1а). Только связывание МНТ с клетками было задано неявно через константу выхода из опухоли в кровь, k_{out} (Рис. 4.8.3). Кроме того, эта модель была адаптирована под анализ данных ОФЭКТ, для чего введен специальный параметр α, описывающий объемную долю крови в опухоли (см. выражение (4.8.4)). Относительные концентрации МНТ или МНТ с ПЭГ в крови хорошо описывалась двухэкспоненциальной зависимостью (см. выражение (4.8.2) и Рис. 4.8.4а). Причем для МНТ без ПЭГ вклад второй наиболее медленной компоненты не отличим от нуля (см. Табл. 4.8.1). Иными словами, присоединение ПЭГ привело к тому, что часть молекул МНТ заметно увеличила свое время циркуляции в кровотоке. Это, в свою очередь, привело к тому, что накопление МНТ в опухоли сильно возросло (Рис. 4.8.4б). Причем наилучшее накопление в опухоли спустя несколько суток после внутривенного введения МНТ с ПЭГ было у варианта с сайтом отщепления данного ПЭГ в опухоли. Анализ полученных результатов с помощью предложенной автором диссертации модели показал, что введение этого сайта привело к сильному (более чем на порядок) уменьшению константы выхода МНТ из опухоли в кровь, k_{out} (см. Табл. 4.8.1). Согласно литературной модели, если связывания молекул с клетками в опухоли не наблюдается, то k_{out} должно быть минимум вдвое больше, чем k_{in} (Thurber and Dane, 2012). У нас, напротив, k_{out} приблизительно вдвое меньше, чем k_{in} (см. Табл. 4.8.1). Это указывает на взаимодействие МНТ и МНТ-ПЭГ$_н$ с клетками в опухоли, из-за чего наблюдается эта задержка. В случае отщепляемого варианта МНТ-ПЭГ эта задержка увеличивается еще минимум в пять раз (см. Табл. 4.8.1), поэтому обычным взаимодействием с клетками ее уже объяснить нельзя. Известно, что опухолеспецифичная протеаза uPA может находиться в опухоли в неактивном состоянии, причем, образовывать при этом довольно крупные агрегаты (Ellis et al., 1991; Al-Ejeh et al., 2004; Sinharay et al., 2017). Автор диссертации предположил, что эти агрегаты сохраняют сродство к введенному в МНТ-ПЭГ сайту uPA, что будет приводить к связыванию МНТ-ПЭГ с этими агрегатами и, в свою очередь, вызывать задержку МНТ-ПЭГ в опухоли. Иными словами, данные агрегаты могут выступать в качестве своеобразного «депо» для молекул транспортера, из которого молекулы транспортера будут медленно выходить и затем, вероятно, поглощаться

клетками опухоли. Такая задержка в опухоли тоже будет положительно сказываться на суммарном накоплении МНТ в опухоли.

На основании сделанного автором предположения о том, что ДТокс отвечает за неспецифическое связывание МНТ в печени и приводит к сильному сокращению времени циркуляции его в крови, было принято решение заменить ДТокс на другой эндосомолитический модуль, аналогичный по мембранолитическим свойствам. В качестве эндосомолитического модуля для замены автор диссертации выбрал короткий синтетический эндосомолитический пептид GALA3, LAEALAEALEALAA (Li et al., 2020). В этом пептиде в качестве основы был взят известный эндосомолитический пептид HA2, полученный из главного гликопротеина оболочки вируса гриппа человека. Из этого пептида точечной заменой глицина на глутаминовую кислоту был получен пептид GALA, который, в свою очередь, Ли и др. укоротили с целью уменьшения его гидрофобности (Li et al., 2020). Самым оптимальным вариантом, который обладал не только низкой гидрофобностью, но и значительно лучшим проникновением связанных с ним конструкций в цитозоль являлся пептид GALA3 (Li et al., 2020). Этот пептид также не являлся цитотоксическим для клеток (Li et al., 2020) и, учитывая его низкую гидрофобность и небольшой размер, можно предположить, что он будет обладать меньшими неспецифическими взаимодействиями в печени, чем ДТокс.

Время циркуляции в крови сравнивали для двух МНТ, имеющих состав антиРЭФР-ДТокс-НМР и антиРЭФР-GALA3-НМР. Данные МНТ были помечены флуоресцентным красителем AF488, а уменьшение относительной концентрации МНТ в крови определяли по падению флуоресценции данного красителя. Для МНТ с ДТокс эта кинетика хорошо описывалась одноэкспоненциальной зависимостью, константа скорости выведения для которой достоверно не отличалась от аналогичной константы для МНТ другого строения, имеющего состав ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ. Для МНТ с GALA3, напротив, кроме быстрой экспоненты, имеющей такую же константу скорости, что и МНТ с ДТокс, появляется медленная экспонента со скоростью падения на порядок ниже, чем у первой. Причем вклад второй экспоненты составляет около трети всего МНТ. По кинетике изменения концентрации МНТ в крови, согласно описанной выше модели, можно построить теоретические кривые накопления данных МНТ в опухоли (см. Рис. 4.8.6б). Из этих кривых видно, что максимальное накопление в опухоли МНТ с GALA3 в четыре раза превышает аналогичное накопление МНТ с ДТокс. Таким образом, альтернативой ПЭГилированию МНТ является замена в МНТ ДТокс на GALA3, что приводит к сходным эффектам по увеличению времени циркуляции МНТ в крови и, соответственно, к увеличению накопления МНТ в опухоли. Эти данные подтверждают предположение

автора диссертации о том, что ДТокс ответственен за неспецифическое связывание МНТ в печени, и что уменьшить это связывание можно заменой его на другой эндосомолитический модуль.

Однако замена эндосомолитического модуля теоретически могла повлиять на способность МНТ доставлять антителоподобные молекулы в цитозоль. Для проверки этого был выбран МНТ следующего состава: антиРЭФР-GALA3-HMP-FKFL-антиKeap1, обозначенный $МНТ_г$. Получение с помощью конфокальной микроскопии изображений клеток, с которыми инкубировался меченный флуоресцентно $МНТ_г$, показало, что он не только интернализуется в клетки, но и выходит из эндосом. Так, только 12 ± 6 % данного МНТ колокализовались с красителем, прокрашивающим эндосомы/лизосомы. Добавление избытка ЭФР приводило к достоверному уменьшению в четыре раза средней интенсивности клеток. Следовательно, $МНТ_г$ интернализуется в клетки преимущественно за счет связывания с рецептором РЭФР, а не за счет неспецифических взаимодействий. Интернализация $МНТ_г$ в клетки и выход его из эндосом указывает на то, что аффибоди к РЭФР и GALA3 в составе данного МНТ сохраняют свои функциональные свойства и позволяют осуществлять доставку монободи к Keap1 в цитозоль. С помощью метода CETSA было показано, что доля свободного Nrf2 в клетках, которые инкубировались с МНТ различные времена, хорошо совпадает для МНТ с GALA3 и МНТ с ДТокс. Иными словами, эффективность доставки молекул в цитозоль у этих двух МНТ одинаковая. Следует отметить, что оба указанных МНТ имеют сайт отщепления монободи к Keap1 в эндосомах. Учитывая относительно небольшие размеры этого монободи, даже если дефекты, образуемые GALA3, будут существенно меньше дефектов, образуемых ДТокс, то это все равно не скажется на эффективности выхода монободи из эндосом. Сравнение этих двух МНТ по способности защищать клетки AML12 от действия перекиси водорода тоже не выявило существенных отличий между ними (Рис. 4.8.9б). Достоверный защитный эффект проявлялся начиная с четырех часов между добавлением $МНТ_г$ и регистрацией флуоресценции cDCF. Таким образом, замена эндосомолитического модуля в МНТ с ДТокс на GALA3 не влияла на эффективность доставки антителоподобных молекул с помощью данного МНТ в клетки-мишени, но существенно увеличивало время циркуляции МНТ в крови.

Еще одним способом увеличения времени циркуляции МНТ в крови может служить включение в его состав модуля, способного взаимодействовать с одним из основных компонентов крови – альбумином. Для этого мы выбрали альбуминсвязывающий домен белка G Streptococcus, G148 (АСД) (Kontermann, 2012; Binder and Skerra, 2025). Этот домен не является иммуногоенным и способен с высоким

сродством связываться с альбуминами разных видов млекопитающих, в частности человека, мыши, крысы и кролика (Kontermann, 2012; Binder and Skerra, 2025). Связывание с альбумином, благодаря его свойству возвращаться из клеток в кровоток, приводило к тому, что различные белки, содержащие АСД, сильно увеличивали свое время циркуляции в крови (Kontermann, 2012; Binder and Skerra, 2025). Причем некоторые такие белки уже проходят клинические испытания, как, например, аффибоди к интерлейкину 17A (Gerdes et al., 2023). Прежде всего, нами был получен МНТ с ДТокс следующего состава: АСД-uPA_site-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, где uPA_site – сайт расщепления опухолеспецифичными протеазами, такими как активатор плазминогена урокиназного типа. Этот МНТ, обозначенный (АСД)$МНТ_{EGF}$, хорошо связывался как с бычьим, так и человеческим сывороточным альбумином (K_d = 21–57 нМ), т.е. АСД в его составе сохранял свои функции. Кроме того, мы показали, что и uPA site в составе (АСД)$МНТ_{EGF}$ является доступным для действия опухолеспецифичных протеаз. Причем наличие АСД в составе МНТ не мешало ему интернализоваться в клетки-мишени и проникать в их ядра. Т.е. наличие АСД не влияло на функциональные свойства всех модулей МНТ. Однако проведенные с помощью ОФЭКТ предварительные эксперименты на мышах, которым внутривенно вводился (АСД)$МНТ_{EGF}$, меченный радиоактивным изотопом ^{111}In, не выявили заметного увеличения времени циркуляции МНТ в крови. Это может быть связано с тем, что основная доля МНТ с ДТокс неспецифически связывается в печени, а наличие АСД на это связывание не влияет. Напротив, можно предположить, что при включении АСД в МНТ с GALA3 будет наблюдаться увеличение времени циркуляции МНТ в крови. Для подтверждения этого предположения выбрали МНТ следующего состава: АСД-uPA_site-антиРЭФР-GALA3-HMP-FKFL-антиKeap1, обозначенный как (АСД)$МНТ_г$. При выбранном строении МНТ возможно частичное экранирование аффибоди к РЭФР при связывании МНТ с альбумином, что сделано для уменьшения специфического поглощения (за счет РЭФР) данного МНТ клетками печени. Введение uPA_site предположительно будет, с одной стороны, приводить к задержке этого МНТ в опухоли, а, с другой стороны, в опухоли АСД вместе со связанным альбумином будут отщепляться и не препятствовать дальнейшему проникновению МНТ в клетки опухоли.

С помощью метода термофореза было показано, что (АСД)$МНТ_г$ с высоким сродством может взаимодействовать с БСА (K_d = 54 ± 9 нМ), т.е. АСД в его составе сохраняет свою способность взаимодействовать с альбумином. С помощью метода проточной цитофлуориметрии изучали связывание этого МНТ, меченного флуоресцентным красителем, с РЭФР на клетках A431. В одном случае это связывание изучали в растворе Хенкса с 0,75% БСА, а в другом – без БСА. Эти эксперименты

показали, что связывание(АСД)МНТ$_г$ с альбумином слабо влияет на взаимодействие и интернализацию этого МНТ в клетку, т.е. экранирования аффибоди к РЭФР альбумином практически не происходило. Показано, что взаимодействие (АСД)МНТ$_г$ с клетками происходит благодаря его связыванию с РЭФР, т.е. лигандный модуль в составе этого МНТ сохраняет свои функциональные свойства. Сохранение своих функций остальными модулями было проверено по способности (АСД)МНТ$_г$ защищать клетки AML12 от действия перекиси водорода. Достоверный защитный эффект выявлен спустя 5 часов между добавлением этого МНТ и регистрацией флуоресценции. Причем, сравнение двух МНТ$_г$, содержащих и не содержащих АСД, не выявило достоверных различий по величине эффекта между ними. Т.е. добавление сайтов АСД и uPA не оказывало заметного влияния на способность МНТ$_г$ осуществлять доставку эффекторного модуля в цитозоль.

Мы ожидали, что наличие АСД в составе (АСД)МНТ$_г$ будет приводить к существенному увеличению его времени жизни в крови. И действительно, было обнаружено, что для этого МНТ, также как и для МНТ без АСД, уменьшение его концентрации в крови описывалось двумя экспонентами. Причем вклад медленной экспоненты составлял около 30 %. Наличие АСД не сказывалось на этом вкладе, а также на константе скорости первой экспоненты. Однако константа скорости второй экспоненты при добавлении АСД уменьшалась в 18 раз. Предположительно первая экспонента отвечает за неспецифическое связывание МНТ в печени, а вторая – за все остальные взаимодействия, за счет которых МНТ выводится из кровотока. Таким образом, если не учитывать неспецифические взаимодействия МНТ в печени, то наличие АСД действительно способно сильно увеличить время циркуляции МНТ в крови.

Используя предложенную модель накопления МНТ в опухоли, можно оценить, как это увеличение времени циркуляции будет сказываться на накоплении МНТ в опухоли. Для оценки k_{out} использовали максимально возможные ее значения, взятые из Таблицы 4.8.1 (k_{out} = 0,15·10^{-4} мин$^{-1}$). Учитывая, что константа скорости выхода крупных молекул из кровеносных сосудов обратно пропорциональна корню квадратному из молекулярной массы (Mittapalli et al., 2017), k_{in} для комплекса (АСД)МНТ$_г$ с альбумином мыши (139 кДа) рассчитывалась из известной k_{in} для МНТ с молекулярной массой 73,1 кДа (k_{in} = 10,1·10^{-4} мин$^{-1}$) (см. Табл. 4.8.1). Этот расчет дал k_{in} = 7,3·10^{-4} мин$^{-1}$. По модели предполагаемое увеличение максимального накопления МНТ в опухоли при добавлении АСД будет в 11 раз, а если сравнивать с МНТ с ДТокс (МНТ до оптимизации), то в 44 раза.

Таким образом, в диссертационной работе описано каким образом, варьируя строение доставляющих различные 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 строение изменяли путем варьирования их состава, что позволило повысить эффективность трансфекции клеток вплоть до 100%, определить оптимальный для трансфекции диапазон размеров полиплексов и выявить, что ключевыми стадиями транспорта полиплексов в клетку, которые определяют эффективность трансфекции клеток, являются: проникновение в клетку и распаковка полиплексов в эндосомах/лизосомах. Для МНТ строение изменяли как путем изменения их состава, так и строения их функциональных модулей. Используя компартментную модель накопления МНТ в опухоли, равновесную модель взаимодействия МНТ с Keap1 и Nrf2, а также целый ряд биофизических методов были предложены следующие возможные пути увеличения эффективности МНТ: 1) добавление сайта отщепления доставляемой молекулы в эндосомах для увеличения его сродства к белку-мишени; 2) добавления 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 эндосомолитического модуля 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.

6. 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 литературы

1. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. // М.: Гриф и К. – 2012. – 944 С. ISBN: 978-5-8125-1466-3.
2. Розенкранц А.А., Сластникова Т.А. Рецептор эпидермального фактора роста: ключ для селективной доставки в клетки // Биохимия. - 2020. - Т. 85. - № 9. - С. 1159-1188.
3. Соболев А.С. Модульные нанотранспортеры - многоцелевая платформа для доставки противораковых лекарств // Вестник РАН. - 2013. - V. 83. - P. 685-697.
4. Терпинская Т.И. Экспериментальные методы регуляции пиноцитоза // Новости медико-биологических наук. - 2021. - Т. 21. - № 4. - С. 231-242.
5. Шилова О.Н., Шилов Е.С., Деев С.М. Создание адресных противовирусных полипептидов, специфичных к SARS-CoV-2. Проблемы и перспективы // Успехи химии. – 2024. – Т. 93. – № 6. – RCR5128.
6. Abdel-Malek Z.A., Swope V.B., Amornsiripanitch N., and Nordlund J.J. In vitro modulation of proliferation and melanization of S91 melanoma cells by prostaglandins // Cancer research - 1987. - V. 47. - P. 3141-3146.
7. Abed D.A., Goldstein M., Albanyan H., Jin H., and Hu L. Discovery of direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as potential therapeutic and preventive agents // Acta Pharm. Sin. B - 2015. - V. 5. - P. 285-299.
8. Aggarwal N. and Sloane B.F. Cathepsin B: multiple roles in cancer // Proteomics. Clin. Appl. - 2014. - V. 8. - P. 427-437.
9. Aggarwal S., Gupta S., Pabla D., and Murthy R.S. Gemcitabine-loaded PLGA-PEG immunonanoparticles for targeted chemotherapy of pancreatic cancer // Cancer Nanotechnol. - 2013. - V. 4. - P. 145-157.
10. Ahmad A., Khan J.M., and Haque S. Strategies in the design of endosomolytic agents for facilitating endosomal escape in nanoparticles // Biochimie - 2019. - V. 160. - P. 61-75.
11. Akinc A., Thomas M., Klibanov A.M., and Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis // J. Gene Med. - 2005. - V. 7. - P. 657-663.
12. Akita H., Ito R., Khalil I.A., Futaki S., and Harashima H. Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by a nonviral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy // Molecular Therapy - 2004. - V. 9. - P. 443-451.

13. Alavi M., Kahrizi S., Movafagh A., Yekta B.G. Viral and non-viral vectors for gene therapy of neurodegenerative disorders: A review and recommendations // Nano Micro Biosystems - 2024. - V. 3. - P. 35-46.
14. Al-Ejeh F., Croucher D., and Ranson M. Kinetic analysis of plasminogen activator inhibitor type-2: urokinase complex formation and subsequent internalisation by carcinoma cell lines // Exp. Cell Res. - 2004. - V. 297. - P. 259-271.
15. Alber F., Dokudovskaya S., Veenhoff L.M., Zhang W., Kipper J., Devos D., Suprapto A., Karni-Schmidt O., Williams R., Chait B.T., Sali A., and Rout M.P. The molecular architecture of the nuclear pore complex // Nature - 2007. - V. 450. - P. 695-701.
16. Amin M., Badiee A., and Jaafari M.R. Improvement of pharmacokinetic and antitumor activity of PEGylated liposomal doxorubicin by targeting with N-methylated cyclic RGD peptide in mice bearing C-26 colon carcinomas // Int. J. Pharm. - 2013. - V. 458. - P. 324-333.
17. Arrowsmith C.H., Audia J.E., Austin C., Baell J., Bennett J., Blagg J., Bountra C., Brennan P.E., Brown P.J., and Bunnage M.E. The promise and peril of chemical probes // Nature chemical biology - 2015. - V. 11. - P. 536-541.
18. Auger M., Sorroza-Martinez L., Brahiti N., Huppe C.A., Faucher-Giguere L., Arbi I., Hervault M., Cheng X., Gaillet B., Couture F., Guay D., and Soultan A.H. Enhancing peptide and PMO delivery to mouse airway epithelia by chemical conjugation with the amphiphilic peptide S10 // Mol. Ther. Nucleic Acids - 2024. - V. 35. - P. 1-17.
19. Autenrieth M.E., Seidl C., Bruchertseifer F., Horn T., Kurtz F., Feuerecker B., D'Alessandria C., Pfob C., Nekolla S., Apostolidis C., Mirzadeh S., Gschwend J.E., Schwaiger M., Scheidhauer K., and Morgenstern A. Treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder with an alpha-emitter immunoconjugate targeting the epidermal growth factor receptor: a pilot study // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging - 2018. - V. 45. - P. 1364-1371.
20. Bachran C., Morley T., Abdelazim S., Fattah R.J., Liu S., and Leppla S.H. Anthrax toxin-mediated delivery of the Pseudomonas exotoxin A enzymatic domain to the cytosol of tumor cells via cleavable ubiquitin fusions // mBio. - 2013. - V. 4. - P. e00201-e00213.
21. Baell J. and Walters M.A. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery // Nature - 2014. - V. 513. - P. 481-483.
22. Baird L. and Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 pathway: From mechanism to medical applications // 2020. - P. 125-147.
23. Bagrov D.V., Adlerberg V.V., Skryabin G.O., Nikishin I.I., Galetsky S.A., Tchevkina E.M., Kirpichnikov M.P., Shaitan K.V. AFM-TEM correlation microscopy and its

application to lipid nanoparticles // Microscopy Research and Technique. 2023. - V. 86. - №. 7. - P. 781-790.

24. Bakail M. and Ochsenbein F. Targeting protein–protein interactions, a wide open field for drug design // Comptes Rendus Chimie - 2016. - V. 19. - P. 19-27.
25. Becker T., Bottinger L., and Pfanner N. Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network // Trends Biochem. Sci. - 2012. - V. 37. - P. 85-91.
26. Benjaminsen R.V., Mattebjerg M.A., Henriksen J.R., Moghimi S.M., and Andresen T.L. The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH // Mol. Ther. - 2013. - V. 21. - P. 149-157.
27. Bennett M.J. and Eisenberg D. Refined structure of monomelic diphtheria toxin at 2.3 A resolution // Protein Science - 1994. - V. 3. - P. 1464-1475.
28. Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.O., Angell-Petersen E., Warloe T., Frandsen N., and Hogset A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications // J. Microsc. - 2005. - V. 218. - P. 133-147.
29. Binder U. and Skerra A. Strategies for extending the half-life of biotherapeutics: successes and complications // Expert Opin. Biol. Ther. - 2025. - V. 25. - P. 93-118.
30. Biniossek M.L., Nagler D.K., Becker-Pauly C., and Schilling O. Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S // J. Proteome. Res. - 2011. - V. 10. - P. 5363-5373.
31. Black P.C., Brown G.A., Dinney C.P., Kassouf W., Inamoto T., Arora A., Gallagher D., Munsell M.F., Bar-Eli M., McConkey D.J., and Adam L. Receptor heterodimerization: a new mechanism for platelet-derived growth factor induced resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy for bladder cancer // J. Urol. - 2011. - V. 185. - P. 693-700.
32. Blewett M.M., Xie J., Zaro B.W., Backus K.M., Altman A., Teijaro J.R., and Cravatt B.F. Chemical proteomic map of dimethyl fumarate-sensitive cysteines in primary human T cells // Sci. Signal - 2016. - V. 9. - rs10.
33. Blumenthal R.D., Fand I., Sharkey R.M., Boerman O.C., Kashi R., and Goldenberg D.M. The effect of antibody protein dose on the uniformity of tumor distribution of radioantibodies: an autoradiographic study // Cancer Immunol Immunother. - 1991. - V. 33. - P. 351-358.
34. Bober Z., Bartusik-Aebisher D., and Aebisher D. Application of Dendrimers in Anticancer Diagnostics and Therapy // Molecules. - 2022. - V. 27. - 3237.

35. Boland W.K. and Bebb G. Nimotuzumab: a novel anti-EGFR monoclonal antibody that retains anti-EGFR activity while minimizing skin toxicity // Expert Opin. Biol. Ther. - 2009. - V. 9. - P. 1199-1206.
36. Bottcher-Friebertshauser E., Klenk H.D., and Garten W. Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium // Pathog. Dis. - 2013. - V. 69. - P. 87-100.
37. Boucrot E., Ferreira A.P., Almeida-Souza L., Debard S., Vallis Y., Howard G., Bertot L., Sauvonnet N., and McMahon H.T. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway // Nature - 2015. - V. 517. - P. 460-465.
38. Bouras A., Kaluzova M., and Hadjipanayis C.G. Radiosensitivity enhancement of radioresistant glioblastoma by epidermal growth factor receptor antibody-conjugated iron-oxide nanoparticles // J. Neurooncol. - 2015. - V. 124. - P. 13-22.
39. Brennich M.E., Round A.R., and Hutin S. Online Size-exclusion and Ion-exchange Chromatography on a SAXS Beamline // JoVE (Journal of Visualized Experiments) - 2017. - V. 119. - №. 54861.
40. Breunig M., Lungwitz U., Liebl R., and Goepferich A. Fluorescence resonance energy transfer: evaluation of the intracellular stability of polyplexes // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics - 2006. - V. 63. - P. 156-165.
41. Broekgaarden M., van V.R., Oliveira S., Roovers R.C., van Bergen en Henegouwen PM, Pieters R.J., Van Gulik T.M., Breukink E., and Heger M. Site-specific conjugation of single domain antibodies to liposomes enhances photosensitizer uptake and photodynamic therapy efficacy // Nanoscale. - 2016. - V. 8. - P. 6490-6494.
42. Bryan H.K., Olayanju A., Goldring C.E., and Park B.K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation // Biochem. Pharmacol. - 2013. - V. 85. - P. 705-717.
43. Bryant P., Pozzati G., and Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2 // Nat. Commun. - 2022. - V. 13. - №. 1265.
44. Bui A.V. and Nguyen M.H. Prediction of viscosity of glucose and calcium chloride solutions // Journal of Food Engineering - 2004. - V. 62. - P. 345-349.
45. Burgess S.A., Walker M.L., Thirumurugan K., Trinick J., and Knight P.J. Use of negative stain and single-particle image processing to explore dynamic properties of flexible macromolecules // Journal of structural biology - 2004. - V. 147. - P. 247-258.
46. Byrne J.D., Betancourt T., and Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2008. - V. 60. - P. 1615-1626.

47. Caballero I.M. and Lundgren S. A Shift in Thinking: Cellular Thermal Shift Assay-Enabled Drug Discovery // ACS Med. Chem. Lett. - 2023. - V. 14. - P. 369-375.
48. Cabral H., Miyata K., Osada K., and Kataoka K. Block Copolymer Micelles in Nanomedicine Applications // Chem. Rev. - 2018. - V. 118. - P. 6844-6892.
49. Cabral H., Nakanishi M., Kumagai M., Jang W.D., Nishiyama N., and Kataoka K. A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles // Pharm. Res. - 2009. - V. 26. - P. 82-92.
50. Cai H.H. and Pandit A. Therapeutic monoclonal antibodies approved by FDA in 2020 // Clin. Res. Immunol - 2021. - V. 4. - P. 1-2.
51. Cai X.E. and Yang J. Molecular forces for the binding and condensation of DNA molecules // Biophys. J. - 2002. - V. 82. - P. 357-365.
52. Caldieri G., Malabarba M.G., Di Fiore P.P., and Sigismund S. EGFR Trafficking in Physiology and Cancer // Prog. Mol. Subcell. Biol. - 2018. - V. 57. - P. 235-272.
53. Cardoso S., Lopez I.P., Pineiro-Hermida S., Pichel J.G., and Moreira P.I. IGF1R Deficiency Modulates Brain Signaling Pathways and Disturbs Mitochondria and Redox Homeostasis // Biomedicines. - 2021. - V. 9. - №. 2. - 158.
54. Catimel B., Teh T., Fontes M.R., Jennings I.G., Jans D.A., Howlett G.J., Nice E.C., and Kobe B. Biophysical characterization of interactions involving importin-a- during nuclear import // Journal of Biological Chemistry - 2001. - V. 276. - P. 34189-34198.
55. Ceresa B.P. and Schmid S.L. Regulation of signal transduction by endocytosis // Current opinion in cell biology - 2000. - V. 12. - P. 204-210.
56. Chandramohan V., Bao X., Keir S.T., Pegram C.N., Szafranski S.E., Piao H., Wikstrand C.J., McLendon R.E., Kuan C.T., Pastan I.H., and Bigner D.D. Construction of an immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, targeting EGFRwt and EGFRvIII for brain tumor therapy // Clin. Cancer Res. - 2013. - V. 19. - P. 4717-4727.
57. Chandramohan V., Pegram C.N., Piao H., Szafranski S.E., Kuan C.T., Pastan I.H., and Bigner D.D. Production and quality control assessment of a GLP-grade immunotoxin, D2C7-(scdsFv)-PE38KDEL, for a phase I/II clinical trial // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2017. - V. 101. - P. 2747-2766.
58. Chapman H.A. Endosomal proteases in antigen presentation // Curr. Opin. Immunol - 2006. - V. 18. - P. 78-84.
59. Chatterjee S., Kon E., Sharma P., and Peer D. Endosomal escape: A bottleneck for LNP-mediated therapeutics // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 2024. - V. 121. - e2307800120.

60. Chaumet A., Wright G.D., Seet S.H., Tham K.M., Gounko N.V., and Bard F. Nuclear envelope-associated endosomes deliver surface proteins to the nucleus // Nat. Commun. - 2015. - V. 6. - 8218.
61. Chen H.H., Ho Y.P., Jiang X., Mao H.Q., Wang T.H., and Leong K.W. Quantitative comparison of intracellular unpacking kinetics of polyplexes by a model constructed from quantum dot-FRET // Molecular Therapy - 2008. - V. 16. - P. 324-332.
62. Chen J., Sawyer N., and Regan L. Protein-protein interactions: general trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area // Protein Sci. - 2013. - V. 22. - P. 510-515.
63. Cho C.W., Cho Y.S., Kang B.T., Hwang J.S., Park S.N., and Yoon D.Y. Improvement of gene transfer to cervical cancer cell lines using non-viral agents // Cancer letters - 2001. - V. 162. - P. 75-85.
64. Christie R.J., Nishiyama N., and Kataoka K. Delivering the code: polyplex carriers for deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid interference therapies // Endocrinology - 2010. - V. 151. - P. 466-473.
65. Ciardiello F. and Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment // N. Engl. J. Med. - 2008. - V. 358. - P. 1160-1174.
66. Cohenuram M. and Saif M.W. Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic // Anticancer Drugs - 2007. - V. 18. - P. 7-15.
67. Cullis P.R. and de K.B. The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural and synthetic origin. A 31P NMR study // Biochim. Biophys. Acta - 1978. - V. 513. - P. 31-42.
68. Cullis P.R. and Hope M.J. Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion // Nature - 1978. - V. 271. - P. 672-674.
69. Cunningham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I., and Van C.E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer // N. Engl. J. Med. - 2004. - V. 351. - P. 337-345.
70. Dai W., Jin W., Zhang J., Wang X., Wang J., Zhang X., Wan Y., and Zhang Q. Spatiotemporally controlled co-delivery of anti-vasculature agent and cytotoxic drug by octreotide-modified stealth liposomes // Pharm. Res. - 2012. - V. 29. - P. 2902-2911.
71. Datta R., Heaster T.M., Sharick J.T., Gillette A.A., and Skala M.C. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications // Journal of biomedical optics - 2020. - V. 25. - P. 071203-071203.

72. Dayalan N.S., Suzuki T., Dikovskaya D., Knatko E.V., Higgins M., Sato M., Novak M., Villegas J.A., Moore T.W., Yamamoto M., and Dinkova-Kostova A.T. The isoquinoline PRL-295 increases the thermostability of Keap1 and disrupts its interaction with Nrf2 // iScience. - 2022. - V. 25. - P. 103703-
73. De Angelis Campos A.C., Rodrigues M.A., de A.C., de Goes A.M., Nathanson M.H., and Gomes D.A. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2011. - V. 412. - P. 341-346.
74. De C.E. and Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years // Clin. Microbiol. Rev. - 2016. - V. 29. - P. 695-747.
75. Deng C., Xiong J., Gu X., Chen X., Wu S., Wang Z., Wang D., Tu J., and Xie J. Novel recombinant immunotoxin of EGFR specific nanobody fused with cucurmosin, construction and antitumor efficiency in vitro // Oncotarget. - 2017. - V. 8. - P. 38568-38580.
76. Desnoyers L.R., Vasiljeva O., Richardson J.H., Yang A., Menendez E.E., Liang T.W., Wong C., Bessette P.H., Kamath K., Moore S.J., Sagert J.G., Hostetter D.R., Han F., Gee J., Flandez J., Markham K., Nguyen M., Krimm M., Wong K.R., Liu S., Daugherty P.S., West J.W., and Lowman H.B. Tumor-specific activation of an EGFR-targeting probody enhances therapeutic index // Sci. Transl. Med. - 2013. - V. 5. - 207ra144.
77. Devarajan P.V., Dandekar P., D'Souza A.A. (ed.). Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis // Berlin: Springer, 2019. - V. 39. - №. 1.
78. Deyev S., Fominykh A., Varvashenya R., Yanovich G., Bodenko V., Plotnikov E., Tretyakova M., Eskova D., Zhelchan R., Schulga A., Konovalova E., Ziganshin R., Orlova A., Belousov M., Tolmachev V., Larkina M. The use of glycine-containing peptide-based chelators for labeling with Tc improves the imaging properties of EpCAM-targeting designed ankyrin repeat Ec1 // Mol. Pharm. 2026. - V. 23. - №. 4. - P. 2469-2480.
79. Dhandapani R.K., Gurusamy D., and Palli S.R. Development of Catechin, Poly-l-lysine, and Double-Stranded RNA Nanoparticles // ACS Appl. Bio Mater. - 2021. - V. 4. - P. 4310-4318.
80. Dhankher A., Lv W., Studstill W.T., and Champion J.A. Coiled coil exposure and histidine tags drive function of an intracellular protein drug carrier // J. Control Release - 2021. - V. 339. - P. 248-258.
81. Dheer D., Nicolas J., and Shankar R. Cathepsin-sensitive nanoscale drug delivery systems for cancer therapy and other diseases // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2019. - V. 151-152. - P. 130-151.

82. Dodson M., de la Vega M.R., Cholanians A.B., Schmidlin C.J., Chapman E., and Zhang D.D. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2019. - V. 59. - P. 555-575.
83. Dong D.W., Xiang B., Gao W., Yang Z.Z., Li J.Q., and Qi X.R. pH-responsive complexes using prefunctionalized polymers for synchronous delivery of doxorubicin and siRNA to cancer cells // Biomaterials - 2013. - V. 34. - P. 4849-4859.
84. Du Y., Zhang T.h., Meng X., Shi Y., Hu M., Yuan S., La C.Y., Li S.x., Liu S., and Li J. Development of high affinity monobodies recognizing SARS-CoV-2 antigen (preprint) // 2020.
85. Durymanov M.O., Yarutkin A.V., Bagrov D.V., Klinov D.V., Kedrov A.V., Chemeris N.K., Rosenkranz A.A., and Sobolev A.S. Application of vasoactive and matrix-modifying drugs can improve polyplex delivery to tumors upon intravenous administration // J. Control Release - 2016. - V. 232. - P. 20-28.
86. Egami Y. Molecular imaging analysis of Rab GTPases in the regulation of phagocytosis and macropinocytosis // Anat. Sci. Int. - 2016. - V. 91. - P. 35-42.
87. El-Kareh A.W. and Secomb T.W. A mathematical model for cisplatin cellular pharmacodynamics // Neoplasia. - 2003. - V. 5. - P. 161-169.
88. El-Sayed I.H., Huang X., and El-Sayed M.A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles // Cancer Lett. - 2006. - V. 239. - P. 129-135.
89. Ellis V., Behrendt N., and Dano K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor // J. Biol. Chem. - 1991. - V. 266. - P. 12752-12758.
90. Emrich J.G., Bender H., Class R., Eshleman J., Miyamoto C., and Brady L.W. In vitro evaluation of iodine-125-labeled monoclonal antibody (MAb 425) in human high-grade glioma cells // Am. J. Clin. Oncol. - 1996. - V. 19. - P. 601-608.
91. Endoh T. and Ohtsuki T. Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2009. - V. 61. - P. 704-709.
92. Erazo-Oliveras A., Muthukrishnan N., Baker R., Wang T.Y., and Pellois J.P. Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges // Pharmaceuticals. (Basel) - 2012. - V. 5. - P. 1177-1209.
93. Faria J.A.Q.A., de A.C., Goes A.M., Rodrigues M.A., and Gomes D.A. Effects of different ligands on epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2016. - V. 478. - P. 39-45.

94. Fenwick J.R., Philpott G.W., and Connett J.M. Biodistribution and histological localization of anti-human colon cancer monoclonal antibody (MAb) 1A3: the influence of administered MAb dose on tumor uptake // Int. J. Cancer - 1989. - V. 44. - P. 1017-1027.
95. Fettiplace R., Andrews D.M., and Haydon D.A. The thickness, composition and structure of some lipid bilayers and natural membranes // The Journal of membrane biology - 1971. - V. 5. - P. 277-296.
96. Fischer D., von Harpe A., and Kissel T. Polyethylenimine: polymer structure influences the physicochemical and biological effects of plasmid/PEI complexes // Biomaterials - 2000. - P. 195-211.
97. Fisher K.J. and Wilson J.M. The transmembrane domain of diphtheria toxin improves molecular conjugate gene transfer // Biochemical Journal - 1997. - V. 321. - P. 49-58.
98. Fletcher A.M., Tellier P., Douville J., Mansell P., Granziano M.J., Mangipudy R.S., Brodie T.A., Achanzar W.E. Adverse vacuolation in multiple tissues in cynomolgus monkeys following repeat-dose administration of a PEGylated protein // Toxicol. Lett. - 2019. - V. 317. - P. 120-129.
99. Flores-Canales J.C., Simakov N.A., and Kurnikova M. Microsecond Molecular Dynamics Simulations of Diphtheria Toxin Translocation T-Domain pH-Dependent Unfolding in Solution // bioRxiv - 2019. - 572040.
100. Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., and Jeffries C.M. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // Journal of applied crystallography - 2017. - V. 50. - P. 1212-1225.
101. Friebe S., van der Goot F.G., and Burgi J. The Ins and Outs of Anthrax Toxin // Toxins. (Basel) - 2016. - V. 8. - №. 3. - 69.
102. Frolov A., Schuller K., Tzeng C.W., Cannon E.E., Ku B.C., Howard J.H., Vickers S.M., Heslin M.J., Buchsbaum D.J., and Arnoletti J.P. ErbB3 expression and dimerization with EGFR influence pancreatic cancer cell sensitivity to erlotinib // Cancer Biol. Ther. - 2007. - V. 6. - P. 548-554.
103. Fuhrmans M., Marelli G., Smirnova Y.G., and Muller M. Mechanics of membrane fusion/pore formation // Chem. Phys. Lipids - 2015. - V. 185. - P. 109-128.
104. Fujimori K., Covell D.G., Fletcher J.E., and Weinstein J.N. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')2, and Fab in tumors // Cancer Res. - 1989. - V. 49. - P. 5656-5663.

105. Fukutomi T., Takagi K., Mizushima T., Ohuchi N., and Yamamoto M. Kinetic, thermodynamic, and structural characterizations of the association between Nrf2-DLGex degron and Keap1 // Mol. Cell Biol. - 2014. - V. 34. - P. 832-846.
106. Fulcher L.J., Hutchinson L.D., Macartney T.J., Turnbull C., and Sapkota G.P. Targeting endogenous proteins for degradation through the affinity-directed protein missile system // Open Biol. - 2017. - V. 7. - №. 5. - 170066.
107. Gao H., Zhang X.X., and Chang W.B. Study on the interaction in single antigen-antibody molecules by AFM // Front Biosci - 2005. - V. 10. - P. 1539-1545.
108. Gao J., Xia Y., Chen H., Yu Y., Song J., Li W., Qian W., Wang H., Dai J., and Guo Y. Polymer-lipid hybrid nanoparticles conjugated with anti-EGF receptor antibody for targeted drug delivery to hepatocellular carcinoma // Nanomedicine (Lond) - 2014. - V. 9. - P. 279-293.
109. Garrido G., Tikhomirov I.A., Rabasa A., Yang E., Gracia E., Iznaga N., Fernandez L.E., Crombet T., Kerbel R.S., and Perez R. Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile // Cancer Biol. Ther. - 2011. - V. 11. - P. 373-382.
110. Ge M.H., Tian H., Mao L., Li D.Y., Lin J.Q., Hu H.S., Huang S.C., Zhang C.J., and Mei X.F. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway // CNS. Neurosci. Ther. - 2021. - V. 27. - P. 1023-1040.
111. Gebauer M. and Skerra A. Engineered Protein Scaffolds as Next-Generation Therapeutics // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2020. - V. 60. - P. 391-415.
112. Gerdes S., Staubach P., Dirschka T., Wetzel D., Weirich O., Niesmann J., da M.R., Rothhaar A., Ardabili M., Vlasitz G., Feldwisch J., Osterling K.L., Ohlman S., Peloso P.M., Brun N.C., and Frejd F.Y. Izokibep for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: a phase II, randomized, placebo-controlled, double-blind, dose-finding multicentre study including long-term treatment // Br. J. Dermatol. - 2023. - V. 189. - P. 381-391.
113. Gilmore J.L., Gallo R.M., and Riese D.J. The epidermal growth factor receptor (EGFR)-S442F mutant displays increased affinity for neuregulin-2beta and agonist-independent coupling with downstream signalling events // Biochem. J. - 2006. - V. 396. - P. 79-88.
114. Ginn S.L., Amaya A.K., Alexander I.E., Edelstein M., and Abedi M.R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update // The journal of gene medicine - 2018. - V. 20. - e3015.

115. Goh L.K., Huang F., Kim W., Gygi S., and Sorkin A. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor // J. Cell Biol. - 2010. - V. 189. - P. 871-883.
116. Goh L.K. and Sorkin A. Endocytosis of receptor tyrosine kinases // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. - 2013. - V. 5. - a017459.
117. Goldoni S., Iozzo R.A., Kay P., Campbell S., McQuillan A., Agnew C., Zhu J.X., Keene D.R., Reed C.C., and Iozzo R.V. A soluble ectodomain of LRIG1 inhibits cancer cell growth by attenuating basal and ligand-dependent EGFR activity // Oncogene - 2007. - V. 26. - P. 368-381.
118. Golla K., Bhaskar C., Ahmed F., and Kondapi A.K. A target-specific oral formulation of Doxorubicin-protein nanoparticles: efficacy and safety in hepatocellular cancer // J. Cancer - 2013. - V. 4. - P. 644-652.
119. Gong X.W., Wei D.Z., He M.L., and Xiong Y.C. Discarded free PEG-based assay for obtaining the modification extent of pegylated proteins // Talanta - 2007. - V. 71. - P. 381-384.
120. Gonzalez Flecha F.L. and Levi V. Determination of the molecular size of BSA by fluorescence anisotropy // Biochemistry and molecular biology education - 2003. - V. 31. - P. 319-322.
121. Gostring L., Chew M.T., Orlova A., Hoiden-Guthenberg I., Wennborg A., Carlsson J., and Frejd F.Y. Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: Methodological aspects // Int. J. Oncol. - 2010. - V. 36. - P. 757-763.
122. Graff C.P. and Wittrup K.D. Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: importance of dosage for penetration, and affinity for retention // Cancer Res. - 2003. - V. 63. - P. 1288-1296.
123. Greasley P.J., Bonnard C., and Amati B. Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis // Nucleic acids research - 2000. - V. 28. - P. 446-453.
124. Greschner A.A., Brahiti N., Auger M., Hu L., Soleymani A.H., Barbeau X., Parent V., Gaillet B., Guay D., Soultan A.H., and Gauthier M.A. PEGylation of a Peptide-Based Amphiphilic Delivery Agent and Influence on Protein Delivery to Cells // Biomacromolecules. - 2023. - V. 24. - P. 4890-4900.
125. Grune T., Kehm R., Hohn A., and Jung T. "Cyt/Nuc," a Customizable and Documenting ImageJ Macro for Evaluation of Protein Distributions Between Cytosol and Nucleus // Biotechnol. J. - 2018. - V. 13. - e1700652.

126. Guntas G., Lewis S.M., Mulvaney K.M., Cloer E.W., Tripathy A., Lane T.R., Major M.B., and Kuhlman B. Engineering a genetically encoded competitive inhibitor of the KEAP1–NRF2 interaction via structure-based design and phage display // Protein Engineering, Design & Selection - 2016. - V. 29. - P. 1-9.
127. Guo N. and Peng Z. MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells // Asia Pac. J. Clin. Oncol. - 2013. - V. 9. - P. 6-11.
128. Haeri A., Zalba S., Ten Hagen T.L., Dadashzadeh S., and Koning G.A. EGFR targeted thermosensitive liposomes: A novel multifunctional platform for simultaneous tumor targeted and stimulus responsive drug delivery // Colloids Surf. B Biointerfaces. - 2016. - V. 146. - P. 657-669.
129. Hamad I., Hunter A.C., Szebeni J., Moghimi S.M. Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process // Mol. Immunol. - 2008. - V. 46. - P. 225-232.
130. Hayes J.D. and Dinkova-Kostova A.T. Oncogene-Stimulated Congestion at the KEAP1 Stress Signaling Hub Allows Bypass of NRF2 and Induction of NRF2-Target Genes that Promote Tumor Survival // Cancer Cell - 2017. - V. 32. - P. 539-541.
131. He C.X., Tabata Y., and Gao J.Q. Non-viral gene delivery carrier and its three-dimensional transfection system // International journal of pharmaceutics - 2010. - V. 386. - P. 232-242.
132. He J., Xu S., and Mixson A.J. The Multifaceted Histidine-Based Carriers for Nucleic Acid Delivery: Advances and Challenges // Pharmaceutics - 2020. - V. 12. - №. 8. - 774.
133. Helmuth J.A., Burckhardt C.J., Greber U.F., and Sbalzarini I.F. Shape reconstruction of subcellular structures from live cell fluorescence microscopy images // J. Struct. Biol. - 2009. - V. 167. - P. 1-10.
134. Hemminki A., Belousova N., Zinn K.R., Liu B., Wang M., Chaudhuri T.R., Rogers B.E., Buchsbaum D.J., Siegal G.P., Barnes M.N., Gomez-Navarro J., Curiel D.T., and Alvarez R.D. An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression // Mol. Ther. - 2001. - V. 4. - P. 223-231.
135. Henriksen L., Grandal M.V., Knudsen S.L., van D.B., and Grovdal L.M. Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands // PloS one - 2013. - V. 8. - e58148.
136. Hillaireau H. and Couvreur P. Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery // Cellular and molecular life sciences - 2009. - V. 66. - P. 2873-2896.

137. Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H.J., Schilcher K., and Schindler H. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy // Proceedings of the National Academy of Sciences - 1996. - V. 93. - P. 3477-3481.
138. Ho Y.P., Chen H.H., Leong K.W., and Wang T.H. Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET // Journal of Controlled Release - 2006. - V. 116. - P. 83-89.
139. Hochtl P., Boresch S., and Steinhauser O. Dielectric properties of glucose and maltose solutions // The Journal of Chemical Physics - 2000. - V. 112. - P. 9810-9821.
140. Holbro T. and Hynes N.E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. - 2004. - V. 44. - P. 195-217.
141. Holz M. and Fahr A. Compartment modeling // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2001. - V. 48. - P. 249-264.
142. Hong M., Zhu S., Jiang Y., Tang G., Sun C., Fang C., Shi B., and Pei Y. Novel anti-tumor strategy: PEG-hydroxycamptothecin conjugate loaded transferrin-PEG-nanoparticles // J. Control Release - 2010. - V. 141. - P. 22-29.
143. Hopp J., Hornig N., Zettlitz K.A., Schwarz A., Fuss N., Muller D., and Kontermann R.E. The effects of affinity and valency of an albumin-binding domain (ABD) on the half-life of a single-chain diabody-ABD fusion protein // Protein Eng Des Sel - 2010. - V. 23. - P. 827-834.
144. Howe S.J., Mansour M.R., Schwarzwaelder K., Bartholomae C., Hubank M., Kempski H., Brugman M.H., Pike-Overzet K., Chatters S.J., de R.D., Gilmour K.C., Adams S., Thornhill S.I., Parsley K.L., Staal F.J., Gale R.E., Linch D.C., Bayford J., Brown L., Quaye M., Kinnon C., Ancliff P., Webb D.K., Schmidt M., von K.C., Gaspar H.B., and Thrasher A.J. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients // J. Clin. Invest - 2008. - V. 118. - P. 3143-3150.
145. Hsu S.C. and Hung M.C. Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family // J. Biol. Chem. - 2007. - V. 282. - P. 10432-10440.
146. Hsu W.C., Cheng C.N., Lee T.W., and Hwang J.J. Cytotoxic Effects of PEGylated Anti-EGFR Immunoliposomes Combined with Doxorubicin and Rhenium-188 Against Cancer Cells // Anticancer Res. - 2015. - V. 35. - P. 4777-4788.
147. Huang W.C., Burnouf P.A., Su Y.C., Chen B.M., Chuang K.H., Lee C.W., Wei P.K., Cheng T.L., and Roffler S.R. Engineering Chimeric Receptors To Investigate the Size- and

Rigidity-Dependent Interaction of PEGylated Nanoparticles with Cells // ACS Nano. - 2016. - V. 10. - P. 648-662.

148. Huang Z., Wang Y., Nayak P.S., Dammann C.E., and Sanchez-Esteban J. Stretch-induced fetal type II cell differentiation is mediated via ErbB1-ErbB4 interactions // J. Biol. Chem. - 2012. - V. 287. - P. 18091-18102.
149. Hwang M.E., Keswani R.K., and Pack D.W. Dependence of PEI and PAMAM Gene Delivery on Clathrin- and Caveolin-Dependent Trafficking Pathways // Pharm. Res. - 2015. - V. 32. - P. 2051-2059.
150. Ibraheem D., Elaissari A., and Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems // Int. J. Pharm. - 2014. - V. 459. - P. 70-83.
151. Ibrahim A.F.M., Shen L., Tatham M.H., Dickerson D., Prescott A.R., Abidi N., Xirodimas D.P., and Hay R.T. Antibody RING-Mediated Destruction of Endogenous Proteins // Mol. Cell - 2020. - V. 79. - P. 155-166.
152. Ilari A., Bonamore A., Farina A., Johnson K.A., and Boffi A. The X-ray structure of ferric Escherichia coli flavohemoglobin reveals an unexpected geometry of the distal heme pocket // J. Biol. Chem. - 2002a. - V. 277. - P. 23725-23732.
153. Ilari A., Bonamore A., Farina A., Johnson K.A., and Boffi A. The X-ray Structure of Ferric Escherichia coliFlavohemoglobin Reveals an Unexpected Geometry of the Distal Heme Pocket // Journal of Biological Chemistry - 2002b. - V. 277. - P. 23725-23732.
154. Inoyama D., Chen Y., Huang X., Beamer L.J., Kong A.N., and Hu L. Optimization of fluorescently labeled Nrf2 peptide probes and the development of a fluorescence polarization assay for the discovery of inhibitors of Keap1-Nrf2 interaction // J. Biomol. Screen. - 2012. - V. 17. - P. 435-447.
155. Iso T., Suzuki T., Baird L., and Yamamoto M. Absolute Amounts and Status of the Nrf2-Keap1-Cul3 Complex within Cells // Mol. Cell Biol. - 2016. - V. 36. - P. 3100-3112.
156. Ivanenko K., Shaymardanov R., Prassolov V., Lebedev T. Advances in targeting growth factor signaling in neuroblastoma and overcoming drug resistance // Cells. 2026. - Vol. 15. - №. 1. - 4.
157. Iwase Y. and Maitani Y. Dual functional octreotide-modified liposomal irinotecan leads to high therapeutic efficacy for medullary thyroid carcinoma xenografts // Cancer Sci. - 2012. - V. 103. - P. 310-316.
158. Jayaraman M., Ansell S.M., Mui B.L., Tam Y.K., Chen J., Du X., Butler D., Eltepu L., Matsuda S., Narayanannair J.K., Rajeev K.G., Hafez I.M., Akinc A., Maier M.A., Tracy M.A., Cullis P.R., Madden T.D., Manoharan M., and Hope M.J. Maximizing the potency

of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo // Angew. Chem. Int. Ed Engl. - 2012. - V. 51. - P. 8529-8533.

159. Jee S.C. and Cheong H. Autophagy/mitophagy regulated by ubiquitination: a promising pathway in cancer therapeutics // Cancers - 2023. - V. 15. - 1112.
160. Jiang X., Huang F., Marusyk A., and Sorkin A. Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits // Mol. Biol. Cell - 2003. - V. 14. - P. 858-870.
161. Jin X., Zhang J., Jin X., Liu L., and Tian X. Folate Receptor Targeting and Cathepsin B-Sensitive Drug Delivery System for Selective Cancer Cell Death and Imaging // ACS Med. Chem. Lett. - 2020. - V. 11. - P. 1514-1520.
162. Jordans S., Jenko-Kokalj S., Kuhl N.M., Tedelind S., Sendt W., Bromme D., Turk D., and Brix K. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions // BMC. Biochem. - 2009. - V. 10. - 23.
163. Jorissen R.N., Walker F., Pouliot N., Garrett T.P., Ward C.W., and Burgess A.W. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling // Exp. Cell Res. - 2003. - V. 284. - P. 31-53.
164. Jung J., Jeong S.Y., Park S.S., Shin S.H., Ju E.J., Choi J., Park J., Lee J.H., Kim I., Suh Y.A., Hwang J.J., Kuroda S., Lee J.S., Song S.Y., and Choi E.K. A cisplatinвЂ‘incorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity // Int. J. Oncol. - 2015. - V. 46. - P. 1268-1274.
165. Jung Y.S., Qian Y., and Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity // Cellular signalling - 2010. - V. 22. - P. 1003-1012.
166. Kanekiyo M., Wei C.J., Yassine H.M., McTamney P.M., Boyington J.C., Whittle J.R., Rao S.S., Kong W.P., Wang L., and Nabel G.J. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies // Nature - 2013. - V. 499. - P. 102-106.
167. Kang S.J., Jeong H.Y., Kim M.W., Jeong I.H., Choi M.J., You Y.M., Im C.S., Song I.H., Lee T.S., and Park Y.S. Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis // Nanoscale. - 2018. - V. 10. - P. 19338-19350.
168. Kang Z., Meng Q., Liu K. Peptide-based gene delivery vectors // Journal of meterials chemistry - 2019. - V. 7. - №. 11. - P. 1824-1841.
169. Kaplon H., Crescioli S., Chenoweth A., Visweswaraiah J., and Reichert J.M. Antibodies to watch in 2023 // MAbs - 2023. - V. 15. - 2153410.

170. Karwaciak I., Salkowska A., Karas K., Dastych J., and Ratajewski M. Nucleocapsid and Spike Proteins of the Coronavirus SARS-CoV-2 Induce IL6 in Monocytes and Macrophages-Potential Implications for Cytokine Storm Syndrome // Vaccines. (Basel) - 2021. - V. 9. - №. 1. - 54.
171. Kauffmann T. and Evans D.S. Macrocytosis // 2024.
172. Kent M.S., Yim H., Murton J.K., Satija S., Majewski J., and Kuzmenko I. Oligomerization of membrane-bound diphtheria toxin (CRM197) facilitates a transition to the open form and deep insertion // Biophys. J. - 2008. - V. 94. - P. 2115-2127.
173. Kern H.B., Srinivasan S., Convertine A.J., Hockenbery D., Press O.W., and Stayton P.S. Enzyme-Cleavable Polymeric Micelles for the Intracellular Delivery of Proapoptotic Peptides // Mol. Pharm. - 2017. - V. 14. - P. 1450-1459.
174. Kim D., Yan Y., Valencia C.A., and Liu R. Heptameric targeting ligands against EGFR and HER2 with high stability and avidity // PloS one - 2012. - V. 7. - e43077.
175. Kim I.Y., Kang Y.S., Lee D.S., Park H.J., Choi E.K., Oh Y.K., Son H.J., and Kim J.S. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice // J. Control Release - 2009. - V. 140. - P. 55-60.
176. Kim J.S., Jun S.Y., and Kim Y.S. Critical Issues in the Development of Immunotoxins for Anticancer Therapy // J. Pharm. Sci. - 2020. - V. 109. - P. 104-115.
177. Kimanius D., Forsberg B.r.O., Scheres S.H., and Lindahl E. Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2 // elife - 2016. - V. 5. - P. e18722-
178. Kinch M.S., Kraft Z., and Schwartz T. Monoclonal antibodies: Trends in therapeutic success and commercial focus // Drug Discov. Today - 2023. - V. 28. - 103415.
179. Kircheis R., Blessing T., Brunner S., Wightman L., and Wagner E. Tumor targeting with surface-shielded ligand–polycation DNA complexes // Journal of Controlled Release - 2001. - V. 72. - P. 165-170.
180. Khan M. Polymers as efficient non-viral gene delivery vectors: the role of the chemical and physical architecture of macromolecules // Polymers - 2024. - V.16. - 2629.
181. Kleemann E., Neu M., Jekel N., Fink L., Schmehl T., Gessler T., Seeger W., and Kissel T. Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG–PEI // Journal of Controlled Release - 2005. - V. 109. - P. 299-316.
182. Klemm A.R., Young D., and Lloyd J.B. Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability // Biochem. Pharmacol. - 1998. - V. 56. - P. 41-46.

183. Kobayashi A., Kang M.I., Watai Y., Tong K.I., Shibata T., Uchida K., and Yamamoto M. Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1 // Mol. Cell Biol. - 2006. - V. 26. - P. 221-229.
184. Kohl M., Essenpreis M., and Cope M. The influence of glucose concentration upon the transport of light in tissue-simulating phantoms // Physics in Medicine & Biology - 1995. - V. 40. - 1267.
185. Kontermann R.E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics // Curr. Opin. Biotechnol. - 2011. - V. 22. - P. 868-876.
186. Kontermann R. (ed.) Therapeutic proteins: strategies to modulate their plasma half-lives // John Wiley & Sons. 2012. - V. 48.
187. Kremer T.M., Rinne M.L., Xu Y., Chen X.M., and Kelley M.R. Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase // Respiratory Research - 2004. - V. 5. - P. 1-11.
188. Krishnamurthy S., Wohlford-Lenane C., Kandimalla S., Sartre G., Meyerholz D.K., Theberge V., Hallee S., Duperre A.M., Del'Guidice T., Lepetit-Stoffaes J.P., Barbeau X., Guay D., and McCray P.B., Jr. Engineered amphiphilic peptides enable delivery of proteins and CRISPR-associated nucleases to airway epithelia // Nat. Commun. - 2019. - V. 10. - 4906.
189. Kunath K., von Harpe A., Petersen H., Fischer D., Voigt K., Kissel T., and Bickel U. The structure of PEG-modified poly (ethylene imines) influences biodistribution and pharmacokinetics of their complexes with NF-kB decoy in mice // Pharmaceutical research - 2002. - V. 19. - P. 810-817.
190. Ladokhin A.S., Kyrychenko A., Rodnin M.V., and Vasquez-Montes V. Conformational switching, refolding and membrane insertion of the diphtheria toxin translocation domain // Methods Enzymol. - 2021. - V. 649. - P. 341-370.
191. Lamouille S., Xu J., and Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2014. - V. 15. - P. 178-196.
192. Langel U. Cell-Penetrating Peptides and Transportan // Pharmaceutics - 2021. - V. 13. - №. 7. - 987.
193. Lebbink R.J., Lowe M., Chan T., Khine H., Wang X., and McManus M.T. Polymerase II promoter strength determines efficacy of microRNA adapted shRNAs // PloS one - 2011. - V. 6. - e26213.
194. Lee D., Lee Y.M., Kim J., Lee M.K., Kin W.J. Enhanced tumor-targeted gene delivery by bioreducible polyethylenimine tethering EGFR divalent ligands // Biomater. Sci. - 2015. - V. 3. - P. 1096-1104.

195. Lee W.M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away? // J. Hepatol. - 2017. - V. 67. - P. 1324-1331.
196. Lemmon M.A. and Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases // Cell - 2010. - V. 141. - P. 1117-1134.
197. Lemmon M.A., Schlessinger J., and Ferguson K.M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. - 2014. - V. 6. - a020768.
198. Li C., Cao X.W., Zhao J., and Wang F.J. Effective Therapeutic Drug Delivery by GALA3, an Endosomal Escape Peptide with Reduced Hydrophobicity // J. Membr. Biol. - 2020. - V. 253. - P. 139-152.
199. Li J. and Yan H. Skin toxicity with anti-EGFR monoclonal antibody in cancer patients: a meta-analysis of 65 randomized controlled trials // Cancer Chemother. Pharmacol. - 2018. - V. 82. - P. 571-583.
200. Li L., Quang T.S., Gracely E.J., Kim J.H., Emrich J.G., Yaeger T.E., Jenrette J.M., Cohen S.C., Black P., and Brady L.W. A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme // J. Neurosurg. - 2010. - V. 113. - P. 192-198.
201. Li L.Q., Xie W.J., Pan D., Chen H., and Zhang L. Inhibition of autophagy by bafilomycin A1 promotes chemosensitivity of gastric cancer cells // Tumour. Biol. - 2016. - V. 37. - P. 653-659.
202. Li S., Goins B., Hrycushko B.A., Phillips W.T., and Bao A. Feasibility of eradication of breast cancer cells remaining in postlumpectomy cavity and draining lymph nodes following intracavitary injection of radioactive immunoliposomes // Mol. Pharm. - 2012. - V. 9. - P. 2513-2522.
203. Li W., Nicol F., and Szoka F.C., Jr. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2004. - V. 56. - P. 967-985.
204. Li Z., Zhao R., Wu X., Sun Y., Yao M., Li J., Xu Y., Gu J. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics //The FASEB journal. - 2005. - V. 19. - №. 14. - P. 1978-1985.
205. Liao H.W., Hsu J.M., Xia W., Wang H.L., Wang Y.N., Chang W.C., Arold S.T., Chou C.K., Tsou P.H., Yamaguchi H., Fang Y.F., Lee H.J., Lee H.H., Tai S.K., Yang M.H., Morelli M.P., Sen M., Ladbury J.E., Chen C.H., Grandis J.R., Kopetz S., and Hung M.C. PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response // J. Clin. Invest - 2015a. - V. 125. - P. 4529-4543.

206. Liao H.W., Hsu J.M., Xia W., Wang H.L., Wang Y.N., Chang W.C., Arold S.T., Chou C.K., Tsou P.H., Yamaguchi H., Fang Y.F., Lee H.J., Lee H.H., Tai S.K., Yang M.H., Morelli M.P., Sen M., Ladbury J.E., Chen C.H., Grandis J.R., Kopetz S., and Hung M.C. PRMT1-mediated methylation of the EGF receptor regulates signaling and cetuximab response // J. Clin. Invest - 2015b. - V. 125. - P. 4529-4543.
207. Liao X., Rabideau A.E., and Pentelute B.L. Delivery of antibody mimics into mammalian cells via anthrax toxin protective antigen // Chembiochem. - 2014. - V. 15. - P. 2458-2466.
208. Lim J.P. and Gleeson P.A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps // Immunol Cell Biol. - 2011. - V. 89. - P. 836-843.
209. Lim S., Khoo R., Peh K.M., Teo J., Chang S.C., Ng S., Beilhartz G.L., Melnyk R.A., Johannes C.W., Brown C.J., Lane D.P., Henry B., and Partridge A.W. bioPROTACs as versatile modulators of intracellular therapeutic targets including proliferating cell nuclear antigen (PCNA) // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 2020. - V. 117. - P. 5791-5800.
210. Lin N., Zheng W., Li L., Liu H., Wang T., Wang P., and Ma X. A novel system enhancing the endosomal escapes of peptides promotes Bak BH3 peptide inducing apoptosis in lung cancer A549 cells // Target Oncol. - 2014. - V. 9. - P. 163-170.
211. Liu D., Liu F., Liu Z., Wang L., and Zhang N. Tumor specific delivery and therapy by double-targeted nanostructured lipid carriers with anti-VEGFR-2 antibody // Mol. Pharm. - 2011. - V. 8. - P. 2291-2301.
212. Liu J., Liu X., Han Y., Zhang J., Liu D., Ma G., Li C., Liu L., and Kong D. Nanovaccine Incorporated with Hydroxychloroquine Enhances Antigen Cross-Presentation and Promotes Antitumor Immune Responses // ACS Appl. Mater. Interfaces. - 2018a. - V. 10. - P. 30983-30993.
213. Liu S., Pi J., and Zhang Q. Mathematical modeling reveals quantitative properties of Keap1-Nrf2 signaling // Redox. Biol. - 2021. - V. 47. - 102139.
214. Liu S., Pi J., and Zhang Q. Signal amplification in the Keap1-Nrf2-ARE antioxidant response pathway // Redox. Biol. - 2022a. - V. 54. - 102389.
215. Liu S., Wang B., Sheng Y., Dong S., and Liu G. Rational Design of Self-Assembled Mitochondria-Targeting Lytic Peptide Conjugates with Enhanced Tumor Selectivity // Chemistry - 2022b. - V. 28. - e202103517.
216. Liu X., Tian P.K., Ju D.W., Zhang M.H., Yao M., Cao X.T., Gu J.R. Systemic genetic transfer of p21WAF–1 and GM-CSF utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex // Cancer gene therapy. - 2003. - V. 10. - №. 7. - P. 529-539.
217. Liu Y., Yang A., Qu Y., Wang Z., Zhang Y., Liu Y., Wang N., Teng L., and Wang D. Ameliorative effects of Antrodia cinnamomea polysaccharides against cyclophosphamide-

induced immunosuppression related to Nrf2/HO-1 signaling in BALB/c mice // Int. J. Biol. Macromol. - 2018b. - V. 116. - P. 8-15.

218. Lo C.L., Chothia C., and Janin J. The atomic structure of protein-protein recognition sites // J. Mol. Biol. - 1999. - V. 285. - P. 2177-2198.
219. Lo H.W. Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications // Discov. Med. - 2010. - V. 10. - P. 44-51.
220. Lo H.W., Ali-Seyed M., Wu Y., Bartholomeusz G., Hsu S.C., and Hung M.C. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1 // J. Cell Biochem. - 2006. - V. 98. - P. 1570-1583.
221. Lo S.C. and Hannink M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria // Exp. Cell Res. - 2008. - V. 314. - P. 1789-1803.
222. London M. and Gallo E. Epidermal growth factor receptor (EGFR) involvement in epithelial-derived cancers and its current antibody-based immunotherapies // Cell Biol. Int. - 2020. - V. 44. - P. 1267-1282.
223. Lonn P. and Dowdy S.F. Cationic PTD/CPP-mediated macromolecular delivery: charging into the cell // Expert Opin. Drug Deliv. - 2015. - V. 12. - P. 1627-1636.
224. Lopez-Laguna H., Cubarsi R., Unzueta U., Mangues R., Vazquez E., and Villaverde A. Endosomal escape of protein nanoparticles engineered through humanized histidine-rich peptides // Science China Materials - 2020. - V. 63. - P. 644-653.
225. Lu H., Zhou Q., He J., Jiang Z., Peng C., Tong R., and Shi J. Recent advances in the development of protein-protein interactions modulators: mechanisms and clinical trials // Signal Transduct. Target Ther. - 2020a. - V. 5. - 213.
226. Lu M., Liu T., Jiao Q., Ji J., Tao M., Liu Y., You Q., and Jiang Z. Discovery of a Keap1-dependent peptide PROTAC to knockdown Tau by ubiquitination-proteasome degradation pathway // Eur. J. Med. Chem. - 2018. - V. 146. - P. 251-259.
227. Lu R.M., Hwang Y.C., Liu I.J., Lee C.C., Tsai H.Z., Li H.J., and Wu H.C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases // J. Biomed. Sci. - 2020b. - V. 27. - P. 1-30.
228. Lundberg P., El-Andaloussi S., Sutlu T., Johansson H., and Langel U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides // FASEB J. - 2007. - V. 21. - P. 2664-2671.
229. Makarova A.O., Svirshchevskaya E.V., Titov M.M., Deyev S.M., Kholodenko R.V. Prospects for the use of antibody-drug conjugates in cancer therapy // Russ. J. Bioorganic. Chem. 2025. - V. 51. - №. 2. - P. 556-573.

230. Maier J.S., Walker S.A., Fantini S., Franceschini M.A., and Gratton E. Possible correlation between blood glucose concentration and the reduced scattering coefficient of tissues in the near infrared // Optics letters - 1994. - V. 19. - P. 2062-2064.
231. Mailer A.G., Clegg P.S., and Pusey P.N. Particle sizing by dynamic light scattering: non-linear cumulant analysis // Journal of Physics: Condensed Matter - 2015. - V. 27. - 145102.
232. Mamot C., Drummond D.C., Noble C.O., Kallab V., Guo Z., Hong K., Kirpotin D.B., and Park J.W. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo // Cancer Res. - 2005. - V. 65. - P. 11631-11638.
233. Mamot C., Ritschard R., Wicki A., Stehle G., Dieterle T., Bubendorf L., Hilker C., Deuster S., Herrmann R., and Rochlitz C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study // Lancet Oncol. - 2012. - V. 13. - P. 1234-1241.
234. Manno C.S., Pierce G.F., Arruda V.R., Glader B., Ragni M., Rasko J.J., Ozelo M.C., Hoots K., Blatt P., Konkle B., Dake M., Kaye R., Razavi M., Zajko A., Zehnder J., Rustagi P.K., Nakai H., Chew A., Leonard D., Wright J.F., Lessard R.R., Sommer J.M., Tigges M., Sabatino D., Luk A., Jiang H., Mingozzi F., Couto L., Ertl H.C., High K.A., and Kay M.A. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response // Nat. Med. - 2006. - V. 12. - P. 342-347.
235. Martinez M.D., Jafari R., Ignatushchenko M., Seki T., Larsson E.A., Dan C., Sreekumar L., Cao Y., and Nordlund P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay // Science - 2013. - V. 341. - P. 84-87.
236. Masso-Valles D. and Soucek L. Blocking Myc to Treat Cancer: Reflecting on Two Decades of Omomyc // Cells - 2020. - V. 9. - №. 4. - 883.
237. Matsuzaki K. Membrane Permeabilization Mechanisms // Adv. Exp. Med. Biol. - 2019. - V. 1117. - P. 9-16.
238. Matthaeus C. and Taraska J.W. Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking // Front Cell Dev. Biol. - 2020. - V. 8. - 614472.
239. Matveenko A.G., Ryzhkova V.E., Zaytseva N.A., Danilov L.G., Mikhailichenko A.S., Barbitoff Y.A., and Zhouravleva G.A. Processing of fluorescent proteins may prevent detection of prion particles in [PSI+] cells // Biology - 2022. - V. 11. - 1688.
240. Misale S., Yaeger R., Hobor S., Scala E., Janakiraman M., Liska D., Valtorta E., Schiavo R., Buscarino M., Siravegna G., Bencardino K., Cercek A., Chen C.T., Veronese S., Zanon C., Sartore-Bianchi A., Gambacorta M., Gallicchio M., Vakiani E., Boscaro V., Medico E., Weiser M., Siena S., Di N.F., Solit D., and Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and

acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer // Nature - 2012. - V. 486. - P. 532-536.

241. Mittapalli R.K., Adkins C.E., Bohn K.A., Mohammad A.S., Lockman J.A., and Lockman P.R. Quantitative Fluorescence Microscopy Measures Vascular Pore Size in Primary and Metastatic Brain Tumors // Cancer Res. - 2017. - V. 77. - P. 238-246.
242. Miyoshi Y., Kadono M., Okazaki S., Nishimura A., Kitamatsu M., Watanabe K., and Ohtsuki T. Endosomal Escape of Peptide-Photosensitizer Conjugates Is Affected by Amino Acid Sequences near the Photosensitizer // Bioconjug. Chem. - 2020. - V. 31. - P. 916-922.
243. Modell A.E., Blosser S.L., and Arora P.S. Systematic Targeting of Protein-Protein Interactions // Trends Pharmacol. Sci. - 2016. - V. 37. - P. 702-713.
244. Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S., Yang C.H., Chu D.T., Saijo N., Sunpaweravong P., Han B., Margono B., Ichinose Y., Nishiwaki Y., Ohe Y., Yang J.J., Chewaskulyong B., Jiang H., Duffield E.L., Watkins C.L., Armour A.A., and Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma // N. Engl. J. Med. - 2009. - V. 361. - P. 947-957.
245. Mondal G., Almawash S., Chaudhary A.K., and Mahato R.I. EGFR-Targeted Cationic Polymeric Mixed Micelles for Codelivery of Gemcitabine and miR-205 for Treating Advanced Pancreatic Cancer // Mol. Pharm. - 2017. - V. 14. - P. 3121-3133.
246. Morgillo F., Woo J.K., Kim E.S., Hong W.K., and Lee H.Y. Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib // Cancer Res. - 2006. - V. 66. - P. 10100-10111.
247. MUELLER P., RUDIN D.O., TIEN H.T., and WESCOTT W.C. Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system // Nature - 1962. - V. 194. - P. 979-980.
248. Mullard A. Targeted protein degraders crowd into the clinic // Nat. Rev. Drug Discov. - 2021. - V. 20. - P. 247-250.
249. Muro S. Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems // J. Control Release - 2012. - V. 164. - P. 125-137.
250. Murphy M.P., Bayir H., Belousov V., Chang C.J., Davies K.J.A., Davies M.J., Dick T.P., Finkel T., Forman H.J., Janssen-Heininger Y., Gems D., Kagan V.E., Kalyanaraman B., Larsson N.G., Milne G.L., Nystrom T., Poulsen H.E., Radi R., Van R.H., Schumacker P.T., Thornalley P.J., Toyokuni S., Winterbourn C.C., Yin H., and Halliwell B. Guidelines for

measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo // Nat. Metab - 2022. - V. 4. - P. 651-662.

251. Murtuza A., Bulbul A., Shen J.P., Keshavarzian P., Woodward B.D., Lopez-Diaz F.J., Lippman S.M., and Husain H. Novel Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors and Strategies to Overcome Therapeutic Resistance in Lung Cancer // Cancer Res. - 2019. - V. 79. - P. 689-698.
252. Nakase I., Kogure K., Harashima H., and Futaki S. Application of a fusiogenic peptide GALA for intracellular delivery // Methods Mol. Biol. - 2011. - V. 683. - P. 525-533.
253. Naumann R.W., Coleman R.L., Burger R.A., Sausville E.A., Kutarska E., Ghamande S.A., Gabrail N.Y., Depasquale S.E., Nowara E., Gilbert L., Gersh R.H., Teneriello M.G., Harb W.A., Konstantinopoulos P.A., Penson R.T., Symanowski J.T., Lovejoy C.D., Leamon C.P., Morgenstern D.E., and Messmann R.A. PRECEDENT: a randomized phase II trial comparing vintafolide (EC145) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in combination versus PLD alone in patients with platinum-resistant ovarian cancer // J. Clin. Oncol. - 2013. - V. 31. - P. 4400-4406.
254. Nayak T.K., Norenberg J.P., Anderson T.L., Prossnitz E.R., Stabin M.G., and Atcher R.W. Somatostatin-receptor-targeted alpha-emitting 213Bi is therapeutically more effective than beta(-)-emitting 177Lu in human pancreatic adenocarcinoma cells // Nucl. Med. Biol. - 2007. - V. 34. - P. 185-193.
255. Neuberg P. and Kichler A. Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines // Adv. Genet. - 2014. - V. 88. - P. 263-288.
256. Niamsuphap S., Fercher C., Kumble S., Huda P., Mahler S.M., and Howard C.B. Targeting the undruggable: emerging technologies in antibody delivery against intracellular targets // Expert Opin. Drug Deliv. - 2020. - V. 17. - P. 1189-1211.
257. Nir S. and Nieva J.L. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion // Progress in lipid research - 2000. - V. 39. - P. 181-206.
258. Nishimura Y., Takeda K., Ezawa R., Ishii J., Ogino C., and Kondo A. A display of pH-sensitive fusogenic GALA peptide facilitates endosomal escape from a Bio-nanocapsule via an endocytic uptake pathway // J. Nanobiotechnology - 2014. - V. 12. - P. 1-6.
259. Nizard P., Chenal A., Beaumelle B., Fourcade A., and Gillet D. Prolonged display or rapid internalization of the IgG-binding protein ZZ anchored to the surface of cells using the diphtheria toxin T domain // Protein Eng - 2001. - V. 14. - P. 439-446.
260. Obozina A.S., Iureva A.M., Kotov A.A., Deyev S.M., Korenkov E.S., Shipunova V.O. Genetically encoded self-assembling affibody-streptavidin nanoparticles for HER2-positive cancer theranostics // J. Control. Release. 2026. - V. 392. - 114679.

261. Ogura T., Tong K.I., Mio K., Maruyama Y., Kurokawa H., Sato C., and Yamamoto M. Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 2010. - V. 107. - P. 2842-2847.
262. Omachi K., Kaseda S., Yokota T., Kamura M., Teramoto K., Kuwazuru J., Kojima H., Nohara H., Koyama K., Ohtsuki S., Misumi S., Takeo T., Nakagata N., Li J.D., Shuto T., Suico M.A., Miner J.H., and Kai H. Metformin ameliorates the severity of experimental Alport syndrome // Sci. Rep. - 2021. - V. 11. - 7053.
263. Ong G.L. and Mattes M.J. Penetration and binding of antibodies in experimental human solid tumors grown in mice // Cancer Res. - 1989. - V. 49. - P. 4264-4273.
264. Orzaez M., Medina M.S., and Perez-Paya E. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors: methods and protocols // 2016.
265. Panday A., Dixena B., Jain N., Jain A.K. Lipid-based non-viral vector: Promising approach for gene delivery // Current Pharmaceutical Design - 2024. - V. 31. - P. 521-539.
266. Panosa C., Fonge H., Ferrer-Batalle M., Menendez J.A., Massaguer A., De L.R., and Reilly R.M. A comparison of non-biologically active truncated EGF (EGFt) and full-length hEGF for delivery of Auger electron-emitting 111In to EGFR-positive breast cancer cells and tumor xenografts in athymic mice // Nucl. Med. Biol. - 2015. - V. 42. - P. 931-938.
267. Paramasivam P., Franke C., Stoter M., Hoijer A., Bartesaghi S., Sabirsh A., Lindfors L., Arteta M.Y., Dahlen A., Bak A., Andersson S., Kalaidzidis Y., Bickle M., and Zerial M. Endosomal escape of delivered mRNA from endosomal recycling tubules visualized at the nanoscale // J. Cell Biol. - 2022. - V. 221. - №. 2.
268. Parker N., Turk M.J., Westrick E., Lewis J.D., Low P.S., and Leamon C.P. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay // Analytical biochemistry - 2005. - V. 338. - P. 284-293.
269. Peace B.E., Hill K.J., Degen S.J., and Waltz S.E. Cross-talk between the receptor tyrosine kinases Ron and epidermal growth factor receptor // Exp. Cell Res. - 2003. - V. 289. - P. 317-325.
270. Pernot P., Round A., Barrett R., De Maria Antolinos A., Gobbo A., Gordon E., Huet J., Kieffer J., Lentini M., and Mattenet M. Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution // Journal of synchrotron radiation - 2013. - V. 20. - P. 660-664.
271. Petrilli R., Eloy J.O., Saggioro F.P., Chesca D.L., de Souza M.C., Dias M.V.S., daSilva L.L.P., Lee R.J., and Lopez R.F.V. Skin cancer treatment effectiveness is improved by

iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection // J. Control Release - 2018. - V. 283. - P. 151-162.

272. Petta I., Lievens S., Libert C., Tavernier J., and De B.K. Modulation of Protein-Protein Interactions for the Development of Novel Therapeutics // Mol. Ther. - 2016. - V. 24. - P. 707-718.
273. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., and Ferrin T.E. UCSF Chimera - visualization system for exploratory research and analysis // Journal of computational chemistry - 2004. - V. 25. - P. 1605-1612.
274. Pfister D. and Morbidelli M. Process for protein PEGylation // J. Control Release - 2014. - V. 180. - P. 134-149.
275. Pinkas-Kramarski R., Shelly M., Guarino B.C., Wang L.M., Lyass L., Alroy I., Alimandi M., Kuo A., Moyer J.D., Lavi S., Eisenstein M., Ratzkin B.J., Seger R., Bacus S.S., Pierce J.H., Andrews G.C., and Yarden Y. ErbB tyrosine kinases and the two neuregulin families constitute a ligand-receptor network // Mol. Cell Biol. - 1998. - V. 18. - P. 6090-6101.
276. Poreba M., Rut W., Vizovisek M., Groborz K., Kasperkiewicz P., Finlay D., Vuori K., Turk D., Turk B., Salvesen G.S., and Drag M. Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes // Chem. Sci. - 2018. - V. 9. - P. 2113-2129.
277. Portnoff A.D., Stephens E.A., Varner J.D., and DeLisa M.P. Ubiquibodies, synthetic E3 ubiquitin ligases endowed with unnatural substrate specificity for targeted protein silencing // J. Biol. Chem. - 2014. - V. 289. - P. 7844-7855.
278. Pozzi D., Marchini C., Cardarelli F., Rossetta A., Colapicchioni V., Amici A., Montani M., Motta S., Brocca P., Cantu L., and Caracciolo G. Mechanistic understanding of gene delivery mediated by highly efficient multicomponent envelope-type nanoparticle systems // Mol. Pharm. - 2013. - V. 10. - P. 4654-4665.
279. Priyadarshini D., Ivica J., Separovic F., and de Planque M.R.R. Characterisation of cell membrane interaction mechanisms of antimicrobial peptides by electrical bilayer recording // Biophys. Chem. - 2022. - V. 281. - 106721.
280. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., and Brubaker M.A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination // Nature methods - 2017. - V. 14. - P. 290-296.
281. Puntheeranurak T., Stroh C., Zhu R., Angsuthanasombat C., and Hinterdorfer P. Structure and distribution of the Bacillus thuringiensis Cry4Ba toxin in lipid membranes // Ultramicroscopy - 2005. - V. 105. - P. 115-124.

282. Puthenveedu M.A., Bachert C., Puri S., Lanni F., and Linstedt A.D. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution // Nat. Cell Biol. - 2006. - V. 8. - P. 238-248.
283. Qiu C., Xia F., Zhang J., Shi Q., Meng Y., Wang C., Pang H., Gu L., Xu C., Guo Q., and Wang J. Advanced Strategies for Overcoming Endosomal/Lysosomal Barrier in Nanodrug Delivery // Research (Wash. D C.) - 2023. - V. 6. - 0148.
284. Raab A., Han W., Badt D., Smith-Gill S.J., Lindsay S.M., Schindler H., and Hinterdorfer P. Antibody recognition imaging by force microscopy // Nature biotechnology - 1999. - V. 17. - P. 901-905.
285. Ragelle H., Vandermeulen G., and Preat V. Chitosan-based siRNA delivery systems // J. Control Release - 2013. - V. 172. - P. 207-218.
286. Ratanji K.D., Derrick J.P., Dearman R.J., Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation // J. Immunotoxicol. - 2014. - V. 11. - № 2. - P. 99-109.
287. Razumienko E., Dryden L., Scollard D., and Reilly R.M. MicroSPECT/CT imaging of co-expressed HER2 and EGFR on subcutaneous human tumor xenografts in athymic mice using (1)(1)(1)In-labeled bispecific radioimmunoconjugates // Breast Cancer Res. Treat. - 2013. - V. 138. - P. 709-718.
288. Reilly R.M., Chen P., Wang J., Scollard D., Cameron R., and Vallis K.A. Preclinical pharmacokinetic, biodistribution, toxicology, and dosimetry studies of 111In-DTPA-human epidermal growth factor: an auger electron-emitting radiotherapeutic agent for epidermal growth factor receptor-positive breast cancer // J. Nucl. Med. - 2006. - V. 47. - P. 1023-1031.
289. Richard J.P., Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., and Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake // J. Biol. Chem. - 2003. - V. 278. - P. 585-590.
290. Roberts M.J., Bentley M.D., and Harris J.M. Chemistry for peptide and protein PEGylation // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2002. - V. 54. - P. 459-476.
291. Roes S., Mumm F., Seydel U., and Gutsmann T. Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy // J. Biol. Chem. - 2006. - V. 281. - P. 2757-2763.
292. Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., Jans D.A., and Sobolev A.S. Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity // FASEB J. - 2003. - V. 17. - P. 1121-1123.

293. Rosenkranz A.A. and Slastnikova T.A. Prospects of Using Protein Engineering for Selective Drug Delivery into a Specific Compartment of Target Cells // Pharmaceutics - 2023. - V. 15. - №.3. - 987.
294. Rosenkranz A.A., Slastnikova T.A., Georgiev G.P., Zalutsky M.R., and Sobolev A.S. Delivery systems exploiting natural cell transport processes of macromolecules for intracellular targeting of Auger electron emitters // Nucl. Med. Biol. - 2020. - V. 80-81. - P. 45-56.
295. Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Pozzi O.R., Lunin V.G., Zalutsky M.R., and Sobolev A.S. Engineered modular recombinant transporters: application of new platform for targeted radiotherapeutic agents to alpha-particle emitting 211 At // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. - 2008. - V. 72. - P. 193-200.
296. Roskoski R., Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update // Pharmacol. Res. - 2020. - V. 152. - 104609.
297. Rouet R. and Christ D. Efficient Intracellular Delivery of CRISPR-Cas Ribonucleoproteins through Receptor Mediated Endocytosis // ACS Chem. Biol. - 2019. - V. 14. - P. 554-561.
298. Rudmann D.G., Alston J.T., Hanson J.C., Heidel S. High molecular weight polyethylene glycol cellular distribution and PEG-associated cytoplasmic vacuolation is molecular weight dependent and does not require conjugation to proteins // Toxicol. Pathol. - 2013. - V. 41. - P. 970-983.
299. Sadowitz P.D., Hubbard B.A., Dabrowiak J.C., Goodisman J., Tacka K.A., Aktas M.K., Cunningham M.J., Dubowy R.L., and Souid A.K. Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs // Drug Metab Dispos. - 2002. - V. 30. - P. 183-190.
300. Sampson J.H., Akabani G., Archer G.E., Berger M.S., Coleman R.E., Friedman A.H., Friedman H.S., Greer K., Herndon J.E., Kunwar S., McLendon R.E., Paolino A., Petry N.A., Provenzale J.M., Reardon D.A., Wong T.Z., Zalutsky M.R., Pastan I., and Bigner D.D. Intracerebral infusion of an EGFR-targeted toxin in recurrent malignant brain tumors // Neuro. Oncol. - 2008. - V. 10. - P. 320-329.
301. Santra M., Reed C.C., and Iozzo R.V. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope // J. Biol. Chem. - 2002. - V. 277. - P. 35671-35681.
302. Sayers E.J., Peel S.E., Schantz A., England R.M., Beano M., Bates S.M., Desai A.S., Puri S., Ashford M.B., and Jones A.T. Endocytic Profiling of Cancer Cell Models Reveals

Critical Factors Influencing LNP-Mediated mRNA Delivery and Protein Expression // Mol. Ther. - 2019. - V. 27. - P. 1950-1962.

303. Scaranti M., Cojocaru E., Banerjee S., and Banerji U. Exploiting the folate receptor +- in oncology // Nature reviews clinical oncology - 2020. - V. 17. - P. 349-359.
304. Scheres S.H. A Bayesian view on cryo-EM structure determination // Journal of molecular biology - 2012. - V. 415. - P. 406-418.
305. Schiffelers R.M., Ansari A., Xu J., Zhou Q., Tang Q., Storm G., Molema G., Lu P.Y., Scaria P.V., and Woodle M.C. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle // Nucleic Acids Res. - 2004. - V. 32. - e149.
306. Schroff R.W., Morgan A.C., Jr., Woodhouse C.S., Abrams P.G., Farrell M.M., Carpenter B.E., Oldham R.K., and Foon K.A. Monoclonal antibody therapy in malignant melanoma: factors effecting in vivo localization // J. Biol. Response Mod. - 1987. - V. 6. - P. 457-472.
307. Schuster M., Schnell L., Feigl P., Birkhofer C., Mohr K., Roeder M., Carle S., Langer S., Tippel F., Buchner J., Fischer G., Hausch F., Frick M., Schwan C., Aktories K., Schiene-Fischer C., and Barth H. The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells // Sci. Rep. - 2017. - V. 7. - 613.
308. Scott D.E., Bayly A.R., Abell C., and Skidmore J. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge // Nat. Rev. Drug Discov. - 2016. - V. 15. - P. 533-550.
309. Selby L.I., Cortez-Jugo C.M., Such G.K., and Johnston A.P.R. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. - 2017. - V. 9. - №. 5. - e1452.
310. Semerdzhiev S.A., Fakhree M.A.A., Segers-Nolten I., Blum C., and Claessens M.M.A.E. Interactions between SARS-CoV-2 N-Protein and alpha-Synuclein Accelerate Amyloid Formation // ACS Chem. Neurosci. - 2022. - V. 13. - P. 143-150.
311. Semple S.C., Akinc A., Chen J., Sandhu A.P., Mui B.L., Cho C.K., Sah D.W., Stebbing D., Crosley E.J., Yaworski E., Hafez I.M., Dorkin J.R., Qin J., Lam K., Rajeev K.G., Wong K.F., Jeffs L.B., Nechev L., Eisenhardt M.L., Jayaraman M., Kazem M., Maier M.A., Srinivasulu M., Weinstein M.J., Chen Q., Alvarez R., Barros S.A., De S., Klimuk S.K., Borland T., Kosovrasti V., Cantley W.L., Tam Y.K., Manoharan M., Ciufolini M.A., Tracy M.A., de F.A., MacLachlan I., Cullis P.R., Madden T.D., and Hope M.J. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery // Nat. Biotechnol. - 2010. - V. 28. - P. 172-176.
312. Shah P., Chaumet A., Royle S.J., and Bard F.A. The NAE Pathway: Autobahn to the Nucleus for Cell Surface Receptors // Cells - 2019. - V. 8. - №. 8. - 915.

313. Shaid S., Brandts C.H., Serve H., and Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy // Cell Death & Differentiation - 2013. - V. 20. - P. 21-30.
314. Sharpe J.C. and London E. Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: probable relationship to oligomerization // J. Membr. Biol. - 1999a. - V. 171. - P. 209-221.
315. Sharpe J.C. and London E. Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: probable relationship to oligomerization // The Journal of membrane biology - 1999b. - V. 171. - P. 209-221.
316. Shen H., Hu D., Du J., Wang X., Liu Y., Wang Y., Wei J.M., Ma D., Wang P., and Li L. Paclitaxel-octreotide conjugates in tumor growth inhibition of A549 human non-small cell lung cancer xenografted into nude mice // Eur. J. Pharmacol. - 2008. - V. 601. - P. 23-29.
317. Shen Z., Wang Y., Su Z., Kou R., Xie K., and Song F. Activation of p62-keap1-Nrf2 antioxidant pathway in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice // Chem. Biol. Interact. - 2018. - V. 282. - P. 22-28.
318. Shin J., Nile A., Oh J.W. Role of adaptin protein complexes in intracellular trafficking and their impact on diseases // Bioengineered - 2021. - V. 12. - №. 1. - P. 8259-8278.
319. Shim M.K., Park J., Yoon H.Y., Lee S., Um W., Kim J.H., Kang S.W., Seo J.W., Hyun S.W., Park J.H., Byun Y., Kwon I.C., and Kim K. Carrier-free nanoparticles of cathepsin B-cleavable peptide-conjugated doxorubicin prodrug for cancer targeting therapy // J. Control Release - 2019. - V. 294. - P. 376-389.
320. Shin Y.J., Park S.K., Jung Y.J., Kim Y.N., Kim K.S., Park O.K., Kwon S.H., Jeon S.H., Trinh l.A., Fraser S.E., Kee Y., and Hwang B.J. Nanobody-targeted E3-ubiquitin ligase complex degrades nuclear proteins // Sci. Rep. - 2015. - V. 5. - 14269.
321. Shipunova V.O. and Deyev S.M. Artificial Scaffold Polypeptides As an Efficient Tool for the Targeted Delivery of Nanostructures In Vitro and In Vivo // Acta Naturae - 2022. - V. 14. - P. 54-72.
322. Shockley T.R., Lin K., Sung C., Nagy J.A., Tompkins R.G., Dedrick R.L., Dvorak H.F., and Yarmush M.L. A quantitative analysis of tumor specific monoclonal antibody uptake by human melanoma xenografts: effects of antibody immunological properties and tumor antigen expression levels // Cancer Res. - 1992. - V. 52. - P. 357-366.
323. Siegrist W., Solca F., Stutz S., Giuffre L., Carrel S., Girard J., and Eberle A.N. Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells // Cancer Res. - 1989. - V. 49. - P. 6352-6358.
324. Sigismund S., Avanzato D., and Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer // Mol. Oncol. - 2018. - V. 12. - P. 3-20.

325. Silva-Islas C.A. and Maldonado P.D. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation // Pharmacol. Res. - 2018. - V. 134. - P. 92-99.
326. Simon N. and FitzGerald D. Immunotoxin Therapies for the Treatment of Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Cancers // Toxins. (Basel) - 2016. - V. 8. - №. 5. - 137.
327. Sinharay S., Howison C.M., Baker A.F., and Pagel M.D. Detecting in vivo urokinase plasminogen activator activity with a catalyCEST MRI contrast agent // NMR Biomed. - 2017. - V. 30. - №. 7. - e3721.
328. Siravegna G., Mussolin B., Buscarino M., Corti G., Cassingena A., Crisafulli G., Ponzetti A., Cremolini C., Amatu A., Lauricella C., Lamba S., Hobor S., Avallone A., Valtorta E., Rospo G., Medico E., Motta V., Antoniotti C., Tatangelo F., Bellosillo B., Veronese S., Budillon A., Montagut C., Racca P., Marsoni S., Falcone A., Corcoran R.B., Di N.F., Loupakis F., Siena S., Sartore-Bianchi A., and Bardelli A. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients // Nat. Med. - 2015. - V. 21. - P. 795-801.
329. Slastnikova T.A., Koumarianou E., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Lupanova T.N., Sobolev A.S., and Zalutsky M.R. Modular nanotransporters: a versatile approach for enhancing nuclear delivery and cytotoxicity of Auger electron-emitting 125I // EJNMMI. Res. - 2012. - V. 2. - 59.
330. Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., and Sobolev A.S. Modular nanotransporters for targeted intracellular delivery of drugs: folate receptors as potential targets // Curr. Pharm. Des - 2015. - V. 21. - P. 1227-1238.
331. Smith S.M. and Smith C.J. Capturing the mechanics of clathrin-mediated endocytosis // Curr. Opin. Struct. Biol. - 2022. - V. 75. - 102427.
332. Sobolev A.S. Modular transporters for subcellular cell-specific targeting of anti-tumor drugs // Bioessays - 2008. - V. 30. - P. 278-287.
333. Sobolev A.S. Modular nanotransporters of anticancer drugs conferring cell specificity and higher efficiency // Biochemistry (Mosc.) - 2009a. - V. 74. - P. 1567-1574.
334. Sobolev A.S. Novel modular transporters delivering anticancer drugs and foreign DNA to the nuclei of target cancer cells // J. BUON. - 2009b. - V. 14 Suppl 1. - P. S33-S42.
335. Sonawane N.D., Szoka F.C., Jr., and Verkman A.S. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes // J. Biol. Chem. - 2003. - V. 278. - P. 44826-44831.
336. Song H., Hedayati M., Hobbs R.F., Shao C., Bruchertseifer F., Morgenstern A., Deweese T.L., and Sgouros G. Targeting aberrant DNA double-strand break repair in triple-negative

breast cancer with alpha-particle emitter radiolabeled anti-EGFR antibody // Mol. Cancer Ther. - 2013. - V. 12. - P. 2043-2054.

337. Song J., Hu M., Zhou J., Xie S., Li T., and Li Y. Targeted protein degradation in drug development: Recent advances and future challenges // Eur. J. Med. Chem. - 2023. - V. 261. - P. 115839-
338. Sorkin A. and Goh L.K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs // Exp. Cell Res. - 2009. - V. 315. - P. 683-696.
339. Sporn M.B. and Liby K.T. Nrf2 and cancer: the good, the bad and the importance of context // Nat. Rev. Cancer - 2012. - V. 12. - P. 564-571.
340. Spradlin J.N., Zhang E., Nomura D.K. Reimagining druggability using chemoproteomic platforms // Acc. Chem. Res. - 2021. - V. 54. - P. 1801-1813.
341. Sreeranganathan M., Uthaman S., Sarmento B., Mohan C.G., Park I.K., and Jayakumar R. In vivo evaluation of cetuximab-conjugated poly(gamma-glutamic acid)-docetaxel nanomedicines in EGFR-overexpressing gastric cancer xenografts // Int. J. Nanomedicine - 2017. - V. 12. - P. 7165-7182.
342. Stehl S., Graslund T., Karlstram A.E., Frejd F.Y., Nygren P., and Lofblom J. Affibody molecules in biotechnological and medical applications // Trends in biotechnology - 2017. - V. 35. - P. 691-712.
343. Steuperaert M., Debbaut C., Segers P., and Ceelen W. Modelling drug transport during intraperitoneal chemotherapy // Pleura. Peritoneum. - 2017. - V. 2. - P. 73-83.
344. Stevens P.J., Sekido M., and Lee R.J. A folate receptor-targeted lipid nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug // Pharm. Res. - 2004. - V. 21. - P. 2153-2157.
345. Su Z., Shi Y., Xiao Y., Sun M., Ping Q., Zong L., Li S., Niu J., Huang A., You W., Chen Y., Chen X., Fei J., and Tian J. Effect of octreotide surface density on receptor-mediated endocytosis in vitro and anticancer efficacy of modified nanocarrier in vivo after optimization // Int. J. Pharm. - 2013. - V. 447. - P. 281-292.
346. Suhling K., Hirvonen L.M., Levitt J.A., Chung P.H., Tregidgo C., Le Marois A., Rusakov D.A., Zheng K., Ameer-Beg S., and Poland S. Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments // Medical Photonics - 2015. - V. 27. - P. 3-40.
347. Sui Z.H., Xu H., Wang H., Jiang S., Chi H., and Sun L. Intracellular Trafficking Pathways of Edwardsiella tarda: From Clathrin- and Caveolin-Mediated Endocytosis to Endosome and Lysosome // Front Cell Infect. Microbiol. - 2017. - V. 7. - 400.

348. Sung C. and van Osdol W.W. Pharmacokinetic comparison of direct antibody targeting with pretargeting protocols based on streptavidin-biotin binding // J. Nucl. Med. - 1995. - V. 36. - P. 867-876.
349. Suzuki M., Iwaki K., Kikuchi M., Fujiwara K., and Doi N. Characterization of the membrane penetration-enhancing peptide S19 derived from human syncytin-1 for the intracellular delivery of TAT-fused proteins // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2022. - V. 586. - P. 63-67.
350. Suzuki R., Takizawa T., Kuwata Y., Mutoh M., Ishiguro N., Utoguchi N., Shinohara A., Eriguchi M., Yanagie H., and Maruyama K. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome // Int. J. Pharm. - 2008. - V. 346. - P. 143-150.
351. Svergun D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria // Journal of applied crystallography - 1992. - V. 25. - P. 495-503.
352. Svergun D.I., Petoukhov M.V., and Koch M.H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering // Biophysical journal - 2001. - V. 80. - P. 2946-2953.
353. Szoka F., Jr. and Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1978. - V. 75. - P. 4194-4198.
354. Takahashi D. and Arimoto H. Selective autophagy as the basis of autophagy-based degraders // Cell chemical biology - 2021. - V. 28. - P. 1061-1071.
355. Talelli M., Oliveira S., Rijcken C.J., Pieters E.H., Etrych T., Ulbrich K., van Nostrum R.C., Storm G., Hennink W.E., and Lammers T. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy // Biomaterials - 2013. - V. 34. - P. 1255-1260.
356. Tang L., Zhou Y., Wang L., Purkayastha S., Zhang L., He J., Wang F., and Song P.X. A Review of Multi-Compartment Infectious Disease Models // Int. Stat. Rev. - 2020. - V. 88. - P. 462-513.
357. Tanizaki J., Okamoto I., Sakai K., and Nakagawa K. Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification // Br. J. Cancer - 2011. - V. 105. - P. 807-813.
358. Teissier E. and Pecheur E.I. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins // Eur. Biophys. J. - 2007. - V. 36. - P. 887-899.
359. Thatcher N., Hirsch F.R., Luft A.V., Szczesna A., Ciuleanu T.E., Dediu M., Ramlau R., Galiulin R.K., Balint B., Losonczy G., Kazarnowicz A., Park K., Schumann C., Reck M., Depenbrock H., Nanda S., Kruljac-Letunic A., Kurek R., Paz-Ares L., and Socinski M.A.

Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial // Lancet Oncol. - 2015. - V. 16. - P. 763-774.

360. Therkildsen C., Bergmann T.K., Henrichsen-Schnack T., Ladelund S., and Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis // Acta Oncol. - 2014. - V. 53. - P. 852-864.
361. Thibeault S., Rautureau Y., Oubaha M., Faubert D., Wilkes B.C., Delisle C., and Gratton J.P. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability // Mol. Cell - 2010. - V. 39. - P. 468-476.
362. Thurber G.M. and Dane W.K. A mechanistic compartmental model for total antibody uptake in tumors // J. Theor. Biol. - 2012. - V. 314. - P. 57-68.
363. Thurber G.M., Schmidt M.M., and Wittrup K.D. Factors determining antibody distribution in tumors // Trends Pharmacol. Sci. - 2008. - V. 29. - P. 57-61.
364. Thurber G.M. and Weissleder R. Quantitating antibody uptake in vivo: conditional dependence on antigen expression levels // Mol. Imaging Biol. - 2011. - V. 13. - P. 623-632.
365. Tolmachev V.M., Chernov V.I., and Deyev S.M. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy // Russian Chemical Reviews - 2022. - V. 91. - RCR5034.
366. Tolvanen T.A. Current Advances in CETSA // Front Mol. Biosci - 2022. - V. 9. - 866764.
367. Tortonese M. and Kirk M. Characterization of application-specific probes for SPMs // Micromachining and Imaging - 1997. - V. 3009. - P. 53-60.
368. Tria G., Mertens H.D., Kachala M., and Svergun D.I. Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering // IUCrJ - 2015a. - V. 2. - P. 207-217.
369. Tria G., Mertens H.D., Kachala M., and Svergun D.I. Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering // IUCrJ - 2015b. - V. 2. - P. 207-217.
370. Trivedi S., Srivastava R.M., Concha-Benavente F., Ferrone S., Garcia-Bates T.M., Li J., and Ferris R.L. Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients // Clin. Cancer Res. - 2016. - V. 22. - P. 5229-5237.

371. Tros d., I and Duzgunes N. Delivery of therapeutic nucleic acids via transferrin and transferrin receptors: lipoplexes and other carriers // Expert Opin. Drug Deliv. - 2013. - V. 10. - P. 1583-1591.
372. ul Haq H.S., Kombe A.J.K., Zahid A., Babar M., Zeng W., He H., and Jin T. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: Importance in viral infection // JUSTC - 2022. - V. 52. - P. 1-1.
373. Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Georgiev G.P., and Sobolev A.S. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation // Life Sci. - 2022. - V. 291. - 120111.
374. Upadhyay K.K., Jadeja R.N., Vyas H.S., Pandya B., Joshi A., Vohra A., Thounaojam M.C., Martin P.M., Bartoli M., and Devkar R.V. Carbon monoxide releasing molecule-A1 improves nonalcoholic steatohepatitis via Nrf2 activation mediated improvement in oxidative stress and mitochondrial function // Redox. Biol. - 2020. - V. 28. - 101314.
375. Ur R.Z., Hoekstra D., and Zuhorn I.S. Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis // ACS Nano. - 2013. - V. 7. - P. 3767-3777.
376. Urnauer S., Muller A.M., Schug C., Schmohl K.A., Tutter M., Schwenk N., Rodl W., Morys S., Ingrisch M., Bertram J., Bartenstein P., Clevert D.-A., Wagner E., Spitzweg C. EGFR-targeted nonviral NIS gene transfer for bioimaging and therapy of disseminated colon cancer metastases // Oncotarget. - 2017. - V. 8. - №. 54. - 92195.
377. Vallis K.A., Reilly R.M., Scollard D., Merante P., Brade A., Velauthapillai S., Caldwell C., Chan I., Freeman M., Lockwood G., Miller N.A., Cornelissen B., Petronis J., and Sabate K. Phase I trial to evaluate the tumor and normal tissue uptake, radiation dosimetry and safety of (111)In-DTPA-human epidermal growth factor in patients with metastatic EGFR-positive breast cancer // Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging - 2014. - V. 4. - P. 181-192.
378. Vanova J., Ciharova B., Hejtmankova A., Epperla C.P., Skvara P., Forstova J., Hubalek K.M., and Spanielova H. VirPorters: Insights into the action of cationic and histidine-rich cell-penetrating peptides // Int. J. Pharm. - 2022. - V. 611. - 121308.
379. Varga C.M., Hong K., and Lauffenburger D.A. Quantitative analysis of synthetic gene delivery vector design properties // Molecular Therapy - 2001. - V. 4. - P. 438-446.
380. Varkouhi A.K., Scholte M., Storm G., and Haisma H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals // J. Control Release - 2011. - V. 151. - P. 220-228.
381. Vazquez-Becerra H., Perez-Cardenas E., Muniz-Hernandez S., Izquierdo-Sanchez V., and Medina L.A. Characterization and in vitro evaluation of nimotuzumab conjugated with cisplatin-loaded liposomes // J. Liposome Res. - 2017. - V. 27. - P. 274-282.
382. Verma R., Mohl D., and Deshaies R.J. Harnessing the Power of Proteolysis for Targeted Protein Inactivation // Mol. Cell - 2020. - V. 77. - P. 446-460.

383. Vermeulen L.M.P., De Smedt S.C., Remaut K., and Braeckmans K. The proton sponge hypothesis: Fable or fact? // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2018. - V. 129. - P. 184-190.
384. Volta-Duran E., Parlade E., Serna N., Villaverde A., Vazquez E., and Unzueta U. Endosomal escape for cell-targeted proteins. Going out after going in // Biotechnol. Adv. - 2023. - V. 63. - 108103.
385. Wang J.K., Zhou Y.Y., Guo S.J., Wang Y.Y., Nie C.J., Wang H.L., Wang J.L., Zhao Y., Li X.Y., and Chen X.J. Cetuximab conjugated and doxorubicin loaded silica nanoparticles for tumor-targeting and tumor microenvironment responsive binary drug delivery of liver cancer therapy // Mater. Sci. Eng C. Mater. Biol. Appl. - 2017. - V. 76. - P. 944-950.
386. Wang P., Wang J., Tan H., Weng S., Cheng L., Zhou Z., and Wen S. Acid- and reduction-sensitive micelles for improving the drug delivery efficacy for pancreatic cancer therapy // Biomater. Sci. - 2018a. - V. 6. - P. 1262-1270.
387. Wang S., Dai T., Qin Z., Pan T., Chu F., Lou L., Zhang L., Yang B., Huang H., Lu H., and Zhou F. Targeting liquid-liquid phase separation of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein promotes innate antiviral immunity by elevating MAVS activity // Nat. Cell Biol. - 2021. - V. 23. - P. 718-732.
388. Wang W.J., Hsu J.M., Wang Y.N., Lee H.H., Yamaguchi H., Liao H.W., and Hung M.C. An essential role of PRMT1-mediated EGFR methylation in EGFR activation by ribonuclease 5 // Am. J. Cancer Res. - 2019. - V. 9. - P. 180-185.
389. Wang Y., Zhou J., Qiu L., Wang X., Chen L., Liu T., and Di W. Cisplatin-alginate conjugate liposomes for targeted delivery to EGFR-positive ovarian cancer cells // Biomaterials - 2014. - V. 35. - P. 4297-4309.
390. Wang Y.N., Lee H.H., Chou C.K., Yang W.H., Wei Y., Chen C.T., Yao J., Hsu J.L., Zhu C., Ying H., Ye Y., Wang W.J., Lim S.O., Xia W., Ko H.W., Liu X., Liu C.G., Wu X., Wang H., Li D., Prakash L.R., Katz M.H., Kang Y., Kim M., Fleming J.B., Fogelman D., Javle M., Maitra A., and Hung M.C. Angiogenin/Ribonuclease 5 Is an EGFR Ligand and a Serum Biomarker for Erlotinib Sensitivity in Pancreatic Cancer // Cancer Cell - 2018b. - V. 33. - P. 752-769.
391. Wang Y.N., Lee H.H., and Hung M.C. A novel ligand-receptor relationship between families of ribonucleases and receptor tyrosine kinases // J. Biomed. Sci. - 2018c. - V. 25. - 83.
392. Wang Y.P., Liu I.J., Chung M.J., and Wu H.C. Novel anti-EGFR scFv human antibody-conjugated immunoliposomes enhance chemotherapeutic efficacy in squamous cell carcinoma of head and neck // Oral Oncol. - 2020. - V. 106. - 104689.

393. Watabe H., Ikoma Y., Kimura Y., Naganawa M., and Shidahara M. PET kinetic analysis--compartmental model // Ann. Nucl. Med. - 2006. - V. 20. - P. 583-588.
394. Watanabe K., Kaneko M., and Maitani Y. Functional coating of liposomes using a folate-polymer conjugate to target folate receptors // Int. J. Nanomedicine - 2012. - V. 7. - P. 3679-3688.
395. Waterman H., Levkowitz G., Alroy I., and Yarden Y. The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor // J. Biol. Chem. - 1999. - V. 274. - P. 22151-22154.
396. Wegner K.D. and Hildebrandt N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors // Chemical Society Reviews - 2015. - V. 44. - P. 4792-4834.
397. Wells J.A. and McClendon C.L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces // Nature - 2007. - V. 450. - P. 1001-1009.
398. Won Y.Y., Sharma R., and Konieczny S.F. Missing pieces in understanding the intracellular trafficking of polycation/DNA complexes // J. Control Release - 2009. - V. 139. - P. 88-93.
399. Wrona M., Patel K., and Wardman P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals // Free Radic. Biol. Med. - 2005. - V. 38. - P. 262-270.
400. Wu W., Cheng Y., Zhou H., Sun C., and Zhang S. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics // Virol. J. - 2023. - V. 20. - 6.
401. Xiang Z., Soto C.S., and Honig B. Evaluating conformational free energies: the colony energy and its application to the problem of loop prediction // Proceedings of the National Academy of Sciences - 2002. - V. 99. - P. 7432-7437.
402. Xiao B., Ma P., Viennois E., and Merlin D. Urocanic acid-modified chitosan nanoparticles can confer anti-inflammatory effect by delivering CD98 siRNA to macrophages // Colloids Surf. B Biointerfaces. - 2016. - V. 143. - P. 186-193.
403. Xu L. and Anchordoquy T. Drug delivery trends in clinical trials and translational medicine: challenges and opportunities in the delivery of nucleic acid-based therapeutics // J. Pharm. Sci. - 2011. - V. 100. - P. 38-52.
404. Yang J.J., Zhou C., Huang Y., Feng J., Lu S., Song Y., Huang C., Wu G., Zhang L., Cheng Y., Hu C., Chen G., Zhang L., Liu X., Yan H.H., Tan F.L., Zhong W., and Wu Y.L. Icotinib versus whole-brain irradiation in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung

cancer and multiple brain metastases (BRAIN): a multicentre, phase 3, open-label, parallel, randomised controlled trial // Lancet Respir. Med. - 2017a. - V. 5. - P. 707-716.

405. Yang Y., Hong Y., Nam G.H., Chung J.H., Koh E., and Kim I.S. Virus-Mimetic Fusogenic Exosomes for Direct Delivery of Integral Membrane Proteins to Target Cell Membranes // Adv. Mater. - 2017b. - V. 29. - №. 13.
406. Yang Y., Tian Z., Ding Y., Li X., Zhang Z., Yang L., Zhao F., Ren F., and Guo R. EGFR-Targeted Immunotoxin Exerts Antitumor Effects on Esophageal Cancers by Increasing ROS Accumulation and Inducing Apoptosis via Inhibition of the Nrf2-Keap1 Pathway // J. Immunol Res. - 2018. - V. 2018. - 1090287.
407. Yarden Y. and Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology // Nat. Rev. Cancer - 2012. - V. 12. - P. 553-563.
408. Ye S.F., Tian M.M., Wang T.X., Ren L., Wang D., Shen L.H., and Shang T. Synergistic effects of cell-penetrating peptide Tat and fusogenic peptide HA2-enhanced cellular internalization and gene transduction of organosilica nanoparticles // Nanomedicine - 2012. - V. 8. - P. 833-841.
409. Yu X., Xue L., Zhao J., Zhao S., Wu D., and Liu H.Y. Non-Cationic RGD-Containing Protein Nanocarrier for Tumor-Targeted siRNA Delivery // Pharmaceutics - 2021. - V. 13. - №. 12. - 2182.
410. Zalba S., Contreras A.M., Merino M., Navarro I., de Ilarduya C.T., Troconiz I.F., Koning G., and Garrido M.J. EGF-liposomes promote efficient EGFR targeting in xenograft colocarcinoma model // Nanomedicine (Lond) - 2016. - V. 11. - P. 465-477.
411. Zeng J., Li H.C., Tanaka T., and Rabbitts T.H. Selection of human single domain antibodies recognizing the CMYC protein using enhanced intracellular antibody capture // Journal of Immunological Methods - 2015. - V. 426. - P. 140-143.
412. Zhang K. Gctf: Real-time CTF determination and correction // Journal of structural biology - 2016. - V. 193. - P. 1-12.
413. Zhang L., Tong H., Garewal M., and Ren G. Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects - 2013. - V. 1830. - P. 2150-2159.
414. Zhang X., Lin Y., and Gillies R.J. Tumor pH and its measurement // J. Nucl. Med. - 2010. - V. 51. - P. 1167-1170.
415. Zhang X., Wu K., Wang D., Yue X., Song D., Zhu Y., and Wu J. Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates interleukin-6 expression through cellular transcription factor NF-kappaB // Virology - 2007. - V. 365. - P. 324-335.

416. Zhang Z.Y. and Smith B.D. High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model // Bioconjug. Chem. - 2000. - V. 11. - P. 805-814.
417. Zhang P., Sun F., Liu S., Jiang S. Anti-PEG antibodies in the clinic: current issues and beyond PEGylation // J. Control. Release. - 2016. - V. 244. - P. 184-193.
418. Zhao L., Zhao J., Zhong K., Tong A., and Jia D. Targeted protein degradation: mechanisms, strategies and application // Signal Transduct. Target Ther. - 2022. - V. 7. - 113.
419. Zhao T.M., Wang Y., Deng Y., Fan X.F., Cao X.C., Hou L.J., Mao L.H., Lin L., Zhao W., Wang B.M., Jiang K., Zhao J.W., and Sun C. Bicyclol Attenuates Acute Liver Injury by Activating Autophagy, Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Capabilities in Mice // Front Pharmacol. - 2020. - V. 11. - 463.
420. Zheng Y. and Gao C. Phase Separation: The Robust Modulator of Innate Antiviral Signaling and SARS-CoV-2 Infection // Pathogens - 2023. - V. 12. - №. 2. - 243.
421. Zheng Y., Li X., Qian X., Wang Y., Lee J.H., Xia Y., Hawke D.H., Zhang G., Lyu J., and Lu Z. Secreted and O-GlcNAcylated MIF binds to the human EGF receptor and inhibits its activation // Nat. Cell Biol. - 2015. - V. 17. - P. 1348-1355.
422. Zhu J.X., Goldoni S., Bix G., Owens R.T., McQuillan D.J., Reed C.C., and Iozzo R.V. Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis // J. Biol. Chem. - 2005. - V. 280. - P. 32468-32479.

Благодарности

Прежде всего, хочу поблагодарить за все и воздать славу Богу. Только Он давал мне силы и вдохновение в этой работе. Хотел также особенно поблагодарить моего научного консультанта и руководителя Александра Сергеевича Соболева за доброе отношение, плодотворное общение и мудрое руководство. Его идеи, энергия и целеустремленность всегда вдохновляли меня к активной работе. Кроме того, хотел поблагодарить всех настоящих и бывших коллег моей лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта ИБГ РАН за создание хорошей дружественной атмосферы и совместную плодотворную работу: А.В. Уласова, А.А. Розенкранца, Т.Н. Лупанову, Т.А. Сластникову, М.О. Дурыманова, Т.С. Карягину, Р.Т. Алиеву, Е.С. Бунина, А.Д. Цветкову (Власову), Г.А. Трусова, Т.Р. Камалетдинову и П.В. Гулака. Данная работа выполнена совместно с коллегами из лабораторий других институтов, среди которых я особенно хотел поблагодарить И.А. Леневу, Н.П. Карташову, А.В. Власова, Ю.Л. Рыжикова, А.И. Куклина, А.С. Орехова, И.Б. Эйдлина, Т.И. Рокитскую и Ю.Н. Антоненко. Я благодарен также руководству ИБГ РАН и биологического факультета МГУ за предоставленные возможности для выполнения данной работы, а также фондам РНФ, РФФИ и CRDF, которые оказывали финансовую поддержку разных этапов этой работы.

Особенно хотел поблагодарить свою супругу Елену Владиславовну и своих родителей Любовь Павловну и Виктора Николаевича за любовь и активную поддержку во всем.