

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

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Государственный научный центр Российской Федерации

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Согомонян Анна Самвеловна

Адресная доставка полимерных наночастиц к

HER2-положительным клеткам

Специальность: 1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук

Шипунова Виктория Олеговна

Москва, 2026

Введение	5
1. Обзор литературы	12
1.1 Адресная доставка соединений.....	15
1.1.1. Пассивная и активная доставка веществ	15
1.1.2. Пассивная доставка веществ.....	17
1.1.3. Активная доставка веществ.....	19
1.2 Нацеливающие агенты для адресной доставки наноагентов к клеткам-мишеням.....	19
1.2.1. Адресные метки на основе иммуноглобулинов	20
1.2.2. Неиммуноглобулиновые белковые скаффолды.....	22
1.2.3. Малые молекулы	25
1.3 Методы оснащения поверхности наноагентов распознающими молекулами.....	27
1.3.1. Ковалентная конъюгация.....	27
1.3.2. Нековалентные подходы связывания наночастиц с адресными метками 30	
1.3.3. Биоспецифические взаимодействия и самосборка.....	31
1.4 Рецептор HER2 как молекулярная мишень раковых клеток для адресной доставки терапевтических агентов	35
1.5 Биосовместимые полимерные наноструктуры как средства адресной доставки	39
1.5.1. Понятие биоразлагаемых полимерных наноносителей.....	39
1.5.2. Натуральные биоразлагаемые полимеры.....	39
1.5.3. Синтетические биоразлагаемые полимеры.....	41
1.6 Типы полимерных наночастиц.....	45
1.7 Методы анализа воздействия наночастиц на опухолевые клетки <i>in vitro</i> .	51
1.8 Методы синтеза полимерных наночастиц	55
1.9 Методы характеристики полимерных наночастиц	59
1.10 Применение полимерных наночастиц в онкотерапии.....	64
1.11 <i>In vivo</i> исследования и примеры клинического применения	66
1.12 Заключение.....	74
2. Материалы и методы.....	76
2.1 Материалы.....	76
2.2 Белковые молекулы.....	77
2.3 Клеточные линии эукариот	78
2.4 Лабораторные животные	78

2.5	Программное обеспечение	78
2.6	Методы	78
2.6.1.	Синтез анти-HER2 PLGA наночастиц	78
2.6.2.	Модификация наночастиц PLGA с аффибоди $Z_{HER2:342}$	79
2.6.3.	Синтез PLGA наночастиц с полноразмерным антителом трастузумаб.....	79
2.6.4.	Синтез наночастиц PLGA/Pht-Mg.....	80
2.6.5.	Сканирующая электронная микроскопия.....	80
2.6.6.	Трансмиссионная электронная микроскопия.....	80
2.6.7.	Динамическое и электрофоретическое измерение светорассеяния.....	80
2.6.8.	Ведение клеточных линий эукариот	81
2.6.9.	Флуоресцентная и конфокальная микроскопия.....	81
2.6.10.	Проточная цитометрия наночастиц.....	83
2.6.11.	Флуоресцентная спектроскопия наночастиц	83
2.6.12.	Исследование генерации активных форм кислорода	84
2.6.13.	Оценка жизнеспособности клеточных линий при воздействии PLGA частиц.....	84
2.6.14.	Клоногенный тест	85
2.6.15.	Анализ выживаемости клеток в реальном времени	86
2.6.16.	Тест на апоптоз.....	86
2.6.17.	Получение и анализ опухолей у мышей BALB/c Nu/Nu.....	87
2.6.18.	Биовизуализация <i>in vivo</i>	88
2.6.19.	Терапия анти-HER2 PLGA наночастицами.....	88
2.6.20.	Статистический анализ	88
3.	Результаты и обсуждение	89
3.1	Получение наночастиц анти-HER2 PLGA для фотодинамической терапии 89	
3.2	Получение наночастиц анти-HER2 PLGA для тераностики опухолей.....	94
3.3	Синтез и характеристика наночастиц анти-HER2 PLGA.....	96
3.4	Специфическое взаимодействие анти-HER2 PLGA с HER2- положительными клетками.....	100
3.5	Визуализация частиц наночастиц анти-HER2 PLGA <i>in vitro</i>	102
3.6	Продукция АФК адресными анти-HER2 PLGA наночастицами	105
3.7	Изучение механизма гибели HER2-положительных клеток, меченных анти-HER2 PLGA	110
3.8	Флуоресцентная биовизуализация опухолей с наночастицами анти-HER2 PLGA <i>in vivo</i>	113
3.9	Фотодинамическая терапия HER2-положительных опухолей <i>in vivo</i>	115
3.10	3D-модель клеточных сфероидов для тестирования анти-HER2 противоопухолевых соединений <i>in vitro</i>	118

3.11 3D-модель клеточных сфероидов для тестирования цитотоксического воздействия наночастиц PLGA/Pht-Mg <i>in vitro</i>	123
4. Выводы	126
5. Заключение	128
6. Благодарности.....	130
7. Список сокращений	131
8. Список литературы	136

Введение

В последние годы наблюдается значительный прогресс в области медицины и фармацевтики, в частности в разработке наночастиц как средств доставки терапевтических веществ к тканям и органам. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является использование полимерных наночастиц.

Полимерные наночастицы представляют собой наноразмерные структуры, которые могут быть разработаны с учетом специфических требований к размеру, форме и функциональности, что открывает новые возможности для терапии различных заболеваний. Важным аспектом использования полимерных наночастиц является возможность контролируемого высвобождения терапевтических веществ, что способствует поддержанию необходимых концентраций в организме в течение длительного времени. Это особенно актуально при лечении онкологических заболеваний, где требуется длительное поддержание терапевтического эффекта.

Кроме того, полимерные наночастицы способны защищать нестабильные молекулы (например, белки или нуклеиновые кислоты) от деградации в организме. Также в полимерные наночастицы может быть загружено несколько активных веществ одновременно, что позволяет комбинировать различные терапевтические подходы в одной системе доставки. Более того, возможность контролировать размер, форму и заряд полимерных наночастиц создает дополнительные условия для оптимизации взаимодействия наноагентов с биологическими системами.

Еще одним важным свойством полимерных наночастиц является возможность модификации их поверхности различными метками для адресной доставки веществ к клеткам-мишеням, например к опухолевым клеткам с гиперэкспрессией клинически релевантного онкомаркера HER2.

Данное исследование направлено на разработку полимерных агентов, а также их всестороннюю характеристику, для задач адресной доставки терапевтических и диагностических средств к HER2-положительным опухолям.

Актуальность исследования

Адресная доставка полимерных частиц к опухолевым клеткам представляет собой одну из наиболее перспективных стратегий в усилении диагностических и терапевтических свойств веществ в лечении онкологических заболеваний. Традиционные методы доставки активных веществ обычно демонстрируют минимальную терапевтическую эффективность из-за ряда факторов, таких как, например, быстрое выведение из кровотока, недостаточная растворимость, необходимость частого введения препаратов, а также неспецифическое распределение в организме, которое может приводить к побочным эффектам.

Для решения этих проблем в лечении онкологических заболеваний были проведены исследования по использованию полимерных наночастиц в качестве потенциального средства доставки терапевтических веществ к целевым клеткам. Эти исследования демонстрируют, что использование полимерных частиц позволяет улучшить фармакокинетику и биодоступность веществ для опухолевых тканей. На сегодняшний день в клинической практике для доставки терапевтических веществ применяются полимерные наноносители, механизм действия которых основан на эффекте повышенной проницаемости и удержания (от англ., *EPR-effect*) в опухолевой ткани. Однако, данный способ доставки веществ ограничен гетерогенностью опухолей и их микроокружением, барьерными свойствами опухолевой ткани, развитием резистентности раковых клеток к веществам, недостаточной селективностью соединений и другими факторами.

Для повышения терапевтической эффективности и уменьшения побочных эффектов исследуется такая стратегия, как адресная доставка полимерных наночастиц, специфичная только к опухолевым клеткам. Эта доставка реализуется за счет использования специфических лигандов на поверхности наночастиц, которые направлены на распознавание и связывание с молекулой-мишенью на раковых клетках.

Актуальность исследования полимерных наночастиц для адресной доставки веществ обусловлена их потенциалом в решении существующих проблем в области медицины.

Цель и задачи

Целью данной работы являлось создание и исследование адресных полимерных наночастиц, селективно воздействующих на HER2-положительные раковые клетки, в качестве агентов для онкотераностики. Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) разработать методы получения коллоидно-стабильных биodeградируемых полимерных наночастиц размером до 200 нм, нагруженных диагностическими и терапевтическими агентами;
- 2) модифицировать поверхность наночастиц адресными молекулами для селективного связывания с HER2-гиперэкспрессирующими клетками;
- 3) всесторонне исследовать полученные наночастицы различными физико-химическими методами и определить наиболее эффективные из них для адресной доставки *in vitro* и *in vivo*;
- 4) исследовать цитотоксические и визуализирующие свойства полученных наночастиц в двумерных (2D) и трехмерных (3D) клеточных культурах *in vitro*;
- 5) разработать трехмерную клеточную модель и оценить её применимость в качестве тест-системы для сравнительного анализа эффективности адресных агентов на 2D- и 3D-моделях.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Впервые реализованы стратегии адресной доставки диагностических и терапевтических соединений *in vitro* и *in vivo* с использованием HER2-специфичных наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот для ИК-контролируемой адресной фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей. Впервые показана возможность использования трёхмерных клеточных сфероидов для более информативной оценки цитотоксического действия иммунотоксинов и биоразлагаемых полимерных наночастиц по сравнению с двумерными клеточными культурами.

Полученные результаты дополняют сведения о возможностях применения биоразлагаемых полимерных наночастиц для адресной доставки диагностических и терапевтических соединений к HER2-положительным опухолевым клеткам, а также о применении трёхмерных клеточных моделей для оценки действия противоопухолевых агентов. Разработанные биоразлагаемые полимерные наночастицы и трёхмерные клеточные модели могут быть использованы в дальнейших исследованиях систем адресной доставки и при доклинической оценке эффективности противоопухолевых соединений.

Методология и методы исследования

Исследование включало получение и физико-химическую характеристику адресных биоразлагаемых наночастиц, изучение их взаимодействия с HER2-положительными клетками и оценку диагностических и терапевтических свойств. Для решения поставленных задач использовали методы динамического и электрофоретического светорассеяния, электронной, флуоресцентной и конфокальной микроскопии, проточной цитометрии, оценки генерации активных форм кислорода, клеточной жизнеспособности и апоптоза, а также методы биовизуализации и исследования противоопухолевого действия *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Разработаны биоразлагаемые полимерные наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) с контролируемыми физико-химическими характеристиками, обеспечивающими адресную доставку диагностических и терапевтических агентов к HER2-положительным клеткам *in vitro* и *in vivo*.
- 2) Установлено, что модификация поверхности полимерных наночастиц HER2-специфичными адресными молекулами обеспечивает их селективное связывание и накопление в HER2-положительных опухолевых клетках, эффективную внутриклеточную доставку инкапсулированных соединений и выраженное цитотоксическое действие в отношении клеток-мишеней.

3) Показано, что анти-HER2 PLGA наночастицы способны длительно удерживаться в опухолевой ткани и метастатических очагах *in vivo*, обеспечивая эффективную визуализацию новообразований и выраженную противоопухолевую активность, вплоть до полной регрессии HER2-положительных опухолей в экспериментальных моделях.

4) Разработана и валидирована воспроизводимая трёхмерная модель клеточных сфероидов, более адекватно воспроизводящая свойства солидных опухолей по сравнению с двумерными клеточными культурами и позволяющая выявлять различия в эффективности и цитотоксичности противоопухолевых соединений, не детектируемые на традиционных 2D-моделях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах

1) Sogomonyan A.S., Deyev S.M., Shipunova V.O. Internalization-Responsive Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles for Image-Guided Photodynamic Therapy against HER2-Positive Breast Cancer //ACS Appl. Nano Mater. 2023. Vol. 6. № 13. Pp. 11402–11415. doi:10.1021/acsanm.3c01446.

2) Shipunova V.O.*, Sogomonyan A.S.*, Zelepukin I.V., Nikitin M.P., Deyev S.M. PLGA Nanoparticles Decorated with Anti-HER2 Affibody for Targeted Delivery and Photoinduced Cell Death // Molecules. 2021. Vol. 26. № 13. P. 3955. doi:10.3390/molecules26133955. (* – равный вклад)

3) Shipunova V.O., Kovalenko V.L., Kotelnikova P.A., Sogomonyan A.S., Shilova O.N., Komedchikova E.N., Zvyagin A.V., Nikitin M.P., Deyev S. M. Targeting Cancer Cell Tight Junctions Enhances PLGA-Based Photothermal Sensitizers' Performance In Vitro and In Vivo // Pharmaceutics. 2022. Vol. 14. № 1. P. 43. doi: 10.3390/pharmaceutics14010043.

4) A.S. Sogomonyan, V.O. Shipunova, V.D. Soloviev, V.I. Larionov, P.A. Kotelnikova, S.M. Deyev. 3D Models of Cellular Spheroids As a Universal Tool

for Studying the Cytotoxic Properties of Anticancer Compounds *In Vitro* // *Acta Naturae*. 2022. Vol. 14, №. 1. Pp. 92–100. doi: 10.32607/actanaturae.11603.

Личный вклад соискателя

Соискателем выполнена экспериментальная часть исследования, проведены обработка и анализ полученных данных. Постановка научных задач, разработка концепции исследования, обсуждение результатов и определение направлений работы проводились совместно с научным руководителем, оказавшим существенную научно-методическую помощь на всех этапах выполнения диссертационного исследования.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных экспериментальных методов, двумерных и трёхмерных клеточных и животных моделей, а также воспроизводимостью экспериментальных данных.

Материалы диссертации были представлены в виде устных и стендовых докладов на следующих конференциях: XXXII, XXXIII, XXXIV, XXXV Зимние молодёжные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», г. Москва, 2020, 2021, 2022, 2023 гг.; VII, VIII Молодёжные Школы-конференции, г. Санкт-Петербург, 2020, 2022 гг.; XXXIII Всероссийская научная конференция, г. Долгопрудный, 2020 г.; XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», г. Москва, 2021 г. Материалы диссертации были опубликованы в 4 рецензируемых журналах.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, а также списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 268

наименований. Работа изложена на 148 страницах, содержит 28 рисунков и 3 таблицы.

1. Обзор литературы

Современная онкология демонстрирует стремительный прогресс в разработке терапевтических подходов, однако эффективность существующего лечения по-прежнему ограничивается рядом фундаментальных факторов. Например, существует проблема гетерогенности опухолей, которая обусловлена наличием совокупности разнообразных клеток, обладающих различными молекулярными характеристиками и разной чувствительностью к лечению химиотерапевтическими препаратами. Такое неравномерное распределение генетически разнородных субпопуляций служит движущей силой для формирования резистентности новообразования к терапевтическим воздействиям. Формирование резистентности, диагностика онкологических процессов на поздних стадиях, а также побочные эффекты при использовании стандартных методов лечения приводят к снижению эффективности терапии опухолевых заболеваний [1].

На сегодняшний день клинически одобренные химиотерапевтические препараты приводят к формированию различных механизмов лекарственной устойчивости, которые снижают эффективность лечения заболеваний. Например, одной из основных причин развития резистентности к химиотерапии является повышенный отток противораковых препаратов из опухолевой ткани, который приводит к снижению внутриклеточной концентрации активных веществ в раковых клетках. Так, в частности, было показано, что белок резистентности рака молочной железы играет роль в оттоке препаратов, тем самым вызывая резистентность опухолевых клеток [2]. Также причиной резистентности может быть повторное воздействие химиопрепаратов, направленных на определенные молекулы-мишени в раковых клетках. Противораковые препараты, направленные на ингибирование сигнальных киназ, приводят к различным мутациям целевого рецептора. Так, при воздействии на тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста EGFR (ErbB-1) препаратов первого поколения gefitinib и erlotinib в опухоли возникает мутация T790M (замена треонина на метионин в позиции 790 экзона 20), которая вызывает резистентность примерно у 50–60 %

пациентов [3,4]. Химиотерапевтические препараты, направленные на повреждение ДНК, также могут приводить к устойчивости опухолевых клеток. Например, после воздействия цисплатина на ДНК раковой клетки, включаются различные механизмы репарации, например, эксцизионная репарация нуклеотидов, репарация неспаренных оснований и другие. Такое восстановление структуры нуклеиновой кислоты приводит к снижению эффективности противоопухолевого препарата [5,6].

Лучевая терапия является еще одним подходом, который широко используется для лечения различных онкологических заболеваний. На сегодняшний день в более чем половине случаев онкологических заболеваний лучевая терапия показана пациентам со злокачественными новообразованиями [7]. Механизм данного метода основан на разрушении ДНК раковых клеток с помощью ионизирующего излучения, которое приводит к снижению скорости роста и метастазирования опухолевых клеток [8,9]. Лучевая терапия является эффективным методом лечения онкозаболеваний, однако часто приводит к неблагоприятным последствиям для здоровья пациентов. Основным побочным эффектом данного метода является воздействие излучения на нетрансформированные клетки и ткани, которое приводит к различным заболеваниям – болезни сердца, легких, глазные болезни, а также повреждения нервной системы. Также есть вероятность появления вторичных опухолей после прохождения терапии [10]. Было показано, что у 13.0 % женщин после лучевой терапии молочных желез, развилась вторичная злокачественная опухоль, из которых 3.4 % были вызваны применением лучевой терапии [11].

Эти ограничения способствуют созданию новых стратегий в лечении онкологических заболеваний. Так, концепция «магической пули», предложенная немецким ученым Паулем Эрлихом в начале XX века, стала основой для разработки современных методов адресной терапии онкологических заболеваний. Данная концепция представляет собой идею о разработке специфического лекарства, способного избирательно уничтожать опухолевые клетки, минимально затрагивая нормальные ткани организма [12]. Эта фундаментальная идея

вдохновила исследователей на поиск подходов для направленного воздействия и на другие патологии. На практике данная концепция была частично реализована с использованием технологии получения гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела, которые специфически взаимодействуют с определёнными молекулами-мишенями на поверхности раковых клеток [13].

Быстроразвивающееся направление в науке и медицине, нанотехнология, открывает новые возможности для достижения цели создания «волшебной пули», которую можно оптимизировать для доставки цитотоксических химиотерапевтических веществ в качестве эффективных средств воздействия на опухоль. Применение нанотехнологий в медицине основано на использовании наноразмерных частиц, синтезированных из органических и/или неорганических материалов. На сегодняшний день в клинической практике среди систем доставки лекарств применяются различные типы наночастиц, например, липосомы, липидные наночастицы, металлические наночастицы, а также наночастицы на основе полимерных материалов и ряд других наноагентов.

Современные исследования демонстрируют, что использование полимерных частиц в качестве систем доставки позволяет не только улучшить фармакокинетику и биодоступность терапевтических веществ в организме, но и повысить их селективность к опухолевым тканям. Адресная доставка полимерных наночастиц реализуется за счет использования специфических молекул на поверхности наночастицы, например, таких как антитела, фрагменты антител или их миметики – дарпины, аффибоды и другие, которые обеспечивают распознавание и связывание с опухолевыми клетками.

Адресная доставка биodeградируемых полимерных частиц к опухолевым клеткам представляет собой одну из наиболее перспективных стратегий в области онкологии. Однако, чтобы инкапсулированное в наночастицу вещество достигло целевого органа, полимерная наночастица должна обладать рядом физико-химических свойств, чтобы преодолеть различные барьеры в организме, например, короткое время циркуляции частиц в кровотоке, микроокружение опухоли, а также поглощение клетками [14]. Так, было показано, что при циркуляции наночастиц в

кровотоке формируется белковая корона на поверхности полимера. Этот эффект способствует быстрому распознаванию и захвату наночастиц клетками системы мононуклеарных фагоцитов (МФС) и быстрой элиминации из организма [15]. Широко распространенным способом избежать узнавания МФС является модификация поверхности полимерных наночастиц гидрофильным слоем, таким как полиэтиленгликоль (ПЭГ) [16,17]. Однако ПЭГилирование частиц имеет серьезный недостаток – иммуногенность, поэтому ведется поиск альтернативных материалов для снижения распознавания наночастиц, например, N-(2-гидроксипропил)метакриламид [18,19]. Другим материалом, которым можно продлить время циркуляции частиц в кровотоке, является альбумин. Например, Hyesun Hyun et al. в своем исследовании показали, что покрытые альбумином PLGA наночастицы эффективнее проникали в раковые клетки и меньше взаимодействовали с фагоцитами, чем частицы без покрытия альбумином [20].

Хотя лечение онкологических заболеваний по-прежнему сталкивается с множеством серьёзных ограничений, использование адресной доставки терапевтических веществ, загруженных в полимерные наночастицы, представляет собой многообещающий подход, который может значительно улучшить результаты терапии. Для широкого применения данного направления в доставке веществ необходимо провести дополнительные исследования, чтобы оценить безопасность и эффективность этих технологий в клинической практике.

1.1 Адресная доставка соединений

1.1.1. Пассивная и активная доставка веществ

Эффективность любой лекарственной формы зависит от различных факторов, в том числе и от способности активных веществ преодолевать различные барьеры в организме, которые возникают с момента введения препарата и до места действия. Эти барьеры представляют собой биологические структуры, включающие эпителий, эндотелий и клеточные мембраны, а также механические, физико-химические и ферментативные компоненты. Помимо биологических

барьеров, состав многих активных соединений не позволяет беспрепятственно проникать внутрь клетки, так как имеет ряд ограничений, например, размер молекулы, ее растворимость, заряд [21]. Более того, ряд веществ, например, химиотерапевтические агенты, являются токсичными для нормальных тканей и органов. Таким образом, появился запрос на разработку систем доставки терапевтических веществ, которые будут снижать их системную токсичность в нормальных тканях и органах, сохраняя их эффективность в органах-мишенях [22].

Так, были разработаны две стратегии доставки веществ на основе наночастиц – пассивная и активная доставка в опухолевые ткани и органы. Пассивная доставка включает в себя увеличение времени циркуляции наночастиц и использование EPR-эффекта, в то время как активная доставка основана на модификации поверхности наночастиц различными лигандами, которые нацелены на клетки, гиперэкспрессирующие определенные рецепторы на своей мембране, тем самым повышая специфичность терапевтических веществ в области органов-мишеней (рисунок 1). Эти наноносители способствуют сохранению и улучшению эффективности терапевтических веществ: инкапсулируя как гидрофильные, так и гидрофобные молекулы, контролируя их высвобождение и распределение, улучшая абсорбцию через слизистые оболочки или клетки и защищая лекарства от разрушения, а также снижая токсические эффекты препаратов на нормальные ткани и органы [23].

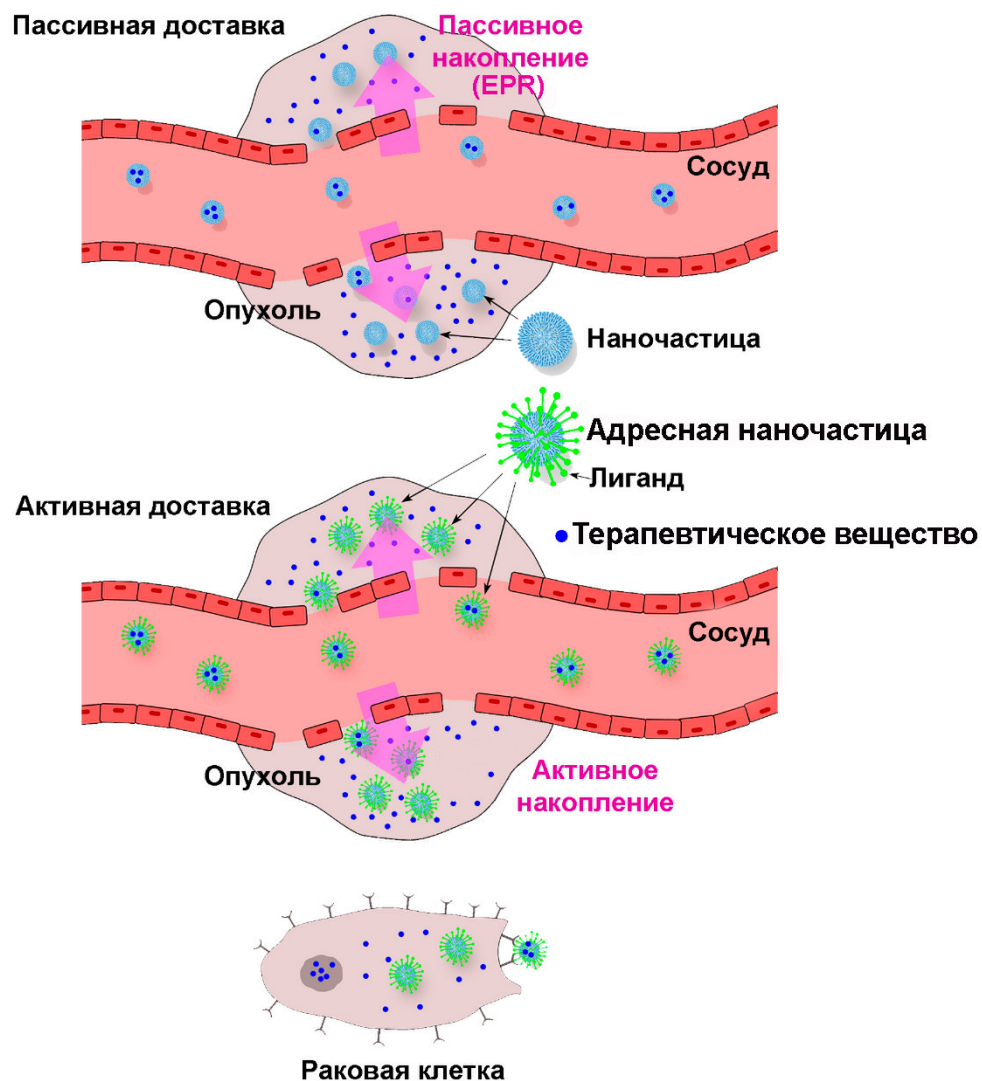


Рисунок 1. Схематическое изображение пассивной и активной доставки наночастиц к опухолевым клеткам. Пассивная доставка активных веществ осуществляется за счёт EPR-эффекта. Наночастицы с инкапсулированными терапевтическими веществами циркулируют в кровотоке, выходят за пределы сосудов и накапливаются в опухолевой ткани через проницаемую сосудистую сеть опухоли. Адресные наночастицы связываются с рецепторами на поверхности опухолевой клетки, обеспечивая адресную доставку веществ к клеткам опухоли. Адаптировано из [22].

1.1.2. Пассивная доставка веществ

Пассивная адресная доставка наночастиц реализуется за счет EPR-эффекта. Этот эффект, впервые описанный Мацумурой и Маэдой, обусловлен накоплением наночастиц в опухолевых тканях с усиленным ангиогенезом и аномальным увеличением пор капилляров [24]. Повышенная скорость роста сосудов возникает

тогда, когда опухоль достигает определенного размера (примерно 2 мм³ или более), при котором поступление питательных веществ и кислорода нарушается, приводя раковые клетки в состояние гипоксии. Гипоксия индуцирует активацию факторов роста: сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α), а это в свою очередь приводит к образованию новых кровеносных сосудов. В опухолях образуются извилистые кровеносные сосуды неправильной формы. Эти кровеносные сосуды беспорядочно разветвлены, имеют нерегулярное капиллярное русло и с расширенными, крупными капиллярными порами от 200 до 2000 нм [25]. Также в опухолевых тканях нарушена лимфатическая система, что приводит к неэффективному дренированию жидкости в интерстиции опухоли [26]. Наличие EPR-эффекта у сосудов опухолевой ткани способствовало большому числу разработок наноносителей для доставки различных терапевтических агентов [27–30]. Стоит отметить, что EPR-эффект сосудов опухолевой ткани в основном наиболее выражен для веществ с молекулярной массой 40 – 800 кДа и размером частиц от 10 до 500 нм. Низкомолекулярные препараты с меньшей молекулярной массой (<40 кДа) быстро выводятся из кровотока и поэтому не могут накапливаться в больших концентрациях в опухолевой ткани [31].

Наночастицы, используемые при пассивной доставке веществ в опухоли, должны обладать определенными физико-химическими характеристиками, наиболее важными из которых являются размер, форма и поверхностный заряд. Эти ключевые параметры способствуют накоплению наночастиц в опухолевой ткани. На сегодняшний день концепция пассивной доставки за счет EPR-эффекта успешно реализуется в онкологии на примере таких клинически одобренных нанопрепаратов, как Doxil и Abraxane [32].

Однако метод пассивной доставки имеет ряд ограничений, зависящих от пор в кровеносных сосудах, которые в свою очередь влияют на накопление наночастиц в опухоли. Более того, диффузия в интерстиции опухоли может быть затруднена высоким давлением интерстициальной жидкости, что также может влиять на распределение частиц в опухолевой ткани. Для обеспечения более эффективной

доставки препаратов в органы-мишени, были разработаны системы активной адресной доставки инкапсулированных веществ [33].

1.1.3. Активная доставка веществ

Помимо патологического ангиогенеза и многочисленных пор в микроокружении опухоли, опухолевые клетки часто имеют избыточную экспрессию определенных рецепторов, на которые можно воздействовать наночастицами, несущими на своей поверхности определенные адресные молекулы. Такая доставка наночастиц является активной адресной и имеет ряд преимуществ в сравнении с пассивной. Например, активная доставка частиц повышает эффективность химиотерапевтических агентов в области органов-мишеней, посредством специфического воздействия с рецепторами на раковых клетках. Такое локальное накопление адресных частиц способствует снижению побочных эффектов веществ в организме [34].

Чаще всего для адресной доставки терапевтических веществ в полимерных наночастицах применяют моноклональные антитела, находящиеся в клинической практике, из-за их высокой специфичности и сродства к мишени, например, такие антитела как трастузумаб и ритуксимаб [33–35]. Помимо антител, для модификации поверхности полимерных наночастиц применяются и другие адресные молекулы – фрагменты антител, аффибоди, аптамеры, дарпины, малые молекулы и другие [36–39].

1.2 Нацеливающие агенты для адресной доставки наноагентов к клеткам-мишеням

Адресная доставка наночастиц подразумевает разработку различных стратегий для целенаправленного переноса терапевтических веществ к определенным клеткам или тканям. Так, с помощью модификации поверхности наночастиц различными адресными молекулами, например, антителами, пептидами, сахарами, малыми молекулами (например, витамины) и другими, реализуется адресная доставка веществ в частицах, при которой белковые

молекулы специфически связываются с рецепторами на поверхности клеток-мишеней (рисунок 2) [40].

Далее будут рассмотрены некоторые молекулы, используемые в качестве адресных меток на поверхности полимерных частиц.

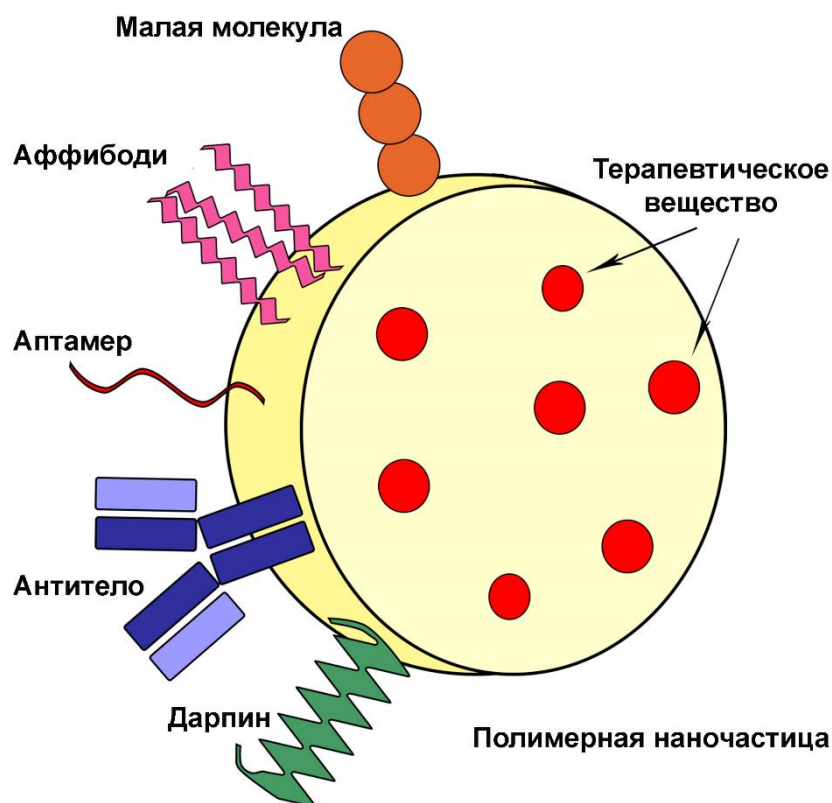


Рисунок 2. Изображения различных типов адресных молекул для модификации поверхности полимерных наночастиц.

1.2.1. Адресные метки на основе иммуноглобулинов

Антитела и фрагменты антител. Моноклональные антитела – это иммуноглобулины, вырабатываемые иммунной системой организма, которые бывают пяти классов (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM). Наиболее значимым для терапии является IgG, который имеет четыре подкласса (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Антитела IgG представляют собой молекулы с молекулярной массой около 150 кДа, обладающие высоким сродством к антигенам с константой диссоциации (K_D) в пределах наномолярного диапазона концентраций ($10^{-9} - 10^{-8}M$) [41].

Терапевтические моноклональные антитела являются крупнейшим классом рекомбинантных белков, используемых для лечения различных заболеваний, в том числе онкологических. Основная функция терапевтических антител – это блокирование целевых рецепторов, которые снижают общую активность определенного молекулярного пути [41]. Помимо роли блокирования рецепторов, моноклональные антитела стали применять в качестве адресных молекул для эффективной доставки полимерных наночастиц с различными терапевтическими веществами к органам-мишеням. Например, для доставки паклитаксела к клеткам рака молочной железы были разработаны адресные наночастицы PLGA, модифицированные моноклональным антителом трастузумаб. Результаты тестов *in vitro* по цитотоксичности на клетках SK-BR-3 дополнительно подтвердили адресное действие трастузумаба на наночастицах – терапевтический эффект паклитаксела, загруженного в адресные наночастицы, был в 13 раз выше, чем у паклитаксела в неадресных наночастицах [42]. Синтезированные адресные наночастицы PLGA, модифицированные анти-EGFR антителом и нагруженные рапамицином, были более эффективными в ингибировании пролиферации опухолевых клеток из-за их более высокого поглощения препарата – в 13 раз больше поглощения в клетках, чем с неконъюгированными наночастицами и в 50 раз больше, чем свободный рапамицин [43]. Также адресные наночастицы PLGA, нагруженные тамоксифеном и конъюгированные с трастузумабом, эффективнее проникали в клетки и усиливали цитотоксический эффект препарата по сравнению с неадресными наночастицами [44].

Тем не менее использование антител в качестве лигандов для доставки веществ имеет ряд ограничений. В частности, крупный размер молекул на поверхности наночастиц может ограничивать их связывание с рецепторами; кроме того, антитела характеризуются чувствительностью к температуре, сложностями в получении и высокой стоимостью конечного препарата, а также возможными побочными эффектами в организме. Так, в качестве альтернативы антителам для доставки наноносителей, стали применять фрагменты антител размером от 20 до

55 кДа, которые сохраняют всю или большую часть связывания с молекулой-мишенью [45].

Было показано, что наночастицы, модифицированные однодоменными антителами (sdAb) против рецептора HER2, имели более высокую скорость накопления в клетках и выведения из тканей в сравнении с частицами, модифицированными трастузумабом [46]. В другом исследовании было показано, что большая плотность Fab-фрагментов антител на поверхности наночастицы способствовала уменьшению образования белковой короны и усилению нацеливания частиц на рецептор HER2 на клетках SKBR-3 [47]. Стоит отметить, что применение фрагментов антител для адресной доставки наночастиц показали многообещающие результаты, и в настоящее время несколько препаратов находятся на стадии клинических испытаний [48].

1.2.2. Неиммуноглобулиновые белковые скаффолды

Дарпины. Дарпины (от англ., *DARPin*s – *Designed Ankyrin Repeat Proteins*) – это искусственные белки, состоящие из анкириновых повторов, длиной 33 а.к. каждый [49]. Они получены из природных последовательностей белков с анкириновыми повторами, которые являются одним из распространенных классов связывающих белков в природе, отвечающих за разнообразные функции, такие как клеточная сигнализация, регуляция и структурная целостность клетки. Дарпины состоят из повторяющиеся мотивов, которые накладываются друг на друга, формируя компактный свернутый домен, обычно вытянутой формы [49]. В состав дарпинов входит несколько внутренних связывающих мотивов, находящихся между N- и C- концевыми мотивами, которые образуют гидрофобное ядро. Связывание с белками формируется за счет переменных аминокислот на внутренних мотивах дарпина. При создании дарпинов, направленных на определенные рецепторы, вводят случайные замены именно в этих участках связывания. Дарпины имеют относительно малые молекулярные массы (14-18 кДа), термостабильны (температура плавления 80-90 °C), выход очищенного белка,

нарабатываемого в бактериях *Escherichia coli* (*E. coli*), может достигать 200 мг/л [50].

Тем не менее структура дарпинов имеет вогнутую, жесткую форму, которая может ограничивать связывание с мишенями. Данное ограничение было преодолено созданием нового поколения дарпинов – LoopDARPin, отличающихся введением удлиненной петли во втором внутреннем мотиве. Данная модификация дарпина не снижает стабильности каркаса и улучшает связывание с молекулой-мишенью [51].

На данный момент были разработаны дарпины для распознавания различных клеточных рецепторов, например, DARPin 9_29 связывается с суб-доменом I рецептора HER2, а DARPin G3 связывается с суб-доменом IV рецептора HER2 [52,53], DARPin Ec1 узнает рецептор EpCAM, анти-VEGF-A DARPin связывает рецептор VEGF-A [54,55]. Дарпины применялись как адресные молекулы для доставки различных наночастиц с терапевтическими веществами к опухолевым клеткам. Так, были разработаны плазмонные наночастицы золота, модифицированные дарпином DARPin 9_29, которые специфически взаимодействуют с рецептором HER2 и проникают в HER2-положительные раковые клетки человека путем эндоцитоза [56], а также было показано значительное снижение жизнеспособности клеток при воздействии наночастиц золота с DARPin 9_29 и облучения лазером 850 нм [56,57].

Помимо роли узнавания, структура дарпинов может быть модифицирована введением дополнительных терапевтических и диагностических функций с использованием методов генной инженерии. Так, например, был разработан иммунотоксин DARP-LoPE – это дарпин DARPin 9_29, связанный с фрагментом экзотоксина A (PE) грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* с удаленными или инактивированными участками распознавания человеческих В-клеток, который узнает рецептор HER2 и приводит к гибели клетки [58], блокируя синтез белка путем АДФ-рибозилирования фактора элонгации 2 [59].

С помощью иммунотоксина DARP-LoPE и полимерных наночастиц была разработана система двойной адресной доставки для улучшенной терапии HER2-положительных раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [36].

На сегодняшний день дарпины проходят клинические испытания на пациентах в разных терапевтических областях, включая вирусологию [60], офтальмологию [61], а также онкологию [62]. Например, успешно завершилась 1 фаза клинических испытаний дарпина MP0274, нацеленного на рецептор HER2. MP0274 имеет два домена, связывающихся с разными участками HER2, и два домена, связывающихся с сывороточным альбумином для продления периода полувыведения из кровотока. Связывание дарпина с рецептором HER2 блокирует нисходящую передачу сигналов HER2/HER3, что приводит к ингибированию пролиферации и индукции апоптоза в клетках, экспрессирующих рецептор HER2 [62]. В экспериментах *in vivo* MP0274 продемонстрировал противоопухолевую активность, аналогичную или превосходящую активность трастузумаба, и эффективность, эквивалентную эффективности комбинации обоих одобренных препаратов – трастузумаб и пертузумаб [63].

Аффибоди. Молекулы аффибоди представляют собой новый класс аффинных белков, состоящих из 3 альфа-спиралей, которые содержат 58 аминокислотных остатков, основанных на структуре Z-домена белка А на поверхности бактерий *Staphylococcus aureus*, который связывается с IgG. Для создания различных вариантов аффибоди меняются определенные участки, которые могут быть направлены на молекулы-мишени [64]. С помощью комбинаторной инженерии и методов отбора *in vitro* проводят рандомизацию аминокислот в двух спиралях аффибоди, и выделяют те белки, которые имеют заданную специфичность к интересующим молекулами-мишенями.

Аффибоди имеют прочную структуру и малую молекулярную массу (6-8 кДа), сохраняют стабильность при высоких температурах (90 °C), а также в кислых и щелочных условиях (рН в диапазоне от 2.5 до 11.0, соответственно) [65,66], что делает их подходящими для широкого спектра применений, например, в качестве адресных молекул для обнаружения молекул-мишеней на поверхности клеток. На

данный момент получены белки аффибоди к различным мишеням, которые находятся на разных этапах клинических испытаний, например: аффибоди RLYB116, направленный на ингибирование фактора комплемента 5 [67], аффибоди Z_{HER2:342}, специфично взаимодействующий с суб-доменом I рецептора HER2 [68,69]. Аффибоди Z_{HER2:342} применяли для модификации поверхности полимерных PLGA наночастиц в стратегии двойного нацеливания адресных молекул, направленных на различные сайты связывания рецептора HER2.

В условиях *in vitro* установлена выраженная цитотоксичность разработанного комплекса, приводившая к полной гибели клеточной популяции (до 100 %). При этом в экспериментах *in vivo* сочетанная схема лечения продемонстрировала терапевтическое превосходство над одностадийным протоколом при воздействии на HER2-положительные новообразования [36]. Сходный результат был достигнут при реализации фототермической терапии (ФТТ) с применением адресных наночастиц серебра, конъюгированных с аффибоди Z_{HER2:342}: авторами было показано полное подавление пролиферации опухолевых клеток как на клеточных моделях, так и в организме экспериментальных животных [70]. Более того, аффибоди Z_{HER2:342} применяется в клинических испытаниях как адресная молекула радиофармацевтических препаратов для диагностики HER2-положительных опухолей [71–73].

1.2.3. Малые молекулы

Малые молекулы. Малые молекулы – это низкомолекулярные соединения, которые имеют среднюю молекулярную массу менее 1 кДа, способные проникать через клеточные мембраны и специфически взаимодействовать с биологическими мишенями: белками, ферментами, рецепторами, нуклеиновыми кислотами или сигнальными путями. На данный момент несколько низкомолекулярных соединений, применяемых в качестве лигандов к определённым мишеням, уже прошли клинические испытания и используются для адресной терапии различных заболеваний [74]. Примером малых молекул природного происхождения является фолиевая кислота (витамин B9), рецепторы которой экспрессируются на

различных клетках, в том числе и на раковых. Например, рецептор фолиевой кислоты альфа (FRA) экспрессируется более чем в 40 % случаев опухолей человека, включая опухоли яичников и центральной нервной системы [75]. Фолиевая кислота широко используется для покрытия и нацеливания различных типов наночастиц на раковые клетки из-за повышения регуляции FRA при многих видах онкозаболеваний [76]. Так, адресные полимерные мицеллы, нагруженные тамоксифеном и декорированные фолиевой кислотой, усилили клеточное поглощение и цитотоксический эффект в опухолевой ткани *in vivo* в сравнении со свободным тамоксифеном [77].

Моносахариды, такие как глюкоза, манноза, галактоза, – это еще один класс малых молекул, которые были применены для адресной доставки частиц. Например, было показано, что полимерные наночастицы, модифицированные галактозой, приводили к быстрому и усиленному эндоцитозу из-за специфического взаимодействия с рецептором асиалогликопротеина клеток печени HepG2 [75]. Тем не менее малые молекулы, такие как мочевины, глюкоза и фолиевая кислота, обладают высокими коэффициентами диффузии в тканях, а также высокой скоростью мембранного транспорта, что может способствовать их биораспределению в нормальных органах, не являющихся мишенями [78].

Аптамеры. Аптамеры представляют собой еще одну категорию соединений с малой молекулярной массой (от 5 до 15 кДа, 2 нм), состоящих из коротких одноцепочечных олигонуклеотидов ДНК или РНК. Они способны распознавать молекулы-мишени с высокой константой связывания (в пределах от нМ до пМ) и специфичностью благодаря своей уникальной трехмерной структуре. Аптамеры имеют малый размер и гибкую структуру, что позволяет им связываться с более мелкими мишенями или некоторыми скрытыми доменами рецепторов, которые недоступны для более крупных молекул, например, антител [75,79]. Несколько аптамеров прошли клинические испытания, например, Macugen/Pegaptanib был одобрен FDA для лечения неоваскулярной формы возрастной макулярной дегенерации. Pegaptanib – это ПЭГилированная форма анти-VEGF аптамера, которая связывается с белком VEGF165 и приводит к блокированию связывания с

рецептором на клетке [80]. Аптамеры активно применяются в исследованиях адресной доставки терапевтических веществ. Например, наночастицы PLGA с цисплатином, модифицированные аптамером A10 и нацеленные на простатспецифический мембранный антиген (PSMA), были в 80 раз более токсичны, чем свободный цисплатин или неадресные наночастицы против раковых клеток *in vitro* [80]. Однако для целевой доставки лекарств ни один конъюгированный с аптамером продукт не был выпущен на фармакологический рынок [81,82].

1.3 Методы оснащения поверхности наноагентов распознающими молекулами

Модификация полимерных наночастиц различными молекулами относится к процессу присоединения молекул или функциональных групп к поверхности наночастиц для изменения их свойств и повышения их эффективности в доставке терапевтических веществ к органам-мишеням. Ниже представлены некоторые наиболее часто используемые способы оснащения поверхности наночастиц различными узнающими соединениями.

1.3.1. Ковалентная конъюгация

EDC/NHS. Одним из распространенных методов связывания наночастиц с адресными молекулами является конъюгация в присутствии карбодиимидов (например, EDC). Этот метод заключается в связывании карбоксильных и амино групп с помощью сшивающих агентов нулевой длины на поверхности интересующих молекул с образованием стабильной амидной связи. 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC) чаще используется для конъюгации биологических веществ, содержащих карбокси и амино группы. Не прореагировавший EDC, а также побочный продукт реакции, изомочевина являются водорастворимыми и могут быть легко удалены диализом или гель-фильтрацией для очищения полученных конъюгатов. Однако из-за возможного гидролиза промежуточного продукта (О-ацилмочевины) возникает риск низкого выхода конечного продукта. Для стабилизации О-ацилмочевины вместе с EDC

применяется N-гидроксисукцинимид (NHS)/ (либо сульфо-N-гидроксисукцинимид (сульфо-NHS)), способствуя более медленному гидролизу [83]. Например, с помощью конъюгации EDC/сульфо-NHS были успешно модифицированы наночастицы PLGA аффибоди Z_{HER2:342} для адресной доставки к HER2-положительным клеткам *in vitro* и *in vivo* [36].

Однако на этот метод накладывается ряд ограничений, например, активационный буфер не должен содержать первичных аминных или карбоксильных групп, поскольку они могут конкурировать за связывание с EDC. Чаще всего предпочтительным буфером для активации EDC является 2-(N -морфолино)этансульфоная кислота (MES) при pH 5-6, а реакцию с сульфо-NHS-эфиром проводят в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) pH от 7.2 до 7.5 [83]. Помимо буферных растворов для конъюгации наночастиц с EDC, важно учитывать расположение доступных карбокси- и аминогрупп на поверхности адресной молекулы. Так, например, если в качестве такой молекулы выступает антитело, в котором расположение доступных для связывания групп может привести к неправильной ориентации антитела на поверхности наночастицы, то это станет причиной потери антителом биологической активности из-за прямого блокирования антигенсвязывающего центра, который узнает рецептор на поверхности клеток [84].

Азид-алкиновая клик-химия. Клик-реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая медью, широко используется в качестве инструмента для биоконъюгации различных адресных молекул с наночастицами. Образование комплекса формируется посредством взаимодействия алкина с азидом, введённых в биомолекулы, с образованием триазольного цикла в присутствии катализатора Cu(I). В таком типе присоединения наличие меди как катализатора реакции и образование пары азид и алкин, не взаимодействующих с другими функциональными группами биологических систем, способствует селективной конъюгации адресных молекул с наночастицами, тем самым исключая побочные продукты реакции [83,85]. С помощью клик-реакции были получены адресные полимерные наночастицы с доксорубицином, модифицированные

фолиевой кислотой, которые значительно снизили рост опухоли по сравнению со свободным препаратом и неадресным наночастицами [86]. Однако данный вид конъюгации имеет ряд серьезных недостатков, ограничивающих применение в живых системах – это цитотоксичность меди в клетках и низкая скорость реакции, затрудняющая модификацию биомолекул в ограниченных количествах [87].

Тиол-дисульфидные связывания. Технология сайт-специфической конъюгации, включающая связывание через сульфгидрильные группы (-SH), также называемые тиоловыми группами, применяют для слияния белковых молекул с различными наночастицами. Сульфгидрилы существуют в белках на боковой цепи аминокислоты цистеина. Пары сульфгидрильных групп цистеина связаны дисульфидными (-S-S-) связями за счет окислительного процесса. Так, например, для антител IgG -S-S- связи обычно присутствуют в шарнирной области структуры. Для связывания антител с наночастицами необходимы свободные сульфгидрильные группы, что требует восстановления дисульфидных связей реагентами сульфгидрильного присоединения или восстановителями. Восстановленные -S-S- связи приводят к расщеплению антитела на половины, при этом эффективность связывания антигена с антителом не меняется. Для восстановления дисульфидной связи обычно предпочтительными реагентами являются дитиотреитол (ДТТ) и 4,4'-дитиодипиридин [88].

Для сайт-специфической конъюгации через сульфгидрильные группы применяется сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексано-1-карбоксилат (SMCC), который содержит NHS-эфирные и малеимидные группы. NHS эфиры, реагирующие с амино- (при pH 7–9), а малеимиды с сульфгидрильными группами (при pH 6,5–7,5) соответственно позволяют соединять молекулы, содержащие эти функциональные группы [83]. Альтернативно для конъюгации частиц с белками используют реактив Траута (2-иминотиолан) и *N* - сукцинимидил- *S* - ацетилтиоацетат, которые могут модифицировать первичные амины тиоловыми группами. Так, реактив Траута был применен для модификации дарпином DARPin 9_29 золотых наностержней для адресной доставки цитотоксического эффекта *in vitro* и *in vivo* [57].

1.3.2. Нековалентные подходы связывания наночастиц с адресными метками

Нековалентное взаимодействие между белками и частицами обычно обусловлено электростатическими и гидрофобными взаимодействиями. Электростатические взаимодействия происходят между противоположно заряженными молекулами, в то время как гидрофобные взаимодействия образуются между неполярными молекулами. На стабильность данных комплексов может влиять несколько факторов, включая силу нековалентных взаимодействий, рН и ионную силу окружающей среды. Более того, эффективность доставки терапевтических веществ с помощью таких способов связывания частиц с белками может быть ограничена силой нековалентных взаимодействий и размером доставляемых веществ [89].

Метод адсорбции применяется для модификации различных наночастиц антителами и другими белковыми молекулами. Данный метод прост и занимает меньше времени в получении адресных частиц, так как для сорбции не требуется дополнительных этапов, таких как модификация антител или активация поверхностных групп наночастиц.

Было проведено *in vitro* исследование, в котором сравнивали эффективность взаимодействия адресных наночастиц с клетками в зависимости от метода модификации поверхности наночастиц антителами. Были разработаны три способа получения модифицированных трастузумабом адресных наночастиц PLGA с доцетакселом: физическая адсорбция белка, электростатическая иммобилизация и ковалентное связывание. Показано, что адресные наночастицы, полученные методом ковалентного связывания, обладают более высокой стабильностью в ФСБ при +4 °C и +37 °C, а также повышенной скоростью интернализации и цитотоксичностью в отношении HER2-положительных клеток по сравнению с адресными наночастицами, полученными методами физической адсорбции и электростатической иммобилизации [90].

Однако в ряде других исследований было показано, что методом адсорбции были получены адресные наночастицы, которые эффективнее интернализуются в клетки и токсичнее, чем неадресные наночастицы. Так, было показано, что метод

адсорбции антитела трастузумаб увеличивает клеточное поглощение и цитотоксичность нанокристаллов доцетаксела в клетках рака молочной железы в сравнении с неадресными частицами [91]. Аналогичным способом поверхность золотых наночастиц модифицировали антителами к рецептору HER2 для усиления внутриклеточного поглощения в раковых клетках [92]. Более того, воздействие на раковые клетки адресных частиц с терапевтическим веществом, полученных методом адсорбции, приводило к полной элиминации опухоли и метастазов в мышинных моделях. Например, с помощью метода адсорбции были получены адресные PLGA наночастицы, декорированные моноклональным антителом трастузумаб, для диагностики и фототерапии HER-положительных опухолей *in vitro* и *in vivo*. Так, адресные наночастицы PLGA, нагруженные флуоресцентными красителями и модифицированные антителом трастузумаб, специфически взаимодействовали и проявляли цитотоксический эффект *in vitro*, а также визуализировали опухоль *in vivo* [93]. Таким же способом были разработаны адресные наночастицы на основе PLGA, загруженные фотосенсибилизатором и химиотерапевтическим препаратом, усиливающие цитотоксический эффект *in vitro* и *in vivo* [94].

1.3.3. Биоспецифические взаимодействия и самосборка

Стрептавидин/биотин. Система стрептавидин/биотин представляет собой комплекс с константой диссоциации $K_D \sim 10^{-14} - 10^{-15}$ М. Стрептавидин – биотинсвязывающий белок с молекулярной массой 52 кДа, выделенный из бактерии *Streptomyces avidinii*, обладает высокой стабильностью к термической и химической денатурации, а также к протеазной деградации. Примечательным свойством стрептавидаина является его практически необратимое сродство к биотину [95]. Биотин (витамин В7) является одним из витаминов группы В – группы незаменимых пищевых микроэлементов, присутствуя в каждой живой клетке, он выступает как кофактор ферментов в различных метаболических процессах.

С помощью комплекса стрептавидин/биотин были присоединены различные адресные молекулы для доставки наночастиц к раковым клеткам. Так, например, были разработаны адресные наночастицы, где антитело модифицировали стрептавидином, направленное на рецептор CD22 на поверхности клеток, а затем антитело-стрептавидин соединяли с биотинилированной полимерной наночастицей для доставки siRNA *in vitro*. Наночастицы, модифицированные антителом, эффективнее интернализировались в раковые клетки и подавляли активность генов с помощью siRNA, в сравнении с частицами без адресной метки [96].

Также был получен комплекс, состоящий из квантовых точек Qdot655, конъюгированных со стрептавидином, и аффибоди Z_{HER2:477} с биотином, для визуализации рецептора HER2 в первичной опухолевой ткани с использованием конфокальной микроскопии [97].

Барназа/барстар. Барназа (от слов «BActerial» и «RiboNucleASE», 110 аминокислот, 12 кДа) – внеклеточная рибонуклеаза, продуцируемая *Bacillus amyloliquefaciens*, Нисимура и Номура впервые описали в 1958 году [98]. Позже был выделен ингибитор барназы – барстар (89 аминокислот, 10 кДа) – внутриклеточный ингибитор, который, связываясь с активным центром рибонуклеазы, ингибирует ее внутриклеточную ферментативную активность, тем самым защищая бактериальные клетки [99]. Оба белка являются мономерными, у которых N- и C-концы не участвуют в формировании комплекса, и которые могут быть использованы для слияния с другими молекулами. Пара барназа-барстар быстро образуют комплекс с константой диссоциации $K_D \sim 10^{-14}$ М, ни один из белков не сшит дисульфидными связями и не требует ионов металлов или других кофакторов для сворачивания или функционирования [100,101]. Барназа и барстар – генетически кодируемые белки, которые являются стабильным в различных диапазонах температурах и pH [101]. Сформированный комплекс барназа/барстар применяется для конструирования мультифункциональных модулей для терапии и диагностики заболеваний [100].

С помощью такой системы барназа/барстар был разработан простой метод модификации поверхности различных наночастиц. Так, наночастицы SiO₂ были покрыты дарпином DARPin 9_29 для доставки к рецепторам HER2 на поверхности клетки. Покрытие наночастиц осуществлялось благодаря сильному сродству пар генетически сконструированных белковых комплексов: сначала наночастицы были покрыты SiO₂-связывающим пептидом (SBP) с бастаром (SBP-Bs), а после барназой с адресной молекулой (Bn-DARPin 9_29). В результате смешивания наночастиц и генетических конструкций был получен гибридный наноматериал SiO₂*SBP-Bs*Bn-DARPin 9_29, который адресно взаимодействовал с раковыми клетками [102].

Комплекс барназа/барстар был также применен для адресной доставки наночастиц магнетита. Наночастицы магнетита были декорированы дарпином DARPin 9_29 для детекции HER2-положительных клеток. Для покрытия частиц были разработаны 2 генетические конструкции, состоящие из С-концевого фрагмента белка Mms6 органелл – магнитосом магнитотактических бактерий *Magnetospirillum magneticum* и барстара (Bs-C-Mms6), а также распознающего белка и барназы (DARPin 9_29-Bn). Данный комплекс наночастиц с белками MNPs-C-Mms6-Bs-Bn-DARPin 9_29 был применен для адресной доставки к HER2-положительным раковым клеткам SK-BR-3 [103].

С помощью системы барназа/барстар был разработан двухстадийный способ адресной доставки противоопухолевого соединения доксорубина, загруженного в PLGA наночастицы. На первом этапе к раковым клеткам был добавлен адресный белковый комплекс Bs-DARPin 9_29, узнающий рецептор HER2 на поверхности клеток. Затем были добавлены PLGA наночастицы, загруженные доксорубином и ковалентно модифицированные барназой, для доставки цитотоксического агента посредством самосборки барназы/барстара. С помощью данного способа был повышен терапевтический эффект наночастиц, загруженных препаратом, в сравнении с одностадийной адресной доставкой PLGA *in vitro* и *in vivo* [39,104].

SpyTag/SpyCatcher. SpyTag и SpyCatcher представляют собой пептид и белок, полученные путем расщепления и конструирования домена CnaB2 фибронектин-

связывающего белка FbaV из инвазивного штамма *Streptococcus pyogenes* (Spy). SpyTag – это короткий пептид (13 аминокислот), который ковалентно связывается со своим белком-партнером SpyCatcher (138 аминокислот, 15 кДа), образуя изопептидную связь [105]. Данная технология применяется для конъюгации различных биоматериалов, где SpyTag/SpyCatcher выступает как молекулярный мостик, образуя многокомпонентные структуры. SpyTag/SpyCatcher функционирует в широком диапазоне температур (от 4 °C до 37 °C) и при различных значениях pH (от 5 до 8), а также устойчив к органическим растворителям [105,106], что позволяет применять данный комплекс как инструмент для решения различных биотехнологических задач.

Так, белковая система SpyTag/SpyCatcher была применена для эффективной одностадийной очистки и иммобилизации рекомбинантных белков. SpyCatcher сначала иммобилизовали на глиоксил-агарозных гелях, а затем полученный иммобилизат SpyCatcher, использовали для разделения и иммобилизации белков, слитых со SpyTag, в неочищенном экстракте [107]. Кроме того, система SpyTag/SpyCatcher применялась при создании вакцинных препаратов на основе вирусоподобных частиц, несущих специфические малярийные антигены. В данной технологической схеме белки вирусоподобных оболочек подвергались генетическому слиянию со SpyCatcher, тогда как антигенные детерминанты связывались со SpyTag. Инъекция вирусоподобных частиц, модифицированная малярийным антигеном, эффективно индуцировала гуморальный ответ уже после однократной иммунизации мышей [108,109].

С помощью комплекса SpyTag/SpyCatcher были разработаны двухфункциональные белковые наночастицы на основе инкапсулина (Encap-белок) для селективного таргетирования и визуализации интересующих клеток. Пептиды ST были поливалентно и равномерно представлены на поверхности Encap посредством генетической вставки. Отдельно были получены флуоресцентные белки и таргетирующие молекулы аффибоди EGFR^{Afb} и HER2^{Afb}, генетически слитые с белком SC. С помощью ковалентной изопептидной связи на поверхности наночастиц формировались комплексы между SpyTag и SpyCatcher, которые

специфически узнавали и визуализировали клетки с рецепторами EGFR и HER2 [110]. Для направленной доставки к HER2-положительным клеткам возможности системы SpyTag/SpyCatcher были использованы при сборке наночастиц альбумина, функционализированных распознающими молекулами аффибоди. В качестве терапевтического агента в данную полимерную матрицу инкапсулировали фотосенсибилизатор – индоцианиновый зелёный, применяемый для фототермического воздействия. Синтезированные наночастицы специфично взаимодействовали с рецептором HER2 *in vitro* и проявляли токсический эффект после фототермической обработки *in vivo* [111].

Систему лигирования SpyTag/SpyCatcher применяли для модификации поверхности белковых наноагентов E2, полученных из пируватдегидрогеназного комплекса грамположительных бактерий *Geobacillus stearothermophilus*, для доставки противоопухолевого агента монометил ауристатина Е (MMAE) и к рецептору HER2 на поверхности клеток. В данном исследовании наноагенты E2 были конъюгированы с одноцепочечными вариabельными фрагментами (scFv), полученными из моноклонального антитела трастузумаб, где scFv был присоединен к SpyCatcher, а пептид SpyTag слит с белком E2. Полученная конструкции scFv-анти-HER2 на поверхности наноагентов с цитотоксическим агентом MMAE обеспечивала эффективную субнаномолярную цитотоксичность в HER2-положительных клеточных линиях [112].

1.4 Рецептор HER2 как молекулярная мишень раковых клеток для адресной доставки терапевтических агентов

Рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), один из семейства четырех мембранных тирозинкиназ, является рецепторной тирозинкиназой (ErbB), кодируемой геном *ERBB2*. Рецептор HER2 отвечает за регуляцию роста, выживания и дифференцировки клеток через множественные пути передачи сигналов и участвует в клеточной пролиферации и дифференцировке [113,114]. HER2 представляет собой трансмембранный

гликопротеин длиной 1255 аминокислот и массой 185 кДа, расположенный на длинном плече 17-й хромосомы человека (17q12). Рецептор, как и другие члены семейства, содержит 3 домена: внеклеточный домен, состоящий из 4-х субдоменов, который содержит богатый цистеином внеклеточный сайт связывания лиганда, трансмембранный домен и внутриклеточный домен, который взаимодействует со множеством сигнальных молекул (рисунок 3) [115,116]. У рецептора HER2 не выявлено связывающего лиганда с внеклеточным доменом, и он может участвовать в активации субклеточных сигнальных путей, контролирующих рост эпителиальных клеток, с помощью гетеродимеризации с другими представителями семейства, такими как HER1 и HER3 [117].

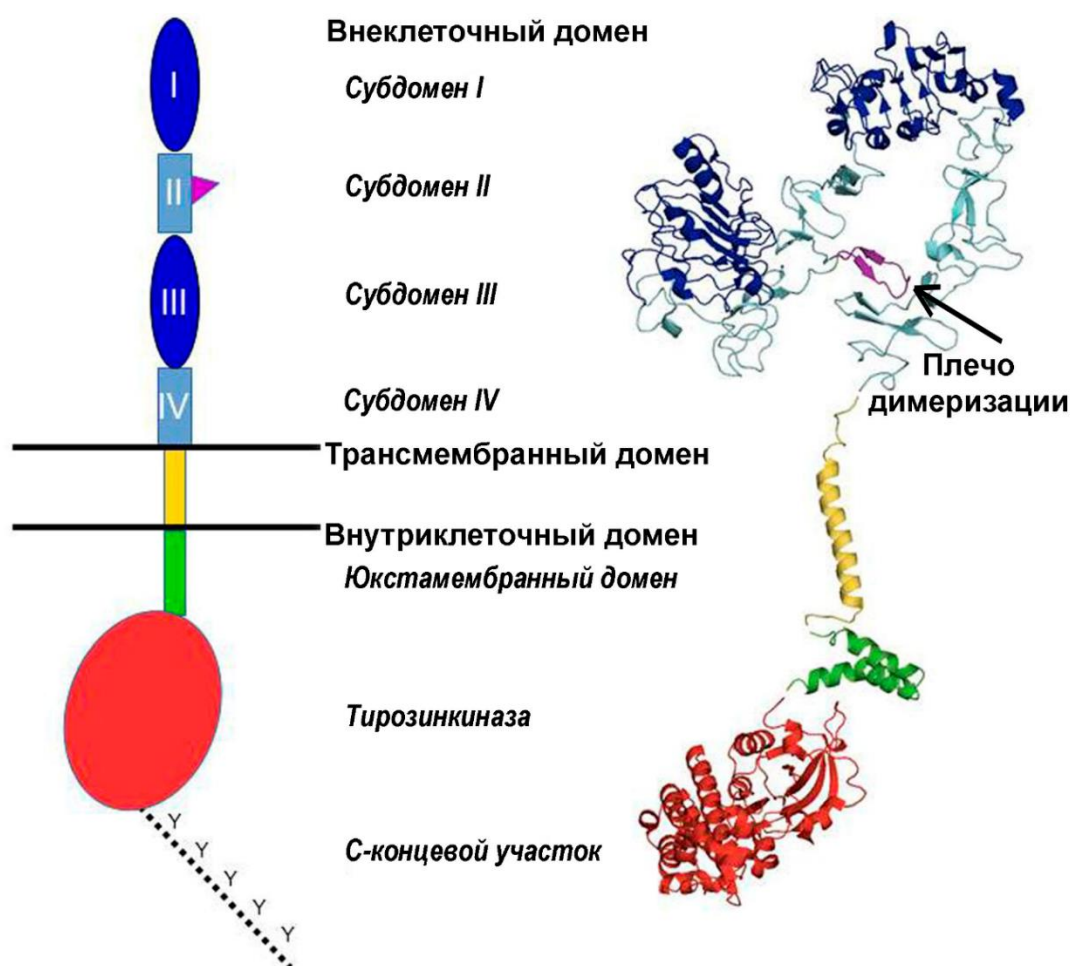


Рисунок 3. Схема строения HER2 рецептора. Адаптировано из [118].

Физиологический уровень экспрессии HER2 обнаруживается на мембранах эпителиальных клеток различных органов и тканей, включая молочные железы,

кожу, лёгкие и кишечник [119]. В норме экспрессия рецептора находится на низком уровне, например, в эпителиальных клетках молочной железы около 20 000 рецепторов HER2 на 1 клетку, тогда как в HER2-гиперэкспрессированных клетках рака груди происходит амплификация гена *ERBB2*, которая увеличивает количество HER2 – уровень возрастает в 40–100 раз, что приводит к экспрессии до 2 миллионов рецепторов на 1 опухолевую клетку [119]. Гиперэкспрессия HER2 выявляется приблизительно в 20 % случаев рака молочной железы, а также при раке яичников и желудка; она ассоциирована с агрессивным клиническим течением заболевания и снижением показателей выживаемости пациентов. Повышенная экспрессия HER2 наблюдается примерно в 20 % случаев рака молочной железы и некоторых видов рака яичников и желудка, и характеризуется агрессивным течением заболевания и снижением выживаемости [120]. Столь выраженная разница в плотности рецепторов HER2 между нормальными и трансформированными клетками делает данный антиген перспективной мишенью для таргетной онкотерапии [121].

В 1998 году FDA был одобрен первый противораковый препарат трастузумаб (в составе препарата Герцептин) для лечения HER2-положительного рака молочной железы. Трастузумаб – рекомбинантное моноклональное антитело, нацеленное на IV внеклеточный суб-домен рецептора HER2 [113]. Трастузумаб, связываясь с рецептором, подавляет внутриклеточные сигнальные пути HER2, ингибирует остановку клеточного цикла и опосредует антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (англ., *ADCC*). Также было разработано и применяется в клинической практике гуманизированное моноклональное антитело к HER2, пертузумаб (одобрен FDA в 2012 году). Пертузумаб взаимодействует со II внеклеточным субдоменом, что препятствует образованию гетеродимеров между HER2 и HER1, HER3 или HER4, в результате чего блокируются сигналы опухолевого роста [122]. Для усиления терапевтического эффекта было разработано химерное антитело маргетуксимаб, которое связывается с тем же участком, что и трастузумаб, но с модифицированным Fc-фрагментом для повышения способности индуцировать

ADCC. Также были разработаны различные ингибиторы тирозинкиназы HER2 – лапатиниб, нератиниб, тукатиниб, которые могут применяться как отдельно, так и в сочетании с моноклональными антителами (рисунок 4) [113,122,123].

На данный момент, помимо антител для терапии HER2-положительного рака, разрабатываются различные аналоги, направленные на определённые участки рецептора. Так, например, дарпины DARPIn 9_29, DARPIn G3, аффибоди Z_{HER2:342} были сконструированы как лиганды, связывающиеся с рецептором HER2 на поверхности клеток [52,53,68].

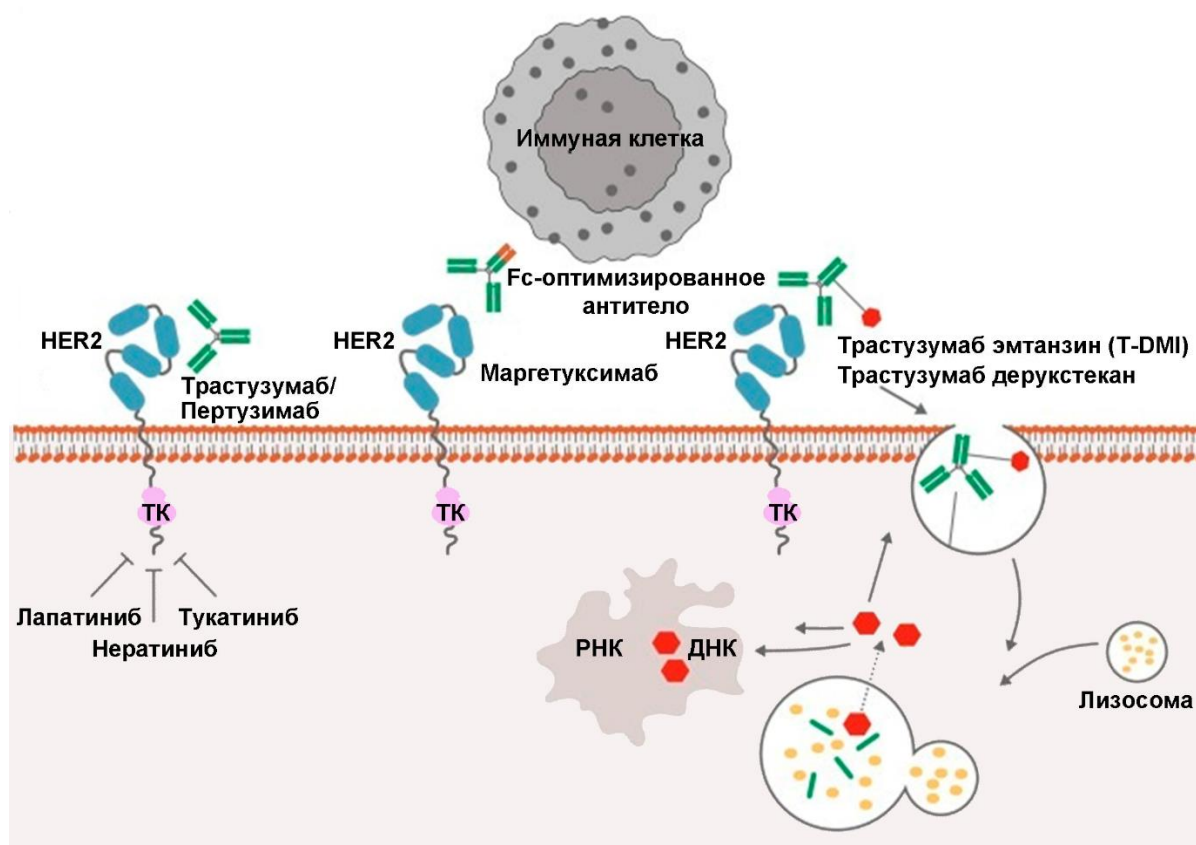


Рисунок 4. Схема воздействия противораковых агентов на рецептор HER2. Моноклональные антитела, такие как трастузумаб и пертузумаб, Fc-модифицированное антитело маргетуксимаб и конъюгаты антитело-лекарство адотрастузумаб эмтанзин (T-DM1) и трастузумаб-дерукстекан (Enhertu), воздействуют на внеклеточные домены рецептора HER2. Ингибиторы тирозинкиназы – лапатиниб, нератиниб и тукатиниб – взаимодействуют с АТФ-связывающим участком во внутриклеточном домене киназы рецептора HER2. Адаптировано из [123].

1.5 Биосовместимые полимерные наноструктуры как средства адресной доставки

1.5.1. Понятие биоразлагаемых полимерных наноносителей

Биоразлагаемые наночастицы разделяют по происхождению на природные (натуральные) и синтетические. Ниже описаны некоторые полимерные материалы, которые чаще используются для доставки лекарств, том числе и к HER2-положительным опухолям.

1.5.2. Натуральные биоразлагаемые полимеры

Натуральные биоразлагаемые полимеры привлекают всё большее внимание в качестве платформ для адресной доставки лекарственных средств. Их природное происхождение обеспечивает высокую биосовместимость, низкую токсичность и способность к безопасной деградации в организме, что делает их перспективной альтернативой синтетическим материалам. Такие полимеры, как полисахариды и белки, могут быть адаптированы для создания нано- и микрочастиц с заданными физико-химическими свойствами, обеспечивающими эффективную доставку терапевтических агентов к целевым тканям и клеткам.

Хитозан – Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из остатков 2-дезоксид-2-(ацетиламино)-D-глюкозы, соединённых 1,4-гликозидными связями. Его получают путем частичного N-деацетилирования хитина. Основными природными источниками хитина являются панцири ракообразных, насекомые, дрожжи и грибы. Благодаря наличию аминогрупп хитозан обладает растворимостью в кислой среде и способен формировать пленки, гидрогели и наночастицы. Биосовместимость, биоразлагаемость, низкая токсичность и антибактериальные свойства обуславливают широкое применение хитозана в качестве наноносителя терапевтических веществ [124]. Катионная природа хитозана, из-за наличия аминогрупп в полимере, способствует эффективному проникновению как чистых наночастиц хитозана, так и покрытых хитозаном наночастиц через клеточную мембрану [125].

Желатин – природный биоразлагаемый полимер, в последние годы привлекает все больше внимания благодаря широкому спектру его применения в различных областях, например, биоинженерии, фармацевтики и пищевой промышленности [126]. Желатин получают путем контролируемого гидролиза волокнистого нерастворимого белка коллагена. Существует 2 типа желатина в зависимости от обработки коллагена: тип А получают путем обработки коллагена кислотой, а тип В получают воздействием на коллаген щелочью [127]. Желатин способен образовывать гидрогели, которые представляют собой сети полимерных цепей, удерживая большое количество воды. Желатин применяют в доставке различных терапевтических веществ, так как полимер способен инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные соединения [128].

Крахмал – это сложный углевод, состоящий из двух основных полисахаридов: амилозы и амилопектина, получаемый из различных растений. Его доступность, невысокая цена и способность к биodeградации делают его интересным для использования в биомедицине. Крахмал обладает биосовместимостью и низкой токсичностью, что крайне важно при создании систем доставки медикаментов. Модификация крахмала может включать физические, химические или ферментативные методы, которые позволяют изменять его молекулярную массу, степень кристалличности и растворимости. Например, химические модификации могут привести к получению производных, которые обладают улучшенными свойствами, такими как повышенная растворимость в воде или улучшенная способность к образованию гелей. Кроме того, крахмал может быть использован в качестве основы для создания наночастиц, которые могут инкапсулировать лекарства и обеспечивать их целенаправленное доставление к пораженным участкам организма. Это особенно актуально в онкологии, где важно минимизировать воздействие на нормальные клетки. Так, наночастицы крахмала, нагруженные п-кумаровой кислотой и конъюгированные с аптамером были разработаны для терапии трижды негативного рака молочной железы [129]. В другом исследовании были синтезированы модифицированные фолиевой кислотой наночастицы оксида магния, покрытые крахмалом, для лечения

рака молочной железы [130]. В целом, крахмал представляет собой многофункциональный биополимер с огромным потенциалом в области медицины, что делает его предметом активных исследований и разработок [131].

Альбумин – природный биополимер, основными функциями которого являются поддержание коллоидно-осмотического давления и перенос различных веществ в организме. Альбумин содержит 585 аминокислот с молекулярной массой 66.5 кДа. Альбумин широко применяют как средство доставки лекарств при различных заболеваниях из-за высокой концентрации в сыворотке, биоразлагаемости, нетоксичности и неиммуногенности, а также способности быстро диффундировать через стенки кровеносных сосудов в опухолях [132]. Более того, альбумины просты в изготовлении и воспроизводимы. Уже одобрен первый препарат на основе альбумина в виде наночастиц – биосовместимые наночастицы альбумина, содержащие противоопухолевый препарат паклитаксел (AbraXane) для лечения рака молочной железы, немелкоклеточного рака лёгких и рака поджелудочной железы [133]. На сегодняшний день продолжают активные разработки наночастиц альбумина, в том числе и для адресной доставки препаратов. Благодаря наличию функциональных групп (амино- и карбоксильных групп) на поверхности альбуминовых наночастиц, возможна химическая конъюгация различных адресных лигандов, делая молекулу таргетной к органам-мишеням [132]. Так, были конъюгированы наночастицы альбумина с аптамером и антителом трастузумаб для доставки к рецептору HER2 *in vitro* и *in vivo* [134,135].

1.5.3. Синтетические биоразлагаемые полимеры

Поли(молочно-гликолевая) кислота (PLGA). Полимер PLGA является сополимером молочной и гликолевой кислоты, одобренным FDA. PLGA наиболее часто используется в качестве носителя для доставки терапевтических веществ, а также как каркасы для тканевой инженерии с хорошей биоразлагаемостью и биосовместимостью. Поли (молочно-гликолевая) кислота при гидролизе образует биосовместимые продукты – молочную и гликолевую кислоты, которые не являются токсичными для организма. На основе PLGA уже были выпущены ряд

лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний, включая рак предстательной и молочной железы (Suprefact Depot, Lupron Depot, Trelstar, Eligard, Decareptyl), а также продолжаются клинические испытания различных препаратов, содержащие PLGA (Таблица 1) [136,137].

На сегодняшний день синтезированы сополимеры PLGA с различным соотношением молочной и гликолевой кислоты (LA:GA). Соотношение полимеров влияет на время высвобождения лекарственного препарата из наночастицы PLGA, а также на время разложения сополимера [138]. PGA – кристаллический гидрофильный полимер, а PLA – жесткий и более гидрофобный полимер; поэтому сополимеры PLGA с более высоким содержанием PLA менее гидрофильны, имеют тенденцию поглощать меньше воды и, следовательно, имеют более длительное время деградации. Время деградации может варьироваться от нескольких месяцев до нескольких лет в зависимости от молекулярной массы и соотношения сополимеров. PLGA растворим в различных растворителях, включая органические растворители, такие как хлороформ, ацетон, этилацетат и тетрагидрофуран. Было показано, что PLGA с соотношением LA:GA 50:50 был более гидрофильным и имел самую быструю скорость разложения, а также имел преимущества перед другими соотношениями при инкапсуляции и высвобождении лекарственного средства [139].

Было показано, что наночастицы PLGA проникают в клетки с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза и преимущественно колокализуются с ранними эндосомами, аппаратом Гольджи и, в некоторых случаях, эндоплазматическим ретикулумом [140].

Активно ведутся разработки наночастиц на основе PLGA для адресной доставки препаратов. Так, были получены и протестированы *in vitro* PLGA наночастицы, модифицированные различными адресными метками, против HER2-положительных раковых клеток [104,141,142]. На сегодняшний день в клинической практике нет адресных наночастицы PLGA, однако около 10 препаратов находятся на стадии клинических испытаний (Таблица 3).

Поли (молочная кислота) (PLA). PLA является полимером, образующимся в результате полимеризации молочной кислоты путём раскрытия кольца её циклического димера, лактида. Повторяющимся звеном в полимерной цепи является молочная кислота. PLA широко используется в фармацевтической промышленности и уже одобрены FDA препараты, содержащие полимер, например, Atridox (ATRIGEL). PLA находит применение в каркасах для тканевой инженерии, костных винтах, швах, протезах, сосудистых трансплантатах, а также временных и долгосрочных имплантатах [143,144].

Полимер PLA имеет ряд необходимых свойств, которые позволяют применять этот материал в качестве наносистемы для доставки терапевтических средств, например, такие как биосовместимость, биоразлагаемость, а также контролируемая кинетика высвобождения веществ. Внутри организма PLA расщепляется на мономеры молочной кислоты, что делает этот полимер безопасным и малотоксичным. Скорость деградации PLA зависит от молекулярной массы полимера, причем она уменьшается с увеличением молекулярной массы. Поэтому PLA с высокой молекулярной массой подходит для производства неразрушающихся хирургических нитей, тогда как PLA с низкой молекулярной массой идеально подходит для использования в качестве упаковочного материала для лекарств с замедленным высвобождением [145].

Материалы на основе PLA используют для контролируемой доставки лекарств различных терапевтических агентов для онкологических заболеваний. Для доставки лекарств применяется как чистый PLA [146], так и в комбинации с другими материалами, например, были разработаны магнитные наночастицы с полимерным покрытием для доставки противораковых препаратов доксорубицина и метотрексата [147]. С целью улучшения биодоступности и эффективности доставки полезной нагрузки, поверхность PLA наночастиц была декорирована адресными молекулами к HER2-положительным клеткам [148,149].

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) – это неионогенное полиэфирное соединение, которое нашло применение в разных областях – широко используется в косметике, продуктах питания и фармацевтике благодаря своим превосходным свойствам

растворителя, поверхностно-активного вещества, основы и смазочного материала. Полимер ПЭГ активно применяется в фармацевтической промышленности, поскольку способен увеличивать время циркуляции лекарственных средств и снижать их иммуногенность, а также улучшать растворимость лекарственных препаратов. ПЭГ нашел широкое применение и в области нанотехнологий в разработке наноносителей лекарственных препаратов для улучшения их биосовместимости и биораспределения. В области нанотехнологий ПЭГ широко используется для создания наночастиц-носителей лекарственных средств, повышая их биосовместимость и улучшая биораспределение. Модификация поверхности наночастиц ПЭГ (так называемая «PEGylation») позволяет снижать адсорбцию белков плазмы, тем самым уменьшая распознавание и захват частиц системой мононуклеарных фагоцитов и продлевая их циркуляцию в организме [150,151]. Модификацию ПЭГом также применяют для декорирования поверхности частиц различными лигандами для адресной доставки препаратов [152–155].

Поли-(ε-капролактон) (ПКЛ) – синтетический гидрофобный, полукристаллический полимер, одобренный FDA для биомедицинских применений. ПКЛ хорошо растворим при комнатной температуре в различных органических растворителях, таких как хлороформ, дихлорметан, четырёххлористый углерод, бензол, толуол и циклогексан. Кроме того, низкая температура плавления (59 – 64 °C) делает ПКЛ перспективным материалом для исследований в области биомедицины.

В организме распад ПКЛ происходит путем гидролиза эфирных связей, образуя капроновую кислоту, которая нетоксична и может быть выведена из организма через обычные метаболические пути. Надо отметить, что ПКЛ медленнее деградирует относительно других полимеров (например, PLGA), поэтому этот материал стал широко использоваться для разработки долгосрочных имплантатов [156]. Помимо этого, как наночастицы из ПКЛ использовали для доставки различных молекул, таких как белки, пептиды и вакцины. Для регулирования скорости деградации, а также улучшения проникновения

наночастиц из ПКЛ в клетки, стали разрабатывать сополимеры поли-(ε-капролактона) с другими биоразлагаемыми полимерами [157,158]. Также полимеры ПКЛ модифицировали антителами для адресной доставки к HER2-положительным опухолям [159,160].

1.6 Типы полимерных наночастиц

Понятие «полимерные наночастицы» охватывает ряд различных видов коллоидно стабильных частиц с разнообразными характеристиками, такими как форма, размер, поверхностные заряды и свойства [161]. Эти параметры имеют решающее значение в доставке наночастиц, так, например, размер является существенным фактором, который позволяет доставлять наночастицы в кровоток и целевые ткани и органы в организме. Гидрофильная поверхность частиц может быть использована для снижения опсонизации и иммунного распознавания, что позволяет увеличить время циркуляции наночастиц в кровотоке. Наличие положительного заряда на поверхности может усиливать эндоцитоз в клетках. Полимерные наночастицы сферической формы являются наиболее распространённой и хорошо изученной конструкцией из-за их простого синтеза и применения в медицине и фармакологии. В настоящее время условно выделяют несколько типов полимерных наночастиц, которые используются в исследованиях для лечения онкозаболеваний — это полимерные наночастицы, полимерные мицеллы, полимерные конъюгаты, дендримеры, полимерсомы, полиплексы и гибридные полимер-липидные системы [162]. На рисунке 5 представлены схемы биоразлагаемых полимерных наночастиц.

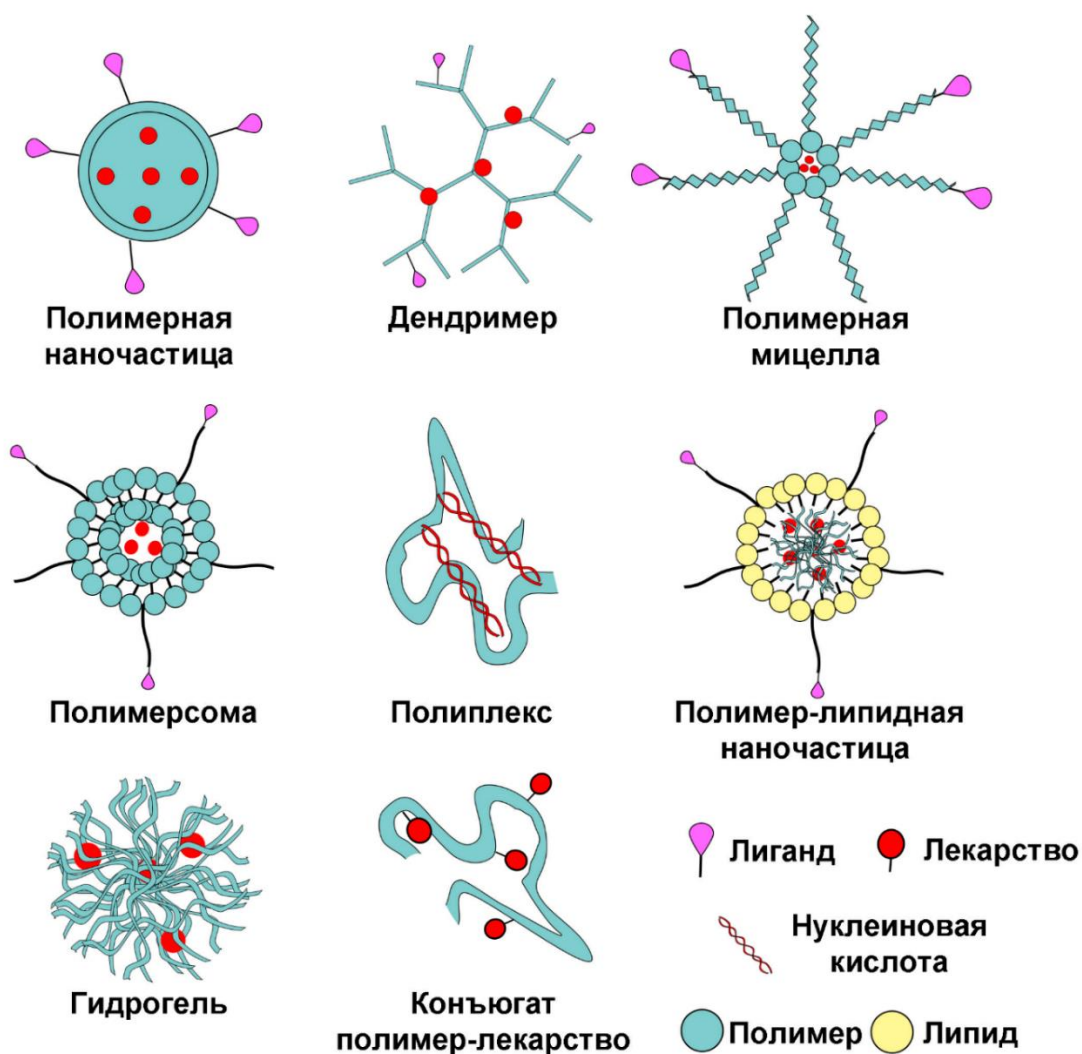


Рисунок 5. Схема различных типов полимерных наночастиц как носителей для адресной доставки лекарств.

Полимерные наночастицы – это наночастицы, образующие матрицу из синтетических или природных полимеров с гидрофобными и гидрофильными частями. Гидрофобная часть образует полимерное ядро, которое удерживает терапевтическое вещество и позволяет полимерным наночастицам доставлять плохо растворимые в воде молекулы, в то время как гидрофильная часть защищает ядро от деградации. Контролирование скорости высвобождения препарата достигается регулированием длины гидрофобной цепи. В полимерную матрицу могут быть загружены как гидрофобные, так и гидрофильные различные лекарственные вещества, в том числе и диагностические метки. Широко используемые синтетические полимеры – это полиэфиры, такие как PLA,

сополимеры PLGA и ПКЛ, а также полиакрилаты (РСА). Природные полимеры включают альбумин, альгинат или хитозан. Хитозан наиболее широко используется благодаря своей легкой модификацией, мукоадгезивным и антимикробным свойствам [163].

Дендримеры – гиперразветвленные полимеры, которые образуют монодисперсные сферические молекулы путем непрерывного добавления повторяющихся звеньев к центральному ядру. Дендримеры состоят из трех частей: ядра, внутренней оболочки и внешней оболочки. Свойства дендримеров в основном определяются функциональными группами на поверхности наночастиц [164].

На данный момент известно более 100 дендритных структур, но наиболее общепризнанными являются дендримеры полиамидоамина (ПАМАМ), дендримеры полипропиленimina (ППИ), а также дендримеры на основе полиамида и полиэфира [165].

Так как дендримеры имеют множество концевых групп и разнообразную химическую структуру, они позволяют использовать их как платформу для конъюгации ряда различных терапевтических соединений, особенно противоопухолевых, с помощью различных расщепляемых линкеров. Более того, дендримеры могут быть модифицированы различными лигандами для адресной доставки лекарств к опухолям. Применяется несколько способов для использования дендримеров в доставке противоопухолевых препаратов: лекарственные препараты конъюгируются с концевыми дендримерами; лекарственное средство физически инкапсулируется в пустоты дендримеров для формирования комплекса дендример – лекарство; химические группы лекарственных препаратов координируются с внешними функциональными группами посредством электростатических взаимодействий [164,165]. Так, были синтезированы дендримеры, конъюгированные антителом трастузумаб, для доставки противоопухолевого препарата нератиниба [166] и доцетаксела к раковым клеткам молочной железы [167].

Полимерные мицеллы. Полимерные мицеллы представляют собой самоагрегирующие коллоидные структуры, состоящие из амфифильных полимеров. Эти полимеры спонтанно образуют мицеллярную структуру при превышении критической концентрации мицеллообразования (ККМ). При низком значении ККМ в разбавленном водном растворе амфифильные полимерные молекулы существуют отдельно. Чтобы достигнуть критической концентрации, в систему добавляется больше полимерных цепей, это приводит к агрегации и осаждению мицелл. Гидрофобные фрагменты полимеров формируют внутреннее ядро сферы, а гидрофильные – внешнюю оболочку [168].

Полимерные мицеллы обладают низкой токсичностью, так как для получения применяются биоразлагаемые и биосовместимые сополимеры. Их гидрофильные участки представлены преимущественно молекулами полиэфиров, например, ПЭГ. А для формирования гидрофобных фрагментов используют полиэфиры, такие как полимолочная кислота, поли(ϵ -капролактон); фосфолипиды, такие как фосфоэтанолламин, глицеро-3-фосфоэтанолламин [164,168].

Мицеллы являются перспективными системами доставки терапевтических веществ – наличие гидрофобного ядра способствует инкапсуляции гидрофобных и плохо растворимых веществ, а также повышению их стабильности. Использование ПЭГ в качестве гидрофильного фрагмента в полимерных мицеллах снижает распознавание и связывание опсонинов в кровотоке и эффективно снижает узнавание клетками системы мононуклеарных фагоцитов [164].

Полимерсомы – это один из видов полимерных везикул, самоорганизующихся из амфифильных блок-сополимеров. Полимерсомы представляют собой полностью замкнутые гидрофобные мембраны с водным ядром внутри [169]. Толщину мембраны в полимерсомах можно регулировать, регулируя молекулярную массу амфифильных полимеров, что может влиять на их физико-химические свойства, такие как механическая стабильность и прочность [170]. Такая структура позволяет нагружать в полимерсомы различные виды терапевтических веществ с гидрофильными и гидрофобными свойствами [169]. Полимерсомы демонстрируют медленную диссоциацию и длительное удержание

терапевтических веществ, что обусловлено низкими критическими концентрациями мицеллообразования [171]. Было показано, что в везикулы могут быть эффективно инкапсулированы различные гидрофильные препараты, белки и нуклеиновые кислоты [172–175]. Полимерсомы активно применяются как наноносители в исследованиях доставки терапевтических [176–178] и диагностических веществ к различным типам опухолей [179].

Гидрогели. Гидрогели представляют собой трёхмерные сети, образованные гидрофильными полимерами посредством химической сшивки (ковалентная связь, ионная связь) или физической сшивки (водородная связь, силы Ван-дер-Ваальса, физическое запутывание). Гидрогели широко применяются для доставки лекарств благодаря своей способности удерживать большие объёмы воды и биологических жидкостей и контролировать высвобождение лекарств [180]. Для создания гидрогелевых наночастиц помимо гидрофильных полимеров, применяют амфифильные полимеры, которые состоят из гидрофильных и гидрофобных цепей, способные набухать и взаимодействовать как в водных, так и в органических растворах [181].

Полиплексы. Доставка нуклеиновых кислот в клетки является новым и многообещающим подходом в терапии онкозаболеваний. На данный момент несколько методов генной терапии, основанных на вирусных векторах, вышли в клиническую практику [182]. Однако внутривенная доставка препаратов на основе нуклеиновых кислот к опухолям остается сложной задачей, включающая множество ограничивающих внеклеточных и внутриклеточных барьеров, от макроуровня пациента до микроуровня ткани, а также наноуровня органелл [183]. Поэтому для защиты и доставки препаратов в неизменном виде в орган-мишень были разработаны наноносители на основе полимеров – полиплексы [182]. Полиплексы представляют собой комплексы, которые спонтанно образуются посредством взаимодействия между анионной нуклеиновой кислотой и катионным полимером [184], образуя сферические, часто положительно заряженные наночастицы. В качестве катионных полимеров чаще используют производные поли-L-лизина (ПЛЛ), полиэтиленимин (ПЭИ) и его производные [182] и хитозана

[185]. Дополнительно, полиплексы могут быть модифицированы белком для обеспечения селективности доставки генов в клетки. Так, например, была сконструирована модель для переноса генов, основанная на полимере ПЭИ и моноклонального антитела трастузумаб, нацеленного на HER2-положительные раковые клетки [186].

Конъюгат полимер-лекарство. Конъюгат полимер-лекарство – еще один тип носителей на основе полимеров, который активно применяется для исследования доставки лекарственных препаратов. Основной характеристикой таких наночастиц является то, что лекарство ковалентно конъюгировано с полимерным носителем, а не физически инкапсулировано в полимерную структуру. Обычно такие наночастицы состоят из 3-х участков: солюбилизирующая, терапевтическая и нацеливающая часть. Солюбилизирующую часть добавляют для повышения растворимости конъюгата в воде. Выбор терапевтической и нацеливающей части зависит от функциональных групп на поверхности лекарств и адресных меток, которые взаимодействуют с полимером через линкеры [187,188]. Для формирования конъюгатов обычно используют как натуральные, так и синтетические полимеры: декстран, гиалуроновая кислота, ПЭГ, ПЭИ, полиакриловая кислота (ПАА), ПКЛ, PLA, а также различные сополимеры: PLGA, N- (2-гидроксипропил) метакриламид (HPMA) и другие [189]. Так, для доставки паклитексала использовали сополимер HPMA, конъюгированный с аффибоди $Z_{HER2:342}$, для направленной доставки к HER-положительным клеткам [190]. Также были разработаны наночастицы мицелл на основе конъюгата полимер-лекарство, конъюгированные с полноразмерным моноклональным антителом трастузумаб, для доставки камптотецина к раковым клеткам [191].

Гибридные полимер-липидные наночастицы. Гибридные наночастицы (ГН) представляют собой системы доставки нового поколения, которые состоят из полимеров, способные включать как гидрофильные, так и гидрофобные лекарственные средства, и липидов, окружающие полимерное ядро. ГН являются многообещающими наночастицами, так как объединяют преимущества двух

компонентов – биоразлагаемость, биосовместимость, доставка гидрофильных и липофильных препаратов, а также увеличение времени высвобождения лекарства [192]. Наиболее распространенными биосовместимыми и биоразлагаемыми типами полимеров, используемых в синтезе гибридных наночастиц, являются ПКЛ, PLGA, PLA и хитозан. Взаимодействие между липидными и полимерными компонентами в таких системах обеспечивается комплексом нековалентных сил, включая гидрофобные, электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. При этом формируется структура типа "ядро–оболочка", где полимерное ядро наночастицы окружено поверхностным липидным слоем [193]. Дополнительно внешний липидный слой может быть модифицирован ПЭГ для улучшения времени системной циркуляции частиц и повышения эффективности их проникновения в клетки [194].

Для создания специализированной системы доставки лекарств внешняя липидная мембрана также может быть изменена путем присоединения определенных антител, аптамеров и биоактивных материалов, таких как ДНК, РНК или белки, которые могут быть связаны ковалентно или нековалентно [193]. Так, например, были разработаны полимер-липидные анти-HER2 наночастицы для целенаправленной доставки салиномицина [195] и доцетаксела к HER2-положительным клеткам [196].

1.7 Методы анализа воздействия наночастиц на опухолевые клетки *in vitro*

Модели клеточных культур

Разработка лекарственных препаратов является длительным и трудоёмким процессом, занимающим более 10 лет до завершения всех этапов клинических испытаний. До настоящего времени тестирование препаратов преимущественно проводится на двумерных клеточных культурах, культивируемых на адгезивных плоских поверхностях. Формирование таких культур занимает от нескольких минут до нескольких часов, что в сочетании с высокой воспроизводимостью, производительностью, а также простотой интерпретации и обработки результатов делает их широко используемой моделью в доклинических исследованиях [197].

Однако эти модели имеют серьезные недостатки, которые не отражают морфологию тканей и органов в организме и, тем самым, способствуют получению ложных результатов относительно прогнозируемых реакций клеток на различные препараты [198]. Отсутствие клеточного разнообразия: как правило двумерные модели часто представлены одним или двумя типами клеток, что приводит к ограниченному взаимодействию клеток между собой, что не отражает реального поведения клеток *in vivo*. Зависимость от нефизиологических типов клеток: статичная микросреда в двумерных моделях затрудняет использование первичных человеческих клеток, сохраняющих физиологически релевантные свойства *in vitro* или клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Это часто ограничивает применение раковых или бессмертных клеточных линий, не воспроизводящих поведение нетрансформированных клеток в организме человека. Такие параметры *in vitro*, как неограниченный доступ к кислороду, питательным веществам, метаболитам и сигнальным молекулам отличаются от *in vivo* условий: все клетки находятся в пределах нескольких сотен микрометров от кровеносных сосудов или перфузируемых жидкостей, в результате чего они оказываются в условиях перекрывающихся градиентов кислорода, глюкозы и питательных веществ. Положение клеток вдоль этих градиентов влияет на экспрессию генов. Напротив, клетки, выращенные в двумерной клеточной культуре, подвергаются воздействию очень небольшого количества градиентов и часто выращиваются при аномально высоких концентрациях кислорода, сахара и других питательных веществ. Также отсутствие механического воздействия: в неподвижной двумерной среде отсутствуют естественные механические сигналы, такие как поток жидкости или периодические сокращения, которые, как известно, влияют на поведение клеток [199].

Таким образом, возникла необходимость в создании трёхмерных платформ (3D-моделей, сфероидов), учитывающих как преимущества, так и ограничения двумерных клеточных культур, для их широкого применения в доклинических исследованиях. За последние 30 лет возросло количество исследований, направленных на создание 3D-моделей, имитирующие сложные структуры тканей

и органов. На сегодняшний день разработаны различные системы, в которых формируются трехмерные клеточные модели: бескаркасные и каркасные, имитирующие внеклеточный матрикс.

В бескаркасных системах применяются низкодгезивные платформы, в которых 3D клеточные модели самоорганизуются за счет взаимодействия «клетка-клетка», при этом не формируя контактов с поверхностью платформы. Для образования сфероидов без каркаса используют различные методы, такие как метод висячей капли [200], использование низкодгезивных поверхностей, покрытых, например, агарозой [201] или агаром [202], а также методы на основе перемешивания суспензии: биореакторы [203], микрофлюидные системы [204]. На рисунке 6 представлены некоторые методы получения клеточных сфероидов.



Рисунок 6. Методы культивирования и изготовления клеточных сфероидов. (а) Силовая агрегация: использование культивирования в виде гранул и центрифугирования для стимулирования агрегации клеток. (б) Висячая капля: капли, содержащие клетки, суспендируются для образования сфероидов. (в) Микросреда с низкой адгезией: создание сфероидов с использованием поверхностей со сверхнизкой адгезией или лунок, покрытых агарозой, для предотвращения адгезии клеток. (г) Динамическое культивирование: использование сосудов с вращающимися стенками и качающихся систем

культивирования для улучшения обмена питательных веществ и газов. (д) Магнитная левитация: использование магнитов и магнитных наночастиц для левитации клеток, способствующее образованию сфероидов без физической поддержки. (е) Микрофлюидика: использование микрофлюидных каналов для точного контроля среды культивирования клеток. (ж) Полимерные каркасы: использование микроструктурированных термочувствительных платформ для культивирования клеток или поверхности хитозана для обеспечения структурной поддержки сфероидов. Адаптировано из [205].

Каркасные системы являются важными компонентами в системах 3D-культивирования клеток, так как позволяют клеткам встраиваться в поддерживающую матрицу, тем самым имитируя ткань с клетками и внеклеточным матриксом [206]. Для создания таких матриц используются различные биоматериалы, например, полимеры, коллаген [207], шелк, желатин; полисахариды: хитозан и гиалуроновая кислота [208]. Также был разработан такой гидрогель как матригель, который является экстрактом, полученным из мышины саркомы Энгельбрета-Холма-Сворма (EHS), который представляет собой сложную смесь белков внеклеточного матрикса, и который играет роль матрицы для 3D клеточных моделей [205]. Еще одним типом каркасных систем являются децеллюляризованные ткани – это ткани, из которых были удалены клеточные компоненты и сохранён только внеклеточный матрикс [209].

Клеточная культура на основе трехмерных платформ стала ценным инструментом в исследовании различных заболеваний, в том числе и онкологических, обеспечивая более физиологически релевантную модель для изучения поведения опухоли, реакции на лекарственные препараты и взаимодействия между раковыми клетками и окружающей средой [210].

Сфероиды являются структурными элементами 3D-моделей и применяют для предварительной оценки проникновения и терапевтического воздействия низкомолекулярных и высокомолекулярных противораковых препаратов. Так, например, было показано, что химиотерапевтический препарат доксорубин (~ 550 Да) эффективно проникает почти через всю глубину сфероида диаметром 300 – 400 мкм.

Также, на сфероидах проводят анализ токсичности различных наночастиц. Однако наночастицы 100 – 200 нм не способны проникнуть вглубь сфероида, из-за плотных межклеточных контактов. Чтобы реализовать направленную доставку частиц в глубину сфероидов, применяют специальные вещества, которые временно разрушают межклеточные контакты, способствуя проникновению крупных молекул в опухоль [209,210]. Высокую эффективность этого метода подтверждают Reed et al.: в их исследовании белок-открыватель помог преодолеть плотные барьеры опухоли и обеспечил глубокое проникновение не только наночастиц, но и гораздо более крупных терапевтических CAR-T клеток [211].

Таким образом, трехмерные клеточные модели позволяют проанализировать эффективность воздействия и токсические эффекты различных терапевтических агентов. Данная модель может способствовать ускорению процессов разработки и тестирования лекарств, а также уменьшению экспериментов на животных моделях.

1.8 Методы синтеза полимерных наночастиц

Полимерные наночастицы могут быть получены различными методами из синтезированных полимеров, включая эмульсионное испарение растворителя, высаливание, нанопреципитацию, распылительную сушку (*spray-drying*), а также микро- и нанофлюидные технологии. В зависимости от выбранного метода могут использоваться различные подходы к формированию частиц, включая органическую и водную фазы, применение стабилизаторов, а также этапы эмульгирования или прямого осаждения полимера. При этом ключевыми факторами, влияющими на размер и свойства наночастиц, являются молекулярная масса полимера, условия синтеза и его химическая природа.

Микроэмульсионный метод с последующим испарением растворителя.

Микроэмульсионный метод является одним из самых распространённых методов получения полимерных наночастиц для доставки различных активных веществ к органам-мишеням. Полимер и терапевтическое вещество растворяются в органическом растворителе, а эмульсии готовятся с использованием водного раствора поверхностно-активных веществ. В качестве растворителя гидрофобных

полимеров и лекарств применяют дихлорметан, хлороформ, этилацетат и другие растворители [212].

Микроэмульсионный метод с последующим испарением растворителя включает две основные стратегии для формирования эмульсий: 1) это приготовление простых эмульсий, состоящих из 1 этапа («масло-в-воде» (o/w)); 2) приготовление двойных эмульсий («вода-в-масле-в-воде», (w/o/w)). Для получения эмульсии используется ультразвуковая обработка либо гомогенизация, в которой происходит смешивание лекарства в полимерном растворе с образованием эмульсии масла в воде в присутствии поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат-80, поллоксамер-188 или поливиниловый спирт. После органический растворитель выпаривается в течение нескольких часов, и далее наночастицы отмывают от избытка стабилизатора и собирают с помощью центрифугирования. Использование метода двойной эмульсии является предпочтительным для синтеза наночастиц, нагруженных водорастворимыми лекарственными препаратами. Для гидрофобных препаратов используется стратегия o/w, где препарат и полимер растворены в органическом растворителе и после смешаны с ПАВ [213].

Нанопреципитация. Метод нанопреципитации, также называемый вытеснением растворителя, основан на осаждении полимера на границе раздела фаз после вытеснения органического растворителя из липофильного раствора в водную фазу. Этот метод применяется для инкапсулирования липофильных лекарств, и не используют для растворимых в воде препаратов. Он включает добавление полимера и терапевтического вещества в органический растворитель, такой как дихлорметан, ацетон или ацетонитрил. Затем его добавляют к водному раствору, содержащему стабилизатор (ПАВ), который подвергается перемешиванию. Межфазная турбулентность между двумя фазами из-за диффузии вызывает осаждение полимера на границе раздела [214]. По мере диффузии растворителя из нанокapпель полимер осаждается в форме нанокapсул или наносфер со средним размером 170 нм. Наносферы получают при растворении или диспергировании активного вещества в полимерном растворе, тогда как нанокapсулы синтезируют, когда лекарственное вещество предварительно

растворено в масле, которое затем эмульгируют в органическом полимерном растворе, после чего внутренняя фаза диспергируется во внешней фазе эмульсии [215].

Высаливание. Метод высаливания основан на отделении растворенного полимера от водного раствора посредством эффекта высаливания, который приводит к получению наносфер. При таком синтезе образуется эмульсия типа «масло-в-воде», которая формируется из смешивающегося с водой полимерного растворителя, такого как ацетон или этанол, высаливающего агента (электролиты – хлорид магния, хлорид кальция и ацетат магния, неэлектролиты – сахароза) и коллоидного стабилизатора (гидроксиэтилцеллюлоза или поливинилпирролидон). Эмульсия «масло-в-воде» образуется при интенсивном перемешивании при комнатной температуре. Затем эмульсию вносят соответствующим объемом в водный раствор, чтобы обеспечить диффузию органического растворителя во внешнюю фазу, приводя к осаждению полимерных наносфер. Средний размер наносфер может варьироваться 170 до 900 нм [216].

Условия синтеза, такие как скорость перемешивания, соотношение внутренней и внешней фаз, концентрация и вид полимеров в органической фазе, тип стабилизатора в водной фазе и концентрация электролита влияют на состав полученных наночастиц. Было показано, что частицы с использованием полимеров PLGA и поли(этиленоксид)-PLGA (PEO-PLGA) имеют разные свойства. Так, наночастицы PEO-PLGA имеют наименьший размер, а PLGA деградировали быстрее по сравнению с другими наночастицами [216].

Распылительная сушка. Распылительная сушка (*spray-drying*) – это процесс, основанный на преобразовании жидкого материала в сухой порошок путем распыления раствора, эмульсии или суспензии в горячую сушильную газовую среду, которой обычно является воздух. Процесс распылительной сушки состоит из четырех основных этапов. Начальным этапом является распыление жидкого материала в аэрозоль, далее происходит смешивание капель аэрозоля с потоком нагретого газа. Капли аэрозоля формируют сухие частицы путем испарения

жидкости. В заключительном этапе происходит сбор и разделение сухих частиц по размерам [217].

На основе метода распылительной сушки был разработан прибор Nano Spray Dryer B-90, представляющий собой нанотехнологию для получения наночастиц в диапазоне от 200 нм до 5 мкм, для доставки лекарственных средств [218]. Так, были получены различные наночастицы PLA/PLGA для инкапсуляции терапевтических веществ [219]. Например, были разработаны двойные наночастицы PLA/PLGA и сывороточного альбумина человека (HSA), нагруженные siRNA, для доставки нуклеиновых кислот в клетки [220]. Также были разработаны наночастицы PLGA, нагруженные кумарином 6, для доставки соединения в легкие [221]. Ohashi et al. приготовили сухие порошки, состоящие из полимерных наночастиц PLGA, нагруженные противотуберкулезным веществом рифампицином, для доставки в легкие *in vivo* [222].

Микрофлюидные технологии. Микрофлюидные технологии стали применяться для разработки наноносителей лекарственных препаратов размером от 40 до 200 нм. Микрофлюидика управляет жидкостями в микрометровых каналах, используя такие принципы, как ламинарный поток, диффузия и капиллярный эффект в устройствах типа «лаборатория на чипе». Микрофлюидика делится на два основных типа: микрофлюидика с непрерывным (однофазная) и сегментированным потоком. Первый тип основан на фокусировке смешиваемой жидкости, в то время как сегментированный поток фокусируется на двухфазной жидкости, где несмешиваемая жидкость или газ вводится в смешивающуюся жидкость для создания равномерно сегментированного интерфейса. Капельная микрофлюидика, одна из видов микрофлюидных технологий с сегментированным потоком, широко применялась для изготовления наночастиц для доставки лекарств [223]. С помощью микрофлюидного метода были получены наночастицы альбумина, нагруженные противораковым препаратом кабазитакселом, со средним размером 145 нм для лечения рака предстательной железы. Для формирования 1 фазы в одном из каналов микрофлюидного чипа кабазитакс и альбумин находились в смешанном состоянии. Для получения 2 фазы кабазитакс взаимодействовал с

альбумином под действием силы трения микрофлюидного чипа для образования наночастиц, нагруженных препаратом. Полученные наночастицы были выведены из выходного отверстия чипа и далее образовали стабильные частицы после ледяной бани [224].

1.9 Методы характеристики полимерных наночастиц

Размер и дисперсность. Одним из основных методов для определения размера и полидисперсности частиц является динамическое рассеяние света (ДРС). Суспензия с частицами освещается монохроматическим лазерным светом, который рассеивается в детекторе фотонов. За счет броуновского движения частиц возникают временные флуктуации интенсивности рассеянного света, которые анализируются с помощью автокоррелятора, определяющий автокорреляционную функцию сигнала. На основе уравнения Стокса – Эйнштейна можно получить гидродинамический диаметр наночастиц в коллоидном растворе [225]. Методом ДРС также можно оценить индекс полидисперсности (ИП). Индекс полидисперсности является мерой гетерогенности коллоидной суспензии на основе размера. Полидисперсность может возникать из-за распределения размеров, агломерации либо агрегации образца во время анализа. Значения ИП $<0,05$ чаще характеризует систему как моодисперсную, тогда как значения ИП $>0,7$ типичны для широкого распределения размеров (полидисперсного) частиц [226].

ζ -потенциал (дзета-потенциал). Помимо размера и полидисперсности, важным параметром наночастиц является поверхностный заряд и стабильность коллоидной суспензии полимерных наночастиц, который определяется с помощью анализа ζ -потенциала. ζ -потенциал является количественной мерой (мВ) и определяет суммарный заряд на границе раздела дисперсионной среды и неподвижным слоем жидкости, остающийся на поверхности диспергированной частице. Измерение проводится с помощью электрофоретического рассеяния света (ELS – electrophoretic light scattering) – к суспензии частиц в кювете с двумя электродами прикладывается электрическое поле, и частицы, имеющие ненулевой суммарный заряд, мигрируют к противоположно заряженному электроду со

скоростью, называемой подвижностью, пропорциональной величине ζ -потенциала [227].

Наночастицы с ζ -потенциалом более ± 30 мВ считаются сильно катионными и сильно анионными, соответственно. Они обладают более сильным электростатическим отталкиванием, что тем самым способствует их стабилизации и предотвращению агрегации. Напротив, потенциал частиц с нейтральным или слабо заряженными зарядом ($\zeta \leq \pm 10$ мВ) являются нестабильными и склонны к коагуляции, флокуляции или агломерации после длительного хранения. Заряд полимерных наночастиц может меняться за счет функционализации положительно или отрицательно заряженными группами посредством сорбции различных веществ, например, покрытием ПЭГом, хитозаном или альбумином, а также конъюгацией таргетными молекулами. Однако необходимо учитывать увеличение размеров наночастиц после покрытия дополнительными веществами, а также их стабильность.

ζ -потенциал является ключевым фактором наночастиц, оказывающим существенное влияние на систему доставки лекарств *in vivo*, например, при циркуляции частиц в кровотоке и их взаимодействии с клеточными мембранами. Так, доставка лекарств через различные слизистые лучше осуществляется с помощью положительно заряженных частиц, так как поверхность слизистой содержит анионные структуры, включая сиаловую кислоту и сульфоновую кислоту, способствующие иммобилизации в слое слизи. Более того, положительно заряженные частицы лучше интернализуются через отрицательно заряженную клеточную мембрану, но также легко захватываются макрофагами системы мононуклеарных фагоцитов, что затрудняет реализацию длительной циркуляции частиц с терапевтическими веществами *in vivo* [228]. Отрицательные и нейтральные частицы имеют преимущество в циркуляции в кровотоке, но, с другой стороны, имеют недостаток в захвате клетками-мишенями.

Морфология полимерных наночастиц. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) – это метод, позволяющий визуализировать поверхность, при котором электронный луч взаимодействует с образцом, создавая различные

сигналы, которые отражают атомный состав и морфологию поверхности образца. В этом процессе СЭМ использует обратно рассеянные электроны и вторичные электроны, испускаемые образцом, которые регистрируются на детекторе для формирования трехмерного изображения исследуемого объекта. Полимерные наночастицы обладают низкой электропроводностью, что приводит к эффекту накопления заряда и искажению изображения в виде засветов, дрейфа и размывания границ, особенно при высоких ускоряющих напряжениях. Кроме того, из-за низкой электронной плотности они характеризуются слабым контрастом, что затрудняет их визуализацию на фоне подложки. Для повышения качества изображения часто используют проводящее покрытие (Au, Pt, C), однако оно может изменять видимую морфологию и увеличивать кажущийся размер частиц. Дополнительные искажения связаны с высушиванием образца в вакууме, которое может вызывать усадку, агрегацию и деформацию наночастиц, отклоняя их от нативного состояния [225].

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (ТЭМ) представляет двумерные изображения полимерных частиц, которые формируются из электронов, прошедших через образец. Субнанометровое разрешение ПЭМ дает информацию о внутренней структуре полимерных частиц, например, для исследования полимерной стенки нанокapsул [229]. Недостатками ТЭМ являются чувствительность к электронному пучку полимерных частиц, приводящая к деградации образца; необходимость испарения растворителя при подготовке образца, что приводит к занижению реальных размеров наночастиц, а также может вызвать кластеризацию и фазовую сегрегацию частиц, искажая их исходное распределение в растворе [230,231].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) также является методом изучения морфологии поверхности полимерных наночастиц с нанометровым разрешением. Получение изображений с помощью АСМ осуществляется путем измерения сил притяжения/отталкивания между очень острым зондирующим наконечником и поверхностью образца. Сила измеряется путем прикрепления зонда к упругой консоли и отслеживания ее отклонения с помощью системы лазер-фотодиод,

которая фиксирует разницу в выходных напряжениях фотодетектора. Для АСМ не требуется специальной процедуры подготовки образцов, и он позволяет исследовать широкий спектр различных материалов. Важным ограничением АСМ для исследования полимерных наночастиц является размер самих частиц – размер кончика консоли часто больше, чем зондируемые частицы, что приводит к завышению поперечных размеров [225].

Эффективность инкапсуляции и профиль высвобождения.

Эффективность инкапсуляции терапевтического вещества является важным параметром доставки лекарственных препаратов, заключенных в полимерную матрицу. Эффективность инкапсуляции – это процент вещества, успешно заключённого в наночастицы, рассчитываемый как отношение количества инкапсулированного вещества к исходному количеству добавленного вещества и умноженное на 100 %. Обычно измерения проводят с использованием спектроскопических методов или хроматографии. На эффективность инкапсуляции влияют различные факторы, такие как соотношение полимера и терапевтического вещества, методы получения наночастиц, составы и количества полимеров, соотношения сополимеров в частице, а также свойства наночастиц, например, размер и ζ -потенциал. Например, было показано, что с увеличением количества полимера в частицах PLGA увеличивалась эффективность загрузки терапевтическим веществом – паклитакселом [232].

Исследование высвобождения лекарственного вещества *in vitro* позволяет оценить скорость и степень его высвобождения из наночастиц. Кинетика высвобождения *in vitro* является предпосылкой для установления корреляций *in vitro–in vivo*, которые служат иллюстрацией эффективности фармацевтических форм *in vivo*. Для оценки высвобождения препаратов из наночастиц чаще применяют метод центрифужной ультрафильтрации. Цель метода заключается в отделении и количественном определении высвобождающегося терапевтического вещества из наночастиц во времени для характеристики профиля высвобождения; полученные данные могут быть использованы для прогнозирования поведения системы *in vivo*.

Тесты in vitro на биосовместимость и базовую цитотоксичность.

Тестирование цитотоксичности различных лекарственных препаратов, в том числе и веществ, загруженных в полимерную наночастицу, на клеточных линиях является необходимым условием оценки токсического воздействия веществ *in vitro*.

Один из анализов на цитотоксичность наночастиц является количественная оценка жизнеспособности клеточных линий с помощью МТТ-теста. МТТ-тест является колориметрическим анализом, отражающий митохондриальную активность клеток. Этот метод основан на способности метаболически активных клеток преобразовывать желтый водорастворимый тетразолиевый краситель (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) в нерастворимый формазан [233]. Для количественного определения живых клеток формазан растворяют в органическом растворителе, преобразуя краситель в цветной раствор, который количественно измеряют с помощью спектрофотометра.

Также для исследования цитотоксичности используют клоногенный анализ, который является количественным методом оценки способности клеток к образованию колоний после цитотоксического воздействия различных агентов. Клетки инкубируют в 6- или 12-луночных планшетах до достижения размера колоний клеток, сформированных из единичной клетки, не менее чем из 50 клеток. Далее колонии подвергают промывке фосфатным буфером, фиксацией метанолом или этанолом с последующей окраской 0.5 % – 1 % кристаллическим фиолетовым [234]. Для оценки жизнеспособности клеток также применяют различные красители, в том числе и флуоресцентные, интенсивность флуоресценции которых оценивают с помощью методов проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Так, например, красный флуоресцентный краситель пропидий йодид, проникающий через поврежденные мембраны и интеркалирующий в ДНК нежизнеспособных клеток, является маркером для определения апоптотических клеток. Белок аннексин V, меченый флуоресцентным красителем, специфически взаимодействует с фосфатидилсерином на внешней стороне мембраны, тем самым позволяет обнаружить раннюю стадию апоптоза клеток [235].

1.10 Применение полимерных наночастиц в онкотерапии

Полимерные наночастицы могут инкапсулировать различные терапевтические агенты, повышать биодоступность и способствовать контролируемому высвобождению, тем самым повышая терапевтическую эффективность и сводя к минимуму побочные эффекты.

Доставка низкомолекулярных соединений. Полимерные наноносители применяются в клинической практике для инкапсуляции низкорастворимых в воде низкомолекулярных препаратов. Так, одним из наиболее известных комплексов полимера и лекарства, одобренного FDA, является альбумин с химиотерапевтическим препаратом паклитакселом (Abraxane). Так же, например, были разработаны полимерные мицеллы Genexol-PM (Samyang Biopharm, Юж. Корея), состоящие из сополимера ПЭГ и PLA, и NK105 (Nippon Kayaku Co., Япония), состоящие из сополимера ПЭГ и модифицированного поли(аспартата), нагруженные паклитакселом, которые применяются для лечения рака молочной железы, рака яичников, рака поджелудочной железы и распространенного немелкоклеточного рака легких [236]. Также были одобрены FDA ПЭГилированные липосомы – Doxil/Caelyx, Lipodox, с инкапсулированным доксорубицином, для лечения рака яичников, рака молочных желез, саркомы Капоши, а также множественную миелому [237].

Доставка нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты, такие как ДНК и siRNA, привлекают большое внимание как перспективные инструменты для лечения генетических заболеваний и в терапии рака. Известно, что этот метод имеет ряд ограничений, например, низкое поглощение клетками, деградация сывороточными нуклеазами и быстрый почечный клиренс после введения препарата. Для преодоления этих трудностей стали применять биоразлагаемые полимерные наночастицы в качестве безопасных и эффективных носителей лекарств, защищая нуклеиновые кислоты от деградации и поглощения нуклеазами без использования агентов трансфекции [238].

Например, были разработаны наночастицы PLGA, доставляющие анти-miR-155 в клетки, которые эффективно ингибировали микроРНК в терапии лимфомы *in*

vivo [239]. Liang et al. синтезировали биоразлагаемые наночастицы PLGA/PEI, нагруженные вектором экспрессии miR-26a, который вызывает остановку клеточного цикла в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 *in vitro* [240]. Также были получены биоразлагаемые наночастицы из триблочных сополимеров mPEG-PLGA-PLL с siRNA, которые были применены в качестве новых невирусных векторов для улучшения доставки siRNA и подавления генов в клетках рака легких человека SPC-A1[241]. Циклодекстринсодержащие полимерные наночастицы CALAA-01, модифицированные человеческим трансферрином и доставляющие siRNA, являются первыми целевыми частицами, которые успешно завершили доклинические испытания и вступили в клинические испытания на людях для лечения солидных опухолей [242]. Этот успешный переход от доклинических разработок к клиническому применению стал важной вехой в развитии наномедицины и подтвердил потенциал направленных систем доставки генетического материала. Дальнейшее развитие технологий доставки нуклеиновых кислот сопровождалось появлением методов точного редактирования генома, среди которых центральное место заняла система CRISPR/Cas9.

В 2020 году за внедрение методов редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas9 Дженнифер Дудна и Эмманюэль Шарпантье были удостоены Нобелевской премии по химии. А уже в 2023 году FDA впервые одобрило первую генную терапию, Casgevy, с использованием CRISPR/Cas9 для лечения пациентов с серповидноклеточной анемией [243]. Однако данная технология имеет свои ограничения, такие как преодоление барьеров тканей и клеточной мембраны, чтобы достичь ядерный геном. Помимо это, например, наиболее широко используемый метод доставки CRISPR/Cas9, включающий вирусные векторы, может приводить к нежелательным мутациям и иммуногенности [244]. Таким образом, невирусная доставка генов с помощью наночастиц является многообещающим подходом для лечения различных заболеваний. Загрузка системы в полимерные матрицы показала эффективную интернализацию в клетки, а также подавления роста опухолей. Например, разработанные магнитные

наночастицы, покрытые полиэтиленэмином, доставляющие CRISPR/Cas9, показали улучшенное проникновение в клетки, а также эффективное подавление роста опухоли *in vivo* [245]. Также были разработаны наночастицы хитозана, загруженные плазмидой sg-VEGFR2/Cas9, для нокаута гена фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2). Было показано эффективное подавление роста опухолевых клеток печени *in vitro* и *in vivo* [246].

Доставка белков и пептидов. Препараты на основе белков и пептидов применяются в доклинической и клинической терапии онкологических заболеваний. Однако применение белковых лекарств ограничено коротким периодом полувыведения, нестабильностью, иммуногенностью, низкой растворимостью и сложной внутриклеточной доставкой. Полимерные наноносители являются решением доставки белковых и пептидных препаратов к органам-мишеням. Например, были разработаны наночастицы PLGA, инкапсулирующие анти-PD-1 (блокирование иммунных контрольных точек PD-1/PD-L1), для иммунотерапии злокачественных новообразований [247].

1.11 *In vivo* исследования и примеры клинического применения

In vivo исследования полимерных наноносителей направлены на оценку их фармакокинетики, биораспределения, биосовместимости и терапевтической эффективности в условиях целого организма. Полимерные системы на основе PEG, PLGA и их блок-сополимеров широко изучаются как носители лекарственных веществ благодаря их биосовместимости, контролируемому высвобождению и способности увеличивать время циркуляции в кровотоке и изменять распределение препарата в организме [248]. В ряде исследований *in vivo* показано, что PEG- и PLA/PLGA-содержащие наночастицы способны существенно продлевать системную циркуляцию и улучшать фармакокинетический профиль по сравнению со свободными формами препаратов [249]. Клинически значимым примером является липосомальный доксорубин (Doxil) который демонстрирует значительно увеличенное время циркуляции и сниженную токсичность по сравнению с свободным доксорубином благодаря покрытию ПЭГом [250].

Дополнительно, полимерные системы PEG-PLGA показали хорошую биосовместимость и низкую системную токсичность в доклинических моделях, что подтверждает их потенциал для дальнейшего клинического применения в онкологии [251].

Клинические испытания PLGA и других полимерных наночастиц представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Полимерные наночастицы для доставки лекарственных средств.
Адаптировано из [238].

Терапевтическое вещество	Полимерная наночастица (Продукт/Компания)	Размер, нм	Нозология/целевые клетки	Статус
Паклитаксел	PEG-PLA (Genexol-PM/Samyang)	23.91 ± 0.4	Рак груди, рак легких	Клинически одобрено
	NIPAM и VP (Nanoxel/Fresenius Kabi Oncology)	80	Рак молочной железы на поздней стадии	Фаза I
	Полимерные мицеллы (Paclical/Oasmia Pharmaceutical)	20-60	Рак яичников	Фаза III
	PEG-PAA (NK-105/NanoCarrier)	Нет данных	Рак желудка, рак груди	Фазы II и III
	PEG-b-PLC	80-90	ES-2 и SKOV3	<i>In vitro/in vivo</i>
	PEG-PGlu-PPhe	~ 90	A2780	<i>In vitro/in vivo</i>
	PEG-PE	15–20	SKOV3	<i>In vitro</i>
Доксорубицин	Полимерные мицеллы (SP1049/Supratek Pharma)	Нет данных	Аденокарцинома на поздней стадии	Фаза III
	mPEG-PCL	25	4T1	<i>In vitro/in vivo</i>
	mPEG-b-pHPMAmLacn	51	A549	<i>In vitro/in vivo</i>
	mPEG-SSP(BLA-co-APILA)	170 ± 20	HeLa	<i>In vitro</i>
	PEG-PAC/PEG-PUC	77.0 ± 0.7	BT-474 и MCF-7	<i>In vitro/in vivo</i>
TLC388	Полимерные мицеллы (Taiwan Liposome)	Нет данных	Рак печени, рак почки	Фазы I и II
СYA	mPEG-b-P(CB-co-LA)	54.3	L3.6pl и MIA	<i>In vitro/in vivo</i>

			PaCa-2	<i>vivo</i>
Оксалиплатин	Полимерные мицеллы (NC-4016/NanoCarrier)	Нет данных	Солидные опухоли, лимфома	Фаза I
	mPEG-b-P(LA-coMCC/OH	200-240	SKOV3	<i>In vitro</i>
DACHPt	PEG-b-PBLG	30 и 70	C-26	<i>In vivo</i>

*ПЭГ, поли(этиленгликоль); NIPAM, N-изопропилакриламид; ВП, винилпирролидон; PEG-РАА, поли(этиленгликоль)/поли(акриловая кислота); PEG-b- PCL, поли(этиленгликоль)-блок-поли(ε-капролактон); ES-2 и SKOV3, рак яичников человека; PEG-PGlu-PPhe, PEG-b-поли(глутаминовая кислота)-b-поли(фенилаланин); A2780, карцинома яичников человека; ПЭ, фосфоэтаноламин; 4T1, опухоль молочной железы; mPEG-b-pHPMAmLacn, PEG-b-поли[N-(2-гидроксипропил)-метакриламидлактат]; A549, немелкоклеточный рак легкого; mPEG-SSP(BLA-co-APILA), метилокси-поли(этиленгликоль)-b-поли[(бензил-L-аспартат)-co-(N-(3-аминопропил) имидазол-L-аспартамид)]; PAC, поли(карбонат); PUC, поли(карбонат); BT-474 и MCF-7, рак молочной железы человека; CYA, циклоамин; mPEG-b-P(CB-co-LA), метоксиполиэтиленгликоль-b-поли(карбонат-кол-молочная кислота); L3.6pl, рак поджелудочной железы; MIA PaCa-2, рак поджелудочной железы; DACHPt, (1,2-диаминоциклогексан) платина(II); PBLG, поли (бензил L-глутамат); C-26, аденокарцинома толстой кишки у мышей.

В Таблице 2 представлены препараты на основе PLGA, одобренные для клинического применения в терапии различных заболеваний.

Таблица 2. Препараты на основе PLGA, одобренные для клинического применения.

№	Название препарата на основе PLGA /Фирма и страна производитель	Действующее вещество	Тип частиц/ Способ применения	Нозология	Год
1	Sandostatin Lar® (Novartis Pharmaceuticals, Switzerland)	Октреотида ацетат	МЧ; п/к	Акромегалия	1998
2	Signifor Lar® Kit (Novartis Pharmaceuticals, Switzerland)	Пасиреотида памоат	МЧ; п/к	Акромегалия	2012
3	Somatuline® LA (Ipsen Pharma Biotech, France) Somatuline® Depot	Ланреотид	МЧ; п/к	Акромегалия, гастроэнтеропанкреатические нейроэндокринные опухоли	2007
4	Lupron Depot® (AbbVie Endocrine Inc, USA)	Лейпролида ацетат	МЧ; в/м	РПЖ, эндометриоз, фибромиома	1989, 1995, 1997, 2011
5	Lupron Depot-PED (AbbVie Endocrine Inc, USA)	Лейпролида ацетат	МЧ; в/м	РПЖ, эндометриоз, фибромиома	1993
6	Lupaneta Pack™ (AbbVie, USA)	Лейпролида ацетат, норетиндрона ацетата	МЧ; в/м и ро	РПЖ, эндометриоз, фибромиома	2012
7	Trelstar® (Verity Pharmaceuticals Inc, USA)	Трипторелина памоат	МЧ; в/м	РПЖ	2000, 2001, 2010
8	Decapeptyl®/Gonapeptyl® (Ipsen Pharmaceuticals,	Трипторелина ацетат	МЧ; в/м	РПЖ	1986

	Spain/Ferring pharmaceuticals, Switzerland)				
9	Triptodur Kit (Azurity Pharmaceuticals, USA)	Трипторелина памоат	МЧ; в/м	Центральное преждевременное половое развитие	2000
10	Bydureon®/Bydureon BCise® (AstraZeneca, USA)	Эксенатид	МЧ; п/к	Диабет 2 типа	2012
11	Risperdal Consta (Janssen Pharmaceuticals Inc., Ireland)	Рисперидон	МЧ; в/м	Шизофрения, биполярное расстройство I типа	2003, 2007
12	Arestin (OraPharma, USA)	Миноциклина гидрохлорид	МЧ; с/в	Пародонтит	2001
13	Zilretta (Flexion therapeutics Inc, USA)	Триамциноло на ацетонид	МЧ; вс/в	Остеоартит	2017
14	Nutropin Depot (Genentech Inc, USA)	Соматотропи н	МЧ; п/к	Дефицит гормона роста	1999
15	Vivitrol (Alkermes Inc, USA)	Налтрексон	МЧ; в/м	Алкогольная и опиоидная зависимость	2006
16	Suprecur® MP (Sanofi-Aventis, Germany) (Aventis Pharma, Japan)	Бузерелина ацетат	МЧ; п/к, в/м	Эндометриоз, миома матки	2002
17	Eligard® (Tolmar Pharmaceuticals, Inc, USA)	Лейпрорелина ацетат	гель <i>in situ</i> ; п/к	РПЖ	2002, 2016
18	Zoladex® (AstraZeneca, USA)	Гозерелина ацетат	Имплантат для п/к	РМЖ, эндометриоз, РПЖ	1989, 1996
19	Ozurdex	Дексаметазон	интравитре альный	Макулярный отек	2009
20	Propel (Intersect ENT, Inc, USA)	Мометазона фуроат	имплантат для околоносовых пазух	Хронический синусит	2011

21	Sublocade (Indivior Inc, USA)	Бупренорфин	имплант п/к	Опиоидная зависимость	2017
22	Lutrate Depot® (GP Pharm, Spain)	Лейпролида ацетат	МЧ; в/м	РПЖ	2018

*МЧ - микрочастицы, РПЖ - рак предстательной железы, РМЖ – рак молочной железы, в/м – внутримышечно, п/к – подкожно, и/в – интравитреально, с/в – субгингивальное введение; вс/в - внутрисуставное введение, po (от лат. per os — «через рот») – пероральное введение

На сегодняшний день в клинической практике не применяются адресные наночастицы для терапии заболеваний. Однако ряд препаратов уже находится на разных стадиях клинических испытаний (Таблица 3).

Таблица 3. Адресные наночастицы, находящиеся на стадии клинических исследований.

Метод терапии	Название Препарата /№ NCT	Типы адресных наночастиц	Действующее вещество	Нозология	Фаза
Химиотерапия	MM-302 (02213744)	Анти-HER2 scFv липосомы	DOX	РМЖ	II/III
	BIND-014 (01792479)	ПСМА полимерные НЧ	Доцетаксел	Рак простаты, немелкоклеточный рак легких	II
	MBP-426 (00964080)	Tf липосомы	Оксалиплатин	Солидные опухоли, рак желудка	I/II
	2B3-101 (01818713)	GSH липосомы	DOX	РМЖ	II
	C225-ILS-DOX (01702129)	Анти-EGFR Fab липосомы	DOX	Солидные опухоли	I
Генная или РНК-интерференционная терапия	CALAA-01 (00689065)	Tf полимерные НЧ	малые интерферирующие РНК	Солидные опухоли	I
	TargomiRs (02369198)	Анти-EGFR АТ бактериальные миниклетки	miR-16, миметик микроРНК	Злокачественная плевральная мезотелиома и немелкоклеточный рак легкого	I
	SGT-53 (05093387)	Анти-TfR scFv липосомы	p53 плазмидная DNA	Солидные опухоли, Рак поджелудочной	I/II

				железы	
	SGT-94 (01517464)	Анти-TfR scFv липосомы	RB94 плазмидная ДНК	Рак мочеполовой системы	I
	Rexin-G (00505713)	vWF-мотив с ретровирусным вектором к коллагеновым белкам	циклин G1	Рак поджелудочной железы, саркома	I/II
	Lipovaxin- MM (01052142)	Анти-DC-SIGN АТ липосомы	опухолевые антигены и цитокин IFN γ	Меланома	I

*АТ – антитело, DC-SIGN – межклеточный адгезионный белок дендритных клеток, vWF – фактор фон Виллебранда, GSH – глутатион

1.12 Заключение

Полимерные наночастицы являются одним из перспективных платформ в наномедицине и системах адресной доставки лекарств, поскольку позволяют улучшать фармакокинетику терапевтических веществ, снижать их токсичность и повышать селективность действия в организме. Однако их клиническое внедрение остаётся ограниченным рядом фундаментальных проблем.

Одной из основных трудностей является масштабируемость производства: методы синтеза, разработанные в лабораторных условиях, часто теряют воспроизводимость при переходе к промышленному масштабу, что приводит к вариабельности размера, морфологии и лекарственной загрузки частиц [183,252]. Не менее важной является проблема стандартизации характеристик наночастиц. Отсутствие единых протоколов оценки таких параметров, как гидродинамический размер, ζ -потенциал, полидисперсность и стабильность в биологических средах, затрудняет сопоставление результатов различных исследований и замедляет развитие данной области [253].

Ключевым биологическим ограничением применения наночастиц в клинической практике остаётся контроль их биораспределения и клиренса. После введения в организм наночастицы могут либо захватываться клетками моноклеарной фагоцитарной системы (преимущественно в печени и селезёнке), либо быстро элиминироваться из организма, что в обоих случаях снижает эффективность адресной доставки и может приводить к развитию побочных эффектов [254,255]. Дополнительную сложность представляют иммунологические эффекты: наночастицы могут активировать систему комплемента, вызывать опсонизацию и ускоренное удаление из кровотока, а также провоцировать воспалительные реакции. Это существенно ограничивает время циркуляции наночастиц и снижает эффективность терапии [252].

Таким образом, основные нерешённые проблемы в применение полимерных наночастиц включают технологические ограничения масштабирования, отсутствие стандартизации, а также биологические барьеры, связанные с фармакокинетикой и иммунной совместимостью. Их решение является ключевым условием перехода наномедицинских систем от экспериментальных разработок к широкому клиническому применению.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

Для синтеза адресных наночастиц использовали реагенты Sigma-Aldrich, США: поли(лактид-ко-гликолид) (PLGA) (лактид:гликолид 85:15, мол. вес 190–240 кДа; лактид:гликолид 50:50, с кислотой и гидроксильными концевыми группами, 25 кДа), хитозан олигосахарид лактат, поливиниловый спирт (ПВС) (Mowiol 4-88, MW 31 кДа), фотосенсибилизатор Rose Bengal (RB, 4,5,6,7-тетрахлор-2',4',5',7'-тетрайодофлуоресцеина), флуоресцентный краситель Nile Blue (NB, 5-амино-9-диэтиламино)бензо[а]феноксазин-7-ий перхлората); Thermo Fisher Scientific, США: набор для определения концентрации белка бицинхониновым BCA Protein Assay Kit; Sigma, Германия: фталоцианат магния (Pht-Mg, #402737-1G); сульфо-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide), EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide); Roche, Швейцария: трастузумаб (в составе препарата Герцептин); PanReac AppliChem, Германия: диметилсульфоксид (ДМСО); Хеликон, Россия: бычий сывороточный альбумин (БСА); Химмед, Россия: хлороформ.

В работе использовали следующее оборудование Merck, США: Milli-Q – система очистки воды; Vibra-Cell (Sonics), США: ультразвуковой гомогенизатор; Sonics & Materials, США: ультразвуковой гомогенизатор; BINDER, Германия: CO₂-инкубатор; Tescan MAIA3, Чехия: сканирующий электронный микроскоп; анализатор наночастиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.), Великобритания; Luna II (Logos Biosystems), Корея: счетчик клеток; Leica DMI6000B, Германия: конфокальный микроскоп (Thorlabs, США); LSM 980 (Carl Zeiss), Германия: конфокальный микроскоп; Infinite M100 Pro (Tecan), Австрия: спектрофотометр; FormLabs Form3, США: 3D-принтер; Оптроник, Россия: лазер с длиной волны 532 нм, 100 мВт (KLM-532-200), лазер с длиной волны 808 нм, 1200 мВт (KLM-H808-1200-5); EPSON Perfection 2400 Photo, Индонезия: сканер; xCELLigence (Agilent), США: анализ клеток в реальном времени; NovoCyte 3000 VYB (ACEA Biosciences), США: проточный цитометр; BD Accuri 6C (BD Biosciences), США: проточный цитометр; Perkin Elmer, Waltham, MA, США:

газовая анестезия для животных (RAS-4 Rodent Anesthesia System), визуализация живых систем (IVIS Spectrum CT); Andor (США): камера iKon IS1803N7357.

Для экспериментов *in vitro* использовали реагенты Gibco, США: ростовая среда DMEM с феноловым красным, ростовая среда FluoroBright DMEM; Capricorn, Германия: фетальная бычья сыворотка (ФБС); Thermo Fisher Scientific, США: пуромицин; Sigma Aldrich, США: флуоресцентные красители PI и акридиновый оранжевый; Elfa, Индия: ципрофлоксацин; Invitrogen, США: набор для анализа общего количества активных форм кислорода CM-H₂DCFDA (общий индикатор окислительного стресса); SERVA, Германия: МТТ (тетразолиевый краситель, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide); Химмед, Россия: кристаллический фиолетовый; ПанЭко, Россия: пенициллин-стрептомицин (50 ед/мл/50 мкг/мл), L-глутамин, раствор Версена, флуоресцентный краситель Хёхст 33342.

Для получения 3D-сфероидов использовали FormLabs Grey Resin 1L, США: фотополимерная смола; ПанЭко, Россия: агароза.

Для экспериментов с животными использовали реагенты Vibras, Франция: общий анестетик Золетил; Bioveta, Чехия: седативный препарат Рометар; Baxter, Канада: ингаляционный анестетик изофлуран (Аерран); Corning, США: матригель.

Буферные растворы: ФСБ (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.77 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 1.7 mM KH₂PO₄), pH 2 (0.1 М глицин-HCl), pH 3 (0.1 М глицин-HCl), pH 4 (0.15 М цитрат-фосфатный буфер), pH 5 (0.15 М цитрат-фосфатный буфер), pH 6 (0.1 М HEPES-буфер), pH 7 (0.15 М фосфатный буфер), pH 8 (0.1 М Tris-буфер) и pH 9 (0.1 М Tris-буфер), буфер MES (2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота, 0.1М, pH 5), боратный буфер (0.4 М H₃BO₃, 70 mM Na₂B₄O₇, pH 8).

2.2 Белковые молекулы

Иммунотоксин DARP-LoPE был выделен и любезно предоставлен Котельниковой П.А. в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН

Аффибоди Z_{HER2:342} и JO-4 были выделены и любезно предоставлены Шульгой А.А. в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН.

2.3 Клеточные линии эукариот

Для *in vitro* и *in vivo* исследований использовали клеточные линии лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН: SK-BR-3 – клеточная линия рака молочной железы человека, SKOVip-kat – клеточная линия карциномы яичников человека, экспрессирующая красный флуоресцентный белок Katushka, BT-NanoLuc – клетки протоковой карциномы молочной железы со стабильной экспрессией люциферазы NanoLuc, MCF-7-iRFP – клетки рака молочной железы со стабильной экспрессией инфракрасного флуоресцентного белка RFP, A549 – клетки карциномы легкого человека, CHO – клетки яичника китайского хомяка.

2.4 Лабораторные животные

Самки мышей BALB/c Nu/Nu (20–25 г) были получены из вивария Института биоорганической химии М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН Россия.

2.5 Программное обеспечение

Обработку данных проводили с использованием следующих программных обеспечений: OriginPro 2015, Adobe Photoshop CC 2018, ImageJ, FlowJo.

2.6 Методы

2.6.1. Синтез анти-HER2 PLGA наночастиц

Синтез PLGA наночастиц

Для синтеза наночастиц использовали микроэмульсионный метод «вода-масло-вода». Первая эмульсия была получена путем добавления 150 мкл 3 г/л Rose Bengal (RB) к 300 мкл 40 г/л PLGA (лактид:гликолид 50:50, с концевой кислотой и гидроксильной группой) в хлороформе и обработки ультразвуком с помощью 130 Вт ультразвукового гомогенизатора Vibra-Cell (Sonics) при температуре +4 °C в течение 1 мин при мощности 40 % и 1 мин при мощности 60 %. Вторая эмульсия была получена путем добавления первой эмульсии в 3 мл 3 % ПВС в воде Milli-Q

с 0.3 г/л лактата олигосахарида хитозана. Вторая эмульсия была повторно обработана ультразвуком в течение 1 мин при мощности 40 % и 1 мин при мощности 60 %. Далее хлороформ выпаривали на ротаторе при 20 об/мин в течение 3 ч при комнатной температуре. Полученные наночастицы были промыты от избытка реагентов троекратным центрифугированием с ФСБ и ресуспендированы в 300 мкл ФСБ. Конечная концентрация частиц была определена путем высушивания при 60 °С.

2.6.2. Модификация наночастиц PLGA с аффибоди Z_{HER2:342}

Ковалентную конъюгацию наночастиц PLGA с аффибоди проводили с использованием реагентов EDC и сульфо-NHS в качестве сшивающих агентов посредством образования амидных связей между карбоксильными группами аффибоди и аминогруппами PLGA. 1 мкг/мкл аффибоди в 100 мкл 0.1 М буфера MES, pH 5.0 активировали 50 мкг EDC и 25 мкг сульфо-NHS в течение 45 мин при 15 °С. Затем активированное аффибоди Z_{HER2:342} быстро добавляли к 1 мг наночастиц PLGA в 300 мкл боратного буфера (0,4 М H₃BO₃, 70 мМ Na₂B₄O₇, pH 8) и обрабатывали ультразвуком в течение нескольких секунд. Реакцию проводили в течение ночи при комнатной температуре. После частицы промывали тройным центрифугированием от несвязанных белков при 4000×g, 10 мин.

2.6.3. Синтез PLGA наночастиц с полноразмерным антителом трастузумаб

Наночастицы были синтезированы методом двойной эмульсии «вода-масло-вода». Первая эмульсия была получена добавлением 150 мкл 3 г/л Rose Bengal в воде Milli-Q и 10 мкл 1 г/л Nile Blue к 300 мкл 40 г/л PLGA в хлороформе. Первую эмульсию подвергали обработке ультразвуковым гомогенизатором с помощью Sonicator VibraCell мощностью 750 Вт в течение 1 мин при мощности 40 % и 1 мин при мощности 60 %. Вторую эмульсию готовили добавлением к первой эмульсии 3 мл 3 % ПВС в воде Milli-Q, содержащая 0,3 г/л лактата олигосахарида хитозана, 200 мкл 10 г/л трастузумаба и 5 мл 1 % БСА. Раствор обрабатывали ультразвуком при тех же условиях. Затем хлороформ выпаривали на ротаторе при 20 об/мин в течение 3 ч при комнатной температуре. Далее частицы промывали ФСБ pH 7.4

тройным центрифугированием и ресуспендировали в 100 мкл ФСБ pH 7.4. Конечную концентрацию наночастиц определяли путем высушивания частиц при 60 °C.

2.6.4. Синтез наночастиц PLGA/Pht-Mg

Наночастицы PLGA/Pht-Mg были получены Коваленко В. Л. и Шипуновой В. О. А именно, эмульсию «масло в воде» получали путем добавления раствора 40 г/л PLGA и 1 г/л фталоцианат магния (Sigma #402737-1G, Pht-Mg) в хлороформе в 3 мл 3 % ПВС в воде Milli-Q с 1 г/л хитозана олигосахарида лактата. Эмульсию непрерывно обрабатывали ультразвуком с помощью аппарата Bandelin Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия) в течение 1 мин с амплитудой 25 % при мощности ультразвукового аппарата 200 Вт. Полученные наночастицы промывали тройным центрифугированием в ФСБ pH 7.4 и ресуспендировали в 300 мкл ФСБ pH 7.4. Конечную концентрацию частиц определяли путем высушивания на воздухе при 90 °C.

2.6.5. Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию частиц PLGA*Z_{HER2:342} оценивали методом сканирующей электронной микроскопии на электронном микроскопе MAIA3 при ускоряющем напряжении 10 кВ, анти-HER2 PLGA – MAIA3 при ускоряющем напряжении 5 кВ. Образцы наносили на кремниевую подложку и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Изображения СЭМ анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ для определения среднего размера наночастиц.

2.6.6. Трансмиссионная электронная микроскопия

Исследование методом трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии (ТЭМ) проводили на микроскопе JEOL JEM-2100 (Япония), обладающем разрешением до 0,19 нм при ускоряющем напряжении 200 кВ.

2.6.7. Динамическое и электрофоретическое измерение светорассеяния

Гидродинамический размер наночастиц PLGA определяли с помощью метода ДРС на анализаторе Zetasizer Nano ZS в воде Milli-Q при 25 °C. ζ-потенциал

измеряли с помощью Zetasizer Nano ZS в 10 мМ KNO₃ при 25 °С. Стабильность частиц измеряли с помощью Zetasizer Nano ZS путем последовательных измерений размера в течение одного месяца. Частицы разводили в буферных растворах с pH от 2 до 9 и измеряли гидродинамический размер частиц. Использовали следующие буферные растворы: pH 2 (0.1 М глицин-HCl), pH 3 (0.1 М глицин-HCl), pH 4 (0.15 М цитрат-фосфатный буфер), pH 5 (0.15 М цитрат-фосфатный буфер), pH 6 (0.1 М HEPES-буфер), pH 7 (0.15 М фосфатный буфер), pH 8 (0.1 М Tris-буфер) и pH 9 (0.1 М Tris-буфер).

2.6.8. Ведение клеточных линий эукариот

Клетки BT-NanoLuc и SK-BR-3 культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10 % ФБС, 2 мМ L-глутамин, 50 ед/мл/50 мкг/мл пенициллин-стрептомицин, 1 мкг/мл пурамицин и 10 мкг/мл ципрофлоксацин в культуральных флаконах (Nunc, Дания) в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂. Клетки MCF-7-iRFP и SKOVip-kat культивировали в питательной среде FluoroBright DMEM с 10 % ФБС, 2 мМ L-глутамин, 50 ед/50 мкг/мл пенициллин-стрептомицин и 10 мкг/мл ципрофлоксацин в культуральных флаконах (Nunc, Дания) в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂. Клетки SK-BR-3 и A549 культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10 % ФБС, 2 мМ L-глутамин, 50 ед/мл/50 мкг/мл пенициллин-стрептомицин и 10 мкг/мл ципрофлоксацин в культуральных флаконах (Nunc, Дания) в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 % CO₂. Клетки удаляли с поверхности культуральных флаконов с помощью раствора Версена.

2.6.9. Флуоресцентная и конфокальная микроскопия

Визуализация сфероидов SKOVip-kat

Визуализацию сфероидов SKOVip-kat и 2D-клеточных линий SKOVip-kat и СНО проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000B. Для визуализации флуоресцентного белка Katushka использовали фильтр возбуждения 545/30 нм и эмиссии 610/75 нм, для флуоресцентного красителя Хёхст 33342 –

фильтр возбуждения 405/10 нм и эмиссии 460/40 нм, для пропидий йодида: фильтр возбуждения 545/30 нм и эмиссии 610/75 нм. Визуализацию клеточных линий SKOVip-kat и CHO проводили на 96-луночных планшетах (Nunc). Условия флуоресценции для конъюгата трастузумаб-ФИТЦ: фильтр возбуждения 470/40 нм и эмиссии 525/50 нм.

Визуализация наночастиц анти-HER2 PLGA

Визуализацию клеток со сверхэкспрессией рецептора HER2, меченных адресными наночастицами анти-HER2 PLGA, проводили на микроскопе Leica DMI6000B, оснащённом модулем для получения конфокальных изображений. Клетки BT-NanoLuc высевали на 96-луночные культуральные планшеты с плоским дном в 100 мкл питательной среды DMEM и инкубировали в течение ночи при 37 °C и 5 % CO₂. Далее частицы PLGA добавляли к 100 мкл полной культуральной среды для получения конечной концентрации 10 мкг/мл наночастиц. Клетки инкубировали с PLGA в течение 1 часа при 37 °C и 5 % CO₂ с последующим исследованием на микроскопе. Клетки визуализировали с помощью зеленого и красного лазеров как по отдельности, так и в их комбинации: зеленый лазер с длиной волны 561 нм возбуждали краситель Rose Bengal (эмиссионный фильтр 600/52 нм); красный лазер с длиной волны 640 нм возбуждали краситель Nile Blue (эмиссионный фильтр 647LP нм). В качестве альтернативы клетки визуализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980 при следующих условиях: $\lambda_{ex} = 543$ нм, $\lambda_{em} = 552\text{--}622$ нм для обнаружения RB и $\lambda_{ex} = 639$ нм, $\lambda_{em} = 676\text{--}693$ нм для обнаружения NB.

Анализ связывания трастузумаба с рецептором HER2 осуществляли с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 980. Клетки обрабатывали раствором, содержащим 1 мкг/мл красителя Хёхст 33342 и 2 мкг/мл трастузумаб-ФИТЦ с добавлением 1 % БСА в ФСБ, в течение 30 мин, после чего промывали раствором ФСБ (pH 7.4) и визуализировали при следующих условиях: $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 492\text{--}500$ нм для обнаружения трастузумаб-ФИТЦ и $\lambda_{ex} = 405$ нм, $\lambda_{em} = 410\text{--}520$ нм для обнаружения Хёхст 33342.

2.6.10. Проточная цитометрия наночастиц

Способность наночастиц PLGA адресно взаимодействовать с HER2-положительными клетками оценивали с помощью метода проточной цитометрии. Для наночастиц PLGA*Z_{HER2:342}: клетки SK-BR-3 и CHO в концентрации 10⁶/мл в 1 % БСА в ФСБ инкубировали с частицами в концентрации 0.1 г/л 15 мин при +4 °С. Далее промывали однократным центрифугированием и ресуспендировали в ФСБ pH 7.4. Анализировали связывание частиц с клетками с помощью проточного цитометра Novocyt 3000 VYB в канале YL2 (λ_{ex} = 561 нм, λ_{em} = 615/20 нм).

Для наночастиц анти-HER2 PLGA: клетки BT-NanoLuc и CHO в концентрации 2×10⁵/300 мкл 1 % БСА в ФСБ инкубировали с разными концентрациями наночастиц при постоянном перемешивании 15 мин при +4 °С. Далее клетки однократно отмывали и ресуспендировали в 100 мкл ФСБ pH 7.4. Образцы анализировали на проточном цитометре BD Accuri C6 в канале FL4 (λ_{ex} = 640 нм, λ_{em} = 675/25 нм).

2.6.11. Флуоресцентная спектроскопия наночастиц

Спектральный анализ наночастиц PLGA с красителем RB проводили на планшетном спектрофотометре Infinite M100 Pro в диапазоне длин волн возбуждения 500–600 нм. Суспензию наночастиц PLGA с красителем RB в 100 мкл ФСБ в концентрации 10 мкг/мл добавляли в 96-луночный плоскодонный планшет. Спектр возбуждения регистрировали в диапазоне 350–600 нм (λ_{em} = 670 нм). Спектр испускания регистрировали в диапазоне 550–850 нм (λ_{ex} = 530 нм). Анализ измерения проводили на спектрофотометре Infinite M100 Pro.

Наночастицы анти-HER2 PLGA, загруженные красителями RB и NB, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ pH 7.4 в концентрации 10 мкг/мл и/или в 100 мкл ДМСО и добавляли в 96-луночный планшет.

2.6.12. Исследование генерации активных форм кислорода

Способность наночастиц анти-HER2 PLGA к генерации активных форм кислорода (АФК) оценивали при воздействии лазерного излучения с длинами волн 532 и 808 нм. Для проведения теста на генерацию АФК в пробирки емкостью 1.5 мл добавляли 600 мкл ФСБ pH 7.4, затем вносили по 20 мкл наночастиц с концентрацией 30 г/л, образец разделяли на четыре пробирки и к этим образцам добавляли реагент Invitrogen (Total Reactive Oxygen Species (ROS)) в соответствии с протоколом производителя. Затем образцы облучали лазерами индивидуально и в комбинации в течение 5 мин. По окончании облучения флуоресценцию образцов регистрировали в 96-луночных планшетах с длиной волны возбуждения 488 нм и эмиссией 525 нм с коэффициентом усиления 149 на спектрофотометре Infinite M100 Pro.

2.6.13. Оценка жизнеспособности клеточных линий при воздействии PLGA частиц

Цитотоксичность PLGA*Z_{HER2:342} и PLGA (Rose Bengal) наночастиц оценивали с помощью МТТ-теста [233]. Клетки SK-BR-3 инкубировали с PLGA*Z_{HER2:342} 30 мин при 37 °C и 5% CO₂, облучали лазером с длиной волны 532 нм в течение 5, 10 или 20 мин и высевали на 96-луночный планшет в концентрации 5×10³ клеток/лунка в 100 мкл полной ростовой среды DMEM. Клетки культивировали в течение 48 ч при 37 °C и 5 % CO₂. Затем среду удаляли и в лунки добавляли 100 мкл 0.5 г/л раствора МТТ в среде DMEM. Клетки инкубировали 1 ч при 37 °C и 5 % CO₂. Раствор МТТ удаляли и в лунки добавляли 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Поглощение измеряли при длине волны $\lambda = 570$ нм (эталонная $\lambda = 630$ нм) с использованием спектрофотометра Infinite M100 Pro.

Оценка жизнеспособности клеток при воздействии анти-HER2 PLGA наночастиц [233].

(1) Эффективность двойной загрузки красителя в наночастицах определяли следующим образом. 75×10³ клеток BT-NanoLuc добавляли в пробирки объемом 1.5 мл в 300 мкл 1 % обезжиренного молока в ФСБ, затем добавляли 25 мкл 30 г/л

частиц, образцы инкубировали в течение 15 мин при +4 °С и отмывали от несвязавшихся частиц трехкратным центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 600 мкл 1 % БСА в ФСБ и разделяли на образцы по 200 мкл в пробирки емкостью 1.5 мл. Клетки облучали: (1) лазером с длиной волны 532 нм, мощностью 100 мВт, 10 мин при комнатной температуре; (2) лазером 808 нм, 1200 мВт, 10 мин при 30 °С, (3) и комбинацией двух лазеров: 532 нм и 808 нм. Затем клетки высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^3 клеток на лунку в 200 мкл полной среды DMEM и культивировали в течение 48 часов.

Затем среду удаляли, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора МТТ в концентрации 0.5 г/л и инкубировали планшеты в течение 1 ч при 37 °С и 5 % CO₂. Затем раствор МТТ удаляли и добавляли 100 мкл ДМСО. Поглощение измеряли при длине волны $\lambda = 570$ нм (эталонная $\lambda = 630$ нм) с помощью спектрофотометра Infinite M100 Pro.

(2) Зависимость от концентрации цитотоксичность анти-HER2 PLGA/NB/RB определяли аналогичным образом путем инкубации клеток с концентрациями наночастиц: 15, 7.5, 3.75, 1.8, 0.9 и 0.45 г/л.

(3) Цитотоксичность наночастиц, нагруженных различными концентрациями RB, определяли аналогичным образом путем инкубации клеток с частицами, синтезированными с различными концентрациями RB: 3, 1.5, 0.75, 0.4, 0.2 г/л.

(4) Влияние времени инкубации на цитотоксичность определяли аналогичным образом – путем облучения клеток (1) сразу после отмывки от несвязавшихся частиц, (2) через 1 ч инкубации при 37 °С и (3) через 4 ч после инкубации при 37 °С.

2.6.14. Клоногенный тест

Клетки BT-NanoLuc инкубировали с наночастицами анти-HER2 PLGA в различных концентрациях (15, 7.5, 3.75, 1.8, 0.9, 0.45 г/л) в пробирках объемом 1.5 мл в концентрации 75×10^3 в 100 мкл бесцветной среды DMEM. Инкубацию проводили при +4 °С на ротаторе в течение 15 мин. Клетки отмывали от несвязавшихся частиц и ресуспендировали в 100 мкл ФСБ с 1 % БСА. Далее клетки

с частицами облучали длиной волны 532 нм в течение 10 мин и/или 808 нм в течение 10 мин. Облученные клетки BT-NanoLuc с адресными частицами добавляли в лунки 12-луночного планшета: 10^3 клеток в 1200 мкл полной среды DMEM. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 7 дней до образования колоний из более чем 50 клеток. После инкубации среду удаляли, лунки промывали 600 мкл ФСБ и фиксировали 600 мкл 70 % этанола в ФСБ. Далее добавляли 600 мкл 95 % этанола и инкубировали лунки в течение 15 мин. Далее, после удаления 95 % этанола, лунки промывали водопроводной водой и добавляли 600 мкл 1 % кристаллического фиолетового. Лунки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем кристаллический фиолетовый удаляли и лунки промывали 10 раз водопроводной водой. Планшеты сканировали с помощью сканера EPSON.

2.6.15. Анализ выживаемости клеток в реальном времени

Анализ выживаемости клеток в реальном времени проводили с использованием анализатора xCELLigence. 3×10^3 клеток BT-NanoLuc инкубировали с наночастицами PLGA/RB, PLGA/NB, PLGA/NB/RB в различных концентрациях в 100 мкл ФСБ pH 7.4 в течение 15 мин при +4 °C. Затем клетки трижды отмывали от несвязавшихся частиц в 200 мкл ФСБ и ресуспендировали в 300 мкл полной бесцветной среде.

Далее образцы подвергали облучению в течение 10 мин лазером с длиной волны 532 нм (100 мВт). Затем в каждую лунку планшета E16 xCELLigence добавляли по 150 мкл облученных и необлученных клеток с частицами, в которые предварительно добавляли 50 мкл полной ростовой среды DMEM, не содержащей фенолового красного. Кинетику связывания и рост клеток измеряли в течение 150 часов при 37 °C и 5 % CO₂.

2.6.16. Тест на апоптоз

Для изучения механизма гибели клеток использовали набор реагентов Invitrogen (набор для определения апоптоза). 400×10^3 клеток BT-NanoLuc инкубировали с наночастицами анти-HER2 PLGA в двух концентрациях, отмывали

от несвязавшихся частиц центрифугированием и ресуспендировали в 400 мкл бесцветной среды FluoroBrite DMEM. Затем в 6-луночные планшеты добавляли по 500 мкл среды FluoroBrite DMEM и в каждую лунку добавляли по 100 мкл 10×10^4 клеток, инкубированных с наночастицами. Далее клетки облучали лазером с длиной волны 532 нм в течение 0, 1, 3, 10, 20 и 40 мин. В качестве контроля использовали клетки без добавления частиц и без облучения. Планшеты инкубировали в течение 12 часов при 37 °C и 5 % CO₂. После инкубации среду из планшетов удаляли и клетки открепляли от пластика раствором Версена. К полученным образцам добавляли реагенты Annexin V и PI согласно рекомендациям производителя. Затем образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte 3000 VYB в канале BL1 (лазер возбуждения 488 нм, фильтр эмиссии 530/30 нм) для Annexin V и в канале BL3 (лазер возбуждения 488 нм, фильтр эмиссии 615/20 нм) для PI.

2.6.17. Получение и анализ опухолей у мышей BALB/c Nu/Nu

Самки мышей BALB/c Nu/Nu (20–25 г) были получены из вивария Института биоорганической химии (Пущино, Россия). Мышей содержали в специальных помещениях, свободных от патогенов, со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры одобрены Институциональной комиссией по содержанию и использованию животных ИБХ РАН (протокол от 29 мая 2020 г. № 298/2020). Эксперименты проводили с использованием анестезии Золетил и Рометар в дозе 25/5 мг/кг. Для анестезии проводилась ингаляция Изофлураном с использованием системы анестезии для грызунов RAS-4 для экспериментов с визуализацией живых систем IVIS Spectrum CT.

Ксенотрансплантаты опухолей получали путем подкожной инокуляции: 2×10^6 клеток BT-NanoLuc в 30 % матригеле в 100 мкл полной культуральной среды вводили в правый бок мышей BALB/c Nu/Nu. 2×10^6 клеток MCF-7-iRFP инокулировали подкожно в левый бок мышей BALB/c Nu/Nu.

2.6.18. Биовизуализация *in vivo*

Биолюминесцентные изображения ксенотрансплантатных опухолей получали путем интраперитонеального введения h-коэленстеразина (200 мкл, 25 мкг/мл в ФСБ). Далее биолюминесцентные изображения были получены с помощью открытого фильтра в системе IVIS Spectrum CT с использованием времени экспозиции 10 сек. со следующими параметрами: f/stop = 1, binning = 8, FOV 13.4 см × 13.4 см и нормированием на количество фотонов в секунду на см² на стерадиан (p/s/cm²/sr). Для исследований локализации наночастиц флуоресцентные изображения получали при следующих условиях: возбуждение 640 нм, эмиссия 680 нм. Визуализацию опухоли MCF7-iRFP проводили при следующих условиях: возбуждение 605 нм, эмиссия 660 нм, экспозиция = 1 с, f/stop = 2, binning = 8, FOV 13.4 см × 13.4 см.

2.6.19. Терапия анти-HER2 PLGA наночастицами

Для экспериментов по исследованию терапевтической эффективности разработанных наноагентов получали ксенографтные опухоли мышей, а затем животных случайным образом делили на три группы (n = 4 в каждой). Динамику роста опухоли оценивали путем измерения объема опухоли штангенциркулем и расчета объема опухоли по формуле: $V = a^2 \cdot b / 2$, где a – ширина, b – длина опухоли. Когда объем опухоли достигал 60 мм³, мышам вводили внутривентрально адресные наночастицы в ФСБ. Через час после инъекции детектировали флуоресценцию с помощью IVIS Spectrum CT. Далее мышей облучали светом (лазер 532 нм, 100 мВт) в соответствии с полученными изображениями, демонстрирующими локализацию первичных опухолей и метастазов: облучали первичные опухоли (10 мин) и лимфатические узлы (3 мин).

2.6.20. Статистический анализ

Все эксперименты проводились независимо трижды. Численные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Значимые различия были определены с использованием двустороннего t-критерия Уэлча. Статистически значимо – P < 0.05 (*), 0.01 (**), 0.001 (***), 0.0001 (****).

3. Результаты и обсуждение

3.1 Получение наночастиц анти-HER2 PLGA для фотодинамической терапии

Наночастицы PLGA были получены с помощью метода двойной эмульсии «вода-масло-вода» с использованием полимера PLGA (лактид:гликолид 50:50) как основы для доставки фотосенсибилизатора RB. Полученные частицы имели на своей поверхности как -COOH (вследствие наличия COOH-терминированного полимера PLGA), так и -NH₂ (вследствие наличия лактата олигосахарида хитозана на поверхности наночастиц) химические группы, что дает возможность для их химической конъюгации с различными белками. Свойства PLGA наночастиц оценивали с использованием серии физико-химических методов. Согласно обработке изображений, полученных методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), полученные частицы представляют собой моодисперсные структуры с формой, близкой к сферической, их физический размер составил 170 ± 40 нм (рисунок 7а). Согласно ДРС измерениям гидродинамический размер наночастиц PLGA составил 198 ± 40 нм (рисунок 7б). Визуальные наблюдения показали, что частицы были стабильны в течение одного года (дальнейшие наблюдения не проводились). Эффективная загрузка синтезированных наночастиц PLGA фотосенсибилизатором RB была оценена с помощью методов оптической и флуоресцентной спектроскопии. Спектр поглощения PLGA и загруженного RB PLGA представлен на рисунке 6в, что подтверждает наличие RB в структуре наночастицы. Чтобы подтвердить, что RB действительно связан с PLGA, мы оценили интенсивность флуоресценции популяций наночастиц методом проточной цитометрии, рассматривая частицы PLGA как отдельные события. Гистограммы проточной цитометрии популяций наночастиц представлены на рисунке 7г, что подтверждает загрузку Rose Bengal в наночастицы.

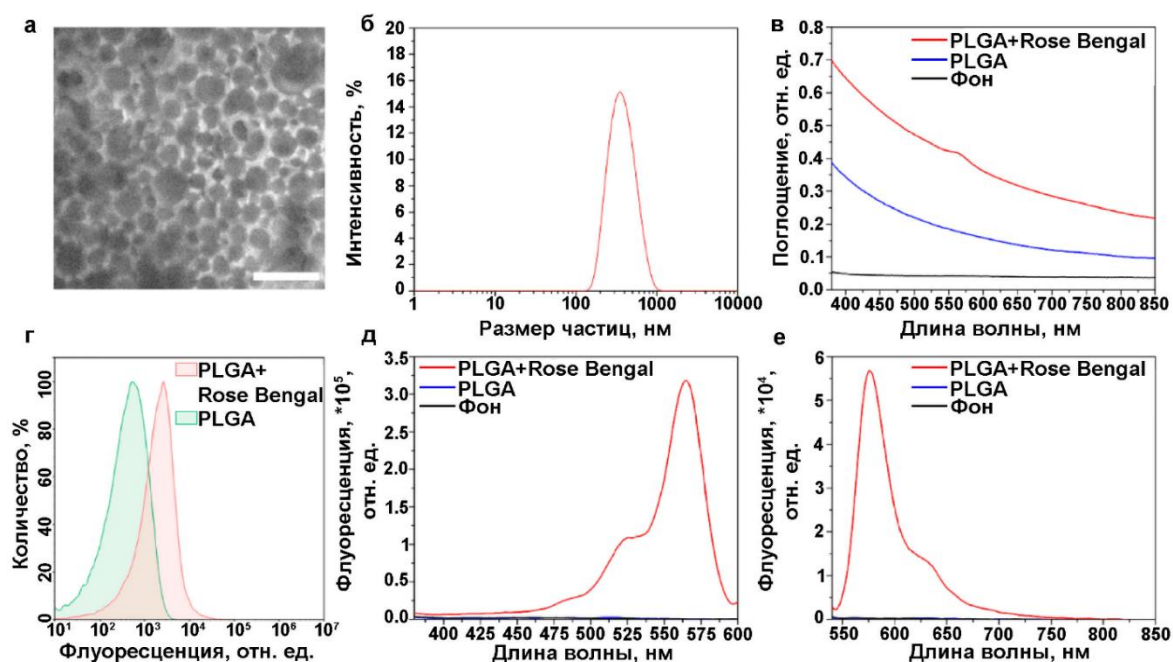


Рисунок 7. Характеристика наночастиц PLGA. (а) Сканирующая электронная микрофотография наночастиц PLGA. Шкала 500 нм. (б) Гидродинамический размер наночастиц PLGA, полученный посредством ДРС измерений. (в) Поглощение наночастиц PLGA и наночастиц PLGA, загруженных красителем RB. (г) Оценка флуоресценции наночастиц PLGA, загруженных RB, методом проточной цитометрии. Спектры возбуждения (д) и испускания (е) наночастиц PLGA и PLGA, загруженных RB.

Спектры возбуждения и испускания наночастиц, представленные на рисунках 7д и е, соответствуют спектру загруженного красителя с максимумами возбуждения и испускания 560 нм и 575 нм. Поскольку RB является фотосенсибилизатором, который производит активные формы кислорода (1O_2 , O_2^{*-} , H_2O_2 и HO^*) при воздействии лазера с длиной волны 532 нм, мы провели эксперимент для подтверждения сохранения способности производить АФК в полимерных частицах. Для этого частицы облучали зеленым светом в течение 15 мин, далее к образцам добавляли общий индикатор окислительного стресса CM- H_2DCFDA . Далее измеряли интенсивность флуоресценции образцов при возбуждении 492 нм и испускании 525 нм, согласно протоколу производителя. Полученные данные подтвердили образование АФК после облучения зеленым светом – интенсивность флуоресценции образцов после облучения была в 5.14 раза

выше, чем у необлученных образцов (4991 ± 101 отн. ед. для необлученного образца PLGA против 25673 ± 67 отн. ед. для облученного образца PLGA).

После наночастицы PLGA с фотосенсибилизатором RB были модифицированы распознающими молекулами для активной адресной доставки к рецептору HER2 на поверхности раковых клеток. В качестве распознающей молекулы использовали аффибоди $Z_{HER2:342}$. Для этого поверхность наночастиц PLGA модифицировали аффибоди $Z_{HER2:342}$ с использованием карбодиимида EDC и сульфо-NHS для получения адресных наночастиц $PLGA*Z_{HER2:342}$. Аффибоди, содержащие COOH-группы, были активированы избытком EDC/сульфо-NHS в кислых условиях, а затем добавлены к наночастицам, содержащим NH_2 -группы в слабо щелочных условиях, что привело к образованию стабильной амидной связи между белком и наночастицами. Эффективность ковалентной конъюгации была подтверждена проведением количественного теста для анализа концентрации белка на основе бицинхониновой кислоты (BCA). В частности, было показано, что с 1 мг наночастиц PLGA связано 5.4 мкг молекул аффибоди.

Для количественной оценки специфичности связывания наночастиц $PLGA*Z_{HER2:342}$ с рецептором на клетках был проведен анализ с использованием метода проточной цитометрии. В качестве целевых клеток использовали клетки с гиперэкспрессией рецептора HER2 – клеточная линия рака молочной железы человека SK-BR-3; как отрицательный контроль – клетки, не имеющие рецептора HER2, – клетки яичников китайского хомяка CHO; а также клетки с нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2 – клетки карциномы легких человека A549.

Наночастицы $PLGA*Z_{HER2:342}$ инкубировали с клетками, после чего клетки были отмыты от несвязанных наночастиц и проанализированы с помощью проточной цитометрии во флуоресцентном канале, соответствующем флуоресценции Rose Bengal (возбуждающий лазер 561 нм, фильтр эмиссии 615/20 нм).

Гистограммы проточной цитометрии, соответствующие популяциям клеток, инкубированных с $PLGA*Z_{HER2:342}$, представлены на рисунке 8а. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) SK-BR-3 с $PLGA*Z_{HER2:342}$ в 2.13 раза выше,

чем соответствующее значение для клеток A549, и в 4.22 раза выше, чем для клеток CHO (рисунок 8б), что подтверждает специфичность связывания адресных наночастиц.

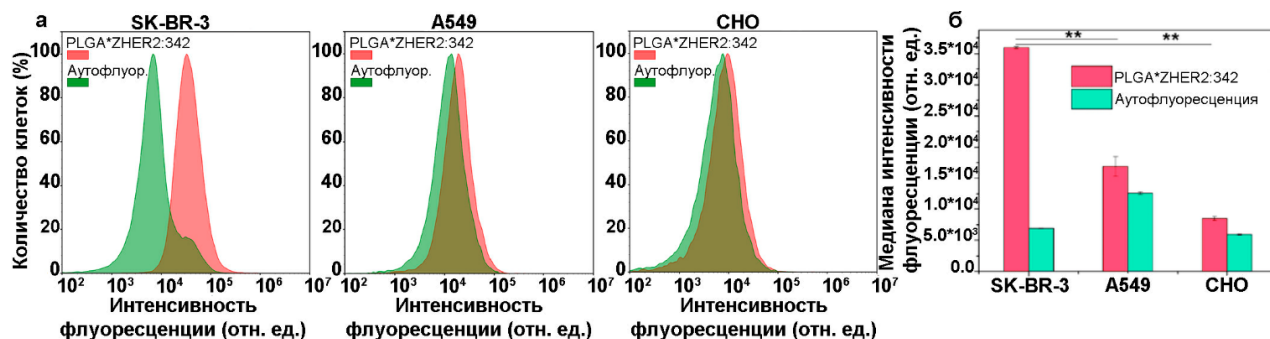


Рисунок 8. Оценка специфичности связывания наночастиц, модифицированных аффибоди Z_{HER2:342}, методом проточной цитометрии. (а) Анализ связывания наночастиц PLGA*Z_{HER2:342} с клеточными линиями. Гистограммы проточной цитометрии были получены в канале YL2 (возбуждающий лазер 561 нм, фильтр эмиссии 615/20 нм). Аутофлуоресценция показана зеленым цветом. Клетки, инкубированные с наночастицами PLGA*Z_{HER2:342}, показаны красным цветом. (б) Медианы интенсивности флуоресценции (MFI) популяций клеток, связанных с PLGA*Z_{HER2:342}, в соответствующем флуоресцентном канале проточного цитометра. ** $p < 0,001$.

Полученные частицы PLGA, загруженные фотосенсибилизатором Rose Bengal, могут быть эффективно использованы в качестве наноагента для ФДТ. Для оценки светоиндуцированной цитотоксичности PLGA*Z_{HER2:342} и PLGA был проведен анализ жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста. Клетки SK-BR-3 инкубировали с различными концентрациями наночастиц, отмывали от несвязанных частиц и облучали зеленым светом в течение 5, 10 или 20 мин. Затем, через 48 ч культивирования, измеряли цитотоксичность с использованием тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид). Данные, представленные на рисунке 9а, подтверждают концентрационную зависимость цитотоксичности PLGA*Z_{HER2:342} при облучении зеленым светом с практически полной гибелью клеток через 20 мин облучения при умеренных концентрациях PLGA. Для оценки цитотоксической эффективности наночастиц на HER2-положительных раковых клетках в

контрольных экспериментах мы использовали неадресные PLGA, нагруженные RB. Данные, представленные на рисунке 9, подтверждают, что наиболее выраженный цитотоксический эффект наблюдается для наночастиц PLGA, нагруженных RB и конъюгированных с адресной молекулой.

Однако небольшой цитотоксический эффект наблюдается для частиц PLGA*Z_{HER2:342}, нагруженных RB и без облучения, что, скорее всего, обусловлено перекисным окислением липидов клеток ксантеновым красителем RB. Наряду с цитотоксичностью, индуцированной частицами, наблюдается также цитотоксичность, индуцированная зеленым светом, которая, скорее всего, обусловлена продукцией активных форм кислорода [256], изменением концентрации внутриклеточного кальция и значительным снижением внутриклеточного pH. Таким образом, сочетая облучение светом и использование адресных терапевтических наночастиц, можно добиться максимально интенсивного цитотоксического эффекта в целевой области.

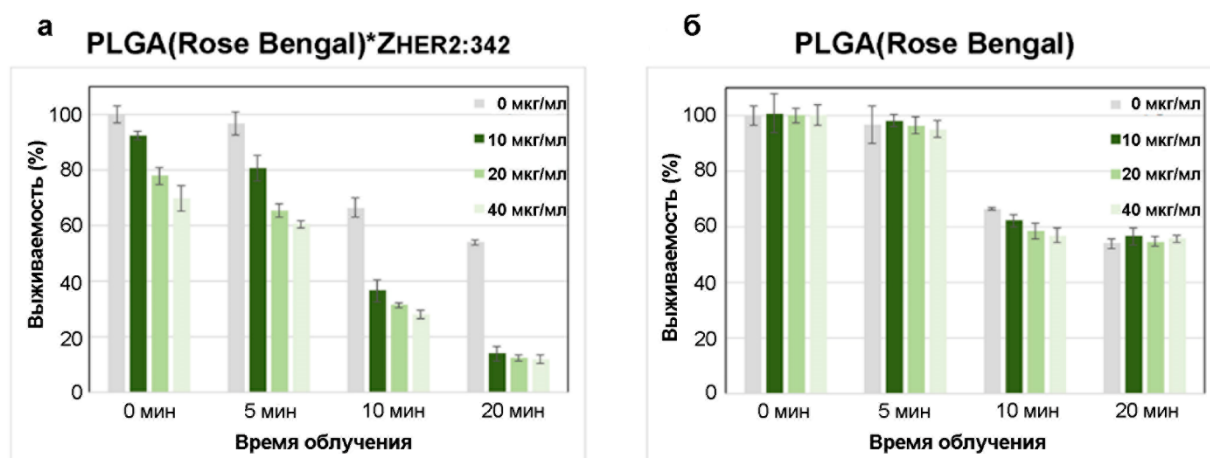


Рисунок 9. Оценка цитотоксичности наночастиц PLGA с различной модификацией на клетках SK-BR-3. Результаты МТТ-теста на токсичность для клеток, инкубированных с PLGA*Z_{HER2:342} и загруженных RB (а), с PLGA, загруженного RB (б). Данные представляют собой процент выживших клеток после 48 ч инкубации по сравнению с контрольными необработанными клетками.

Таким образом, с помощью метода двойной эмульсии были получены адресные полимерные наночастицы PLGA, модифицированные белком аффибоди Z_{HER2:342}, которые специфично взаимодействуют с HER2-положительными

клетками, и которые способны генерировать АФК под внешним облучением светом, приводя к гибели раковые клетки.

3.2 Получение наночастиц анти-HER2 PLGA для тераностики опухолей

HER2-специфическую диагностику и онкотерапию осуществляли по следующей экспериментальной схеме (рисунок 10). В качестве основы для синтеза тераностических наноагентов использовали сополимер молочной и гликолевой кислот PLGA. Для получения наночастиц был выбран сополимер с соотношением мономеров молочной и гликолевой кислот 85:15, поскольку увеличение доли молочной кислоты в составе PLGA приводит к замедлению гидролитической деградации полимера и, как следствие, к более медленному высвобождению инкапсулированных красителей и терапевтических веществ. Ранее было показано, что PLGA с соотношением мономеров 85:15 обеспечивает более продолжительное высвобождение препарата по сравнению с полимерами, имеющими соотношение 75:25 и 50:50. Такой состав полимера позволяет повысить стабильность наночастиц и снизить вероятность преждевременного высвобождения инкапсулированного вещества до достижения органа-мишени [257]. Кроме того, загрузка лекарственных веществ в полимерную наночастицу при соотношении 85:15 выше, чем при соотношении 50:50 [139].

Наночастицы PLGA были синтезированы методом двойной эмульсии «вода-масло-вода» с добавлением водорастворимого красителя Rose Bengal в первую «водную» фазу и водонерастворимого красителя Nile Blue в «масляную» фазу. Наночастицы были покрыты анти-HER2-антителом трастузумабом для воздействия на HER2-специфические раковые клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. При системном введении в организм наночастицы анти-HER2 PLGA селективно связываются с раковыми клетками опухоли, гиперэкспрессирующими HER2, посредством взаимодействия трастузумаба с рецепторами HER2, присутствующими на поверхности раковых клеток. Диагностический метод с использованием наночастиц PLGA, нацеленных на рецептор HER2, был реализован за счёт инкапсуляции NB с последующим облучением красным светом для

визуализации опухоли. Наночастицы эффективно интернализовались в клетки и после клеточного поглощения клетками флуоресцировали при возбуждении красным светом благодаря сольватохромным свойствам NB [258]. NB представляет собой водонерастворимый краситель, флуоресцирующий только в липофильном микроокружении внутри клеток, со слабой флуоресценцией вне клеток в водных буферных системах. Благодаря этому эффекту уменьшалась фоновая флуоресценция наночастиц, поэтому визуализация опухоли не требовала их полной элиминации из кровотока после системного введения *in vivo*.

Терапевтический подход с визуальным контролем был реализован за счет включения красителя Rose Bengal в первую водную фазу во время синтеза наночастиц. RB представляет собой ксантеновый фотосенсибилизатор, который производит АФК под воздействием зеленого света. Он демонстрирует слабую флуоресценцию при возбуждении как зелёным, так и красным светом [259], не оказывает влияния на флуоресцентный сигнал NB и не индуцирует образование АФК при воздействии красным светом, таким образом, являясь идеальным агентом для ФДТ опухолей, который можно активировать после биовизуализации, опосредованной NB. Таким образом, диагностический и терапевтический подходы объединены в одной наночастице, разработанной для дифференциальной активации красным или зелёным световым излучением, что обеспечивает HER2-специфическую диагностику и ФДТ.

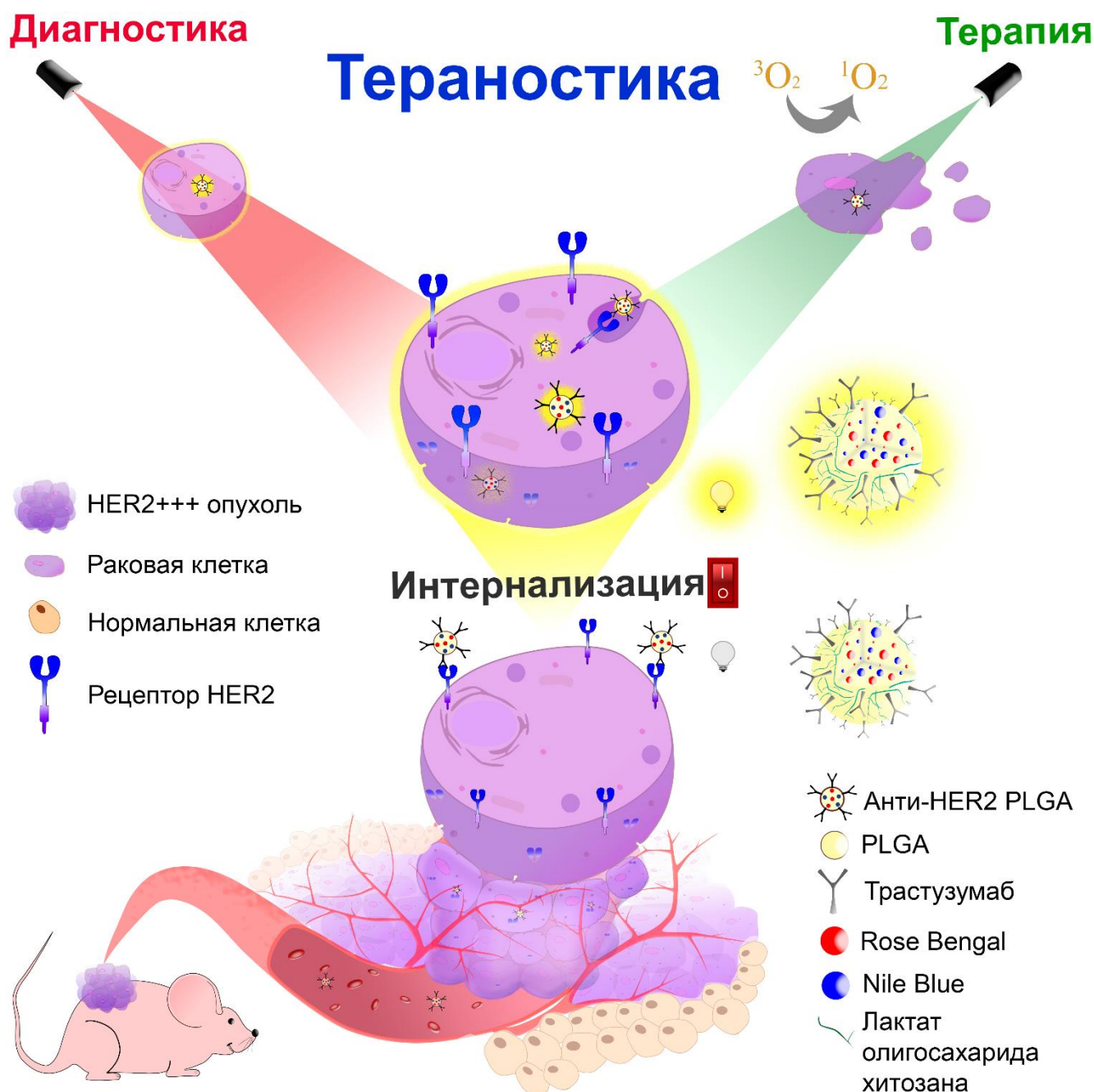


Рисунок 10. Схематическое изображение адресных наночастиц анти-HER2 PLGA. Полимерные наночастицы загружены фотосенсибилизатором Rose Bengal и флуоресцентным красителем Nile Blue и покрыты моноклональным антителом трастузумабом. Диагностический краситель NB визуализирует опухоль HER2+ *in vivo* при облучении красным светом, тогда как терапевтический краситель RB генерирует АФК при облучении зеленым светом.

3.3 Синтез и характеристика наночастиц анти-HER2 PLGA

Полимерные наночастицы были синтезированы методом двойной эмульсии, как схематически показано на рисунке 11а. Первую эмульсию получали обработкой ультразвуком смеси раствора PLGA и NB в хлороформе с раствором

RB в воде. Вторую эмульсию получали путем обработки ультразвуком первой эмульсии и смеси поливинилового спирта и лактата олигосахарида хитозана в ФСБ.

Чтобы обеспечить нацеливание на рецептор HER2 на поверхности клетки, к синтезу частиц было добавлено моноклональное антитело трастузумаб во вторую водную фазу. Антитело включается во внешний слой наночастиц, вероятно, через его слегка гидрофобный Fc-фрагмент по сравнению с Fab-фрагментами [260]. Поскольку PLGA является гидрофобным полимером, формирующим наночастицы в водном микроокружении, в структуру наночастиц можно включить слабогидрофобный фрагмент белка. Присутствие антител против рецептора HER2 на поверхности наночастиц PLGA было подтверждено с помощью теста флуоресцентной спектроскопии путем мечения поверхности наночастиц флуоресцентными антителами против IgG человека. Данные, представленные на рисунке 13, подтвердили, что поверхность адресных наночастиц PLGA была модифицирована моноклональным антителом трастузумаб против рецептора HER2.

Морфологию полученных наночастиц с трастузумабом и без него исследовали с помощью электронной сканирующей и просвечивающей микроскопии. Данные, представленные на рисунке 11б-ж, демонстрируют, что наночастицы являются монодисперсными и сферическими со средним диаметром 235 ± 68 и 232 ± 67 нм для анти-HER2 PLGA и PLGA.

Данные динамического и электрофоретического светорассеяния свидетельствуют, что гидродинамический размер наночастиц составил 369 ± 166 и 323 ± 113 нм для анти-HER2 PLGA и PLGA (рисунок 11и), а ζ -потенциал -0.66 ± 13.9 и -3.60 ± 14.8 мВ для анти-HER2 PLGA и PLGA (рисунок 11к). Полученные данные подтверждают коллоидную стабильность синтезированных наночастиц.

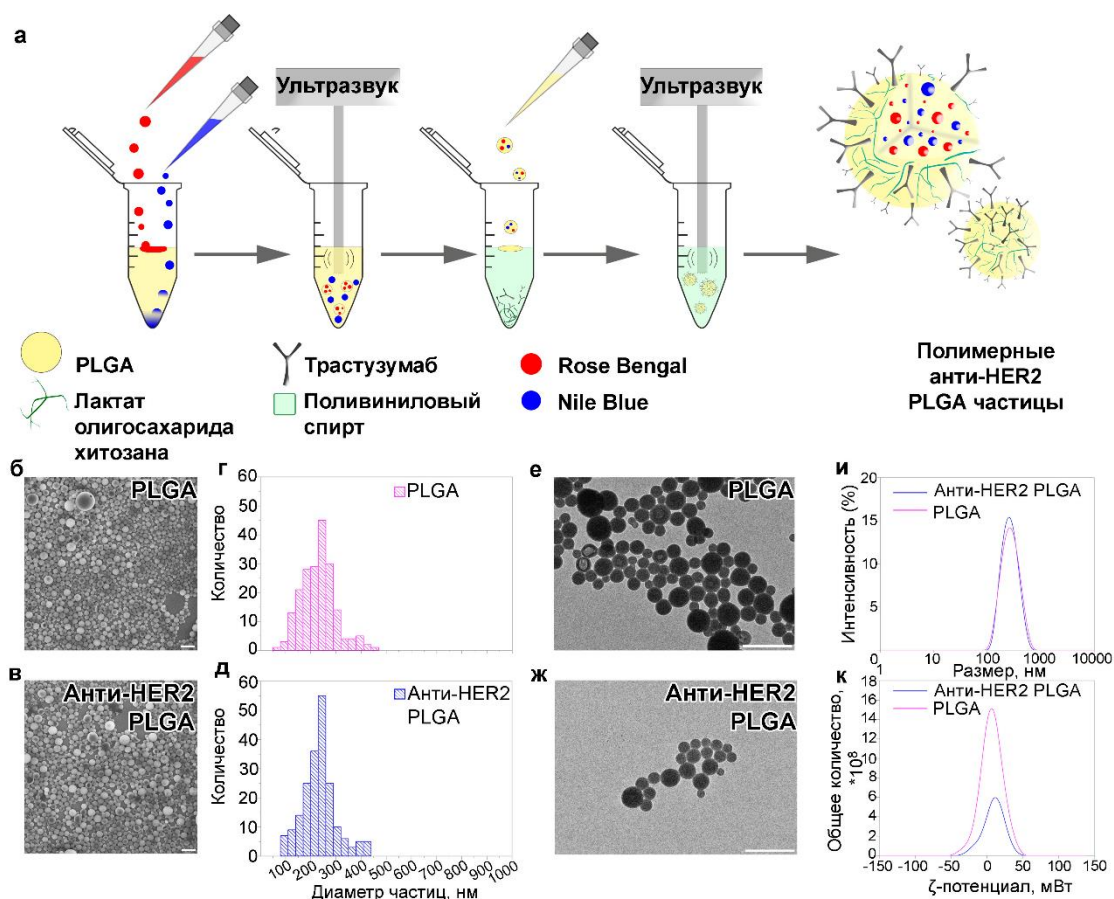


Рисунок 11. Синтез и характеристика тераностических наночастиц PLGA, направленных на HER2. (а) Схематическая иллюстрация синтеза наночастиц, направленных на HER2. Схема метода двойной эмульсии «вода-масло-вода». Частицы нагружены NB в качестве диагностического метода и фотосенсибилизатором RB в качестве терапевтического метода. (б, в) Сканирующие электронные микрофотографии немодифицированных наночастиц PLGA (б) и анти-HER2 PLGA (в). Шкалы – 1 мкм. (г, д) Распределение физических размеров немодифицированных наночастиц PLGA (г) и анти-HER2 PLGA (д). (е, ж) Просвечивающие электронные микрофотографии немодифицированных наночастиц PLGA (е) и анти-HER2 PLGA (ж). (и) Гидродинамическое распределение размеров немодифицированных наночастиц PLGA и анти-HER2 PLGA. (к) Распределение ζ -потенциалов немодифицированных наночастиц PLGA и анти-HER2 PLGA, полученное методом электрофоретического рассеяния света.

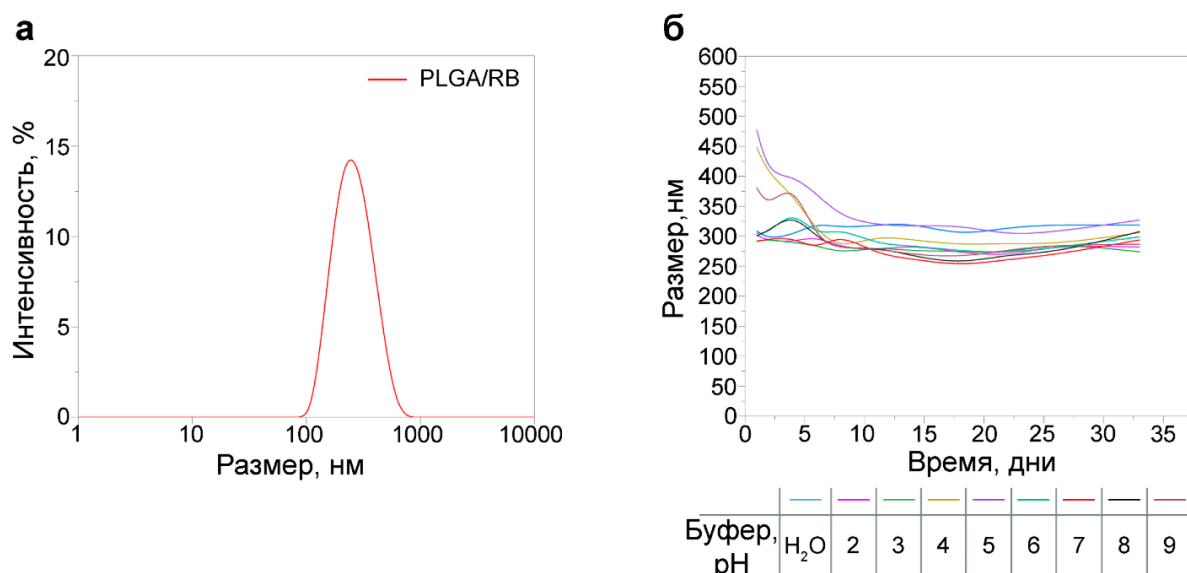


Рисунок 12. Оценка коллоидной стабильности наночастиц PLGA. (а) Гидродинамический размер частиц PLGA/RB. (б) Коллоидная стабильность PLGA/RB при pH 2-9, измеренная с помощью ДЛС.

Долговременная коллоидная стабильность анти-HER2 PLGA была подтверждена измерением гидродинамического диаметра наночастиц после 1 месяца хранения в буферных системах при pH в диапазоне от 2 до 9 (рисунок 12б). Во избежание взаимодействия NB с длиной волны лазера 633 нм на анализаторе ZetaSizer NanoZS для данного теста использовали наночастицы без NB (PLGA/RB). Измерения динамического светорассеяния показали стабильность наночастиц в течение месяца при pH от 2 до 9; наночастицы не образовывали агрегатов в течение как минимум 35 дней при всех тестируемых условиях.

Измерения эффективности загрузки NB и RB методом флуоресцентной спектроскопии показали, что загрузка красителей равна 2.31 ± 0.04 мкг RB на 1 мг наночастиц и 2.54 ± 0.04 мкг NB на 1 мг наночастиц.

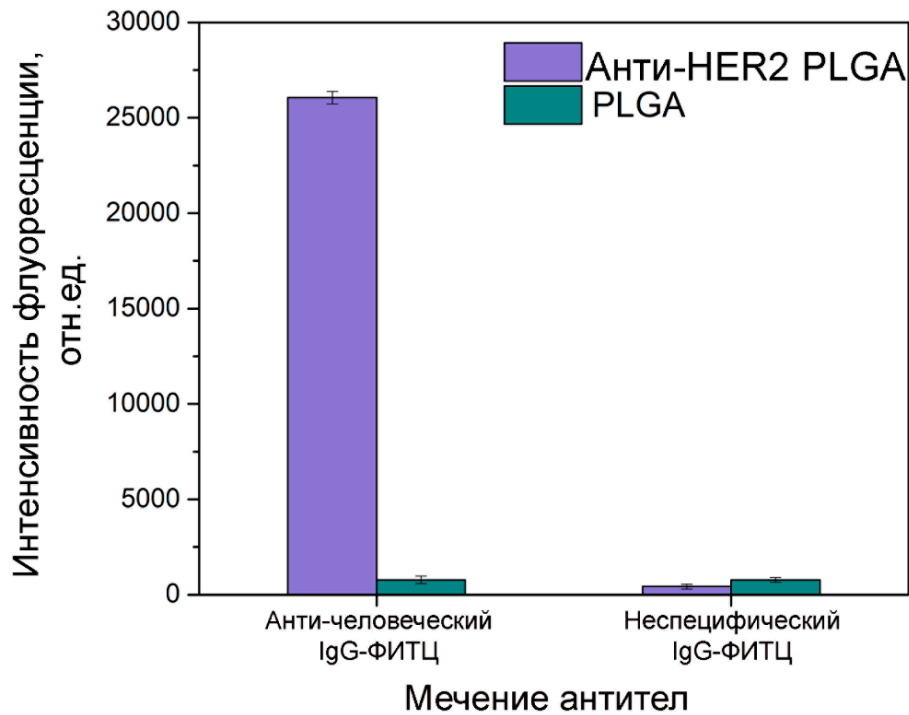


Рисунок 13. Характеристика наночастиц анти-HER2 PLGA: наличие антитела (гуманизированного анти-HER2 IgG) на поверхности PLGA. Адресные и неадресные наночастицы PLGA инкубировали с конъюгированными с ФИТЦ козьими античеловеческими IgG (специфичными к трастузумабу) и с конъюгированными с ФИТЦ контролем (козьи анти-дигоксиновые IgG), отмывали от несвязанных IgG и анализировали с помощью флуоресцентной спектроскопии при возбуждении и условия излучения, соответствующие флуоресценции ФИТЦ.

3.4 Специфическое взаимодействие анти-HER2 PLGA с HER2-положительными клетками

Эффективность нацеливания тераностических наночастиц PLGA к рецептору HER2 была подтверждена *in vitro* с помощью специфического флуоресцентного мечения раковых клеток с гиперэкспрессией HER2. Для этих тестов использовали клетки BT-474 со стабильной экспрессией люциферазы NanoLuc – клетки BT-NanoLuc [261,262]. Для проверки гиперэкспрессии HER2 на поверхности клеток BT-NanoLuc был проведен анализ методом проточной цитофлуориметрии после инкубации с антителом к рецептору HER2, конъюгированным с флуоресцентным красителем ФИТЦ – трастузумаб-ФИТЦ. Клетки яичника китайского хомяка (CHO) использовали в качестве отрицательного контроля (без рецептора HER2) [36].

Данные, представленные на рисунке 14а, подтверждают гиперэкспрессию HER2 клетками BT-NanoLuc; а именно, средние интенсивности флуоресценции (MFI) клеточных популяций, меченных трастузумабом-ФИТЦ, были равны 207 441 и 12 706 для клеток BT-NanoLuc и CHO соответственно. Данные проточной цитометрии подтверждаются методами флуоресцентной микроскопии: клетки были мечены трастузумаб-ФИТЦ и Хёхст 33342 и визуализированы с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (рисунок 14б).

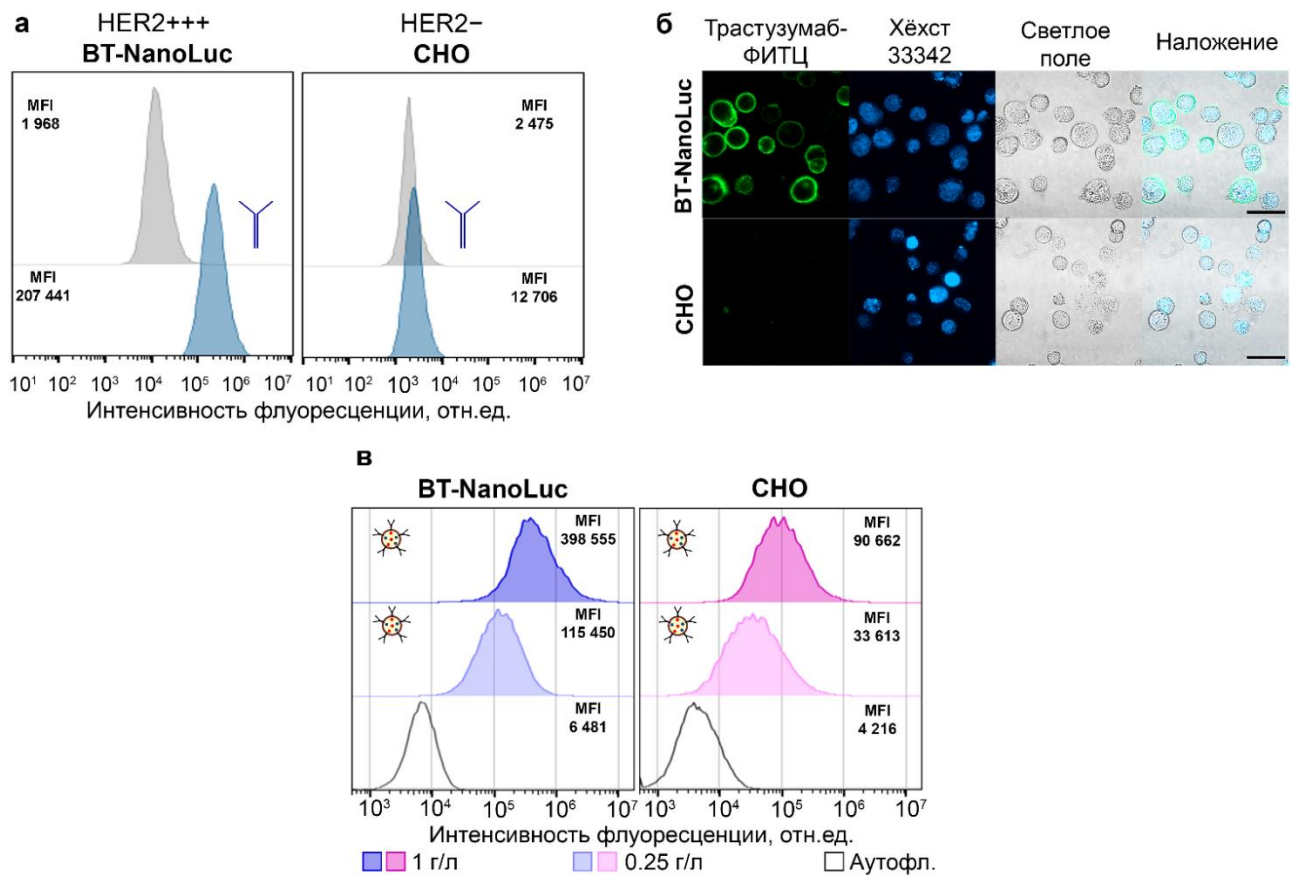


Рисунок 14. Нацеливание тераностических наночастиц PLGA на рецептор HER2 раковых клеток *in vitro*. (а) Анализ экспрессии рецептора HER2 на поверхности клеток BT-NanoLuc и CHO с помощью проточной цитометрии. Синие гистограммы – клетки, меченные трастузумаб-ФИТЦ, серые гистограммы – аутофлуоресценция. Данные получены в канале FL1 (λ_{ex} = 488 нм, λ_{em} = 525/20 нм). (б) Изображения конфокальной микроскопии клеток BT-NanoLuc и CHO в присутствии трастузумаб-ФИТЦ (λ_{ex} = 488 нм, λ_{em} = 492–500 нм) и красителя Хёхст 33342 для окрашивания ядер (λ_{ex} = 405 нм, λ_{em} = 410–520 нм). Шкалы – 50 мкм. (в) Оценка эффективности адресной доставки PLGA наночастиц в отношении HER2-положительных клеток. Синие и розовые гистограммы: клетки, меченные анти-HER2 PLGA в разных концентрациях, контурные гистограммы –

аутофлуоресценция клеток. Данные проточной цитометрии получали в канале FL4 ($\lambda_{ex} = 640$ нм, $\lambda_{em} = 675/25$ нм).

Далее была оценена способность анти-HER2 PLGA к нацеливанию на HER2-положительные клетки с помощью метода проточной цитометрии. Данные, представленные на рисунке 14в и 15, подтверждают специфические взаимодействия адресных наночастиц PLGA с клетками, гиперэкспрессирующими HER2: MFI клеток BT-NanoLuc, меченных PLGA против HER2, примерно в 4.5 раза выше, чем для клеток CHO.

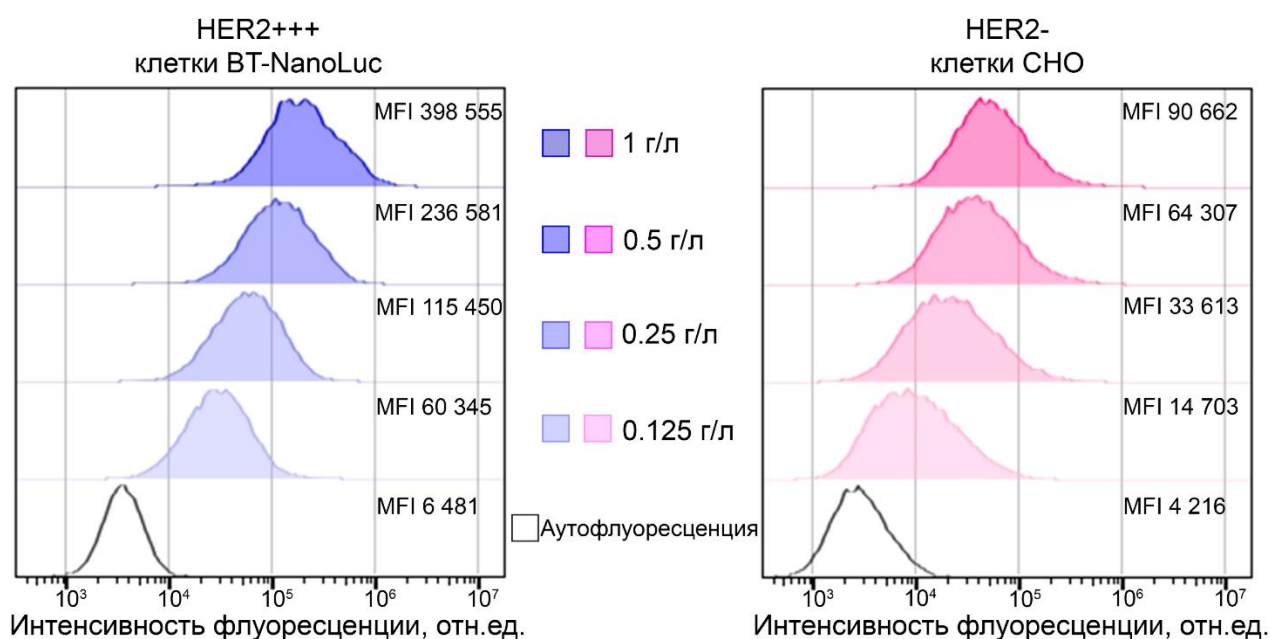


Рисунок 15. Исследование эффективности связывания адресных наночастиц анти-HER2 PLGA с помощью проточной цитометрии: синие и розовые гистограммы: клетки, меченные анти-HER2 PLGA в разных концентрациях, черные открытые гистограммы – аутофлуоресценция клеток. Данные проточной цитометрии получали в канале FL4 ($\lambda_{ex} = 640$ нм, $\lambda_{em} = 675/25$ нм).

3.5 Визуализация частиц наночастиц анти-HER2 PLGA *in vitro*

Липофильная природа Nile Blue и его высокие сольватохромные свойства, означающие, что излучение флуоресценции сильно зависит от используемого растворителя, особенно от его полярности, делают этот краситель отличным кандидатом для визуализации наночастиц только после поглощения клетками. Этот факт был подтвержден с помощью как бесклеточных, так и *in vitro* тестов.

Для подтверждения диагностического потенциала тераностических наночастиц анти-HER2 PLGA была проведена визуализация клеток с гиперэкспрессией рецептора HER2. Клетки высевали на 96-луночные планшеты, затем добавляли анти-HER2 PLGA без стадии промывания от несвязавшихся частиц. Клетки инкубировали с наночастицами в течение 5 мин (тест до интернализации) и 1 ч (тест после интернализации), а затем визуализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии при следующих условиях: $\lambda_{ex} = 543$ нм, $\lambda_{em} = 552\text{--}622$ нм (визуализация RB, канал FL2) и $\lambda_{ex} = 639$ нм, $\lambda_{em} = 676\text{--}693$ нм (визуализация NB, канал FL3) (рисунки 14г и 16). Отсутствие этапов промывки было намеренным, чтобы продемонстрировать, что флуоресценция в канале FL3, которая соответствует флуоресценции NB, наблюдается только через 1 час после инкубации, тогда как наночастицы в канале FL2 легко визуализируются (флуоресценция соответствует красителю Rose Bengal, сольватохромные свойства которого не так выражены).

Данные, представленные на рисунке 14г, свидетельствуют о том, что при возбуждении зеленым лазером вне клеток в канале FL2 наблюдается флуоресценция наночастиц, соответствующая флуоресценции RB ($\lambda_{ex} = 543$ нм, $\lambda_{em} = 552\text{--}622$ нм, голубой цвет) до (5-минутная инкубация) и после интернализации наночастиц (инкубация 1 час). Однако флуоресценция наночастиц в канале FL3, соответствующая флуоресценции NB ($\lambda_{ex} = 639$ нм, $\lambda_{em} = 676\text{--}693$ нм, оранжевый цвет), наблюдается только после интернализации наночастиц в клетки. После 5-минутной инкубации флуоресценция у FL3 практически отсутствует. Таким образом, выбрав корректные длины волн возбуждения и излучения флуоресценции, было показано, что детектируются наночастицы, которые интернализованы в клетку.

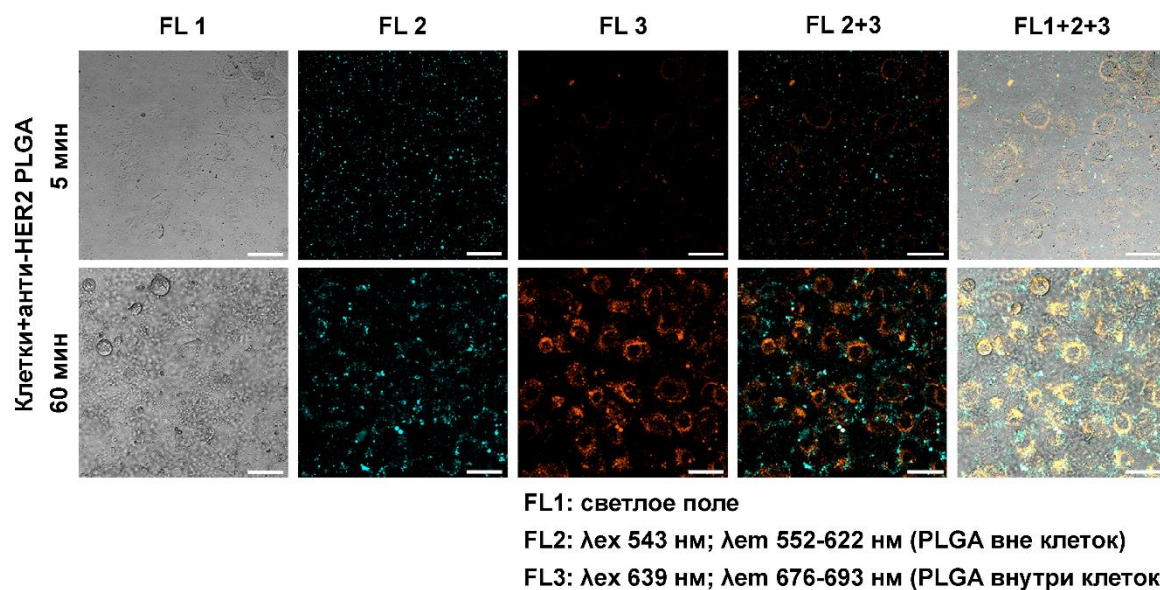


Рисунок 16. Флуоресценция анти-HER2 PLGA наночастиц, интернализованных в клетки, вызванная красителем NB. Конфокальная микроскопия клеток BT-NanoLuc после инкубации с наночастицами PLGA против HER2, содержащими флуоресцентные красители: RB (канал FL2) и NB (канал FL3) без каких-либо этапов отмывки от несвязанных наночастиц. Шкалы – 50 мкм.

Также важно отметить, что присутствие RB внутри наночастиц усиливает этот эффект. Флуоресценция наночастиц внутри полярного микроокружения была значительно выше для частиц, содержащих одновременно NB и RB, по сравнению с наночастицами, загруженными только RB (рисунок 16). Это явление, скорее всего, связано с эффектом FRET между NB и RB в наночастице (рисунок 17).

Сольватохромные свойства NB в наночастицах были подтверждены методом флуоресцентной спектроскопии. Наночастицы, нагруженные Nile Blue (PLGA/NB), Rose Bengal (PLGA/RB) или обоими красителями (PLGA/NB/RB), облучали при λ_{ex} = 500–530 нм, соответствующей диапазону возбуждения красителем RB, и при λ_{ex} = 590–630 нм, соответствующей диапазону возбуждения NB, в водном буферном растворе (ФСБ) или полярном растворителе (ДМСО).

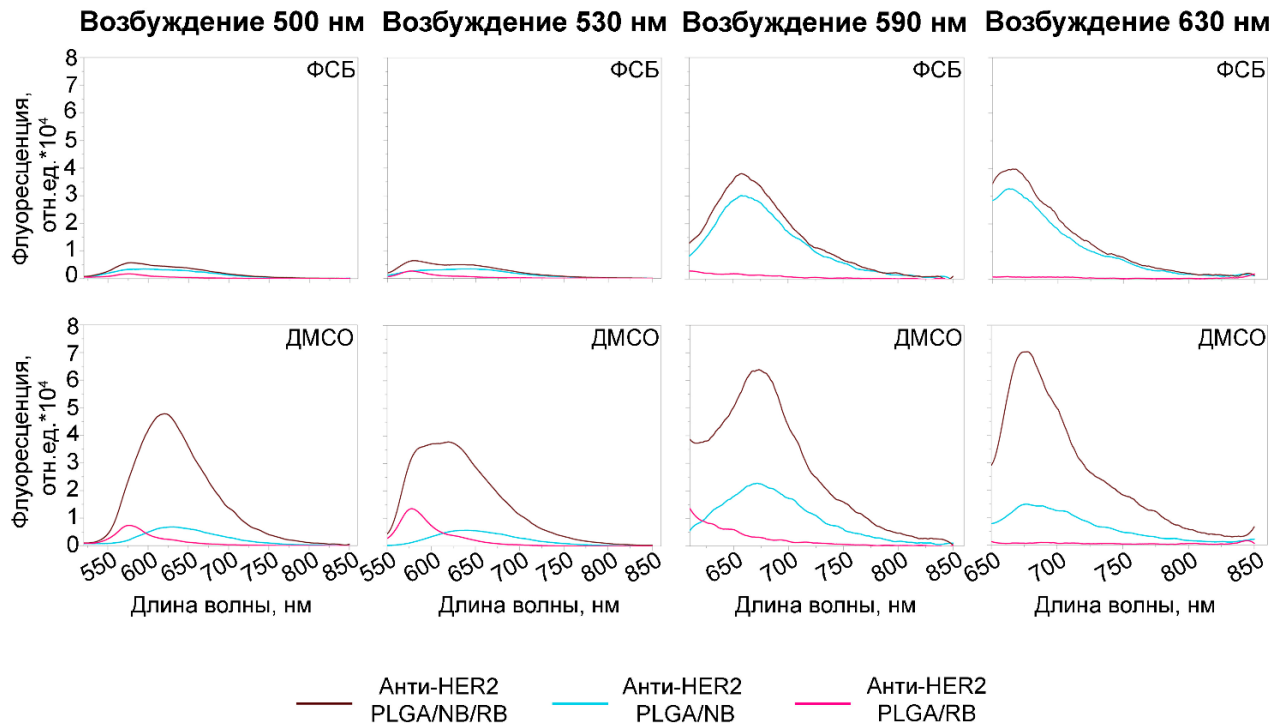


Рисунок 17. Флуоресценция наночастиц анти-HER2 PLGA. Регистрировали спектры эмиссии флуоресценции адресных наночастиц анти-HER2 с различной загрузкой красителя в ФСБ и ДМСО при λ_{ex} = от 500 до 630 нм.

Данные, представленные на рисунке 17, подтверждают, что при совместной загрузке наночастиц обоими красителями интенсивность их флуоресценции значительно возрастает по сравнению с наночастицами, содержащими только NB или RB, в полярном растворителе ДМСО (см. возбуждение при 630 нм), что, вероятно, обусловлено эффектом FRET между RB и NB.

3.6 Продукция АФК адресными анти-HER2 PLGA наночастицами

Наночастицы анти-HER2 PLGA были загружены красителем RB, который является фотосенсибилизатором и используется в качестве антибактериального агента ввиду активной продукции АФК, а также в исследованиях по лечению меланомы. Чтобы найти наиболее эффективную концентрацию RB во время синтеза наночастиц и предотвратить проблемы, связанные с агрегацией красителя в структуре наночастиц, было проведено исследование эффективности генерации АФК. Синтез частиц осуществляли с использованием красителей в концентрации 1 г/л NB и серийных двукратных разведений RB в диапазоне 0.2-3 г/л, а также частиц, синтезированных только с одним красителем: NB или RB.

Для предварительной оценки терапевтических свойств наночастиц измеряли генерацию АФК при воздействии на адресные частицы лазера $\lambda_{\text{ex}} = 532$ нм. Чтобы исследовать наличие комбинированного эффекта зеленого и инфракрасного излучения для фотосенсибилизации, наночастицы облучали лазером с длиной волны $\lambda_{\text{ex}} = 808$ нм и комбинацией лазеров с длинами волн $\lambda_{\text{ex}} = 532$ и 808 нм. Для оценки эффективности генерации АФК посредством измерения интенсивности флуоресценции использовали набор для анализа общего количества активных форм кислорода, 520 нм (рисунки 18а и 19). Согласно полученным данным (рисунок 18а), чем выше концентрация RB, тем выше продукция АФК при облучении с длиной волны $\lambda_{\text{ex}} = 532$ нм. Интересно, что добавление NB в наночастицы не влияет на генерацию АФК при облучении зеленым светом и слегка снижает АФК при использовании комбинации зеленого и ближнего инфракрасного излучения по сравнению с наночастицами, загруженными только RB (рисунок 18а).

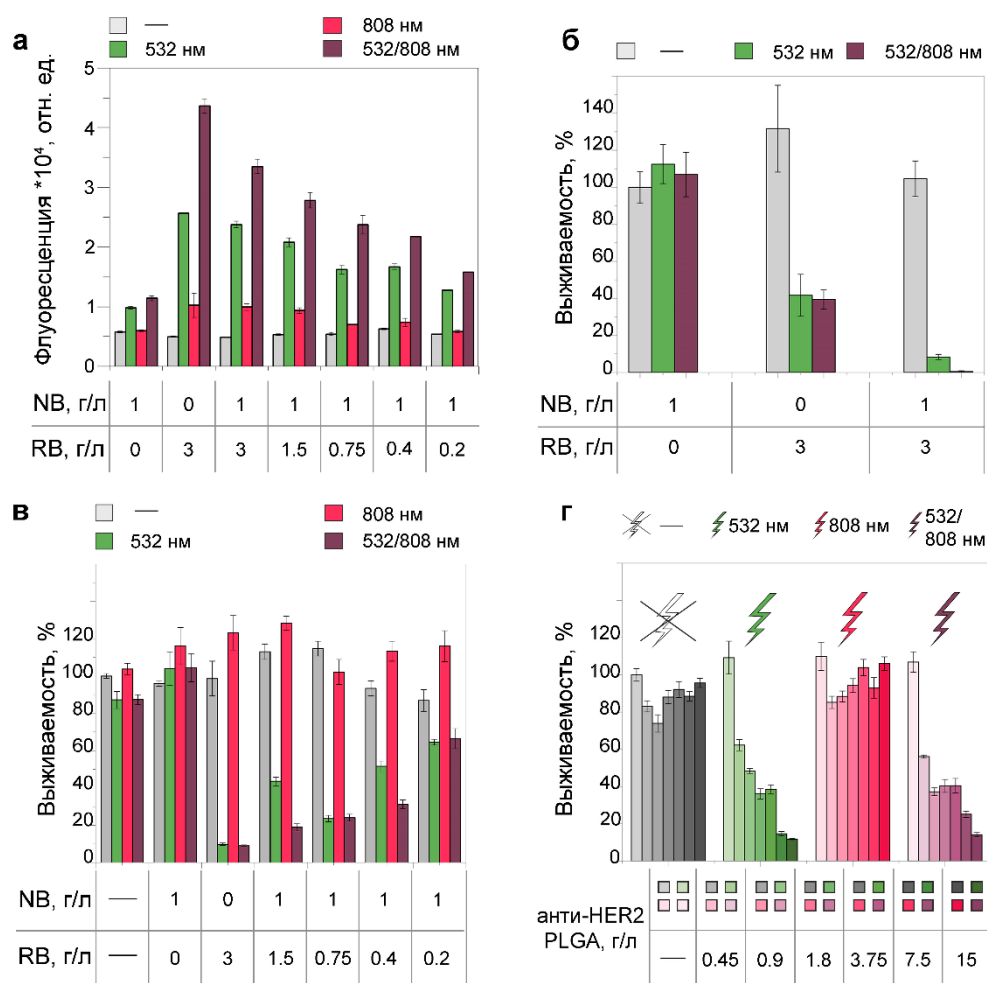


Рисунок 18. Светоиндуцированная цитотоксичность наночастиц анти-PLGA в отношении раковых клеток с гиперэкспрессией рецептора HER2 *in vitro*, опосредованная образованием АФК. (а) Продукция АФК адресными наночастицами PLGA при лазерном облучении ($\lambda_{ex} = 532, 808$ или $532/808$ нм) в зависимости от загрузки RB и NB в наночастицу PLGA в процессе синтеза. (б) Жизнеспособность BT-NanoLuc оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки инкубировали с наночастицами, содержащими различные составы красителей, и облучали лазерами: $\lambda_{ex} = 532, 808$ или $532/808$ нм в течение 10 мин. В качестве контроля использовали немеченые и необлученные клетки. (в) Анализ жизнеспособности BT-NanoLuc при воздействии различных концентрации RB в наночастицах PLGA. (г) Анализ жизнеспособности BT-NanoLuc: зависимость от концентрации цитотоксичность наночастиц PLGA анти-HER2, загруженных NB (1 г/л) и RB (3 г/л), изучали при облучении лазерами: $\lambda_{ex} = 532, 808$ или $532/808$ нм в течение 10 мин.

Затем измеряли жизнеспособность клеток со сверхэкспрессией HER2, инкубированных с наночастицами анти-HER2 PLGA. Чтобы оценить процент жизнеспособных клеток при воздействии адресных наночастиц и облучения, была проведена серия МТТ-анализов и клоногенных тестов (рисунки 18б-г и 21). Для оценки цитотоксических эффектов сравнивали адресные наночастицы, содержащие один (NB или RB) или оба красителя (NB/RB). Клетки BT-NanoLuc инкубировали с наночастицами и облучали зеленым или зеленым/ближним ИК-лазером. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные с наночастицами без облучения. Данные, представленные на рисунке 18б, демонстрируют, что в отличие от исследования бесклеточных АФК, частицы, нагруженные обоими красителями, проявляют более сильный цитотоксический эффект по сравнению с частицами только с RB при облучении как зеленым, так и зеленым/ближним ИК-светом (рисунок 18б). Вероятно, это связано с дополнительными цитотоксическими эффектами красителя NB при воздействии БИК-света, не связанными с высвобождением АФК; при воздействии БИК-света на наночастицы, содержащие RB, усиленного цитотоксического эффекта не наблюдалось, что подтверждает эффект БИК-света только в присутствии NB (рисунок 18б).

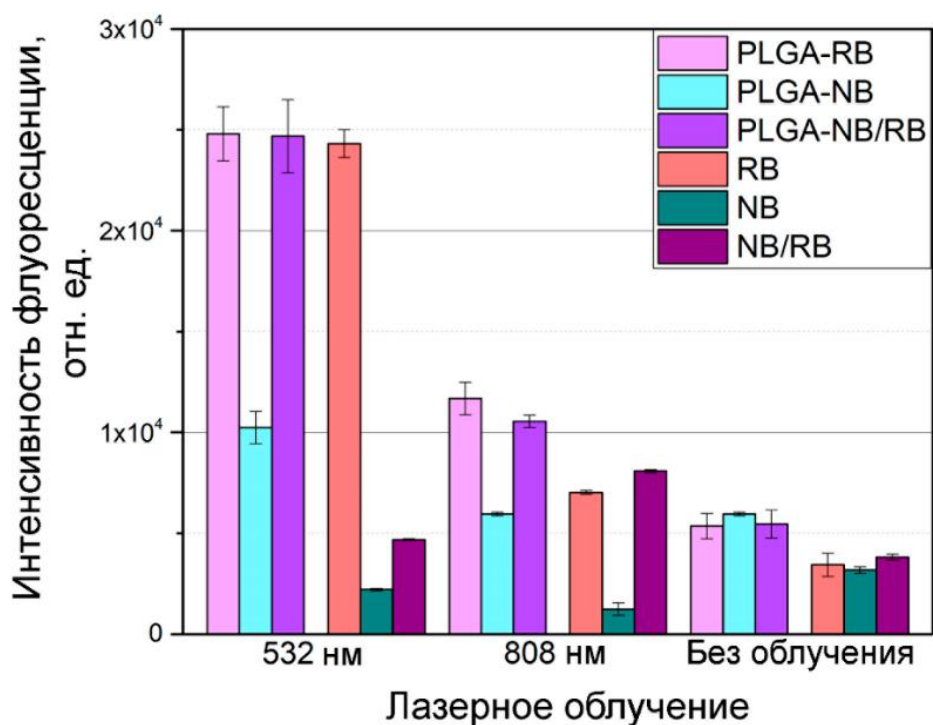


Рисунок 19. Исследование генерации АФК. Наночастицы анти-HER2 PLGA, загруженные RB, NB или их комбинацией, а также свободные молекулярные формы красителей (RB, NB и смесь RB/NB) в эквимоллярных концентрациях, были облучены лазерами с длинами волн 532 и 808 нм в течение 5 мин. АФК измеряли с помощью набора для анализа общего количества активных форм кислорода, 520 нм (Thermo). Флуоресценцию образцов измеряли через 30 мин после лазерного облучения.

Поскольку цитотоксичность RB не полностью коррелирует с продукцией АФК *in vitro*, было изучено влияние концентрации загрузки RB на светоиндуцированную цитотоксичность. Данные, представленные на рисунке 18в, подтверждают, что концентрация 3 г/л RB при синтезе по-прежнему является оптимальной, что и было использовано в дальнейших экспериментах, а именно в концентрационных и временных исследованиях. Интересно, что при облучении лазером длиной волны 808 нм мы не наблюдали выраженной цитотоксичности наночастиц; однако двойное возбуждение 532/808 нм приводило к немного большему цитотоксическому эффекту, чем только 532 нм. Мы предполагаем, что данное явление обусловлено синергетическим взаимодействием двух красителей, локализованных внутри полимерной наночастицы. Этот синергизм может определяться двумя ключевыми факторами: 1) реализацией внутривещного

безызлучательного переноса энергии (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer*) между NB и RB, при котором возбужденное состояние RB передается на молекулы NB, что, вероятно, способно модулировать метаболическую активность клеток; 2) усиление генерации АФК при сочетанном облучении, нагруженных NB/RB наночастиц лазерным излучением с длинами волн 532 и 808 нм по сравнению с облучением лазером длиной волны 532 нм. Эти два эффекта, скорее всего, усиливают цитотоксичность наночастиц при двойном возбуждении длиной 532/808 нм по сравнению только с 532 нм.

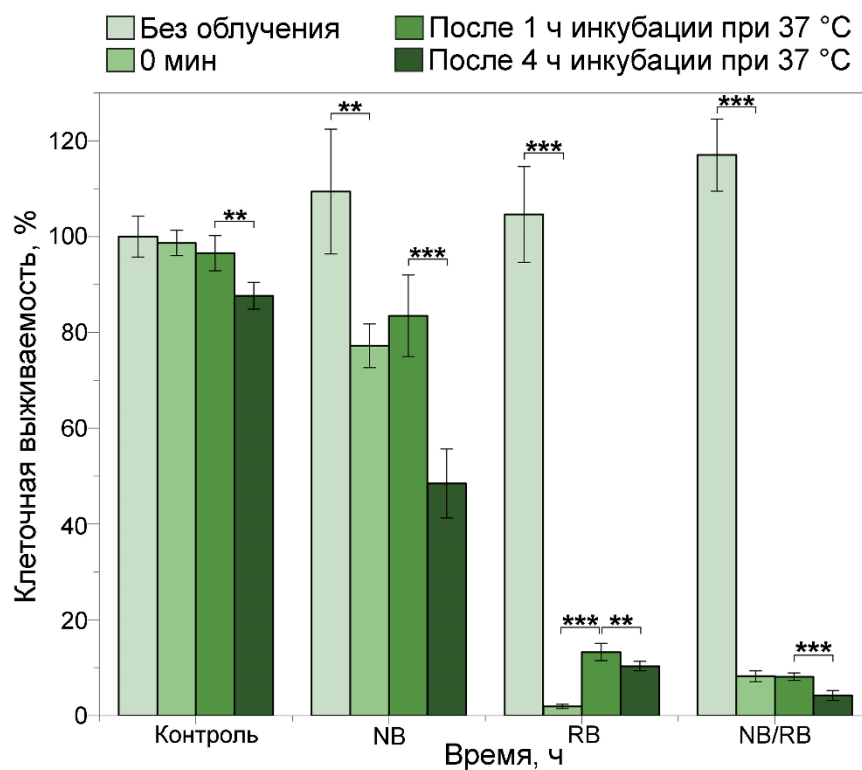


Рисунок 20. *In vitro* оценка цитотоксичности адресных наночастиц анти-HER2 PLGA в отношении раковых клеток, гиперэкспрессирующих рецептор HER2. Клетки инкубировали с адресными наночастицами с различной загрузкой красителей (NB, RB, NB/RB) и облучали зеленым лазером в течение 10 мин. Облучение проводили сразу (0 мин), через 1 и 4 ч после отмывки клеток от несвязавшихся частиц. В качестве контроля использовали клетки без добавления частиц. $P < 0,01$ (**), $0,001$ (***), t-критерий Уэлча.

Затем клетки BT-NanoLuc инкубировали с анти-HER2 PLGA наночастицами в разных концентрациях (рисунок 18г) и в течение разного времени инкубации (рисунок 20). После удаления несвязавшихся наночастиц образцы подвергали

лазерному облучению. Более высокая концентрация наночастиц приводила к более высокой светоиндуцированной цитотоксичности (рисунок 18г). Более того, цитотоксичность, индуцированная анти-HER2 PLGA, значительно возрастает при интернализации наночастиц в клетку – цитотоксичность значительно повышается после длительной инкубации наночастиц с клетками при температуре +37 °С, и цитотоксичность может быть немного увеличена при использовании комбинации облучения зеленым и ближним светом.

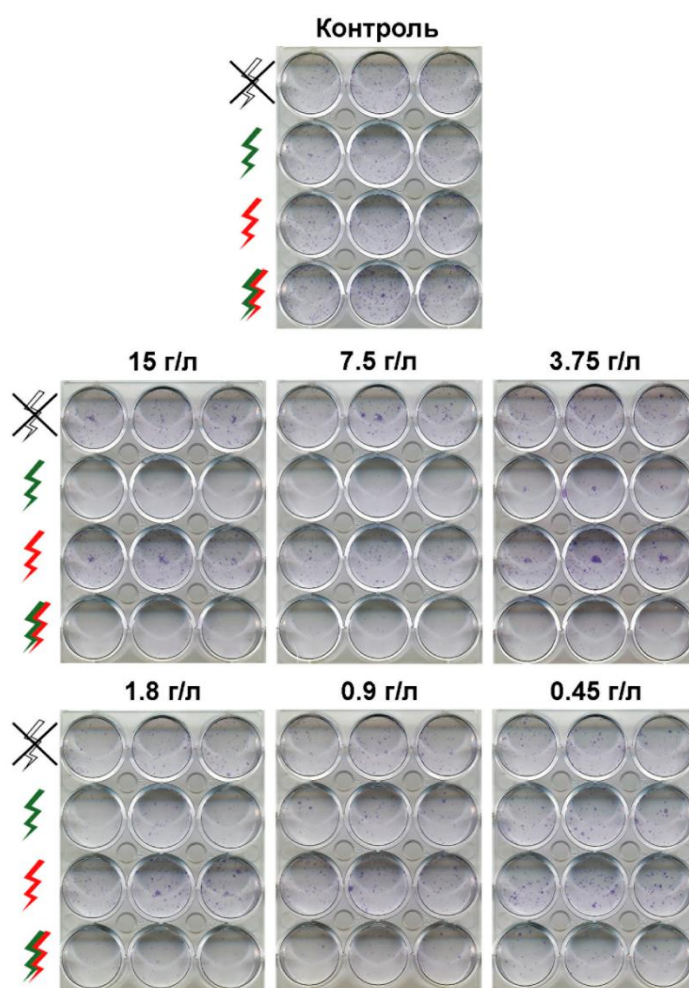


Рисунок 21. Клоногенный анализ. Оценка пролиферативной активности клеточных линий BT-NanoLuc после воздействия анти-HER2 PLGA и облучения лазерами: $\lambda_{ex} = 532$ нм, 808 нм или 532/808 нм в течение 10 мин.

3.7 Изучение механизма гибели HER2-положительных клеток, меченных анти-HER2 PLGA

Для изучения механизма гибели HER2-положительных клеток после светового облучения мы сначала исследовали динамику роста клеток. Скорость

роста HER2-положительных клеток исследовали с использованием системы клеточного анализа в реальном времени (RTCA) E16 xCelligence (рисунок 22а). RTCA – это безметочный биосенсор, который непрерывно контролирует поведение клеток, измеряя импеданс золотых микроэлектродов на нижней поверхности лунки микропланшета с клетками. Импеданс потока электронов в лунке, вызванный прилипшими клетками, представлен как безразмерный параметр, называемый клеточным индексом (КИ), $КИ = (\text{импеданс в момент времени } n - \text{импеданс в отсутствие клеток}) / \text{номинальное значение импеданса}$.

Клетки BT-NanoLuc инкубировали с анти-HER2 PLGA наночастицами и облучали лазером 532 нм. Облученные и необлученные клетки с наночастицами высевали на планшеты E16 и исследовали рост клеток в течение 150 ч (6.2 дня). Данные, представленные на рисунке 22а, демонстрируют, что при облучении динамика роста клеток существенно зависит от концентрации наночастиц. Однако в отсутствие облучения адресные наночастицы незначительно влияют на рост клеток; единственное значительное снижение наблюдается для самой высокой используемой концентрации. Было показано, что снижение динамики роста клеток после облучения связано в основном с загрузкой RB в наночастицу и незначительно зависит от загрузки NB.

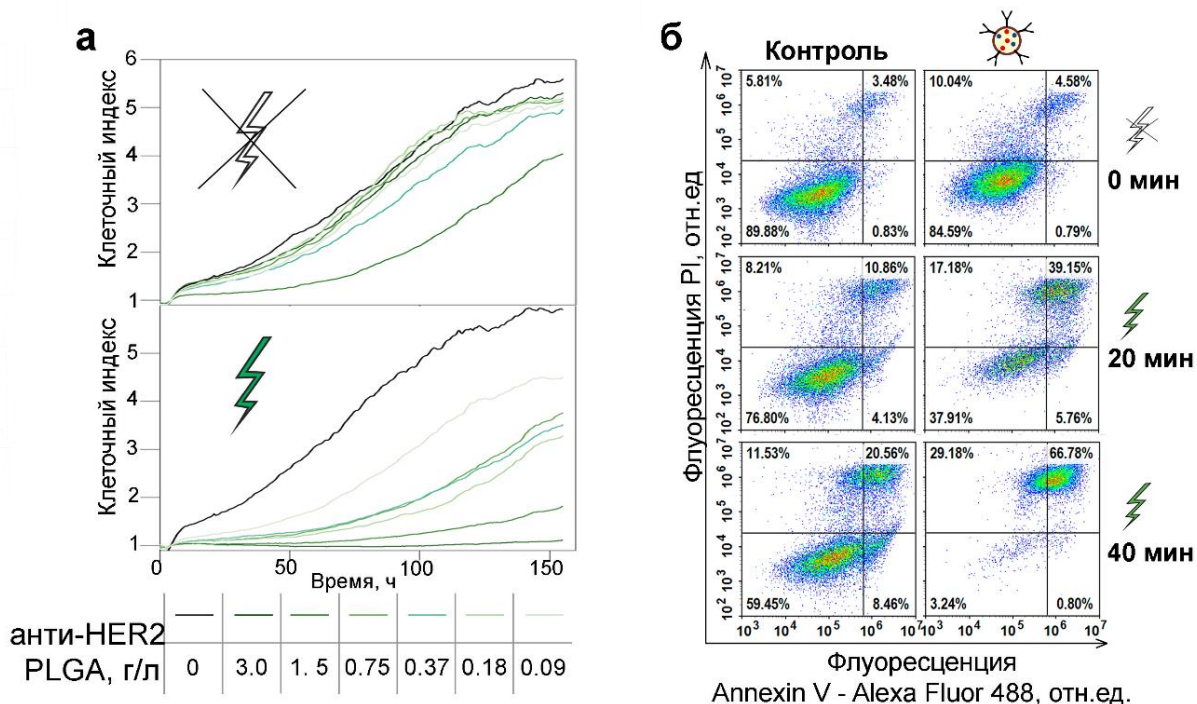


Рисунок 22. Фотоиндуцированная цитотоксичность наночастиц PLGA в отношении раковых клеток с гиперэкспрессией рецептора HER2 *in vitro*, опосредованная генерацией АФК. (а) Анализ скорости роста клеток BT-NanoLuc в реальном времени после инкубации с наночастицами PLGA против HER2 и облучения зеленым светом: зависимость индекса клеток от времени культивирования. (б) Исследование механизма гибели клеток. Анализ проточной цитометрии Annexin V/PI клеток, обработанных анти-HER2 PLGA и облученных зеленым светом в течение 0 – 40 минут. Точечные графики проточной цитометрии показывают зависимость интенсивности флуоресценции PI (маркера позднего апоптоза/некроза) от интенсивности сигнала Annexin V (маркера апоптоза). Популяции жизнеспособных, ранних апоптотических, а также поздних апоптотических и некротических клеток локализованы в левом нижнем (Annexin V–/PI–), правом нижнем (Annexin V+/PI–) и правом верхнем (Annexin V+/PI+) квадрантах соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что гибель клеток преимущественно обусловлена достаточно медленным механизмом запрограммированной гибели клеток (апоптоз), а не немедленной гибелью вследствие повреждения (некроз). Для определения механизма гибели клеток использовали тест с Annexin V-Alexa Fluor 488/PI для проточной цитометрии. Клетки BT-NanoLuc инкубировали с анти-HER2 PLGA наночастицами против рецептора HER2 в различных концентрациях, облучали зеленым лазером от 0–40

минут и высевали в 6-луночные планшеты. Клетки культивировали в течение 12 часов, а затем окрашивали Annexin V-Alexa Fluor 488/PI и анализировали с помощью проточной цитометрии (рисунок 22б). Данные, представленные на рисунке 22б, демонстрируют наличие апоптотических (правый нижний квадрант) и поздних апоптотических/некротических (правый верхний квадрант точечной диаграммы проточной цитометрии) клеток в зависимости от концентрации наночастиц и времени облучения, что подтверждает путь гибели клеток через апоптоз.

3.8 Флуоресцентная биовизуализация опухолей с наночастицами анти-HER2 PLGA *in vivo*

Диагностические свойства наночастиц анти-HER2 PLGA изучали по их способности визуализировать локализацию опухолей, гиперэкспрессирующих HER2. Мышам BALB/c Nu/Nu подкожно вводили клетки BT-NanoLuc, гиперэкспрессирующие рецептор HER2. Стабильная экспрессия люциферазы NanoLuc позволяет отслеживать рост опухоли и распространение метастазов неинвазивно посредством внутривенного введения h-коэлютеразина, специфического субстрата люциферазы NanoLuc.

При достижении объема опухоли 60 мм³ мышам вводили h-коэлютеразин и регистрировали биолюминесценцию первичного очага на правой стороне тела и метастазов на контрлатеральной стороне с помощью системы прижизненного имиджинга IVIS Spectrum CT (рисунок 23). Далее животным в различных дозах вводили наночастицы анти-HER2 PLGA, после чего оценивали флуоресценцию ($\lambda_{ex} = 640$ нм, $\lambda_{em} = 680$ нм) через 1, 2, 6, 12 и 18 часов после инъекции. Данные, представленные на рисунке 23а, иллюстрируют накопление анти-HER2 PLGA в зоне первичной опухоли, а также в метастазах с последующим выраженным снижением интенсивности сигнала через 2–6 ч, характер которого зависел от количества введенного препарата. При этом максимальная доза обеспечивала стабильную флуоресценцию на протяжении всего периода наблюдения (до 18 часов). В качестве оптимальной для дальнейших исследований была выбрана доза

3 мг, поскольку она позволяла получать стабильный и информативный флуоресцентный сигнал в течение более чем 2 ч после введения.

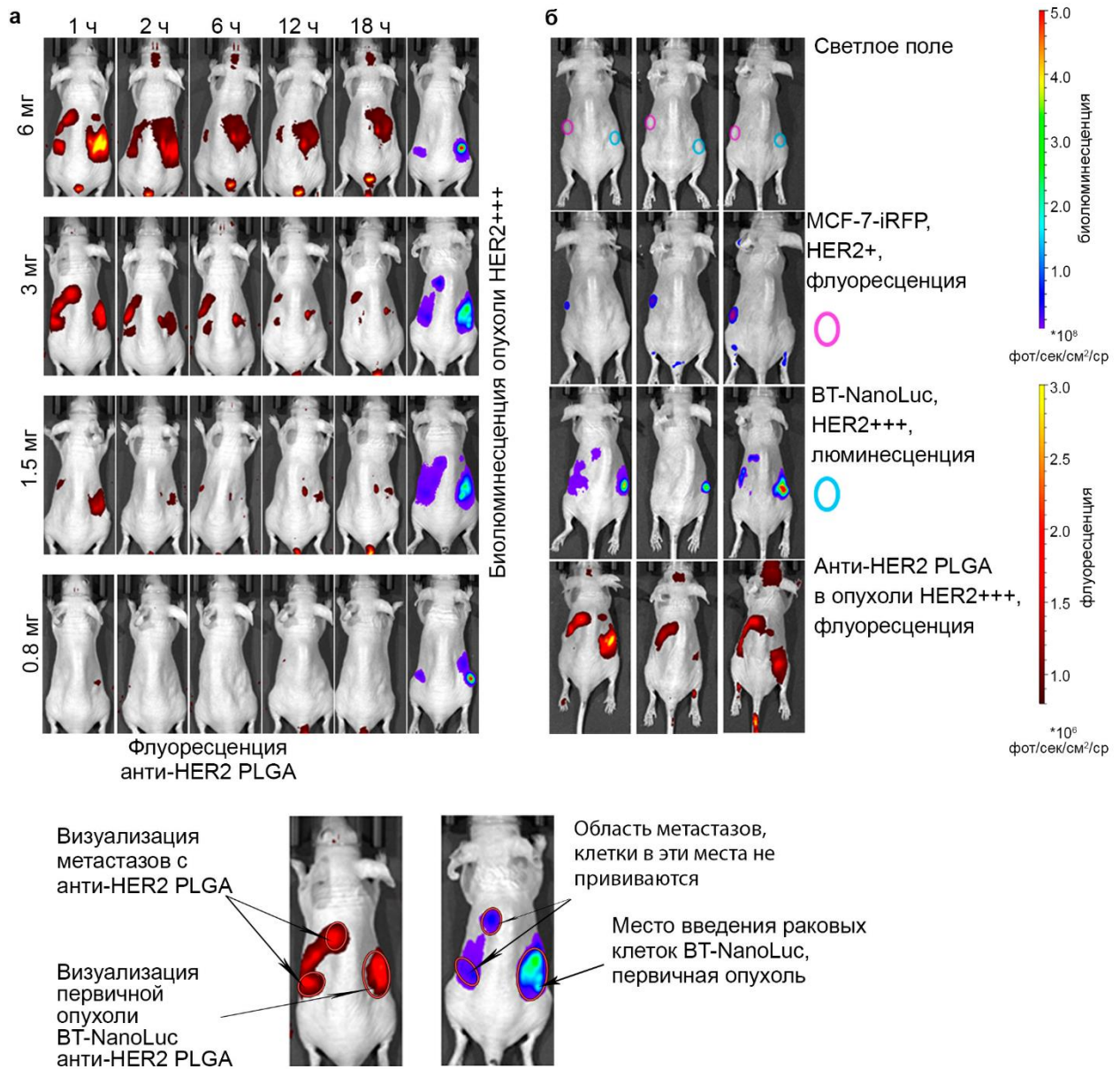


Рисунок 23. Визуализация HER2-положительных опухолей с помощью наночастиц PLGA *in vivo*. (а) Мышам BALB/c Nu/Nu подкожно вводили опухолевые клетки BT-NanoLuc, обладающие сверхэкспрессией HER2, и вводили анти-HER2 PLGA, после визуализировали через 1, 2, 6, 12 и 18 часов ($\lambda_{ex} = 640$ нм, $\lambda_{em} = 680$ нм). Первичную опухоль BT-NanoLuc и метастазы визуализировали через в/в инъекцию h-коэлютеразина и последующей биолуминесценцией *in vivo* (правая панель). (б) Мышам с двумя опухолями: (1) опухоли MCF7-iRFP (левый бок, розовый круг, изображение, полученные с помощью флуоресцентной детекции) и (2) опухоли BT-NanoLuc (правый бок, синий круг, изображение с

помощью биолюминесцентной детекции) вводили анти-HER2 PLGA и через 1 час после инъекции регистрировали флуоресценцию анти-HER2 PLGA ($\lambda_{ex} = 640$ нм, $\lambda_{em} = 680$ нм).

Поскольку рецептор HER2 обычно экспрессируется в нормальных тканях человека, но в значительно меньших количествах по сравнению с клетками рака молочной железы [36,263,264] необходимо решить вопрос селективности, синтезированного анти-HER2 PLGA с точки зрения связывания HER2 до начала терапевтического исследования *in vivo*. Для этого использовали мышей BALB/c Nu/Nu с двумя опухолями, обладающими разной экспрессией HER2. Клетки BT-NanoLuc со сверхэкспрессией HER2 вводили подкожно в правый бок, а флуоресцентные клетки MCF-7-iRFP с нормальной экспрессией HER2 вводили в левый бок. Распределение клеток BT-NanoLuc регистрировали посредством обнаружения биолюминесценции, а локализацию клеток MCF-7-iRFP регистрировали посредством флуоресценции белка iRFP. Мышам вводили анти-HER2 PLGA с последующей флуоресцентной биовизуализацией (рисунок 23б). Данные, представленные на рисунке 23б, подтверждают, что анти-HER2 PLGA НЧ локализованы преимущественно в опухолях BT-NanoLuc на правом боку и в области метастазов на противоположном боку (слева) – в паховых и подмышечных лимфатических узлах. При этом в ткани HER2-отрицательного контроля MCF-7-iRFP, расположенного анатомически между указанными лимфоузлами, регистрировалось лишь незначительное неспецифическое накопление наночастиц.

3.9 Фотодинамическая терапия HER2-положительных опухолей *in vivo*

Терапевтическую эффективность анти-HER2 PLGA оценивали *in vivo*. Лечение ксенотрансплантатных опухолей проводили на 14-е сутки, когда объем опухоли достигал примерно 60 мм³ по схеме (рисунок 24). Мышей случайным образом разделяли на три группы ($n = 4$) и которым вводили: (1) чистый ФСБ, (2) анти-HER2 PLGA и (3) анти-HER2 PLGA с облучением зеленым светом (рисунок 24б). Первичные опухоли облучали в течение 10 мин, а участки с метастазами – в

течение 3 мин. Измерения роста опухоли проводились с помощью штангенциркуля (рисунок 24а) и биолюминесцентной визуализацией *in vivo* (рисунок 24б).

Результаты терапии экспериментальных животных *in vivo* демонстрирует высокий терапевтический потенциал НЧ PLGA. Рост HER2-положительной опухоли полностью подавлялся комбинацией анти-HER2 PLGA и облучения зелёным светом; к концу эксперимента (через 40 дней после начала лечения) люминесценции опухолей и метастазов не наблюдалось. Однако, несмотря на очевидную эффективность синтезированных адресных наночастиц, необходимы дальнейшие исследования их фармакодинамики, биораспределения и биобезопасности. В частности, оценка биораспределения требует проведения масштабных экспериментов с включением в состав наночастиц радиоактивных меток или магнетита. Исследования биораспределения с использованием методов флуоресцентной визуализации не являются количественными и не дают точной информации о реальном накоплении наночастиц в органах, а также о красителях, высвобождающихся из них. Кроме того, собственная аутофлуоресценция биологических тканей и неравномерная глубина проникновения света с разной длиной волны существенно усложняют интерпретацию оптических данных.

С позиций биобезопасности важно отметить, что представленные на рисунке 24б результаты указывают на снижение массы тела мышей в ходе эксперимента. На данном этапе остается невыясненным, вызвана ли потеря веса прогрессированием опухолевого процесса или спецификой самой методики лечения. При этом мы не обнаружили статистически значимых различий в динамике веса животных между двумя опытными группами и группой контроля.

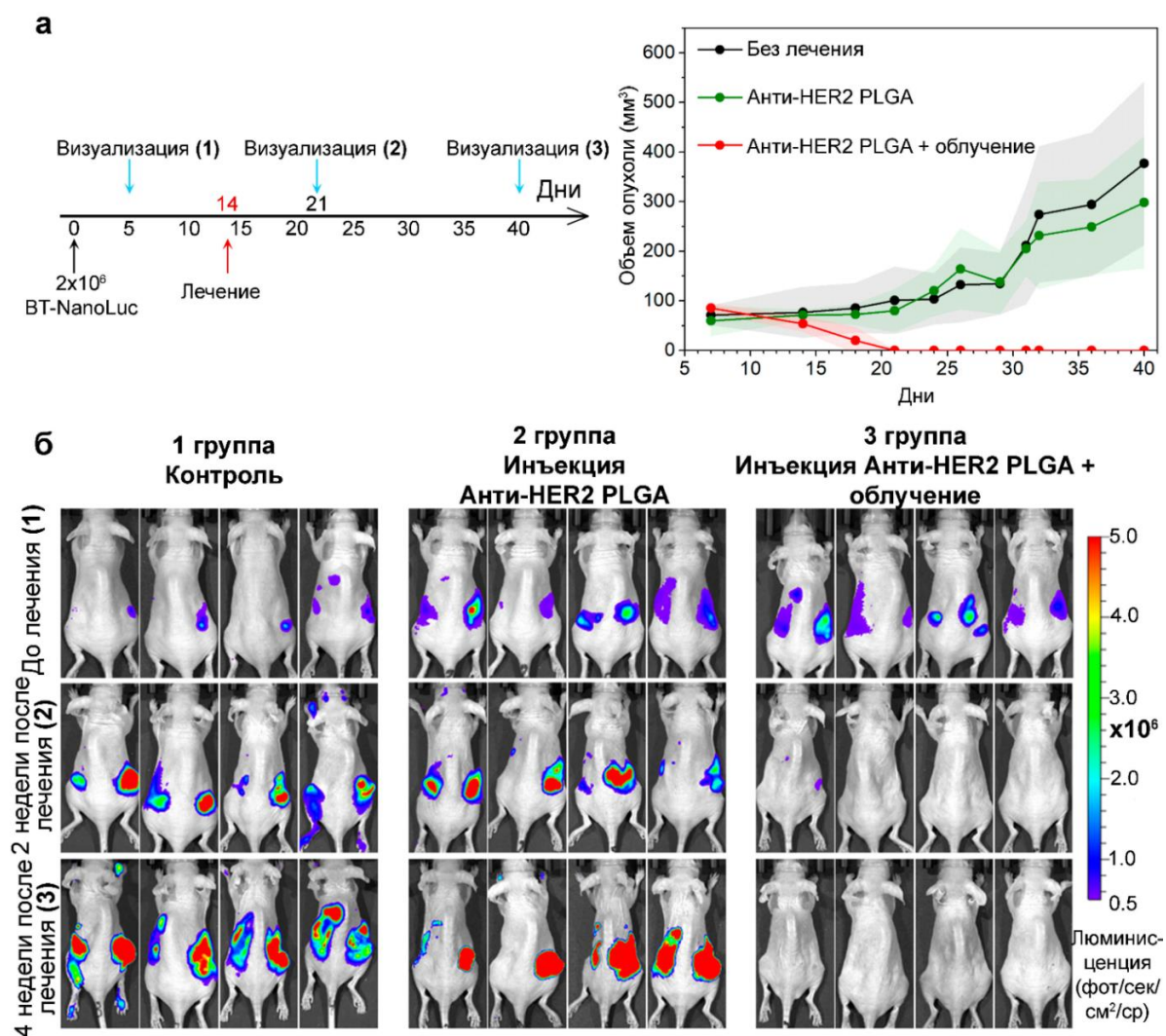


Рисунок 24. Фотодинамическая терапия HER2-положительных опухолей с помощью тераностических наночастиц анти-HER2 PLGA. (а) Схема лечения на основе анти-HER2 PLGA. Мышам BALB/с Nu/Nu подкожно вводили 2×10^6 клеток BT474-NanoLuc. Через 14 дней после инокуляции опухоли мышей распределяли случайным образом на группы ($n = 4$), которым вводили ФСБ (контрольная группа) либо анти-HER2 PLGA, либо комбинацию анти-HER2 PLGA со световым облучением. Динамика роста опухоли: контрольная группа, группа с однократной инъекцией анти-HER2 PLGA и группа с однократной инъекцией анти-HER2 PLGA и облучением зеленым светом первичной опухоли и метастазов. (б) Прижизненный оптический имиджинг ксенотрансплантатов опухоли BT474-NanoLuc: (1) до лечения, (2) и (3) – после лечения. Для визуализации животным внутрибрюшинно вводили 5 мкг h-коэлентеразина с последующей регистрацией биолюминесцентного сигнала на системе IVIS Spectrum CT.

Тераностические агенты обладают огромным потенциалом для улучшения диагностики и лечения рака благодаря избирательному уничтожению опухолевых клеток, ингибированию роста и пролиферации [265]. Однако разработка и клиническое применение этих агентов сталкивается с серьезными проблемами,

включая сложный синтез, характеристику и воспроизводимость от партии к партии [252].

Данное исследование демонстрирует успешную разработку онкотераностической платформы на основе наночастиц PLGA для HER2-адресной диагностики и ФДТ агрессивного рака молочной железы. За счет использования гидрофобного полимера PLGA с терапевтическими и диагностическими соединениями и модификации поверхности наночастиц антителами против HER2 в ходе микроэмульсионного синтеза были успешно созданы универсальные тераностические наночастицы

Представленная онкотераностическая платформа на основе наночастиц PLGA имеет большие перспективы для клинического применения в адресной диагностике и ФДТ в лечении опухоли молочной железы и, возможно, других HER2-положительных злокачественных опухолей. Будущие исследования стоит сосредоточить на дальнейшей оптимизации платформы, а также на изучении ее применимости при других типах онкологических заболеваний и в сочетании с существующими методами лечения.

3.10 3D-модель клеточных сфероидов для тестирования анти-HER2 противоопухолевых соединений *in vitro*

Трёхмерные клеточные сфероиды более точно воспроизводят условия *in vivo* по сравнению с двумерными культурами, поскольку последние не способны отражать сложную пространственную организацию и архитектуру тканей в живом организме. Сфероиды применяются для моделирования органоидов и тканей, имитирующих гетерогенность и патофизиологические особенности опухолевых процессов в организме, а также для оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов [266,267].

В частности, в данной работе была исследована модель 3D клеточных сфероидов с одинаковой формой и размерами для тестирования воздействия различных веществ *in vitro*. Для изготовления гелевых форм из фотополимерной смолы использовалась технология 3D-печати. Формы заполняли агарозой, которая

служила мастер-формой для формирования клеточных сфероидов (Рисунок 25). Для оценки жизнеспособности клеток в агарозных лунках применяли флуоресцентную микроскопию (флуоресцентный краситель Хёхст 33342 окрашивает живые клетки, а PI – мертвые) и МТТ-тест.

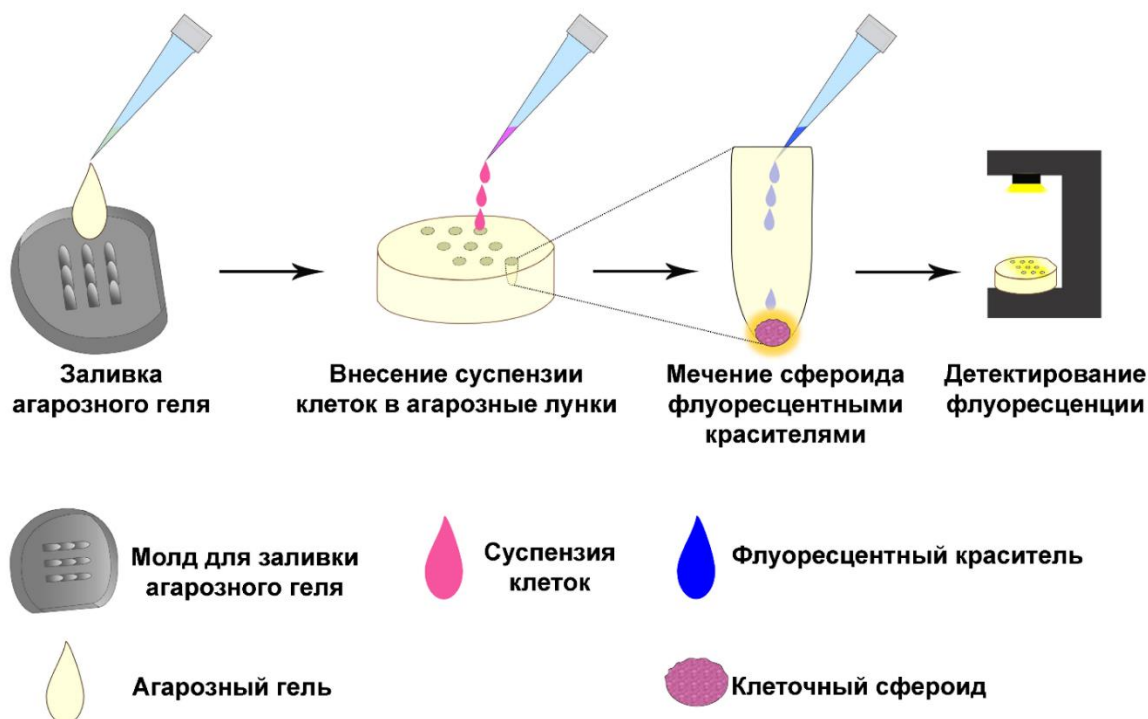


Рисунок 25. Схема получения 3D сфероидов в агарозных 9-луночных формах.

Для проверки разработанной 3D-модели (рисунок 23) в качестве инструмента для изучения противоопухолевой эффективности соединений мы оценили цитотоксичность адресного противоопухолевого соединения, иммунотоксина DARP-LoPE. В качестве 3D-модели использовали флуоресцентную клеточную линию рака яичников человека SKOVip-kat.

На первом этапе мы оценили воздействие иммунотоксина на 2D-клеточной модели SKOVip-kat. На рисунке 26 показаны результаты анализа цитотоксичности DARP-LoPE и данные флуоресцентной микроскопии, подтверждающие специфичность связывания иммунотоксина с флуоресцентными клетками SKOVip-kat. Цитотоксичность оценивали с помощью анализа МТТ; данные обрабатывали с помощью программного обеспечения OriginPro 2015. Полученные результаты свидетельствуют об адресной цитотоксичности DARP-LoPE в клетках SKOVip-kat

и отсутствии цитотоксичности DARP-LoPE в клетках CHO. Значение IC₅₀ для DARP-LoPE в клетках SKOVip-kat составило 41.9 пМ (рисунок 26).

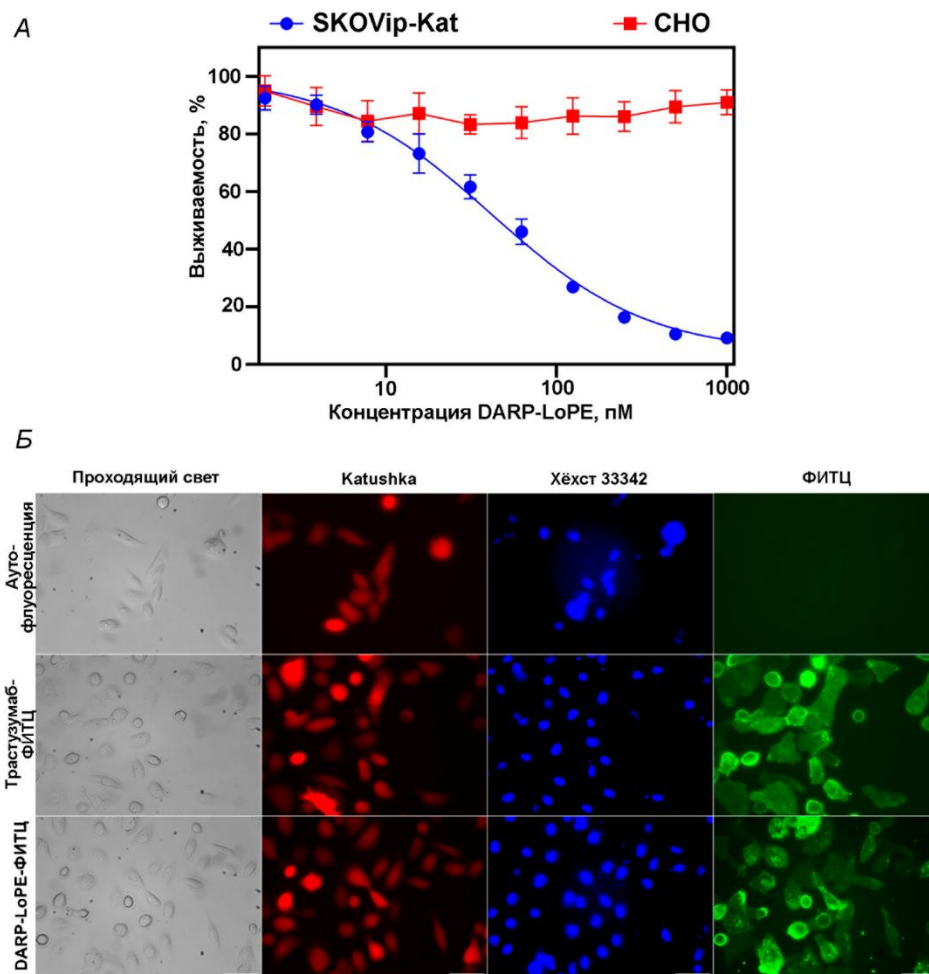


Рисунок 26. Взаимодействие адресного иммунотоксина DARP-LoPE с клетками SKOVip-kat. (а) Оценка цитотоксического действия DARP-LoPE в клетках SKOVip-kat и CHO с помощью МТТ-анализа. Жизнеспособность клеток в отсутствие иммунотоксина DARP-LoPE принималась за 100 %. (б) Прижизненная микроскопия клеточных линий с использованием детекции сигнала флуоресцентного белка Katushka и красителя Хёхст 33342; визуализация экспрессии рецептора HER2 на клетках SKOVip-kat, инкубированных с моноклональным антителом трастузумаб-ФИТЦ и иммунотоксином DARP-LoPE-ФИТЦ. Длины волн возбуждения и испускания: 545/30 и 610/75 нм для белка Katushka, 405/10 и 460/40 нм для Хёхст 33342 и 470/40 и 525/50 нм для ФИТЦ соответственно. Шкалы – 50 мкм.

Далее для выбора оптимального количества клеток в лунках сфероиды был протестирован диапазон концентраций от 1500 до 15 000 клеток на лунку.

Оптимальные концентрации были определены на 3-й день инкубации клеток в агарозных микролунках методами микроскопии светлого поля и флуоресцентной визуализации белка Katushka в SKOVip-kat. Воспроизводимое формирование стабильных клеточных контактов (отсутствие фрагментации клеток) [268] наблюдали в лунках, содержащих 15 000 клеток на лунку (рисунок 27).

Наряду с выбором концентраций клеток, цитотоксичность DARP-LoPE изучали путем инкубации сфероидов с различными концентрациями иммунотоксина. После инкубации с белком и окрашивания Хёхст 33342 и пропидий йодидом образцы анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (рисунок 27). Визуально определенная IC₅₀ DARP-LoPE в 3D-культуре составила 0.3 нМ, что примерно в восемь раз превышает показатель 2D-модели (41.9 пМ). Поскольку структурная организация 3D-моделей клеток ближе к животным моделям *in vivo*, чем 2D-моделей, результаты визуализации и цитотоксичности в 3D-системах обладают высокой прогностической ценностью для последующих исследований на животных.

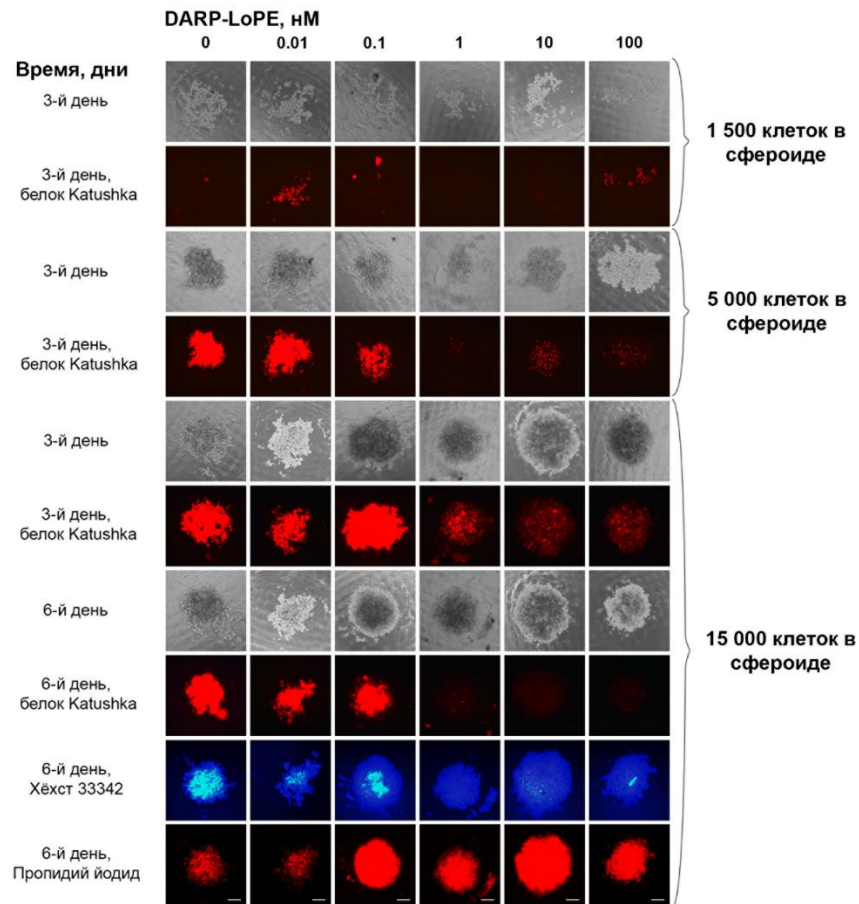


Рисунок 27. Анализ цитотоксичности иммунотоксина DARP-LoPE в 3D сфероиде клеточной линии SKOVip-kat по флуоресценции белка Katushka и красителей Хёхст 33342 и пропидий йодида. Клетки инкубировали с различными концентрациями DARP-LoPE и оценивали жизнеспособность клеток SKOVip-kat с помощью флуоресцентной микроскопии в реальном времени на 3-и и 6-е сутки. На 6-й день сфероиды инкубировали с красителями Хёхст 33342 – для оценки живых и пропидий йодида – для оценки мертвых клеток и визуализировали на флуоресцентном микроскопе. Длины волн возбуждения и испускания: 565/30 и 620/60 нм для Katushka, 365/12 и 397/LP нм для Хёхст 33342, и 565/30 и 620/60 нм для пропидий йодида, соответственно. Шкалы – 250 мкм.

Переход от 2D- к 3D-моделям обусловлен тем, что двумерные культуры недостаточно точно отражают поведение клеток *in vivo* и ограничены в оценке действия терапевтических веществ. 3D сфероиды лучше воспроизводят микросреду опухолей, включая градиенты pH, кислорода, CO₂ и сигнальных факторов, а также клеточную морфологию и пролиферацию, что делает их более релевантными для доклинических исследований. Кроме того, их использование позволяет снизить количество экспериментов на животных моделях.

В работе представлен метод получения опухолевых сфероидов с использованием агарозных форм, обеспечивающий простоту и воспроизводимость. Благодаря низкой адгезии агарозы клетки взаимодействуют преимущественно друг с другом, формируя структуры, близкие к опухолевым тканям, а прозрачность материала позволяет применять модель в различных типах исследований, включая ФДТ и ФТТ, а также визуализировать различные вещества в реальном времени. Полученная система также является открытой и допускает различные экспериментальные манипуляции, такие как изменение среды, добавление клеток и воздействие излучения.

Используя данный подход, были получены однородные сфероиды клеток SKOVip-kat, а также выявлены различия в цитотоксическом эффекте между 2D- и 3D-моделями на примере иммунотоксина DARP-LoPE. Таким образом, предложенный метод позволяет создавать удобные и физиологически релевантные модели для клеточных и молекулярных исследований.

3.11 3D-модель клеточных сфероидов для тестирования цитотоксического воздействия наночастиц PLGA/Pht-Mg *in vitro*

Разработанные нами сфероиды, имитирующие солидные опухоли, были использованы для оценки эффективности фототермических свойств 200 нм наночастиц PLGA с фталоцианатом магния при облучении 808 нм лазером. Для эксперимента были выбраны концентрации в пределах 74–2000 мкг/мл и время облучения 0, 5 и 15 мин, как наиболее четко отражающие реакцию клеток на инкубацию с наночастицами и облучением. Для усиления цитотоксического эффекта сфероиды инкубировали с белком-открывателем межклеточного соединения, JO-4, который вызывает кратковременный эпителиально-мезенхимальный переход и временно открывает межклеточные контакты в эпителиальных клетках. Этот временный разрыв межклеточных контактов позволяет наночастицам проникать вглубь сфероида. Сфероиды инкубировали с JO-4 в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 2 часов и с наночастицами в

течение ночи с последующим лазерным облучением, а на 6-й день культивирования проводили анализ интенсивности флуоресценции, отражающей жизнеспособность клеток в сфероиде.

Сфероиды были визуализированы с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Флуоресцентные изображения сфероидов были проанализированы с помощью программного обеспечения ImageJ для расчета общей флуоресценции сфероидов с использованием параметра «интегрированная плотность».

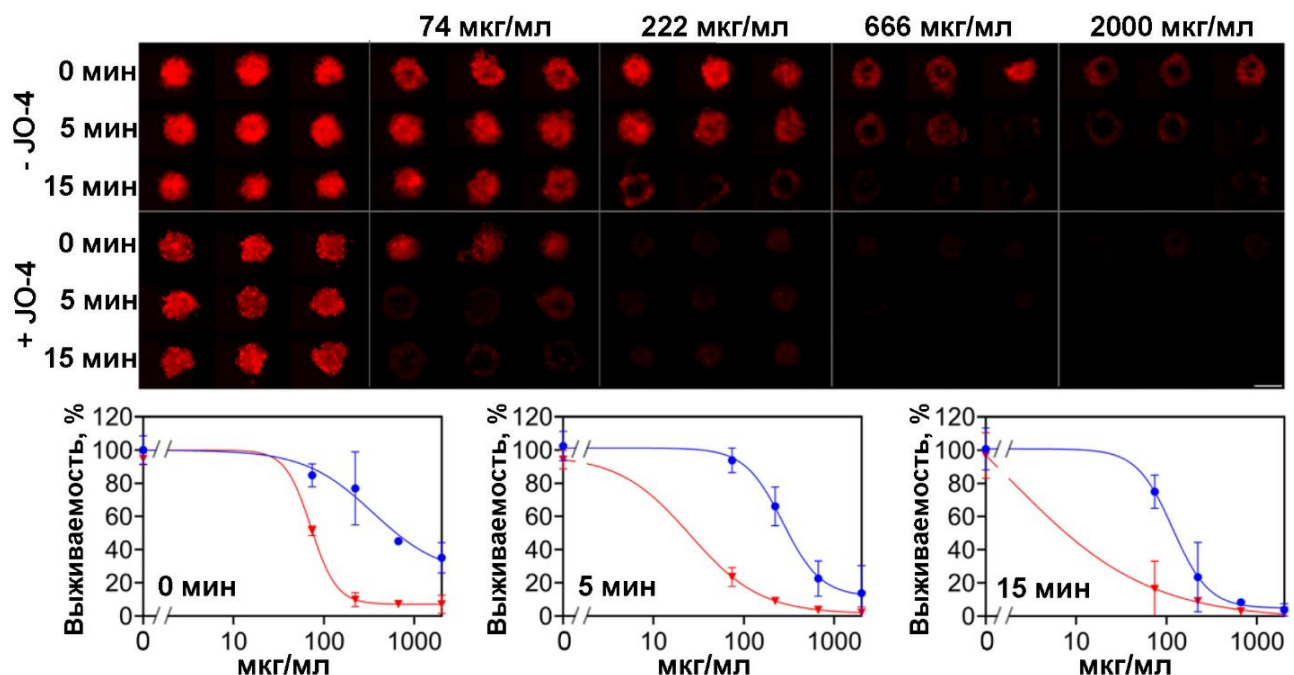


Рисунок 28. Белок JO-4 повышает терапевтическую эффективность наночастиц PLGA/Pht-Mg *in vitro*. **а)** Флуоресцентные изображения 3D-сфероидов клеточной линии SKOVip-Kat, инкубированных с разным количеством PLGA/Pht-Mg и облученных ближним инфракрасным светом в течение 0, 5 и 15 мин. **б)** Кривые цитотоксичности на основе флуоресценции сфероидов SKOVip-kat, инкубированных с PLGA/Pht-Mg и облученных в течение 0, 5 и 15 минут с предварительной инкубацией с белком JO-4 (красные кривые) или без (синие кривые). Шкалы – 250 мкм.

Данные, представленные на рисунке 28, подтверждают высокую эффективность данного подхода, приводящего к повышению цитотоксического воздействия наночастиц в 3D-культуре. Действительно, значение IC₅₀, рассчитанное для кривой жизнеспособности частиц PLGA/Pht-Mg,

инкубированных с JO-4, без облучения составило 72 мкг/мл, 25 мкг/мл при 5 мин облучения и 1.9 мкг/мл при 15 мин облучения.

Несмотря на прогресс в лечении онкологических заболеваний, терапия солидных опухолей остаётся сложной задачей из-за плотных межклеточных контактов, снижающих эффективность химиотерапии и доставки адресных агентов. В связи с этим перспективным направлением является воздействие на межклеточные соединения для улучшения доставки терапевтических веществ.

В данном исследовании мы показали, что совместное применение белка JO-4, открывающего межклеточные контакты, и 200 нм наночастиц PLGA/Pht-Mg повышает эффективность диагностики и терапии опухолевых сфероидов. Этот подход может быть применён и к другим полимерным наночастицам, используемым в ФТТ и ФДТ. Учитывая клиническое использование PLGA-препаратов (например, Lupron Depot и Trelstar), данная стратегия может повысить эффективность уже существующих систем. Совместное применение агентов, разрушающих межклеточные контакты, с нанопрепаратами представляет перспективный подход к лечению и диагностике солидных новообразований, в том числе метастатических очагов.

4. Выводы

1) Разработаны HER2-специфичные полимерные наночастицы на основе PLGA, модифицированные аффибоди $Z_{HER2:342}$ и моноклональным антителом трастузумабом, обладающие средним гидродинамическим диаметром менее 200 нм, низкой полидисперсностью и коллоидной стабильностью, что обеспечивает возможность их применения в качестве платформы для адресной доставки диагностических и терапевтических агентов.

2) Установлено, что модификация поверхности PLGA-наночастиц HER2-специфичными белками обеспечивает их селективное связывание с HER2-положительными клетками и эффективную внутриклеточную доставку инкапсулированных соединений, что подтверждается данными проточной цитометрии, а также флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

3) Показано, что анти-HER2 PLGA наночастицы обеспечивают длительное накопление и удержание в HER2-положительных опухолях и метастатических очагах *in vivo*, сохраняя высокий контраст визуализации опухолевой ткани по сравнению с окружающими нормальными тканями.

4) Установлено, что фотоактивация анти-HER2 PLGA наночастиц, содержащих фотосенсибилизатор Rose Bengal, приводит к эффективному образованию активных форм кислорода и развитию выраженного цитотоксического эффекта в отношении HER2-положительных клеток, сопровождающегося существенным снижением их метаболической активности и клоногенного потенциала.

5) Показано, что применение анти-HER2 PLGA фотосенсибилизирующих наночастиц в сочетании с облучением лазером с длиной волны 532 нм обеспечивает высокоэффективное подавление роста HER2-положительных опухолей *in vivo* вплоть до полной регрессии первичных опухолевых очагов и метастазов у экспериментальных животных.

6) Разработана воспроизводимая трёхмерная модель сфероидов, позволяющая формировать стандартизированные HER2-положительные клеточные структуры заданного размера и использовать их для оценки противоопухолевой

активности терапевтических агентов в условиях, приближённых к структуре солидной опухоли.

7) Установлено, что клеточные сфероиды характеризуются сниженной чувствительностью к воздействию иммунотоксичных и полимерных наночастиц по сравнению с двумерными культурами, что свидетельствует о большей физиологической релевантности сфероидов для доклинической оценки противоопухолевых препаратов.

8) Показано, что использование белка-открывателя межклеточных контактов повышает эффективность проникновения и противоопухолевого действия PLGA-наночастиц в трёхмерных клеточных моделях, что сопровождается усилением их цитотоксического эффекта по сравнению с воздействием наночастиц без предварительной модификации межклеточных взаимодействий.

5. Заключение

Онкологические заболевания остаются одной из ключевых медико-биологических проблем современности. Несмотря на существенный прогресс в развитии методов диагностики и терапии, эффективность лечения многих злокачественных новообразований по-прежнему ограничивается недостаточной селективностью противоопухолевых воздействий, развитием побочных эффектов и невозможностью обеспечить эффективную доставку терапевтических агентов непосредственно к опухолевым клеткам. В связи с этим создание адресных систем доставки, способных сочетать диагностические и терапевтические функции, является одним из наиболее востребованных направлений современной молекулярной биологии и биомедицины.

В рамках настоящей работы разработана платформа адресных полимерных наночастиц на основе биоразлагаемого сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), предназначенная для селективного распознавания HER2-положительных опухолевых клеток, их визуализации и последующего терапевтического воздействия. Полученные результаты продемонстрировали возможность эффективной модификации поверхности наночастиц HER2-специфичными молекулами, обеспечивающими их селективное взаимодействие с клетками-мишенями как *in vitro*, так и *in vivo*. Показано, что разработанные наноагенты способны служить универсальной платформой для доставки диагностических и терапевтических соединений, обеспечивая эффективную визуализацию опухолевых очагов и выраженное противоопухолевое действие в рамках фотодинамической терапии. Кроме того, в работе разработана и апробирована трёхмерная модель клеточных сфероидов, позволяющая более адекватно воспроизводить свойства солидных опухолей и повышать достоверность доклинической оценки противоопухолевых агентов.

Полученные результаты не только подтверждают высокий потенциал адресных PLGA-наночастиц для решения задач онкотераностики HER2-положительных новообразований, но и формируют основу для дальнейшего развития многофункциональных наномедицинских платформ. Дальнейшая

оптимизация подобных систем доставки, расширение спектра используемых терапевтических агентов и их исследование на более сложных доклинических моделях могут способствовать созданию новых поколений высокоэффективных и безопасных противоопухолевых препаратов, ориентированных на принципы персонализированной медицины.

6. Благодарности

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность научному руководителю д.б.н., в.н.с. Шипуновой Виктории Олеговне за неоценимую помощь, постоянное внимание и всестороннюю поддержку на всех этапах работы над диссертацией. Автор выражает особую благодарность д.б.н., акад. РАН, проф. Дееву Сергею Михайловичу и всему коллективу лаборатории молекулярной иммунологии ГНЦ ИБХ РАН за поддержку в сложные моменты и помощь в работе. Также автор выражает благодарность своей маме, Согомонян Лилии Мамиконовне, за безграничную любовь, поддержку и веру на протяжении всего пути.

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

7. Список сокращений

АСМ – атомно-силовая микроскопия

АТ – антитело

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БИК-свет – ближний инфракрасный свет

БСА – бычий сывороточный альбумин

ГН – гибридные наночастицы

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРС – динамическое рассеяние света

ДТТ – дитиотреитол

ИП – индекс полидисперсности

КИ – клеточный индекс

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид

МФС – система моонуклеарных фагоцитов

НЧ – наночастица

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПАМАМ – полиамидоамин

ПВС – поливиниловый спирт

ПКЛ – поликапролактон

ПЛЛ – поли-L-лизина

ППИ – полипропиленмин

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭИ – полиэтиленмин

РНК – рибонуклеиновая кислота

сульфо-NHS – N-hydroxysulfosuccinimide, N-гидроксисульфосукцинимид

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ТЭМ – трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФТТ – фототермическая терапия

A549 – клеточная линия аденокарциномы легкого человека

ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity, антителозависимая клеточная цитотоксичность

BALB/c Nu/Nu – homozygous nude mice, иммунодефицитные мыши линии BALB/c nude

BCA – bicinchoninic acid, бицинхониновая кислота

BT-NanoLuc – клеточная линия протоковой карциномы молочной железы человека BT-474, экспрессирующая люциферазу NanoLuc

CD22 – cluster of differentiation 22, кластер дифференцировки 22, мембранный белок В-лимфоцитов, иммунологический маркер

CHO – клетки яичника китайского хомяка

CM-H₂DCFDA – 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(и-6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат

CRISPR/Cas9 – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9, система редактирования генома CRISPR/Cas9

DARPin – Designed Ankyrin Repeat Proteins, искусственные белки с анкириновыми повторами

DARPin-LoPE – дарпин DARPin 9_29, связанный с фрагментом экзотоксина А (PE) грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

DC-SIGN – dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, межклеточный адгезионный белок дендритных клеток

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, модифицированная среда Игла по Дульбекко

EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид

EGFR – epidermal growth factor receptor (ErbB-1), рецептор эпидермального фактора роста

EHS – Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, мышинная саркома Энгельбрета-Холма-Сворма

ELS – electrophoretic light scattering, электрофоретическое рассеяние света

EpCAM – Epithelial cell adhesion molecule, молекула адгезии эпителиальных клеток

EPR-effect – enhanced permeability and retention effect, эффект повышенной проницаемости и удержания

Fab – fragment antigen-binding, антигенсвязывающий фрагмент антитела

FDA – Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

FRET – Förster Resonance Energy Transfer, резонансный перенос энергии Фёрстера

FR α – folate receptor alpha, рецептор фолиевой кислоты α

GSH – glutathione, глутатион

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), буфер

HepG2 – клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека

HER2/HER3/HER4 – human epidermal growth factor receptor 2/3/4, рецептор эпидермального фактора роста человека 2/3/4

HPMA – N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide, N-(2-гидроксипропил)метакриламид

HSA – human serum albumin, сывороточный альбумин человека

IgA, IgD, IgE, IgG, IgM – immunoglobulins A, D, E, G, M, иммуноглобулины A, D, E, G, M

iRFP – infrared fluorescent protein, инфракрасный флуоресцентный белок

JO-4 – junction opener 4, белок-модулятор межклеточных контактов

K_D – equilibrium dissociation constant, константа равновесной диссоциации

MCF-7-iRFP – клетки рака молочной железы со стабильной экспрессией инфракрасного флуоресцентного белка RFP

MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

MFI – mean fluorescence intensity, средняя интенсивность флуоресценции

MMAE – monomethyl auristatin E, монометилауристатин E

Mms6 – magnetosome membrane-specific protein 6, мембраноспецифический белок магнитосом 6

MP0274 – дарпин, специфичный к рецептору HER2

NB – Nile Blue, Нильский синий

NHS – N-hydroxysuccinimide, N-гидроксисукцинимид

PDGF – platelet-derived growth factor, тромбоцитарный фактор роста

Pht-Mg – magnesium phthalocyanine, фталоцианат магний

PI – propidium iodide, йодид пропидия

PLA – polylactic acid, полимолочная кислота

PLGA – poly(lactic-co-glycolic acid), полилактид-со-гликолид

PSMA – prostate-specific membrane antigen, простатспецифический мембранный антиген

Qdot655 – quantum dot 655, квантовые точки

RB – Rose Bengal, Бенгальская роза

RLYB116 – молекула аффибоди, направленная на ингибирование фактора комплемента 5

ROS – reactive oxygen species, активные формы кислорода

scFv – single-chain variable fragment, одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела

sdAb – single-domain antibody, однодоменное антитело

siRNA – short interfering RNA, малые интерферирующие РНК

SK-BR-3 – клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека

SKOVip-kat – клеточная линия карциномы яичников человека, экспрессирующая красный флуоресцентный белок Katushka

SMCC – succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат

T-DM1 – trastuzumab emtansine, derivative maytansine 1, конъюгат трастузумаба с ЭМТАНЗИНОМ

TNF- α – tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли α

VEGF – vascular endothelial growth factor, сосудистый эндотелиальный фактор роста

vWF – von Willebrand factor, фактор фон Виллебранда

Z_{HER2:342} – HER2-specific affibody molecule, молекула аффибоди, специфичная к рецептору HER2

8. Список литературы

1. Dagogo-Jack I., Shaw A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies // *Nat Rev Clin Oncol*. 2018. Т. 15, № 2. С. 81–94.
2. Mao Q., Unadkat J. D. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update // *AAPS J*. 2015. Т. 17, № 1. С. 65–82.
3. Roberts S. K. и др. Targeting mutant EGFR in non-small cell lung cancer in the context of cell adaptation and resistance // *Drug Discovery Today*. 2025. Т. 30, № 7. С. 104407.
4. Yun C.-H. и др. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Т. 105, № 6. С. 2070–2075.
5. Huang R., Zhou P.-K. DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy // *Sig Transduct Target Ther*. 2021. Т. 6, № 1. С. 254.
6. Martin L. P., Hamilton T. C., Schilder R. J. Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways // *Clinical Cancer Research*. 2008. Т. 14, № 5. С. 1291–1295.
7. Zhu H. и др. Global radiotherapy demands and corresponding radiotherapy-professional workforce requirements in 2022 and predicted to 2050: a population-based study // *The Lancet Global Health*. 2024. Т. 12, № 12. С. e1945–e1953.
8. Verginadis I. I. и др. Radiotherapy toxicities: mechanisms, management, and future directions // *The Lancet*. 2025. Т. 405, № 10475. С. 338–352.
9. Xuan L. и др. Radiation-targeted immunotherapy: A new perspective in cancer radiotherapy // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2024. Т. 75. С. 1–11.
10. Reinmuth N. и др. Characteristics and outcome of patients with second primary lung cancer // *Eur Respir J*. 2013. Т. 42, № 6. С. 1668–1676.
11. Toss M. и др. Current trials to reduce surgical intervention in ductal carcinoma in situ of the breast: Critical review // *The Breast*. 2017. Т. 35. С. 151–156.
12. Strebhardt K., Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress // *Nat Rev Cancer*. 2008. Т. 8, № 6. С. 473–480.
13. Köhler G. Derivation and Diversification of Monoclonal Antibodies // *Science*. 1986. Т. 233, № 4770. С. 1281–1286.
14. Austria E. и др. Breaking biological barriers: Engineering polymeric nanoparticles for cancer therapy // *Nano Today*. 2025. Т. 60. С. 102552.
15. Dawidczyk C. M. и др. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines // *Journal of Controlled Release*. 2014. Т. 187. С. 133–144.
16. Graván P. и др. Exploring the Impact of Nanoparticle Stealth Coatings in Cancer Models: From PEGylation to Cell Membrane-Coating Nanotechnology // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2024. Т. 16, № 2. С. 2058–2074.
17. Kolata A. и др. PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems // *Journal of Controlled Release*. 2014. Т. 192. С. 67–81.
18. Jäger E. и др. Self-assembly of biodegradable copolyester and reactive HPMA-based polymers into nanoparticles as an alternative stealth drug delivery system // *Soft Matter*. 2012. Т. 8, № 37. С. 9563.
19. Suk J. S. и др. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016. Т. 99. С. 28–51.
20. Hyun H. и др. Surface modification of polymer nanoparticles with native albumin for enhancing drug delivery to solid tumors // *Biomaterials*. 2018. Т. 180. С. 206–224.
21. Wu K. и др. Overcoming Challenges in Small-Molecule Drug Bioavailability: A Review of Key Factors and Approaches // *IJMS*. 2024. Т. 25, № 23. С. 13121.

22. Attia M. F. и др. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019. Т. 71, № 8. С. 1185–1198.
23. Behera A., Padhi S. Passive and active targeting strategies for the delivery of the camptothecin anticancer drug: a review // *Environ Chem Lett*. 2020. Т. 18, № 5. С. 1557–1567.
24. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs // *Cancer Res*. 1986. Т. 46, № 12 Pt 1. С. 6387–6392.
25. Upponi J. R., Torchilin V. P. Passive vs. Active Targeting: An Update of the EPR Role in Drug Delivery to Tumors // *Nano-Oncologicals* / под ред. Alonso M. J., Garcia-Fuentes M. Cham: Springer International Publishing, 2014. С. 3–45.
26. Cote B. и др. Lymphatic changes in cancer and drug delivery to the lymphatics in solid tumors // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019. Т. 144. С. 16–34.
27. Kang H. и др. Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting // *Adv Healthcare Materials*. 2020. Т. 9, № 1. С. 1901223.
28. Zastre J. и др. Enhanced cellular accumulation of a P-glycoprotein substrate, rhodamine-123, by caco-2 cells using low molecular weight methoxypolyethylene glycol-block-polycaprolactone diblock copolymers // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2002. Т. 54, № 3. С. 299–309.
29. Xiao L. и др. Role of cellular uptake in the reversal of multidrug resistance by PEG-b-PLA polymeric micelles // *Biomaterials*. 2011. Т. 32, № 22. С. 5148–5157.
30. Mathot F. и др. Intestinal uptake and biodistribution of novel polymeric micelles after oral administration // *Journal of Controlled Release*. 2006. Т. 111, № 1–2. С. 47–55.
31. Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. Т. 63, № 3. С. 136–151.
32. Pawar P. V., Domb A. J., Kumar N. Systemic Targeting Systems-EPR Effect, Ligand Targeting Systems // *Focal Controlled Drug Delivery* / под ред. Domb A. J., Khan W. Boston, MA: Springer US, 2014. С. 61–91.
33. Sun L. и др. Strategies of polymeric nanoparticles for enhanced internalization in cancer therapy // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015. Т. 135. С. 56–72.
34. Maya S. и др. Actively Targeted Cetuximab Conjugated γ -Poly(glutamic acid)-Docetaxel Nanomedicines for Epidermal Growth Factor Receptor Over Expressing Colon Cancer Cells // *J Biomed Nanotechnol*. 2014. Т. 10, № 8. С. 1416–1428.
35. Nobs L. и др. Biodegradable Nanoparticles for Direct or Two-Step Tumor Immunotargeting // *Bioconjugate Chem*. 2006. Т. 17, № 1. С. 139–145.
36. Shipunova V. O. и др. Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment // *ACS Nano*. 2020. Т. 14, № 10. С. 12781–12795.
37. Miranda M. A. и др. Targeted uptake of folic acid-functionalized polymeric nanoparticles loading glycoalkaloidic extract in vitro and in vivo assays // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2020. Т. 192. С. 111106.
38. Zhou W. и др. Aptamer-nanoparticle bioconjugates enhance intracellular delivery of vinorelbine to breast cancer cells // *Journal of Drug Targeting*. 2014. Т. 22, № 1. С. 57–66.
39. Komedchikova E. N. и др. Two-Step Targeted Drug Delivery via Proteinaceous Barnase-Barstar Interface and Doxorubicin-Loaded Nano-PLGA Outperforms One-Step Strategy for Targeted Delivery to HER2-Overexpressing Cells // *Pharmaceutics*. 2022. Т. 15, № 1. С. 52.
40. Ciftci F. и др. Advances in Drug Targeting, Drug Delivery, and Nanotechnology Applications: Therapeutic Significance in Cancer Treatment // *Pharmaceutics*. 2025. Т. 17, № 1. С. 121.
41. Awwad S., Angkawinitwong U. Overview of Antibody Drug Delivery // *Pharmaceutics*. 2018. Т. 10, № 3. С. 83.

42. Sun B., Ranganathan B., Feng S.-S. Multifunctional poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer // *Biomaterials*. 2008. T. 29, № 4. C. 475–486.
43. Acharya S., Dilnawaz F., Sahoo S. K. Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy // *Biomaterials*. 2009. T. 30, № 29. C. 5737–5750.
44. Vivek R. и др. Multifunctional HER2-Antibody Conjugated Polymeric Nanocarrier-Based Drug Delivery System for Multi-Drug-Resistant Breast Cancer Therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014. T. 6, № 9. C. 6469–6480.
45. Srivastava A. и др. Polymer-antibody fragment conjugates for biomedical applications // *Progress in Polymer Science*. 2014. T. 39, № 2. C. 308–329.
46. Vorotnikov Y. A. и др. Single-domain antibody C7b for address delivery of nanoparticles to HER2-positive cancers // *Nanoscale*. 2020. T. 12, № 42. C. 21885–21894.
47. Li M. и др. Controlling Conjugated Antibodies at the Molecular Level for Active Targeting Nanoparticles toward HER2-Positive Cancer Cells // *Mol. Pharmaceutics*. 2021. T. 18, № 3. C. 1196–1207.
48. Alibakhshi A. и др. Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines // *Journal of Controlled Release*. 2017. T. 268. C. 323–334.
49. Plückthun A. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. T. 55, № 1. C. 489–511.
50. Stumpp M. T., Binz H. K., Amstutz P. DARPs: A new generation of protein therapeutics // *Drug Discovery Today*. 2008. T. 13, № 15–16. C. 695–701.
51. Schilling J., Schöppe J., Plückthun A. From DARPs to LoopDARPs: Novel LoopDARPin Design Allows the Selection of Low Picomolar Binders in a Single Round of Ribosome Display // *Journal of Molecular Biology*. 2014. T. 426, № 3. C. 691–721.
52. Zahnd C. и др. A Designed Ankyrin Repeat Protein Evolved to Picomolar Affinity to Her2 // *Journal of Molecular Biology*. 2007. T. 369, № 4. C. 1015–1028.
53. Jost C. и др. Structural Basis for Eliciting a Cytotoxic Effect in HER2-Overexpressing Cancer Cells via Binding to the Extracellular Domain of HER2 // *Structure*. 2013. T. 21, № 11. C. 1979–1991.
54. Stefan N. и др. DARPs Recognizing the Tumor-Associated Antigen EpCAM Selected by Phage and Ribosome Display and Engineered for Multivalency // *Journal of Molecular Biology*. 2011. T. 413, № 4. C. 826–843.
55. Stahl A. и др. Highly potent VEGF-A-antagonistic DARPs as anti-angiogenic agents for topical and intravitreal applications // *Angiogenesis*. 2013. T. 16, № 1. C. 101–111.
56. Deyev S. и др. Synthesis, Characterization, and Selective Delivery of DARPin–Gold Nanoparticle Conjugates to Cancer Cells // *Bioconjugate Chem.* 2017. T. 28, № 10. C. 2569–2574.
57. Proshkina G. M. и др. DARPin_9-29-Targeted Gold Nanorods Selectively Suppress HER2-Positive Tumor Growth in Mice // *Cancers*. 2021. T. 13, № 20. C. 5235.
58. Proshkina G. M. и др. Bifunctional Toxin DARPin-LoPE Based on the Her2-Specific Innovative Module of a Non-Immunoglobulin Scaffold as a Promising Agent for Theranostics // *Mol Biol.* 2017. T. 51, № 6. C. 865–873.
59. Zdanovsky A. G. и др. Mechanism of action of Pseudomonas exotoxin. Identification of a rate-limiting step. // *Journal of Biological Chemistry*. 1993. T. 268, № 29. C. 21791–21799.
60. Stojcheva N. и др. Ensovibep, a SARS-CoV-2 antiviral designed ankyrin repeat protein, is safe and well tolerated in healthy volunteers: Results of a first-in-human, ascending single-dose Phase 1 study // *Brit J Clinical Pharma*. 2023. T. 89, № 7. C. 2295–2303.
61. Callanan D. и др. Impact of Modifying Abicipar Manufacturing Process in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration: MAPLE Study Results // *OPHTH.* 2023. T. Volume 17. C. 1367–1384.
62. Fischer S. и др. A Case of Sustained Tumor Regression With MP0274, a Novel DARPin Therapeutic Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Signaling, in Metastatic Human

- Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer After Prior Trastuzumab and Pertuzumab // *JCO Precision Oncology*. 2022. № 6. C. e2200006.
63. Stumpp M. T., Dawson K. M., Binz H. K. Beyond Antibodies: The DARPin® Drug Platform // *BioDrugs*. 2020. T. 34, № 4. C. 423–433.
 64. Nygren P. Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold // *The FEBS Journal*. 2008. T. 275, № 11. C. 2668–2676.
 65. Ahlgren S. и др. Targeting of HER2-Expressing Tumors with a Site-Specifically^{99m}Tc-Labeled Recombinant Affibody Molecule, Z_{HER2:2395}, with C-Terminally Engineered Cysteine // *J Nucl Med*. 2009. T. 50, № 5. C. 781–789.
 66. Tran T. и др. ^{99m}Tc-maEEE-Z_{HER2:342}, an Affibody Molecule-Based Tracer for the Detection of HER2 Expression in Malignant Tumors // *Bioconjugate Chem*. 2007. T. 18, № 6. C. 1956–1964.
 67. Ma M. Evaluating Clinical Endpoints for C5 Inhibitors // *Blood*. 2024. T. 144, № Supplement 1. C. 5249–5249.
 68. Orlova A. и др. Tumor Imaging Using a Picomolar Affinity HER2 Binding Affibody Molecule // *Cancer Research*. 2006. T. 66, № 8. C. 4339–4348.
 69. Ståhl S. и др. Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications // *Trends in Biotechnology*. 2017. T. 35, № 8. C. 691–712.
 70. Shipunova V. O. и др. Photothermal Therapy with HER2-Targeted Silver Nanoparticles Leading to Cancer Remission // *Pharmaceutics*. 2022. T. 14, № 5. C. 1013.
 71. Sörensen J. и др. First-in-Human Molecular Imaging of HER2 Expression in Breast Cancer Metastases Using the¹¹¹In-ABY-025 Affibody Molecule // *J Nucl Med*. 2014. T. 55, № 5. C. 730–735.
 72. Sandström M. и др. Biodistribution and Radiation Dosimetry of the Anti-HER2 Affibody Molecule⁶⁸Ga-ABY-025 in Breast Cancer Patients // *J Nucl Med*. 2016. T. 57, № 6. C. 867–871.
 73. Xu Y. и др. PET imaging of a ⁶⁸Ga labeled modified HER2 affibody in breast cancers: from xenografts to patients // *The British Journal of Radiology*. 2019. T. 92, № 1104. C. 20190425.
 74. Govardhanagiri S., Bethi S., Nagaraju G. P. Small Molecules and Pancreatic Cancer Trials and Troubles // *Breaking Tolerance to Pancreatic Cancer Unresponsiveness to Chemotherapy*. Elsevier, 2019. C. 117–131.
 75. Zhao Z. и др. Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery // *Cell*. 2020. T. 181, № 1. C. 151–167.
 76. Ebrahimnejad P. и др. An updated review of folate-functionalized nanocarriers: A promising ligand in cancer // *Drug Discovery Today*. 2022. T. 27, № 2. C. 471–489.
 77. Nasr M. и др. Folic acid grafted mixed polymeric micelles as a targeted delivery strategy for tamoxifen citrate in treatment of breast cancer // *Drug Deliv. and Transl. Res*. 2024. T. 14, № 4. C. 945–958.
 78. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges // *Nat Rev Drug Discov*. 2017. T. 16, № 3. C. 181–202.
 79. Guymer R. H., Campbell T. G. Age-related macular degeneration // *The Lancet*. 2023. T. 401, № 10386. C. 1459–1472.
 80. Dhar S. и др. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. T. 105, № 45. C. 17356–17361.
 81. Fu Z., Xiang J. Aptamer-Functionalized Nanoparticles in Targeted Delivery and Cancer Therapy // *IJMS*. 2020. T. 21, № 23. C. 9123.
 82. Stewart M. Extended Duration Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition in the Eye: Failures, Successes, and Future Possibilities // *Pharmaceutics*. 2018. T. 10, № 1. C. 21.
 83. *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 2008.
 84. Marques A. C. и др. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies // *Journal of Controlled Release*. 2020. T. 320. C. 180–200.
 85. Haldón E., Nicasio M. C., Pérez P. J. Copper-catalysed azide–alkyne cycloadditions (CuAAC): an update // *Org. Biomol. Chem*. 2015. T. 13, № 37. C. 9528–9550.

86. Quadir M. A. и др. Ligand-decorated click polypeptide derived nanoparticles for targeted drug delivery applications // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017. Т. 13, № 5. С. 1797–1808.
87. Singh M. S., Chowdhury S., Koley S. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade // *Tetrahedron*. 2016. Т. 72, № 35. С. 5257–5283.
88. Stasińska A. R., Putaj P., Chmielewski M. K. Disulfide bridge as a linker in nucleic acids' bioconjugation. Part I: An overview of synthetic strategies // *Bioorganic Chemistry*. 2019. Т. 92. С. 103223.
89. Behzadipour Y., Hemmati S. Covalent conjugation and non-covalent complexation strategies for intracellular delivery of proteins using cell-penetrating peptides // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2024. Т. 176. С. 116910.
90. Choi J.-S., Jang W. S., Park J.-S. Comparison of adsorption and conjugation of Herceptin on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles – Effect on cell internalization in breast cancer cells // *Materials Science and Engineering: C*. 2018. Т. 92. С. 496–507.
91. Choi J.-S., Park J.-S. Surface modification of docetaxel nanocrystals with HER2 antibody to enhance cell growth inhibition in breast cancer cells // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017. Т. 159. С. 139–150.
92. Rayavarapu R. G. и др. Synthesis and Bioconjugation of Gold Nanoparticles as Potential Molecular Probes for Light-Based Imaging Techniques // *International Journal of Biomedical Imaging* / под ред. Cong W. 2007. Т. 2007, № 1. С. 029817.
93. Kotelnikova P. A., Shipunova V. O., Deyev S. M. Targeted PLGA–Chitosan Nanoparticles for NIR-Triggered Phototherapy and Imaging of HER2-Positive Tumors // *Pharmaceutics*. 2023. Т. 16, № 1. С. 9.
94. Komedchikova E. N. и др. Targosomes: Anti-HER2 PLGA nanocarriers for bioimaging, chemotherapy and local photothermal treatment of tumors and remote metastases // *Journal of Controlled Release*. 2024. Т. 365. С. 317–330.
95. Suganuma M. и др. Mirror-image streptavidin with specific binding to L-biotin, the unnatural enantiomer // *Sci Rep*. 2022. Т. 12, № 1. С. 9568.
96. Palanca-Wessels M. C. и др. Anti-CD22 Antibody Targeting of pH-responsive Micelles Enhances Small Interfering RNA Delivery and Gene Silencing in Lymphoma Cells // *Molecular Therapy*. 2011. Т. 19, № 8. С. 1529–1537.
97. Peckys D. B. и др. Visualisation of HER2 homodimers in single cells from HER2 overexpressing primary formalin fixed paraffin embedded tumour tissue // *Mol Med*. 2019. Т. 25, № 1. С. 42.
98. Susumu Nishimura, Masayasu Nomura. Ribonuclease of *Bacillus subtilis* // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1958. Т. 30, № 2. С. 430–431.
99. Hartley R. W. Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together // *Trends in Biochemical Sciences*. 1989. Т. 14, № 11. С. 450–454.
100. Deyev S. M. и др. Design of multivalent complexes using the barnase·barstar module // *Nat Biotechnol*. 2003. Т. 21, № 12. С. 1486–1492.
101. Hartley R. W. Barnase–Barstar Interaction // *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2001. Т. 341. С. 599–611.
102. Shipunova V. O. и др. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO₂ -Binding Peptide and Proteinaceous Barnase*Barstar Interface // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. Т. 10, № 20. С. 17437–17447.
103. Shipunova V. O. и др. Self-assembling nanoparticles biofunctionalized with magnetite-binding protein for the targeted delivery to HER2/neu overexpressing cancer cells // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2019. Т. 469. С. 450–455.
104. Shipunova V. O. и др. Targeted Two-Step Delivery of Oncotheranostic Nano-PLGA for HER2-Positive Tumor Imaging and Therapy In Vivo: Improved Effectiveness Compared to One-Step Strategy // *Pharmaceutics*. 2023. Т. 15, № 3. С. 833.

105. Zakeri B. и др. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Т. 109, № 12.
106. Si M. и др. SpyTag/SpyCatcher Cyclization Enhances the Thermostability of Firefly Luciferase // *PLoS ONE* / под ред. Van Raaij M. J. 2016. Т. 11, № 9. С. e0162318.
107. Tian J. и др. One-step purification and immobilization of recombinant proteins using SpyTag/SpyCatcher chemistry // *Biotechnol Lett.* 2021. Т. 43, № 5. С. 1075–1087.
108. Brune K. D. и др. Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization // *Sci Rep.* 2016. Т. 6, № 1. С. 19234.
109. Thrane S. и др. Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines // *J Nanobiotechnol.* 2016. Т. 14, № 1. С. 30.
110. Bae Y. и др. Engineering Tunable Dual Functional Protein Cage Nanoparticles Using Bacterial Superglue // *Biomacromolecules.* 2018. Т. 19, № 7. С. 2896–2904.
111. Lee C., Kang S. Development of HER2-Targeting-Ligand-Modified Albumin Nanoparticles Based on the SpyTag/SpyCatcher System for Photothermal Therapy // *Biomacromolecules.* 2021. Т. 22, № 6. С. 2649–2658.
112. Ahn D. и др. Enhanced Targeted Drug Delivery System to Control Avidity and Drug Encapsulation Using E2 Nanocages and SpyTag/SpyCatcher // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2025. Т. 11, № 5. С. 2768–2782.
113. Yoon J., Oh D.-Y. HER2-targeted therapies beyond breast cancer — an update // *Nat Rev Clin Oncol.* 2024. Т. 21, № 9. С. 675–700.
114. Iqbal N., Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications // *Molecular Biology International.* 2014. Т. 2014. С. 1–9.
115. Rubin I., Yarden Y. The basic biology of HER2 // *Annals of Oncology.* 2001. Т. 12. С. S3–S8.
116. Van Der Geer P., Hunter T., Lindberg R. A. Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Their Signal Transduction Pathways // *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1994. Т. 10, № 1. С. 251–337.
117. Baselga J., Swain S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 // *Nat Rev Cancer.* 2009. Т. 9, № 7. С. 463–475.
118. Appert-Collin A. и др. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion // *Front. Pharmacol.* 2015. Т. 6.
119. Furrer D. и др. The Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Prognostic and Predictive Biomarker: Molecular Insights into HER2 Activation and Diagnostic Implications // *Cancer Prognosis* / под ред. Lemamy G.-J. IntechOpen, 2018.
120. Baselga J. Treatment of HER2-overexpressing breast cancer // *Annals of Oncology.* 2010. Т. 21. С. vii36–vii40.
121. Nahta R., Esteva F. J. Herceptin: mechanisms of action and resistance // *Cancer Letters.* 2006. Т. 232, № 2. С. 123–138.
122. Swain S. M., Shastry M., Hamilton E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions // *Nat Rev Drug Discov.* 2023. Т. 22, № 2. С. 101–126.
123. Wynn C. S., Tang S.-C. Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions // *Cancer Metastasis Rev.* 2022. Т. 41, № 1. С. 193–209.
124. Idrees H. и др. A Review of Biodegradable Natural Polymer-Based Nanoparticles for Drug Delivery Applications // *Nanomaterials.* 2020. Т. 10, № 10. С. 1970.
125. Transport of a Caspase Inhibitor Across the Blood–Brain Barrier by Chitosan Nanoparticles // *Methods in Enzymology.* Elsevier, 2012. Т. 508. С. 253–269.
126. Madkhali O. A. Drug Delivery of Gelatin Nanoparticles as a Biodegradable Polymer for the Treatment of Infectious Diseases: Perspectives and Challenges // *Polymers.* 2023. Т. 15, № 21. С. 4327.
127. George A., Shah P. A., Shrivastav P. S. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review // *International Journal of Pharmaceutics.* 2019. Т. 561. С. 244–264.

128. Echave M. C. и др. Enzymatic crosslinked gelatin 3D scaffolds for bone tissue engineering // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Т. 562. С. 151–161.
129. Mariadoss A. V. A. и др. Smart drug delivery of p-Coumaric acid loaded aptamer conjugated starch nanoparticles for effective triple-negative breast cancer therapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022. Т. 195. С. 22–29.
130. Mariadoss A. V. A. и др. Folic acid functionalized starch encapsulated green synthesized copper oxide nanoparticles for targeted drug delivery in breast cancer therapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. Т. 164. С. 2073–2084.
131. Mei S. и др. Synthesis, characterization, and applications of starch-based nano drug delivery systems for breast cancer therapy: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Т. 280. С. 136058.
132. Elzoghby A. O., Samy W. M., Elgindy N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems // *Journal of Controlled Release*. 2012. Т. 157, № 2. С. 168–182.
133. Kiarashi M., Yasamineh S. Albumin nanoparticles are a promising drug delivery system in dentistry // *BioMed Eng OnLine*. 2024. Т. 23, № 1. С. 122.
134. Saleh T., Soudi T., Shojaosadati S. A. Aptamer functionalized curcumin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles for targeted delivery to HER-2 positive breast cancer cells // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Т. 130. С. 109–116.
135. Wan X. и др. Incorporation of lapatinib into human serum albumin nanoparticles with enhanced anti-tumor effects in HER2-positive breast cancer // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015. Т. 136. С. 817–827.
136. Lim Y. W. и др. Challenges and Complications of Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Long-Acting Drug Product Development // *Pharmaceutics*. 2022. Т. 14, № 3. С. 614.
137. Yang J. и др. Recent Applications of PLGA in Drug Delivery Systems // *Polymers*. 2024. Т. 16, № 18. С. 2606.
138. Oh J. Conjugation of drug to poly(lactic-co-glycolic acid) for controlled release from biodegradable microspheres // *Journal of Controlled Release*. 1999. Т. 57, № 3. С. 269–280.
139. Sun R. и др. The drug release of PLGA-based nanoparticles and their application in treatment of gastrointestinal cancers // *Heliyon*. 2024. Т. 10, № 18. С. e38165.
140. Cartiera M. S. и др. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells // *Biomaterials*. 2009. Т. 30, № 14. С. 2790–2798.
141. Chiu H. I. и др. Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review // *RSC Adv*. 2021. Т. 11, № 16. С. 9433–9449.
142. Kocbek P. и др. Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody // *Journal of Controlled Release*. 2007. Т. 120, № 1–2. С. 18–26.
143. Conn R. E. и др. Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer // *Food and Chemical Toxicology*. 1995. Т. 33, № 4. С. 273–283.
144. Swetha T. A. и др. A comprehensive review on polylactic acid (PLA) – Synthesis, processing and application in food packaging // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. Т. 234. С. 123715.
145. Sahini M. G. Polylactic acid (PLA)-based materials: a review on the synthesis and drug delivery applications // *emergent mater*. 2023. Т. 6, № 5. С. 1461–1479.
146. Feng C. и др. Preparation and optimization of poly (lactic acid) nanoparticles loaded with fisetin to improve anti-cancer therapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Т. 125. С. 700–710.
147. Sadr S. H. и др. PLA-based magnetic nanoparticles armed with thermo/pH responsive polymers for combination cancer chemotherapy // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018. Т. 45. С. 240–254.
148. Dou S. и др. ScFv-Decorated PEG-PLA-Based Nanoparticles for Enhanced siRNA Delivery to Her2⁺ Breast Cancer // *Adv Healthcare Materials*. 2014. Т. 3, № 11. С. 1792–1803.

149. Cui N., Zhu S.-H. Monoclonal antibody-tagged polyethylenimine (PEI)/poly(lactide) (PLA) nanoparticles for the enhanced delivery of doxorubicin in HER-positive breast cancers // *RSC Adv.* 2016. T. 6, № 83. С. 79822–79829.
150. Padín-González E. и др. Understanding the Role and Impact of Poly (Ethylene Glycol) (PEG) on Nanoparticle Formulation: Implications for COVID-19 Vaccines // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. T. 10. С. 882363.
151. Hsing M.-T. и др. Improved Delivery Performance of n-Butylidenephthalide-Polyethylene Glycol-Gold Nanoparticles Efficient for Enhanced Anti-Cancer Activity in Brain Tumor // *Cells.* 2022. T. 11, № 14. С. 2172.
152. Gao Z. и др. Sono-Polymerization of Poly(ethylene glycol)-Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery // *ACS Macro Lett.* 2019. T. 8, № 10. С. 1285–1290.
153. Cole A. J. и др. Polyethylene glycol modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumor targeting // *Biomaterials.* 2011. T. 32, № 8. С. 2183–2193.
154. Guan S.-S. и др. Polyethylene glycol-conjugated HER2-targeted peptides as a nuclear imaging probe for HER2-overexpressed gastric cancer detection in vivo // *J Transl Med.* 2018. T. 16, № 1. С. 168.
155. Wang Y. и др. Anti-HER2 PLGA-PEG polymer nanoparticle containing gold nanorods and paclitaxel for laser-activated breast cancer detection and therapy // *Biomed. Opt. Express.* 2021. T. 12, № 4. С. 2171.
156. Woodruff M. A., Hutmacher D. W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century // *Progress in Polymer Science.* 2010. T. 35, № 10. С. 1217–1256.
157. Ntrivala M. A. и др. Polycaprolactone (PCL): the biodegradable polyester shaping the future of materials – a review on synthesis, properties, biodegradation, applications and future perspectives // *European Polymer Journal.* 2025. T. 234. С. 114033.
158. Bilensoy E. и др. Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors // *International Journal of Pharmaceutics.* 2009. T. 371, № 1–2. С. 170–176.
159. Peng J. и др. Herceptin-conjugated paclitaxel loaded PCL-PEG worm-like nanocrystal micelles for the combinatorial treatment of HER2-positive breast cancer // *Biomaterials.* 2019. T. 222. С. 119420.
160. Niza E. и др. Trastuzumab-Targeted Biodegradable Nanoparticles for Enhanced Delivery of Dasatinib in HER2+ Metastatic Breast Cancer // *Nanomaterials.* 2019. T. 9, № 12. С. 1793.
161. Beach M. A. и др. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery // *Chem. Rev.* 2024. T. 124, № 9. С. 5505–5616.
162. Joshi M. D., Patravale V., Prabhu R. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights // *IJN.* 2015. С. 1001.
163. Zaidi S., Misba L., Khan A. U. Nano-therapeutics: A revolution in infection control in post antibiotic era // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2017. T. 13, № 7. С. 2281–2301.
164. Jiang T. и др. Nanoparticles for tumor targeting // *Biopolymer-Based Composites.* Elsevier, 2017. С. 221–267.
165. Wang J. и др. Dendrimer-based drug delivery systems: history, challenges, and latest developments // *J Biol Eng.* 2022. T. 16, № 1. С. 18.
166. Aleanizy F. S. и др. Trastuzumab Targeted Neratinib Loaded Poly-Amidoamine Dendrimer Nanocapsules for Breast Cancer Therapy // *IJN.* 2020. T. Volume 15. С. 5433–5443.
167. Kulhari H. и др. Trastuzumab-grafted PAMAM dendrimers for the selective delivery of anticancer drugs to HER2-positive breast cancer // *Sci Rep.* 2016. T. 6, № 1. С. 23179.
168. Ghezzi M. и др. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions // *Journal of Controlled Release.* 2021. T. 332. С. 312–336.

169. Xu X. и др. Nanotechnology-based delivery of CRISPR/Cas9 for cancer treatment // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021. Т. 176. С. 113891.
170. Sharma A. K. и др. Emerging era of “somes”: polymersomes as versatile drug delivery carrier for cancer diagnostics and therapy // *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2020. Т. 10, № 5. С. 1171–1190.
171. Mohammadi M. и др. Biocompatible polymersomes-based cancer theranostics: Towards multifunctional nanomedicine // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. Т. 519, № 1–2. С. 287–303.
172. Rameez S. и др. Reactivity of Polymersome Encapsulated Hemoglobin with Physiologically Important Gaseous Ligands: Oxygen, Carbon Monoxide, and Nitric Oxide // *Macromolecules*. 2012. Т. 45, № 5. С. 2385–2389.
173. Upadhyay K. K. и др. Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-*block* -Poly(γ -benzyl glutamate) Copolymers // *Biomacromolecules*. 2009. Т. 10, № 10. С. 2802–2808.
174. Korobko A. V., Backendorf C., Van Der Maarel J. R. C. Plasmid DNA Encapsulation within Cationic Diblock Copolymer Vesicles for Gene Delivery // *J. Phys. Chem. B*. 2006. Т. 110, № 30. С. 14550–14556.
175. Lam J. H. и др. Polymersomes as Stable Nanocarriers for a Highly Immunogenic and Durable SARS-CoV-2 Spike Protein Subunit Vaccine // *ACS Nano*. 2021. Т. 15, № 10. С. 15754–15770.
176. Fang Y. и др. EGFR-targeted multifunctional polymersomal doxorubicin induces selective and potent suppression of orthotopic human liver cancer in vivo // *Acta Biomaterialia*. 2017. Т. 64. С. 323–333.
177. Alibolandi M. и др. Tetrac-conjugated polymersomes for integrin-targeted delivery of camptothecin to colon adenocarcinoma in vitro and in vivo // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. Т. 532, № 1. С. 581–594.
178. Zhong Y. и др. CD44-targeted vesicles encapsulating granzyme B as artificial killer cells for potent inhibition of human multiple myeloma in mice // *Journal of Controlled Release*. 2020. Т. 320. С. 421–430.
179. Chiang W.-H. и др. Functionalized polymersomes with outlayered polyelectrolyte gels for potential tumor-targeted delivery of multimodal therapies and MR imaging // *Journal of Controlled Release*. 2013. Т. 168, № 3. С. 280–288.
180. Zhao L. и др. Natural Polymer-Based Hydrogels: From Polymer to Biomedical Applications // *Pharmaceutics*. 2023. Т. 15, № 10. С. 2514.
181. Lacroce E. и др. Amphiphilic pH-responsive core-shell nanoparticles can increase the performances of cellulose-based drug delivery systems // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Т. 283. С. 137659.
182. Vetter V. C., Wagner E. Targeting nucleic acid-based therapeutics to tumors: Challenges and strategies for polyplexes // *Journal of Controlled Release*. 2022. Т. 346. С. 110–135.
183. Blanco E., Shen H., Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // *Nat Biotechnol*. 2015. Т. 33, № 9. С. 941–951.
184. Ita K. Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020. Т. 150. С. 105358.
185. Tavakoli Naeini A. и др. Purification and Surface Modification of Chitosan-based Polyplexes Using Tangential Flow Filtration and Coating by Hyaluronic Acid // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022. Т. 111, № 10. С. 2857–2866.
186. Chiu S.-J., Ueno N. T., Lee R. J. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin®) conjugated polyethylenimine // *Journal of Controlled Release*. 2004. Т. 97, № 2. С. 357–369.
187. Mahadik N. и др. Polymer–drug conjugates as nano-sized multi-targeting systems for the treatment of Alzheimer’s disease // *RSC Pharm*. 2024. Т. 1, № 2. С. 161–181.
188. Alven S. и др. Polymer-Drug Conjugate, a Potential Therapeutic to Combat Breast and Lung Cancer // *Pharmaceutics*. 2020. Т. 12, № 5. С. 406.

189. Chang M. и др. Smart linkers in polymer–drug conjugates for tumor-targeted delivery // *Journal of Drug Targeting*. 2016. Т. 24, № 6. С. 475–491.
190. Radford D. C. и др. Multivalent HER2-binding polymer conjugates facilitate rapid endocytosis and enhance intracellular drug delivery // *Journal of Controlled Release*. 2020. Т. 319. С. 285–299.
191. K.C. R. B. и др. Redox Potential Ultrasensitive Nanoparticle for the Targeted Delivery of Camptothecin to HER2-Positive Cancer Cells // *Mol. Pharmaceutics*. 2014. Т. 11, № 6. С. 1897–1905.
192. Shah S. и др. Lipid polymer hybrid nanocarriers: Insights into synthesis aspects, characterization, release mechanisms, surface functionalization and potential implications // *Colloid and Interface Science Communications*. 2022. Т. 46. С. 100570.
193. Bangera P. D. и др. Highlights on Cell-Penetrating Peptides and Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticle: Overview and Therapeutic Applications for Targeted Anticancer Therapy // *AAPS PharmSciTech*. 2023. Т. 24, № 5. С. 124.
194. Hadinoto K., Sundaresan A., Cheow W. S. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013. Т. 85, № 3. С. 427–443.
195. Li J. и др. Polymer–lipid hybrid anti-HER2 nanoparticles for targeted salinomycin delivery to HER2-positive breast cancer stem cells and cancer cells // *IJN*. 2017. Т. Volume 12. С. 6909–6921.
196. Khan M. и др. Macrophage membrane-functionalized nanotherapeutics for tumor targeted therapy // *Theranostics*. 2025. Т. 15, № 10. С. 4823–4847.
197. Langhans S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning // *Front. Pharmacol*. 2018. Т. 9. С. 6.
198. Chaicharoenaudomrung N., Kunhorm P., Noisa P. Three-dimensional cell culture systems as an *in vitro* platform for cancer and stem cell modeling // *WJSC*. 2019. Т. 11, № 12. С. 1065–1083.
199. Jørgensen A. и др. Hanging drop cultures of human testis and testis cancer samples: a model used to investigate activin treatment effects in a preserved niche // *Br J Cancer*. 2014. Т. 110, № 10. С. 2604–2614.
200. Li M. и др. Agarose-based spheroid culture enhanced stemness and promoted odontogenic differentiation potential of human dental follicle cells in vitro // *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*. 2021. Т. 57, № 6. С. 620–630.
201. Minamikawa-Tachino R. и др. Time-lapse imaging of HeLa spheroids in soft agar culture provides virtual inner proliferative activity // *PLoS ONE* / под ред. Gullberg D. 2020. Т. 15, № 4. С. e0231774.
202. Rauh J. и др. Bioreactor Systems for Bone Tissue Engineering // *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2011. Т. 17, № 4. С. 263–280.
203. Kuo C.-T. и др. Configurable 2D and 3D spheroid tissue cultures on bioengineered surfaces with acquisition of epithelial–mesenchymal transition characteristics // *NPG Asia Mater*. 2012. Т. 4, № 9. С. e27–e27.
204. Liu K.-C. и др. Scaffold-free 3D culture systems for stem cell-based tissue regeneration // *APL Bioengineering*. 2024. Т. 8, № 4. С. 041501.
205. Abuwatfa W. H., Pitt W. G., Hussein G. A. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research // *J Biomed Sci*. 2024. Т. 31, № 1. С. 7.
206. Chen L. и др. The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs // *Biomaterials*. 2012. Т. 33, № 5. С. 1437–1444.
207. Kleinman H. K., Martin G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity // *Seminars in Cancer Biology*. 2005. Т. 15, № 5. С. 378–386.
208. Zhang X. и др. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering // *Bioactive Materials*. 2022. Т. 10. С. 15–31.
209. Wang C. E. и др. Junction opener protein increases nanoparticle accumulation in solid tumors // *Journal of Controlled Release*. 2018. Т. 272. С. 9–16.

210. Beyer I. и др. Coadministration of Epithelial Junction Opener JO-1 Improves the Efficacy and Safety of Chemotherapeutic Drugs // *Clinical Cancer Research*. 2012. Т. 18, № 12. С. 3340–3351.
211. Reed S. J. и др. Junction opener enables CAR T cell treatment of solid tumors // *Sci Rep*. 2026. Т. 16, № 1. С. 12529.
212. Pal S., Saha C. Solvent effect in the synthesis of hydrophobic drug-loaded polymer nanoparticles // *IET Nanobiotechnology*. 2017. Т. 11, № 4. С. 443–447.
213. Saffarionpour S. One-step preparation of double emulsions stabilized with amphiphilic and stimuli-responsive block copolymers and nanoparticles for nutraceuticals and drug delivery // *JCIS Open*. 2021. Т. 3. С. 100020.
214. Kuddushi M. и др. Recent advances in nanoprecipitation: from mechanistic insights to applications in nanomaterial synthesis // *Soft Matter*. 2025. Т. 21, № 15. С. 2759–2781.
215. Zielińska A. и др. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology // *Molecules*. 2020. Т. 25, № 16. С. 3731.
216. Sarcan E. T., Silindir-Gunay M., Ozer A. Y. Theranostic polymeric nanoparticles for NIR imaging and photodynamic therapy // *International Journal of Pharmaceutics*. 2018. Т. 551, № 1–2. С. 329–338.
217. Malamatarı M. и др. Spray Drying for the Preparation of Nanoparticle-Based Drug Formulations as Dry Powders for Inhalation // *Processes*. 2020. Т. 8, № 7. С. 788.
218. Li X. и др. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90 // *Journal of Controlled Release*. 2010. Т. 147, № 2. С. 304–310.
219. Arpagaus C. PLA/PLGA nanoparticles prepared by nano spray drying // *J. Pharm. Investig.* 2019. Т. 49, № 4. С. 405–426.
220. Amsalem O. и др. Solid nano-in-nanoparticles for potential delivery of siRNA // *Journal of Controlled Release*. 2017. Т. 257. С. 144–155.
221. Torge A. и др. The influence of mannitol on morphology and disintegration of spray-dried nano-embedded microparticles // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017. Т. 104. С. 171–179.
222. Ohashi K. и др. One-step preparation of rifampicin/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-containing mannitol microspheres using a four-fluid nozzle spray drier for inhalation therapy of tuberculosis // *Journal of Controlled Release*. 2009. Т. 135, № 1. С. 19–24.
223. Zhang H. и др. Microfluidics for nano-drug delivery systems: From fundamentals to industrialization // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2023. Т. 13, № 8. С. 3277–3299.
224. Sun Y. и др. Microfluidic self-assembly of high cabazitaxel loading albumin nanoparticles // *Nanoscale*. 2020. Т. 12, № 32. С. 16928–16933.
225. Crucho C. I. C., Barros M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods // *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Т. 80. С. 771–784.
226. Mudalige T. и др. Characterization of Nanomaterials // *Nanomaterials for Food Applications*. Elsevier, 2019. С. 313–353.
227. Serrano-Lotina A. и др. Zeta potential as a tool for functional materials development // *Catalysis Today*. 2023. Т. 423. С. 113862.
228. Öztürk K., Kaplan M., Çalış S. Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery // *International Journal of Pharmaceutics*. 2024. Т. 666. С. 124799.
229. Stewart P. L. Cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography of nanoparticles // *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2017. Т. 9, № 2. С. e1417.
230. Michen B. и др. Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: Characterizing the size and colloidal state of nanoparticles // *Sci Rep*. 2015. Т. 5, № 1. С. 9793.
231. Wilson B. K., Prud'homme R. K. Nanoparticle size distribution quantification from transmission electron microscopy (TEM) of ruthenium tetroxide stained polymeric nanoparticles // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021. Т. 604. С. 208–220.
232. Özdal Z. D. и др. Development and characterization of polymeric nanoparticles containing ondansetron hydrochloride as a hydrophilic drug // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022. Т. 74. С. 103599.

233. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. 1983. T. 65, № 1–2. С. 55–63.
234. Franken N. A. Р. и др. Clonogenic assay of cells in vitro // *Nat Protoc*. 2006. Т. 1, № 5. С. 2315–2319.
235. Vermes I. и др. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V // *Journal of Immunological Methods*. 1995. Т. 184, № 1. С. 39–51.
236. He Z. и др. A high capacity polymeric micelle of paclitaxel: Implication of high dose drug therapy to safety and in vivo anti-cancer activity // *Biomaterials*. 2016. Т. 101. С. 296–309.
237. Xia W., King M. W. Advances in Targeted Delivery of Doxorubicin for Cancer Chemotherapy // *Bioengineering*. 2025. Т. 12, № 4. С. 430.
238. Banik B. L., Fattahi P., Brown J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine // *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*. 2016. Т. 8, № 2. С. 271–299.
239. Babar I. A. и др. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Т. 109, № 26.
240. Liang G. F. и др. PLGA-based gene delivering nanoparticle enhance suppression effect of miRNA in HePG2 cells // *Nanoscale Res Lett*. 2011. Т. 6, № 1. С. 447.
241. Du J. и др. Biodegradable Nanoparticles of mPEG-PLGA-PLL Triblock Copolymers as Novel Non-Viral Vectors for Improving siRNA Delivery and Gene Silencing // *IJMS*. 2012. Т. 13, № 1. С. 516–533.
242. Davis M. E. The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic // *Mol. Pharmaceutics*. 2009. Т. 6, № 3. С. 659–668.
243. Frangoul H. и др. Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickel Cell Disease // *N Engl J Med*. 2024. Т. 390, № 18. С. 1649–1662.
244. Sioson V. A., Kim M., Joo J. Challenges in delivery systems for CRISPR-based genome editing and opportunities of nanomedicine // *Biomed. Eng. Lett*. 2021. Т. 11, № 3. С. 217–233.
245. Dong X. и др. Targeting DNA mismatch repair pathway by CRISPR nanosystem for boosting checkpoint blockade cancer immunotherapy // *Nano Today*. 2022. Т. 45. С. 101555.
246. Zhang B.-C. и др. Efficient CRISPR/Cas9 gene-chemo synergistic cancer therapy via a stimuli-responsive chitosan-based nanocomplex elicits anti-tumorigenic pathway effect // *Chemical Engineering Journal*. 2020. Т. 393. С. 124688.
247. Luo L. и др. Sustained release of anti-PD-1 peptide for perdurable immunotherapy together with photothermal ablation against primary and distant tumors // *Journal of Controlled Release*. 2018. Т. 278. С. 87–99.
248. Chhetri P. PLGA-Based nanocarriers in drug delivery: Advances in block copolymer engineering, hybrid platforms, and clinical translation // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2026. Т. 72. С. 102896.
249. Shi C. и др. A drug-specific nanocarrier design for efficient anticancer therapy // *Nat Commun*. 2015. Т. 6, № 1. С. 7449.
250. Butowska K. и др. Polymeric Nanocarriers: A Transformation in Doxorubicin Therapies // *Materials*. 2021. Т. 14, № 9. С. 2135.
251. Zhang D. и др. Drug-loaded PEG-PLGA nanoparticles for cancer treatment // *Front. Pharmacol*. 2022. Т. 13. С. 990505.
252. Anselmo A. C., Gokarn Y., Mitragotri S. Non-invasive delivery strategies for biologics // *Nat Rev Drug Discov*. 2019. Т. 18, № 1. С. 19–40.
253. Mitchell M. J. и др. Engineering precision nanoparticles for drug delivery // *Nat Rev Drug Discov*. 2021. Т. 20, № 2. С. 101–124.
254. Bae Y. H., Park K. Advanced drug delivery 2020 and beyond: Perspectives on the future // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020. Т. 158. С. 4–16.

255. Peer D. и др. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy // *Nature Nanotech.* 2007. Т. 2, № 12. С. 751–760.
256. Wang Y. и др. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells // *Sci Rep.* 2017. Т. 7, № 1. С. 7781.
257. Swider E. и др. Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications // *Acta Biomaterialia.* 2018. Т. 73. С. 38–51.
258. Jose J., Burgess K. Benzophenoxazine-Based Fluorescent Dyes for Labeling Biomolecules // *ChemInform.* 2007. Т. 38, № 4. С. chin.200704258.
259. Jose J., Burgess K. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules // *Tetrahedron.* 2006. Т. 62, № 48. С. 11021–11037.
260. Deslignière E. и др. A Combination of Native LC-MS Approaches for the Comprehensive Characterization of the Antibody-Drug Conjugate Trastuzumab Deruxtecan // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2022. Т. 27, № 10. С. 290.
261. Niwa T. и др. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior // *Journal of Controlled Release.* 1993. Т. 25, № 1–2. С. 89–98.
262. Osiecka B., Nockowski P., Szepietowski J. Treatment of Actinic Keratosis with Photodynamic Therapy Using Red or Green Light: A Comparative Study // *Acta Derm Venerol.* 2018. Т. 98, № 7. С. 689–693.
263. Shipunova V. O. и др. Comparative Evaluation of Engineered Polypeptide Scaffolds in HER2-Targeting Magnetic Nanocarrier Delivery // *ACS Omega.* 2021. Т. 6, № 24. С. 16000–16008.
264. Shipunova V. O., Deyev S. M. Artificial Scaffold Polypeptides As an Efficient Tool for the Targeted Delivery of Nanostructures In Vitro and In Vivo // *Acta Naturae.* 2022. Т. 14, № 1. С. 54–72.
265. Wischke C., Schwendeman S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles // *International Journal of Pharmaceutics.* 2008. Т. 364, № 2. С. 298–327.
266. Карапчыńska М. и др. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures // *aoms.* 2016.
267. Zanoni M. и др. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained // *Sci Rep.* 2016. Т. 6, № 1. С. 19103.
268. Tang Y., Liu J., Chen Y. Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test // *Microelectronic Engineering.* 2016. Т. 158. С. 41–45.