

*На правах рукописи*

Гилева Анастасия Михайловна

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

Специальность 1.5.6 – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории биомедицинских материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель: **Марквичева Елена Арнольдовна**, доктор химических наук

Официальные оппоненты: **Горин Дмитрий Александрович**, доктор химических наук, профессор центра фотоники и фотонных технологий автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

**Ле-Дейген Ирина Михайловна**, кандидат химических наук, доцент кафедры химической энзимологии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской федерации «Институт медико-биологических проблем РАН»

Защита состоится 28 октября 2026 года в 11:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке ИБХ РАН и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_

Учёный секретарь  
Диссертационного совета,  
доктор физико-  
математических наук



В.А. Олейников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи:

1. Разработать наноносители на основе липопептидов, загруженные противораковыми препаратами или биомакромоллекулами, в частности катионные липосомы, включая «стелс»-системы с пассивной доставкой; керасомы с пролонгированным высвобождением препарата; катионные липосомы для таргетной доставки, а также липоплексы (с миРНК или ДНК).
2. Получить полимерные наноносители (наноконтейнеры и многослойные полиэлектролитные капсулы) для пассивной или таргетной доставки в опухолевые клетки как липофильных, так и гидрофильных препаратов.

3. Изучить некоторые физико-химические параметры всех наноносителей (средний размер и распределение по размерам,  $\zeta$ -потенциал, стабильность при хранении, высвобождение препарата в модели *in vitro* и т. д.).
4. Исследовать накопление и локализацию наноносителей в монослойной культуре клеток (2D модель *in vitro*) и мультиклеточных опухолевых сфероидов (3D модель *in vitro*).
5. Изучить цитотоксичность всех полученных наноносителей в 2D и 3D моделях *in vitro*.

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

В работе впервые получены и охарактеризованы:

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

Впервые все наноносители изучены в 3D моделях *in vitro* (на основе мультиклеточных опухолевых сфероидов), сформированных разработанным ранее в ИБХ РАН методом индуцированной самосборки клеток под действием циклического RGD-пептида. Цитотоксичность наноносителей изучена с использованием 10 линий раковых и нормальных (нераковых) клеток, а также проведен сравнительный анализ результатов для 2D и 3D моделей.

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

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

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

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов подтверждается применением различных современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования, а также статистической обработки данных. Научная ценность работы подтверждена статьями в российских и зарубежных журналах. Основные результаты работы были представлены в виде 41 постерного и устного доклада на следующих конференциях: 23<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> и 26<sup>th</sup> International Conference on Bioencapsulation (2015 г, Делфт, Нидерланды; 2016 г, Лиссабон, Португалия; 2019 г, Страсбург, Франция), 6<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent advances safety-toxicology and ecology issues» (2015-2019 и 2021 гг, Крит, Греция), 33rd Conference of The European Colloid and Interface Society (2019 г, Левин, Бельгия), EUPOC 2018: Biomimetic Polymers by Rational Design, Imprinting and Conjugation (2018 г, Комо, Италия), 10th Microencapsulation Training School (2018 г, Тронхейм, Норвегия), International conference Biocatalysis-2015: Fundamentals & applications (2015 г, Москва, Россия), 4th International Symposium and School for young scientists on «Physics, Engineering and Technologies for Bio-Medicine» (2019 г, Москва, Россия), IV и V Международная Школа молодых ученых «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (2024-2025 гг, Москва, Россия), XXVII-XXXIII и XXXVII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2015-2021 и 2025 гг, Москва, Россия), III и IV Международная конференция «Физика - наукам о жизни» (2019 и 2021 гг, Санкт-Петербург, Россия), The second International Online Conference on Polymer Science: Polymers and Nanotechnology for Industry 4.0, IOCPS 2021 (2021 г, онлайн-конференция), Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии МКХТ-2019 (2019 г, Москва, Россия), Межвузовская научная студенческая конференция МГУ "Студенческий биохимический форум» (2018 г, Москва, Россия), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (2018 г, Москва, Россия), Biomembranes'18 (2018 г, Москва, Россия), Sechenov International Biomedical Summit 2018 (2018 г, Москва, Россия), IX Научная конференция молодых ученых "Инновации в химии: достижения и перспективы" (2018 г, Москва, Россия), VII Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры-2017» (2017 г, Москва, Россия).

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

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1 Клетки и модели для тестирования наночастиц, полученных в работе

В работе использованы следующие опухолевые клеточные линии: глиобластома головного мозга крысы (C6); колоректальная карцинома человека (HCT116); рак шейки матки человека (HeLa); гепатоцеллюлярная карцинома человека (HepG2); меланома кожи мыши (M3); аденокарцинома молочной железы человека (MCF-7); глиобластома головного мозга человека (U-87MG). В качестве нормальных (нераковых) клеток использовали фибробласты крайней плоти человека (Bj-5ta); клетки эмбриональной почки человека (HEK293T) и мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из кожи человека (MSC).

Исследования наночастиц выполняли с использованием монослойной культуры клеток (2D модель *in vitro*) и мультиклеточных сфероидов (3D модель *in vitro*), сформированных методом RGD-индуцированной самосборки клеток. Сфероиды были получены добавлением циклического RGD-пептида (cyclo-RGDfK), модифицированного 4-карбоксибутилтрифенилфосфонием (TRP), непосредственно к монослойной культуре клеток. Самосборка сфероидов происходила в течение 72 ч. Метод был разработан ранее в лаборатории биомедицинских материалов ИБХ РАН. Его отличает простота, универсальность (подходит для многих линий клеток), а также возможность получать несколько десятков унимодальных сфероидов в одной лунке планшета, в отличие, например, от метода «висячей капли» (один сфероид в лунке).

### 2 Наночастицы на основе липидов

#### 2.1 ПЭГилированные катионные липосомы и липоплексы

На основе катионных липопептидов ( $\text{OrnGlu}(\text{C}_{16}\text{H}_{33})_2$ ,  $\text{OrnOrnGlu}(\text{C}_{16}\text{H}_{33})_2$ ,  $(\text{Orn})_2\text{OrnGlu}(\text{C}_{16}\text{H}_{33})_2$ ), различающихся количеством положительно заряженных групп (2, 3 или 4) в составе полярной головки, были получены липосомы или липоплексы, загруженные плазмидой pGL3 или модельной мРНК. Изучены размер и морфология наночастиц в зависимости от типа липопептида, а также их цитотоксичность, уровень накопления в клетках и эффективность их трансфекции. Для получения ПЭГилированных липосом и липоплексов был выбран липотрипептид, отличающийся низкой цитотоксичностью и высокой эффективностью трансфекции.

ПЭГилирование является известным и универсальным способом стабилизации наночастиц, однако непосредственно ПЭГ может приводить к нежелательным побочным эффектам. Таким образом, в работе получены и исследованы три новых производных ПЭГ (**а**, **б**, **в**, 2–15 мол. %) с разными гидрофобными фрагментами.

Немодифицированные липосомы (без ПЭГ) использовали в качестве контроля. Физико-химические параметры некоторых образцов приведены в Таблице 1. Обнаружено, что введение производных ПЭГ в липосомы приводило к увеличению их среднего размера на 10–15 нм во всех образцах. При этом также наблюдали уменьшение среднего диаметра и двукратное снижение  $\zeta$ -потенциала липоплексов по сравнению с липосомами. Все образцы были стабильны более 12 месяцев.

Таблица 1 – Средний размер и  $\zeta$ -потенциал ПЭГилированных и немодифицированных липосом и липоплексов на основе липотрипептида

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

Морфологию ПЭГилированных липосом изучали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Показано, что ПЭГилирование не вызывало изменения морфологии наноносителей, тогда как введение миРНК приводило к образованию липоплексов с характерной «сэндвичеобразной» структурой.

Цитотоксичность ПЭГилированных липосом оценивали с помощью МТТ–теста на клетках НЕК293Т и НерG2. Максимальные значения IC<sub>50</sub> (235 ± 84 и 303 ± 86 мкг/мл для клеток НЕК293Т и НерG2, соответственно) выявили для липосом без ПЭГ (контроль). При этом ПЭГилирование липосом приводило к снижению их токсичности в 1,5 и более раз: например, для образца с производным ПЭГ **б** (6 мол. %) значения IC<sub>50</sub> составляли 396 ± 82 и 377 ± 17 мкг/мл для клеток НЕК293Т и НерG2, соответственно.

Эффективность трансфекции клеток НЕК293Т или НерG2 изучали с помощью люциферазного теста (для рGL3–липopleксов) или методом ко-трансфекции с последующим ПЦР-анализом (для миРНК–липopleксов). Установлено, что наноносители способны эффективно инкапсулировать как ДНК (плазмиду рGL3), так и миРНК, а также успешно доставлять их в клетки НЕК293Т и НерG2, различающиеся восприимчивостью к трансфекции. Так, после 24 ч инкубации (Рисунок 1) максимальную эффективность трансфекции наблюдали в случае хорошо трансфицируемых клеток НЕК293Т для всех производных ПЭГ (2 мол. %, N/P = 32/1). Для плохо трансфицируемых клеток НерG2 уровень трансфекции в случае производного **б** был выше, чем для **а** и **в**. При увеличении времени инкубации до 48 ч эффективность трансфекции ПЭГилированными липopleксами для обеих клеточных линий в 2 раза превысила уровни трансфекции липopleксами без ПЭГ и Липофектамином 2000. Максимальная эффективность трансфекции показана для образцов с ПЭГ **б** (4–6 мол. %, N/P = 32/1).

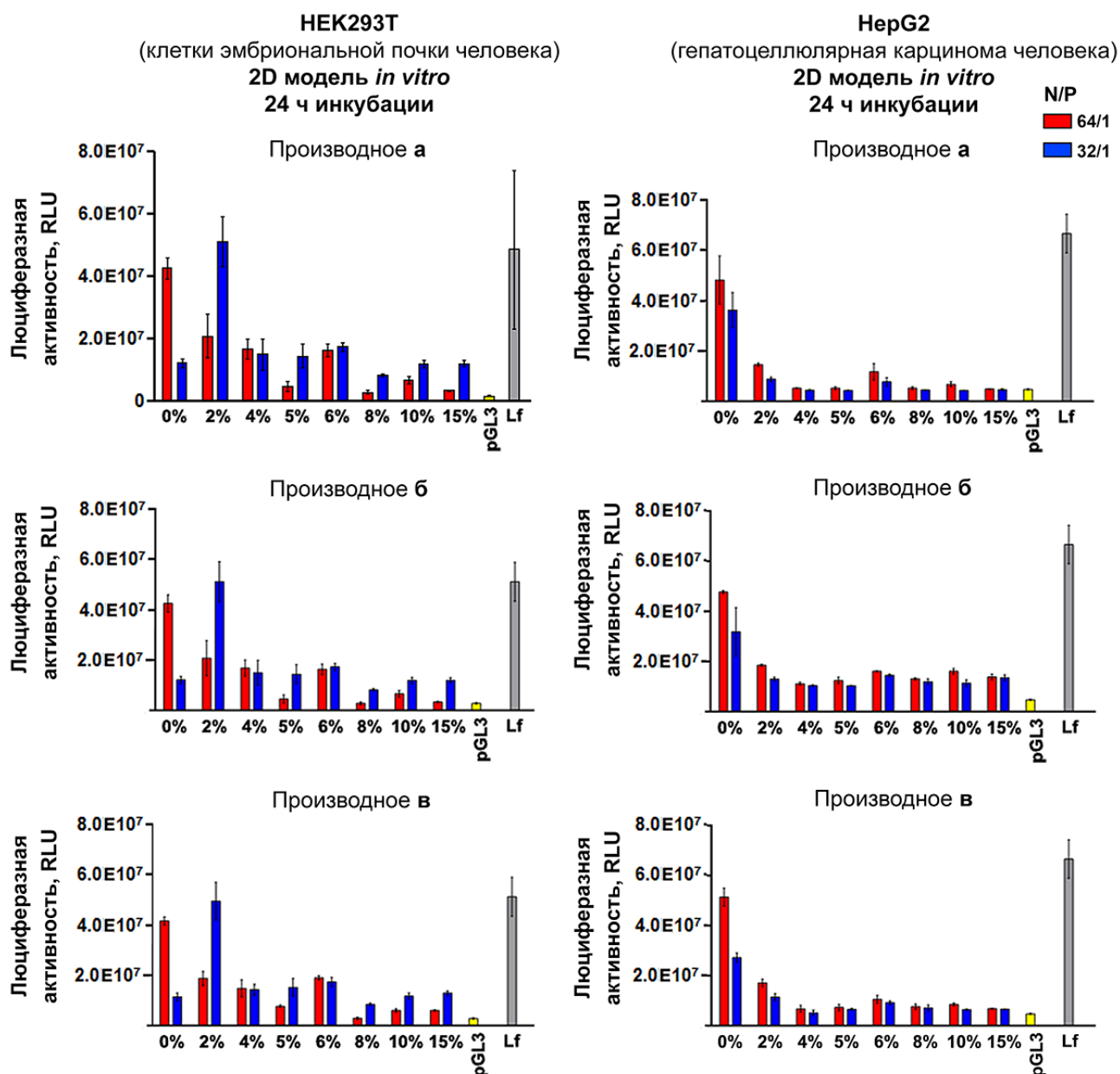


Рисунок 1 – Эффективность трансфекции клеток HEK293T и НерG2 ПЭГилированными pGL3-липоплексами. Контроли: немодифицированные липосомы (без ПЭГ); Липофектамин 2000 (Lf); нативная плаزمида pGL3. Люциферазный анализ

В случае миРНК-липоплексов увеличение количества производных ПЭГ в их составе приводило к снижению эффективности трансфекции по сравнению с образцами без ПЭГ. Вероятно, это связано с тем, что ПЭГилированным липоплексам требуется больше времени для накопления в клетках и высвобождения миРНК, чем немодифицированным (без ПЭГ). Принимая во внимание полученные результаты (высокая эффективность трансфекции клеток HEK293T и НерG2), липоплексы, содержащие ПЭГ **б** (4–6 мол. %, соотношение N/P = 32/1) были выбраны как наиболее перспективные образцы.

Количественную (Рисунок 2) и качественную оценку эффективности накопления ПЭГилированных и немодифицированных (без ПЭГ) липосом провели как в 2D, так и 3D моделях *in vitro* из клеток HEK293T и НерG2. Как и ожидалось, в сфероидах накопление всех наноносителей проходило в 2 раза медленнее, чем в случае

монослойной культуры. При этом поглощение клетками ПЭГилированных образцов было в 2–4 раза медленнее, чем немодифицированных. Так, максимальные уровни накопления образцов без ПЭГ были достигнуты после 1 ч инкубации в случае монослойной культуры (83 % и 87 % для клеток НЕК293Т и НерG2) и через 4 ч в случае сфероидов (77 % и 73 %, соответственно). Накопление ПЭГилированных липосом не зависело от типа производного ПЭГ и линии клеток и было максимальным после 4 ч инкубации в 2D модели и 8 ч в 3D модели.

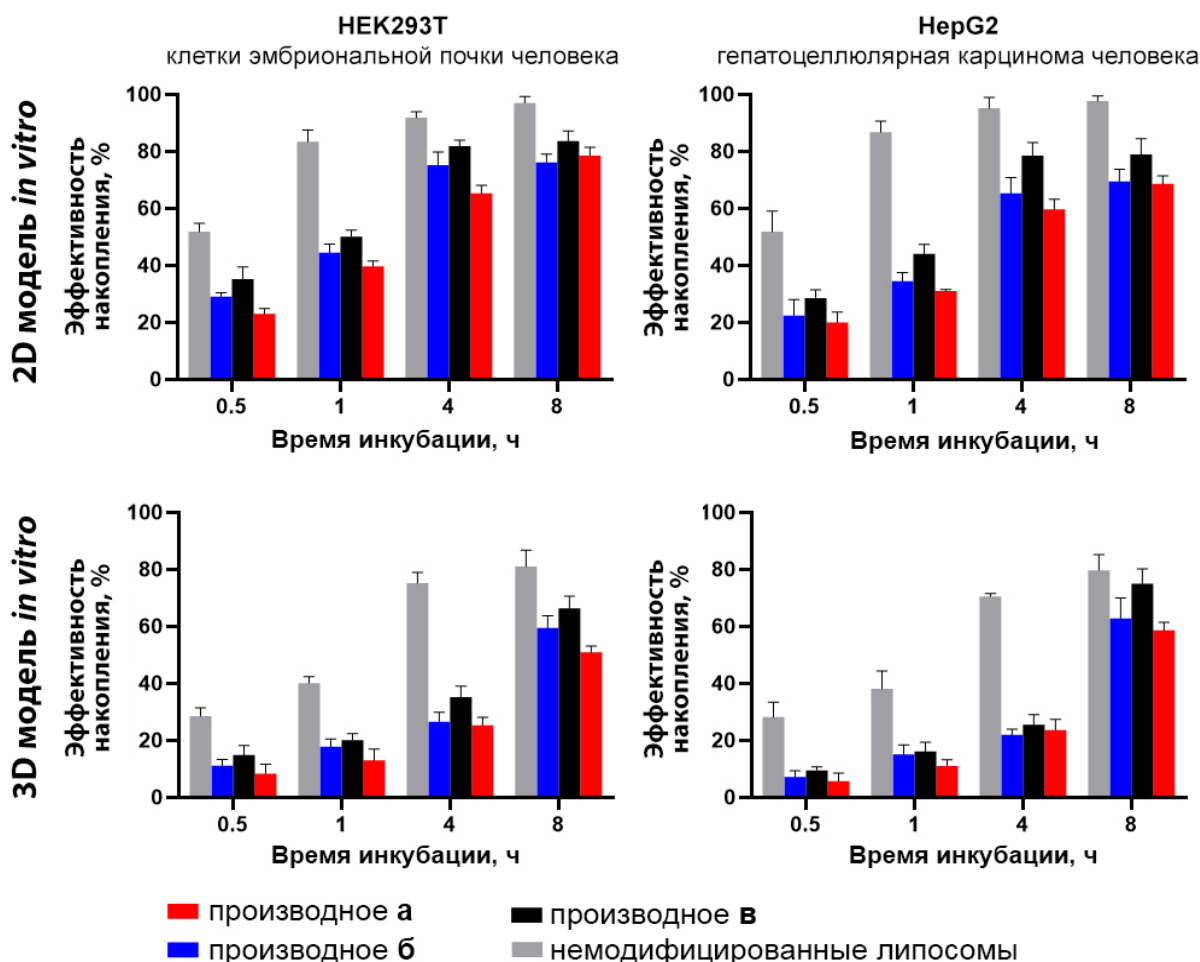


Рисунок 2 – Накопление ПЭГилированных (6 мол. %, N/P = 32/1) липосом в клетках НЕК293Т и НерG2. Контроль: немодифицированные липосомы (без ПЭГ). Проточная цитофлуориметрия (2D модель *in vitro*) и флуориметрия (3D модель *in vitro*)

Таким образом, разработаны и изучены в 2D и 3D моделях *in vitro* новые катионные ПЭГилированные липоплексы для доставки генетического материала (ДНК, миРНК). Показано, что тип производного ПЭГ (а, б или в) не влиял на эффективность трансфекции и накопление образцов в клетках. При этом общий % введения производных ПЭГ значительно сказывался на эффективности трансфекции клеток как миРНК–липopleксами, так и рGL3–липopleксами. Установлено, что липоплексы с производным ПЭГ б (6 мол. %, N/P = 32/1) являются перспективными наноносителями для трансфекции клеток.

## 2.2 Керасомы

Чистые керасомы (1) и (2) были стабильны не менее 120 дней, смешанные керасомы (1)+DPPC и (2)+DPPC – 30 и 40 дней, соответственно, а обычные липосомы только 14 дней. Таким образом, стабильность керасом в 2–9 раз (в зависимости от состава) превышала стабильность обычных липосом.

Высвобождение DOX из керасом изучали с помощью спектрофотометрии. Большой разницы в высвобождении DOX из обычных липосом (77 % после 60 ч) и смешанных керасом (64 % для образца (1)+DPPC и 60 % для (2)+DPPC) не обнаружили. Для чистых керасом (1) и (2) высвобождение DOX было 27 и 25 %, соответственно. Эти результаты можно объяснить быстрой деградацией DPPC, что приводило к образованию пор и диффузии DOX. Плотная силоксановая сеть на поверхности чистых керасом обеспечивала пролонгированное высвобождение DOX. Таким образом, варьируя соотношение CFLA и DPPC, можно получать керасомы с различными физико-химическими свойствами и, следовательно, обеспечивать требуемую эффективность высвобождения препарата.

Качественная оценка накопления и локализации керасом в клетках MCF-7 (2D и 3D модели *in vitro*) была проведена методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) (Рисунок 4).

#### MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека)

Образец (2)+DPPC - смешанные катионные керасомы

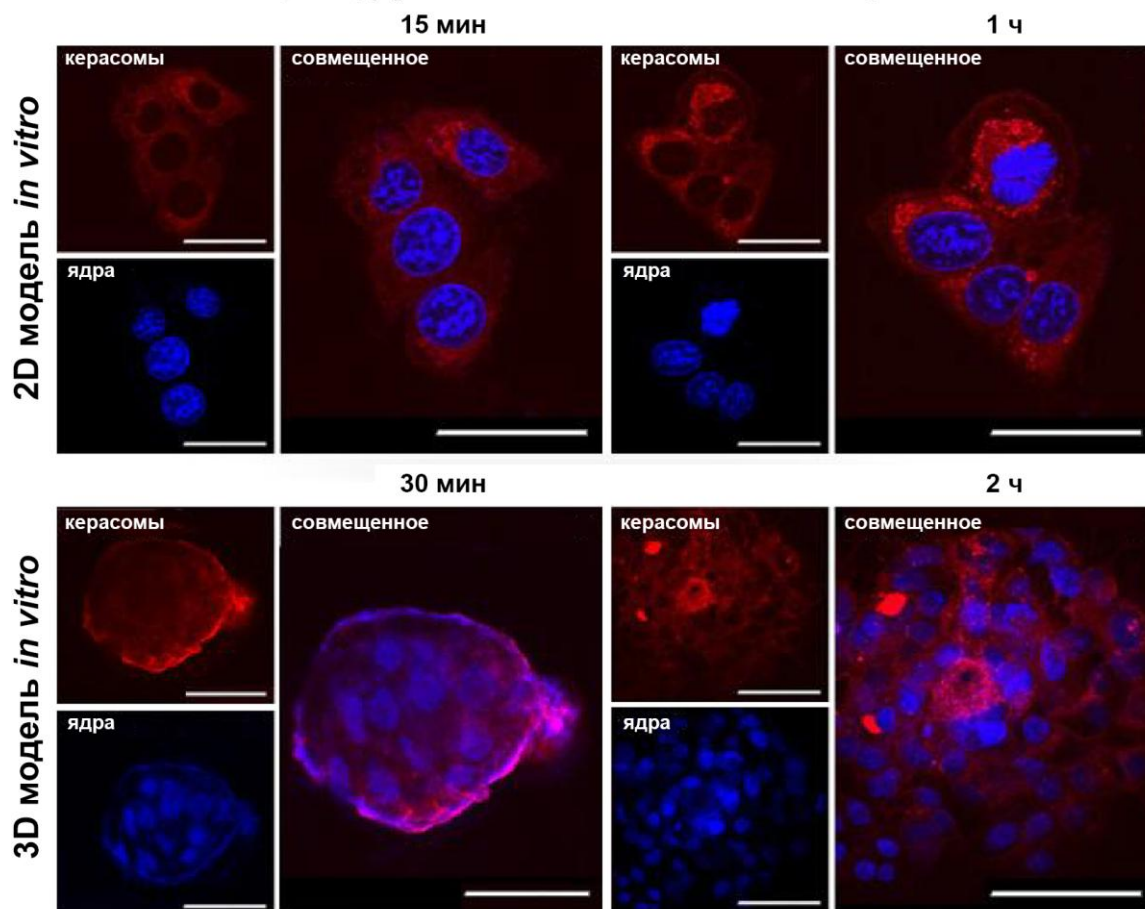


Рисунок 4 – Микрофотографии монослойной культуры и сфероидов из клеток MCF-7 после инкубации с керасомами. Керасомы (DOX) – красный, ядра клеток (Hoechst 33258) – синий. КЛСМ. Шкала – 50 мкм

В 2D модели катионные керасомы (образцы (2) и (2)+DPPC) обнаружили в клетках после 30 мин инкубации, в частности в цитоплазме и, вероятно, эндоплазматической сети. Нейтральные керасомы (1) и (1)+DPPC после 1 ч инкубации наблюдали преимущественно в цитоплазме. В 3D модели накопление проходило значительно медленнее: катионные керасомы обнаружили в центре сфероидов через 1,5–2 ч, а нейтральные – только через 3,5–4 ч. Таким образом, в обеих моделях катионные керасомы накапливались в 2–5 раз быстрее, чем нейтральные, а в 3D модели накопление всех образцов замедлялось, что можно объяснить мультислойной структурой сфероидов.

Количественная оценка эффективности накопления керасом в клетках MCF-7 (2D модель) показала, что все образцы накапливались в клетках медленнее, чем свободный DOX (Рисунок 5). Максимальный уровень накопления DOX (38 %) обнаружили уже через 1 ч. Катионные керасомы (2) и (2)+DPPC накапливались в клетках в 5–6 раз эффективнее, чем нейтральные образцы (1) и (1)+DPPC. Например, после 0,5 ч инкубации уровни накопления катионных керасом составляли 28 и 23 % для образцов (2) и (2)+DPPC, а для нейтральных керасом – только 4 и 5 % для образцов (1) и (1)+DPPC, соответственно.

**MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека)**  
**2D модель *in vitro***

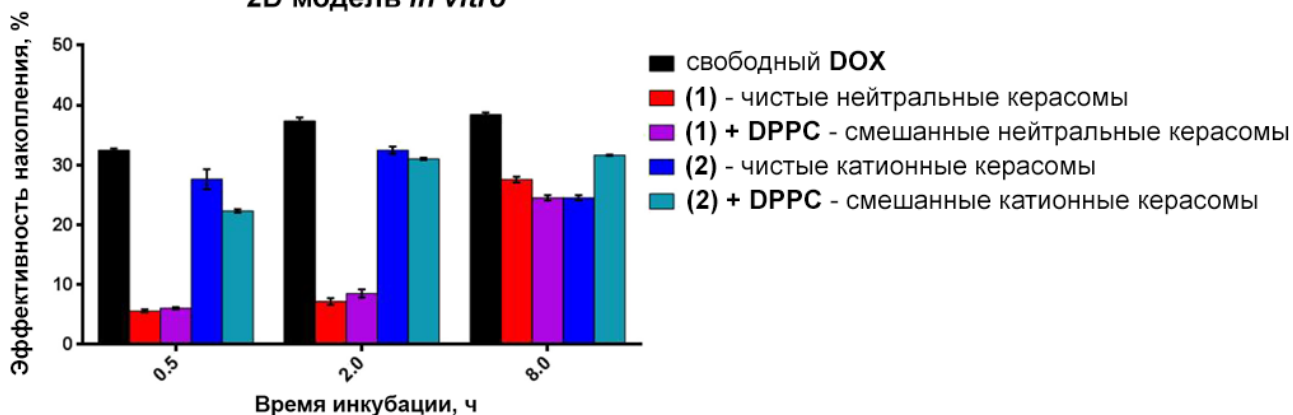


Рисунок 5 – Накопление керасом, загруженных DOX, в клетках MCF-7. Контроль: свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Цитотоксичность керасом оценивали с помощью МТТ–теста (Таблица 3). Пустые керасомы не проявляли токсичности даже в течение 72 ч ( $IC_{50} > 10,0$  мкМ). Цитотоксичность смешанных керасом с DOX проявлялась быстрее и была выше, чем у чистых. Так, величина  $IC_{50}$  была  $6,7 \pm 1,9$  мкМ для смешанных катионных керасом (2)+DPPC уже через 24 ч инкубации, а для смешанных нейтральных (1)+DPPC она достигала  $6,3 \pm 1,6$  мкМ только через 48 ч. Это можно объяснить более быстрым накоплением в клетках катионных керасом, чем нейтральных. Чистые керасомы (1) и (2) вызывали гибель клеток только после 72 ч ( $IC_{50}$   $9,8 \pm 2,3$  мкМ и  $5,1 \pm 1,4$  мкМ, соответственно), что может быть связано с медленным высвобождением DOX из этих образцов. Свободный DOX был более цитотоксичен по сравнению со всеми образцами керасом. Среди керасом максимальное значение  $IC_{50}$  ( $0,4 \pm 0,1$  мкМ),

сопоставимое со свободным **DOX**, обнаружили для смешанных катионных керасом **(2)+DPPC** после 72 ч. Следовательно, цитотоксичность **DOX**-загруженных керасом в первую очередь связана с составом носителя, который определяет такие свойства как эффективность накопления в клетках и профили высвобождения **DOX**.

Таблица 3 – Значения  $IC_{50}$  для керасом после 24, 48 и 72 ч инкубации с клетками MCF-7. 2D модель *in vitro*. МТТ–тест

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

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

Таким образом, были разработаны и протестированы в 2D и 3D моделях *in vitro* **DOX**-загруженные керасомы с заданными параметрами (стабильность, эффективность высвобождения препарата и пр.), которые были достигнуты путем варьирования их химического состава. Благодаря высокой стабильности (в 2–9 раз больше чем у обычных липосом) керасомы перспективны в качестве систем пассивной доставки с пролонгированным высвобождением препарата.

### 2.3 Фолат-конъюгированные катионные липосомы

В работе изучено 4 типа фолат-конъюгированных липосом, которые относятся к системам с таргетной доставкой противоопухолевых препаратов за счет сверхэкспрессии фолатных рецепторов (ФР) на поверхности многих раковых клеток. Три образца FLp были сформированы классическим методом гидратации тонкой липидной пленки (**FLp-ТП**) и один – методом пост-модификации (**FLp-ПМ**). Все полученные FLp были загружены **DOX** (40 % масс.), эффективность загрузки составила 91–95 % для всех образцов.

Изучены физико-химические свойства FLp (средний размер,  $\zeta$ -потенциал и др.). Показано, что средний размер **FLp-ПМ** был вдвое меньше ( $135 \pm 5$  нм), чем размер образцов **FLp-ТП** ( $238 \pm 24$  нм и более), что можно объяснить локализацией части фолатных лигандов внутри **FLp-ТП**. Все FLp, загруженные **DOX**, были стабильны не менее 3 недель, в течение которых высвобождение **DOX** было < 5 %.

Цитотоксичность липосом исследовали на клетках HeLa (МТТ–тест). Максимальные значения  $IC_{50}$  ( $8,4 \pm 1,5$  и  $1,4 \pm 0,3$  мкМ после 24 и 48 ч инкубации, соответственно) обнаружили для образца FLp-ПМ с **DOX** (**FLp-ПМ-DOX**), что было сопоставимо с результатом для свободного **DOX** ( $IC_{50}$   $4,2 \pm 0,9$  мкМ через 24 ч).

Принимая во внимание оптимальные физико-химические параметры, а также

результаты МТТ–теста на клетках HeLa, образец **FLp-ПМ-DOX** был выбран для дальнейших экспериментов. Контроль – обычные липосомы Lp, загруженные DOX (**Lp-DOX**), но без лиганда. Для изучения эффективности накопления и цитотоксичности **FLp-ПМ-DOX** выбрали клетки, различающиеся уровнями экспрессии фолатных рецепторов: MCF-7 и C6 (с высокой экспрессией ФР), а также линии U-87MG и MSC (с низкой экспрессией ФР). Качественный анализ накопления образцов проводили с помощью КЛСМ. В 2D модели из клеток C6 и MCF-7 **FLp-ПМ-DOX** наблюдали внутри клеток уже через 15 мин, тогда как **Lp-DOX** к этому моменту были локализованы только на клеточной мембране. В клетках U-87MG и MSC накопление и локализация **FLp-ПМ-DOX** и **Lp-DOX** не отличались: в частности, после 30 мин оба образца наблюдали в мембранах клеток. В 3D модели разница в интернализации образцов была более выраженной: **FLp-ПМ-DOX** наблюдали во внутреннем объеме сфероидов из клеток MCF-7 и C6 уже через 1–1,5 ч; а **Lp-DOX** – только через 2,5–3,0 ч.

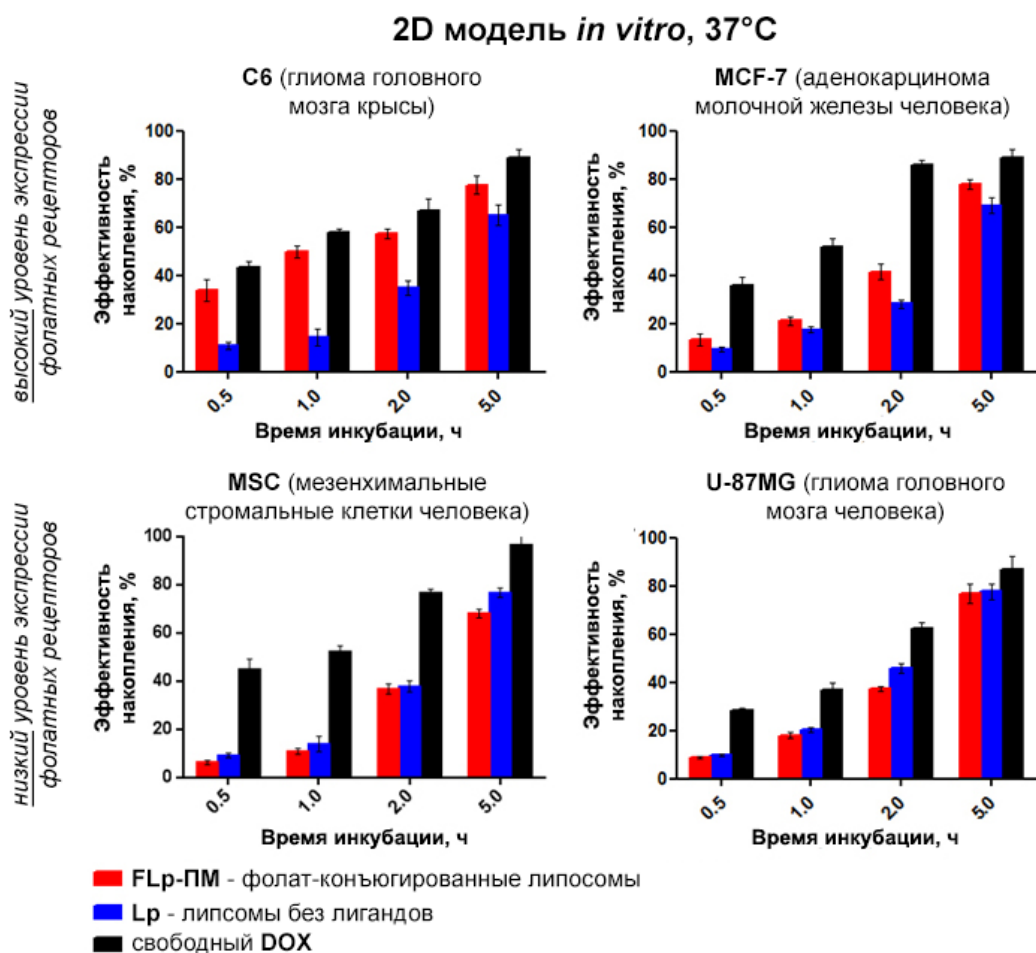


Рисунок 6 – Накопление фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом с DOX в клетках при 37°C. Контроль: свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Количественная оценка накопления **FLp-ПМ-DOX** и **Lp-DOX** в клетках была выполнена с использованием 2D (при 37°C и 4°C) и 3D (при 37°C) моделей *in vitro*. Как видно из Рисунка 6, при 37°C в клетках с высокой экспрессией ФР (C6 и MCF-7) накопление **FLp-ПМ-DOX** проходило значительно более эффективно, чем **Lp-DOX**

без лиганда. В клетках же с низким уровнем экспрессии ФР (U-87MG и MSC) накопление этих образцов было примерно одинаковым. Как и ожидалось, накопление свободного **DOX** сначала (0,5–2 ч инкубации) превосходило накопление всех образцов липосом для всех линий клеток, но после 5 ч инкубации уровни накопления липосом (**Lp-DOX**, **FLp-ПМ-DOX**) и свободного **DOX** были практически одинаковы.

В 3D модели при 37°C получены аналогичные результаты: в сфероиде из клеток с высокой экспрессией ФР (MCF-7 и C6) образец **FLp-ПМ-DOX** накапливался в 1,7–2,1 раза быстрее, чем **Lp-DOX**, что особенно заметно после 4 ч инкубации (Рисунок 7). Уровни накопления **Lp-DOX** и **FLp-ПМ-DOX** в сфероиде из клеток с низким уровнем экспрессии ФР (U-87MG и MSC) были примерно одинаковыми.

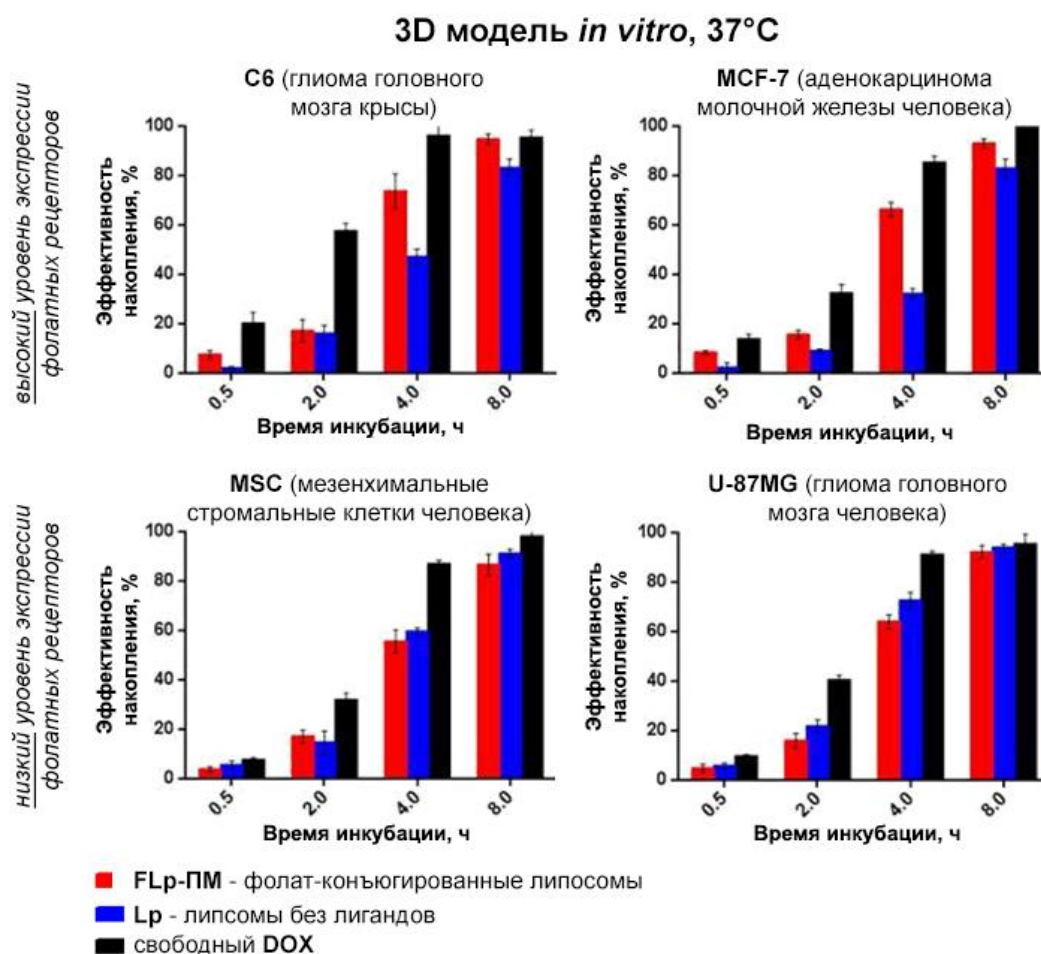


Рисунок 7 – Накопление фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом с **DOX** в сфероиде при 37°C. Контроль: свободный **DOX**. Флуориметрия

В условиях заблокированного эндоцитоза (4°C) уровни накопления всех образцов были значительно ниже (Рисунок 8), чем при 37°C (см. Рисунок 6). Так, в клетках с низкой экспрессией ФР (MSC и U-87MG) образцы практически не накапливались даже через 5 ч (< 5 % для **FLp-ПМ-DOX** и **Lp-DOX**; < 10 % для **DOX**). Такие результаты можно объяснить низким уровнем экспрессии ФР в этих клетках. В клетках с высокой экспрессией ФР (C6 и MCF-7) уровень накопления **FLp-ПМ-DOX** был значительно выше, чем **Lp-DOX**, что, вероятно, связано с их проникновением в клетку по механизму рецептор-опосредованного эндоцитоза.

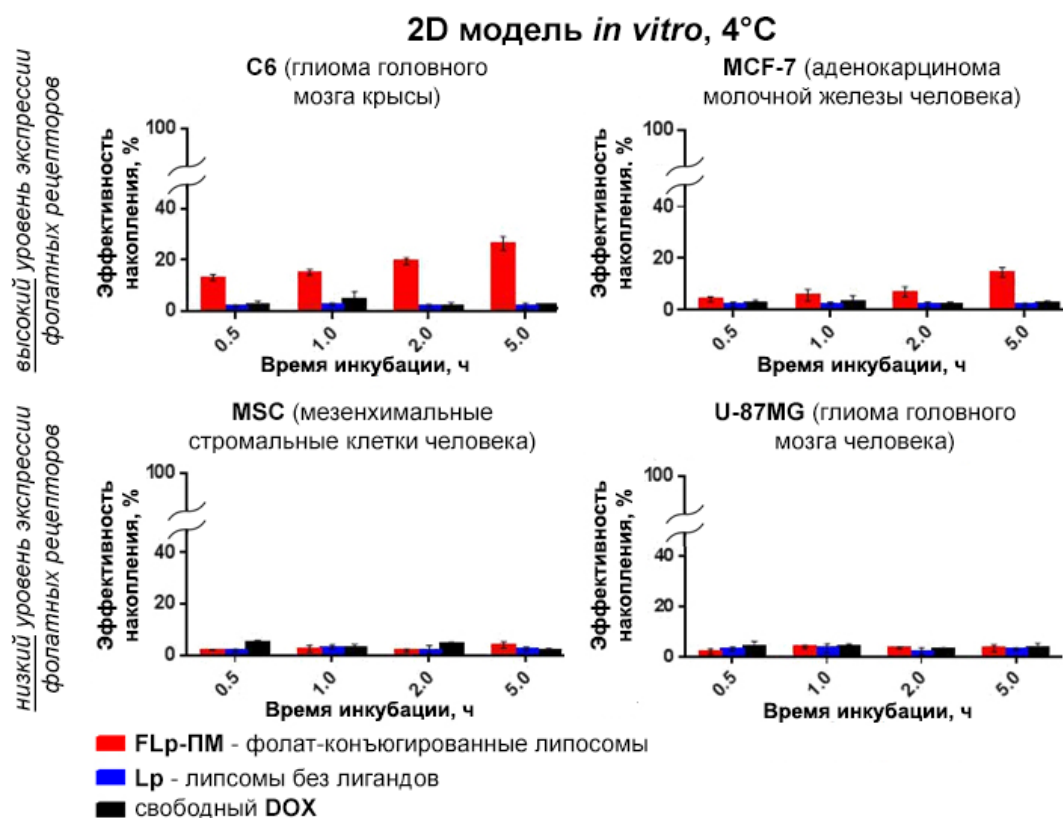


Рисунок 8 – Накопление фолат-конъюгированных и обычных (без лиганда) липосом с DOX в клетках при 4°C. Контроль: свободный DOX. Проточная цитофлуориметрия

Результаты MTT-теста в 2D (при 37°C и 4°C) и 3D (при 37°C) моделях представлены в Таблице 4. Цитотоксичность **Lp-DOX** была практически одинаковой для всех клеток, тогда как токсичность **FLp-PM-DOX** зависела от линии клеток. Так, в клетках с высокой экспрессией ФР (С6 и MCF-7) цитотоксичность **FLp-PM-DOX** была в 2 и более раз выше, чем у **Lp-DOX**. Для клеток с низкой экспрессией ФР (MSC и U-87MG) уровни цитотоксичности практически не различались. Аналогичная зависимость токсичности **FLp-PM-DOX** от типа клеток (с высоким либо низким содержанием ФР) была показана и в 3D модели, однако в этом случае требовалось значительно больше липосом, чем для монослойных культур. Это хорошо согласуется с результатами по накоплению липосом в 2D (см. Рисунок 6) и 3D (см. Рисунок 7) моделях, где видно, что их проникновение в сфероиды занимало больше времени. Поскольку образец **FLp-PM-DOX** накапливался в клетках С6 и MCF-7 даже при 4°C (см. Рисунок 8), предполагали, что в этих условиях его токсичность будет выше, чем у **Lp-DOX** и свободного **DOX**. Из Таблицы 4 видно, что **Lp-DOX** не проявляли цитотоксичности даже через 72 ч ( $IC_{50} > 50,0$  мкМ). При этом **FLp-PM-DOX** были токсичны уже через 48 ч, а после 72 ч их  $IC_{50}$  увеличилась более чем в 2 раза.

Таким образом, получены катионные фолат-конъюгированные липосомы, загруженные DOX, и показана их таргетная доставка в клетки в 2D и 3D моделях. Селективный цитотоксический эффект продемонстрирован с использованием 4 линий клеток с разным уровнем экспрессии ФР. Используемый в работе метод пост-модификации перспективен для создания многофункциональных наноносителей, поскольку позволяет легко модифицировать поверхность липосом.

Таблица 4 – Значения IC50 для образцов липосом, загруженных DOX, после 24, 48 и 72 ч инкубации в 2D (37°C и 4°C) и 3D (37°C) моделях *in vitro*. МТТ–тест

| Образцы                            | Значения IC50, мкМ              |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
|------------------------------------|---------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------|--|------------|--|
|                                    | Клетки                          |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
|                                    | с высоким уровнем экспрессии ФР |            |            |             |             |            | с низким уровнем экспрессии ФР |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
|                                    | MCF-7                           |            |            | C6          |             |            | U-87MG                         |            |            | MSC        |            |             |        |  |            |  |
|                                    | Время инкубации, ч              |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
|                                    | 24                              | 48         | 72         | 24          | 48          | 72         | 24                             | 48         | 72         | 24         | 48         | 72          |        |  |            |  |
| 2D модель <i>in vitro</i> при 37°C |                                 |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| Lp-DOX                             | 15,6 ± 3,1                      | 4,2 ± 0,8  | 3,2 ± 0,8  | 25,7 ± 4,4  | 10,6 ± 1,7  | 5,5 ± 1,1  | 12,9 ± 2,0                     | 9,4 ± 1,5  | 6,2 ± 1,3  | 17,0 ± 2,8 | 8,0 ± 1,6  | 5,4 ± 1,4   |        |  |            |  |
| FLp-ПМ-DOX                         | 6,3 ± 1,5                       | <1,1 ± 0,1 | <1,4 ± 0,2 | 15,5 ± 2,6  | 2,1 ± 0,3   | <1,3 ± 0,1 | 16,0 ± 3,1                     | 10,0 ± 2,2 | 8,3 ± 1,4  | 20,1 ± 4,0 | 10,2 ± 1,2 | 7,4 ± 0,7   |        |  |            |  |
| FLp-ПМ (без DOX)                   | > 100,0                         |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| свободн. DOX                       | 4,3 ± 0,8                       | <1,0 ± 0,3 | <1,0 ± 0,1 | 14,5 ± 2,9  | 10,6 ± 1,6  | 3,4 ± 0,6  | 15,6 ± 2,3                     | 11,8 ± 1,7 | 8,0 ± 2,0  | 9,1 ± 2,0  | 4,1 ± 0,8  | < 1,0 ± 0,1 |        |  |            |  |
| 3D модель <i>in vitro</i> при 37°C |                                 |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| Lp-DOX                             | 73,8 ± 13,4                     | 48,0 ± 9,7 | 24,2 ± 5,2 | 80,6 ± 19,1 | 60,1 ± 10,8 | 23,8 ± 6,8 | 24,5 ± 5,4                     | 19,5 ± 3,7 | 22,0 ± 3,9 | 30,4 ± 8,7 | 19,6 ± 2,6 | 22,2 ± 4,4  |        |  |            |  |
| FLp-ПМ-DOX                         | 46,4 ± 9,2                      | 30,2 ± 7,7 | 23,5 ± 1,9 | 50,5 ± 15,4 | 33,1 ± 10,1 | 17,2 ± 3,0 | 35,1 ± 7,5                     | 26,1 ± 3,3 | 19,3 ± 2,9 | 28,6 ± 5,2 | 20,0 ± 2,8 | 17,0 ± 3,5  |        |  |            |  |
| FLp-ПМ (без DOX)                   | > 100,0                         |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| свободн. DOX                       | 34,8 ± 5,8                      | 23,3 ± 4,1 | 20,4 ± 2,5 | 41,1 ± 8,0  | 25,9 ± 3,6  | 10,7 ± 1,7 | 24,4 ± 3,5                     | 25,2 ± 2,8 | 12,0 ± 0,9 | 21,1 ± 3,0 | 15,4 ± 2,2 | 10,1 ± 0,6  |        |  |            |  |
| 2D модель <i>in vitro</i> при 4°C  |                                 |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| Lp-DOX                             | > 50,0                          |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| FLp-ПМ-DOX                         | 49,4 ± 7,8                      | 31,1 ± 8,8 | 13,2 ± 3,0 | 44,5 ± 9,0  | 28,6 ± 7,5  | 10,6 ± 2,3 | >50,0                          | 47,0 ± 9,7 | 11,3 ± 1,4 | >50,0      | 42,5 ± 7,2 | 10,7 ± 1,0  |        |  |            |  |
| FLp-ПМ (без DOX)                   | > 50,0                          |            |            |             |             |            |                                |            |            |            |            |             |        |  |            |  |
| свободн. DOX                       | > 50,0                          |            | 43,2 ± 6,7 |             | > 50,0      |            | 50,8 ± 9,0                     |            | > 50,0     |            | 41,4 ± 6,5 |             | > 50,0 |  | 46,7 ± 5,2 |  |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

### 3 Наноносители на основе полимеров

#### 3.1 Полиэлектrolитные биodeградируемые наноконтейнеры

Полиэлектrolитные наноконтейнеры были получены методом эмульгирования с применением низкочастотного ультразвука. Ядро ПН представляло собой гидрофобную фазу (масло), в которую был загружен липофильный препарат тимохинон, а оболочка была сформирована из противоположно заряженных полиэлектrolитов (хитозан/ксантановая камедь или ДЭАЭ-декстран/ксантановая камедь). Эффективность загрузки – 100 %. Поверхность ПН была модифицирована путем электростатической адсорбции ПЭГ (образец **ПН-ПЭГ**) или поли-L-лизина (образец **ПН-ПЛ**). Изменение соотношения масло/вода позволяло варьировать средний диаметр ПН, а модификация поверхности ПЭГ или поли-L-лизином – их  $\zeta$ -потенциал. Все образцы были стабильны при хранении (4°C) в течение 6 месяцев.

Морфологию образцов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На Рисунке 9 представлены микрофотографии **немодифицированных ПН** состава хитозан/ксантановая камедь со средним размером  $512 \pm 80$  нм (1/500, v/v) и  $2130 \pm 150$  нм (1/50, v/v). Видно, что ПН имели сферическую форму, а их средний размер коррелировал с результатами, полученными методом динамического светорассеяния (DLS).

#### немодифицированные ПН (хитозан/ксантановая камедь)

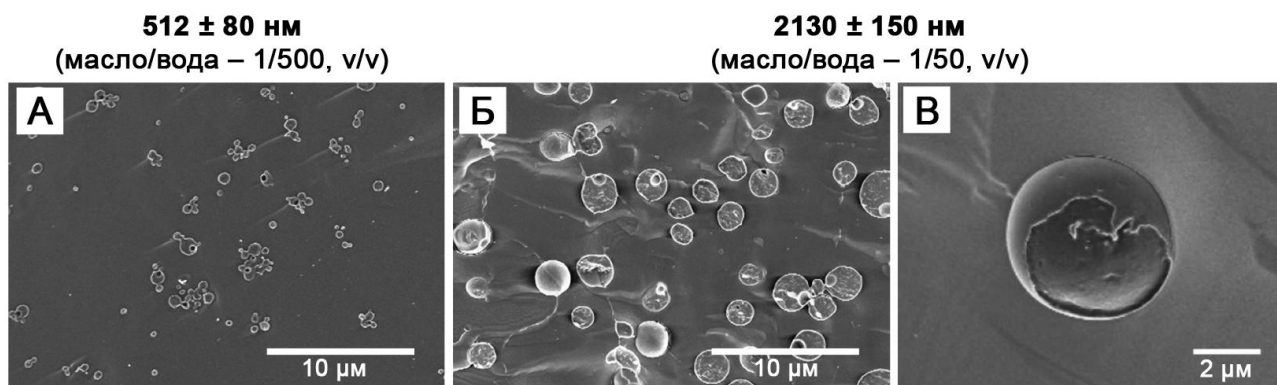


Рисунок 9 – Микрофотографии полиэлектrolитных наноконтейнеров. СЭМ.  
Шкала – 10 мкм (А, Б) и 2 мкм (В)

Локализацию и накопление ПН изучали методом КЛСМ в 2D и 3D моделях *in vitro* с использованием клеток MCF-7 и МЗ. Для обеспечения флуоресценции в масляную фазу ПН был загружен флуоресцентный краситель Nile Red. Сначала для изучения влияния размера ПН на их накопление в клетках было выбрано 2 образца **немодифицированных ПН** со средним диаметром  $2130 \pm 150$  нм и  $512 \pm 80$  нм, соответственно. В 3D модели разница в уровнях накопления ПН была более явной, чем в 2D модели. Так, после 1 ч инкубации с клетками накапливалось больше ПН  $512 \pm 80$  нм, чем ПН  $2130 \pm 150$  нм и они были локализованы во внутреннем объеме сфероидов, а более крупные ПН ( $2130 \pm 150$  нм) оставались адсорбированными на внешней поверхности сфероидов. После 4 ч уровни накопления обоих образцов

увеличивались, причем ПН  $512 \pm 80$  нм были максимально сконцентрированы в центре сфероидов, тогда как ПН  $2130 \pm 150$  нм только начали смещаться к их центру.

Количественная оценка накопления **немодифицированных ПН**, **ПН-ПЭГ** и **ПН-ПЛ** проведена с помощью проточной цитофлуориметрии (2D модель) и флуориметрии (3D модель), результаты представлены на Рисунке 10. В 2D модели эффективность накопления **ПН-ПЛ** была выше, чем у других образцов, что можно объяснить их самым высоким положительным  $\zeta$ -потенциалом ( $+25,5 \pm 5,1$  мВ). Так, максимальное накопление **ПН-ПЛ** (96 %) наблюдали уже через 1 ч, тогда как в случае **немодифицированных ПН** и **ПН-ПЭГ** уровни постепенно увеличивались в течение 4 ч. Накопление **ПН-ПЭГ** проходило медленнее всего, что особенно заметно через 4 ч (62 % против 96 % и 98 % для **немодифицированных ПН** и **ПН-ПЛ**, соответственно). В 3D модели **ПН-ПЛ** также накапливались быстрее остальных образцов, но их максимальный уровень обнаружили только через 2 ч.

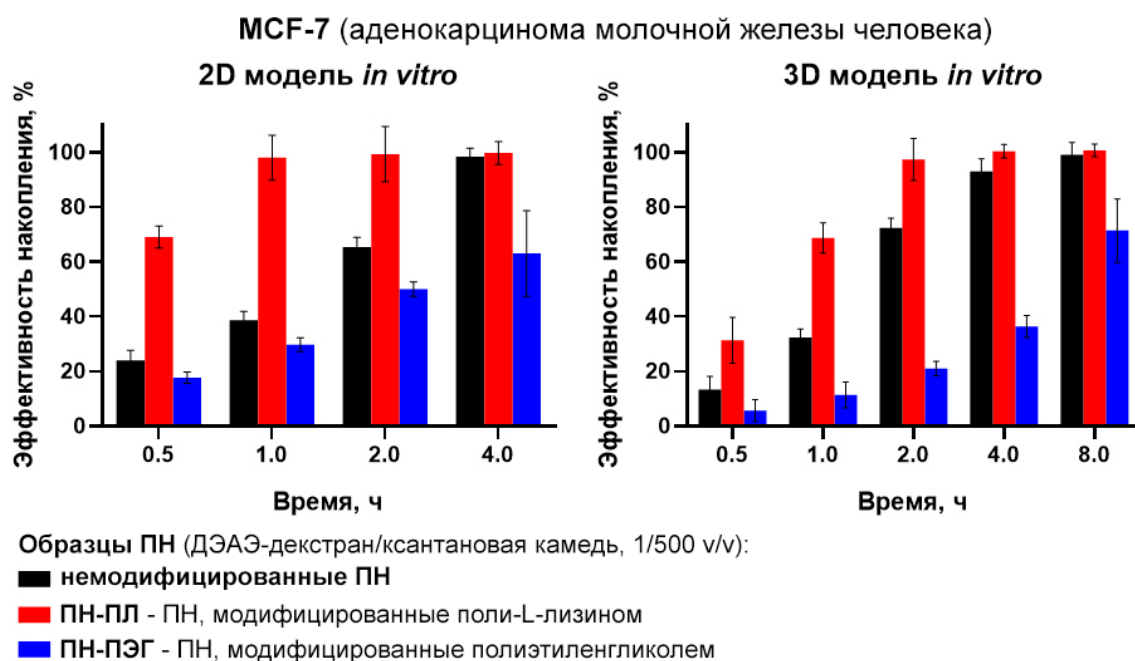


Рисунок 10 – Накопление полиэлектролитных наноконтейнеров, загруженных красителем NileRed, в клетках MCF-7. Проточная цитофлуориметрия (2D модель *in vitro*) и флуориметрия (3D модель *in vitro*)

Как видно из Таблицы 5, **немодифицированные ПН** и **ПН-ПЭГ**, не загруженные тимохиноном, не вызывали гибели клеток MCF-7 даже после 72 ч инкубации ( $IC_{50} > 0,50$  мг/мл). **ПН-ПЛ** без TQ были умеренно цитотоксичны ( $IC_{50} 0,48 \pm 0,07$  мг/мл после 48 ч), что можно объяснить их высоким  $\zeta$ -потенциалом. Максимальную цитотоксичность закономерно выявили у загруженного тимохиноном образца **ПН-ПЛ-TQ**, тогда как **немодифицированные ПН-TQ** были менее токсичны, но вызывали гибель 50 % клеток уже через 24 ч. Для образца **ПН-ПЭГ-TQ** концентрация  $IC_{50}$  была достигнута только спустя 72 ч, что коррелировало с результатами по накоплению (см. Рисунок 10).

Таблица 5 – Значения IC50 для полиэлектролитных наноконтейнеров после инкубации с клетками MCF-7. 2D модель *in vitro*. MTT–тест

| Образцы               |        | IC50, мг/мл |             |             |
|-----------------------|--------|-------------|-------------|-------------|
|                       |        | 24 ч        | 48 ч        | 72 ч        |
| немодифицированные ПН | с TQ   | 0,48 ± 0,09 | 0,41 ± 0,10 | 0,19 ± 0,05 |
|                       | без TQ | > 0,50      |             |             |
| ПН-ПЛ                 | с TQ   | 0,07 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 | < 0,02      |
|                       | без TQ | > 0,50      | 0,48 ± 0,07 | 0,37 ± 0,04 |
| ПН-ПЭГ                | с TQ   | > 0,50      |             | 0,27 ± 0,04 |
|                       | без TQ | > 0,50      |             |             |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Таким образом, получены новые полиэлектролитные наноконтейнеры для доставки гидрофобных противоопухолевых препаратов, в частности тимохинона, а их цитотоксичность протестирована в 2D и 3D моделях *in vitro*. Показано, что накопление ПН в клетках и их цитотоксичность можно варьировать путем изменения их размера и модификации их поверхности. Такие наноносители перспективны для доставки различных липофильных препаратов.

### 3.2 Полиэлектролитные мультислойные капсулы, модифицированные DR5-B

В работе получены биodeградируемые полиэлектролитные мультислойные капсулы, сформированные методом послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов (L-b-L technique), для таргетной доставки в опухолевые клетки. Для получения ПМК поликатион поли-L-аргинин и полианион сульфат декстрана поочередно адсорбировали на карбонатные микросферы, которые далее растворяли для формирования полых мультислойных капсул со структурой полиаргинин/сульфат декстрана (Parg/DS)<sub>3</sub>. Средний диаметр ПМК составил 500 ± 65 нм (образец ПМК<sub>500</sub>). Далее капсулы термически сжимали (90°C, 1 ч) и получали ПМК со средним диаметром 320 ± 80 нм (образец ПМК<sub>300</sub>). Оба образца ПМК были загружены субтоксичным количеством DOX и/или модифицированы лигандом DR5-B (рекомбинантный вариант цитокина TRAIL, способный селективно воздействовать на рецептор DR5, вызывая апоптоз раковых клеток). Загрузка DOX составила 85 % (0,002 мкг DOX на капсулу). Термообработка позволила не только уменьшить размер капсул, но и пролонгировать высвобождение из них DOX (6 и 20 % для ПМК<sub>300</sub> и ПМК<sub>500</sub> после 72 ч, соответственно). Все ПМК были стабильны не менее 30 дней.

Накопление и локализацию ПМК в опухолевых (MCF-7, HCT116) и нормальных (Bj-5ta) клетках изучали в 2D и 3D моделях *in vitro*. Количественная оценка накопления ПМК<sub>500</sub> и ПМК<sub>300</sub> методом проточной цитофлуориметрии показала, что ПМК<sub>300</sub> накапливались быстрее, чем ПМК<sub>500</sub>. Так, через 5 мин инкубации накопление ПМК<sub>300</sub> было в 3,5 раза больше, чем ПМК<sub>500</sub>, через 30 мин – в 1,5 раза, а через 1 ч уровни практически сравнялись (91 и 95 % для ПМК<sub>300</sub> и ПМК<sub>500</sub>, соответственно).

Методом КЛСМ установлено (Рисунок 11), что модифицированные лигандом образцы **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** накапливались в клетках быстрее, чем свободный **DR5-B** (контроль). Кроме того, образец **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** накапливался более эффективно, чем **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B**, как после 15 мин, так и после 1 ч инкубации.

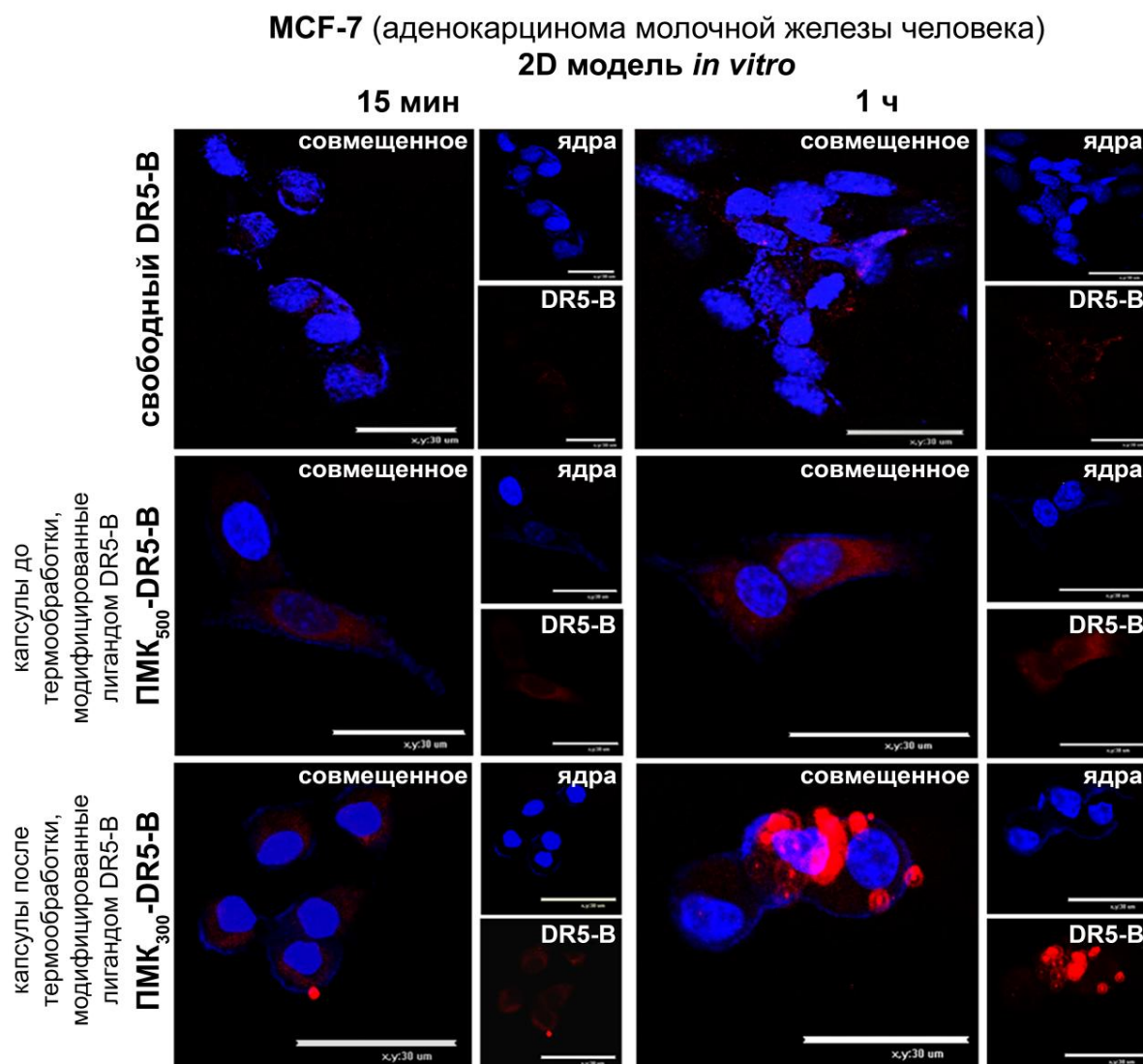


Рисунок 11 – Микрофотографии клеток MCF-7 после инкубации с капсулами и свободным DR5-B. DR5-B (Cy3) – красный; ядра клеток (Hoechst 33258) – синий. КЛСМ. Шкала – 30 мкм

Таким образом, капсулы **ПМК<sub>300</sub>** были выбраны для следующих экспериментов. Количественная оценка накопления ПМК в клетках MCF-7 (2D и 3D модели) представлена на Рисунке 12. Видно, что уже через 5 мин уровни накопления модифицированных лигандами капсул (образцы **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX**) была 70 % и 71 %, соответственно. Отметим, что в 2D модели вплоть до 30 мин инкубации уровни накопления этих образцов превосходили накопление свободных **DOX** и **DR5-B**, что хорошо соотносится с результатами КЛСМ (см. Рисунок 11). В 3D модели наблюдали обратную ситуацию: накопление свободных **DOX** и **DR5-B** проходило быстрее, чем ПМК, что можно объяснить структурой мультиклеточных сфероидов. Поглощение клетками капсул, не модифицированных лигандом (образец **ПМК<sub>300</sub>+DOX**), было значительно медленнее.

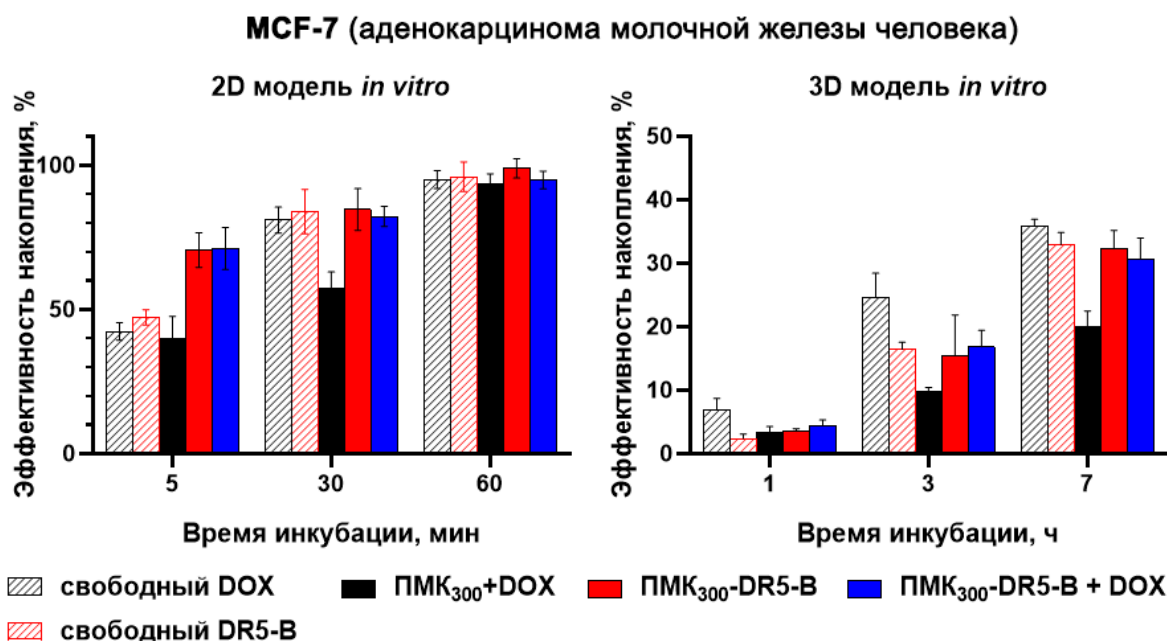


Рисунок 12 – Накопление капсул, загруженных DOX и/или модифицированных белком DR5-B в клетках MCF-7. Контроли: свободный DOX; свободный DR5-B. Проточная цитофлуориметрия (2D модель *in vitro*) и флуориметрия (3D модель *in vitro*)

В Таблице 6 приведены результаты по цитотоксичности модифицированных **DR5-B** капсул для клеток HCT116 (чувствительных к DR5-B) и MCF-7 (резистентных к DR5-B). В обеих моделях для клеток HCT116 максимальные IC<sub>50</sub> обнаружены для свободного **DR5-B**, а образцы **ПМК<sub>300</sub>** и **ПМК<sub>500</sub>** (оба без DR5-B) не вызывали гибели клеток (IC<sub>50</sub> > 1000,0 нг/мл) даже после 72 ч. Образец **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** был токсичнее, чем **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B**, что можно объяснить более высоким уровнем его накопления в клетках (см. Рисунок 12). Так, после 72 ч инкубации со сфероидом IC<sub>50</sub> для **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** была даже выше ( $19,3 \pm 1,6$  нг/мл), чем у свободного **DR5-B** ( $28,5 \pm 5,1$  нг/мл). Для клеток MCF-7 обнаружили аналогичную тенденцию, но значения IC<sub>50</sub> для всех образцов с DR5-B (свободный **DR5-B**, **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B** и **ПМК<sub>500</sub>-DR5-B**) были значительно выше. Так, в 2D модели цитотоксичность (IC<sub>50</sub>  $627,4 \pm 3,9$  и  $980,1 \pm 61,0$  нг/мл для образцов **DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B**, соответственно) была выявлена только после 72 ч инкубации, что подтвердило резистентность клеток MCF-7 к DR5-B.

Синергетический противоопухолевый эффект DR5-B и субтоксичных концентраций DOX был изучен с использованием **ПМК<sub>300</sub>** (Таблица 7). В случае клеток HCT116 (в 2D и 3D моделях) образец **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX** был более токсичен, чем ПМК без DOX (**ПМК<sub>300</sub>-DR5-B**), особенно после 48 ч инкубации. Аналогичный эффект наблюдали и для контролей: значения IC<sub>50</sub> для комбинации **DR5-B+DOX** были ниже, чем для свободного **DR5-B** (без DOX). В отличие от линии HCT116, для клеток MCF-7 образцы без DOX (свободный **DR5-B** и **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B**) не проявили противоопухолевой активности и вызывали гибель клеток только в 2D модели после 72 ч инкубации. Для клеток MCF-7, как и HCT116, использование комбинации DR5-B с DOX (в свободной форме и при загрузке в ПМК) усиливало цитотоксичность, что и позволило преодолеть резистентность клеток MCF-7 как в 2D, так и в 3D моделях *in vitro*.

Таблица 6 – Значения IC50 для образцов капсул, модифицированных DR5-B. MTT–тест

| Образцы                   | Значения IC50, нг/мл      |              |            |                           |            |              |                           |      |              |                           |      |      |
|---------------------------|---------------------------|--------------|------------|---------------------------|------------|--------------|---------------------------|------|--------------|---------------------------|------|------|
|                           | HCT116                    |              |            |                           |            |              | MCF-7                     |      |              |                           |      |      |
|                           | 2D модель <i>in vitro</i> |              |            | 3D модель <i>in vitro</i> |            |              | 2D модель <i>in vitro</i> |      |              | 3D модель <i>in vitro</i> |      |      |
|                           | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч       | 24 ч                      | 48 ч       | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч | 72 ч |
| ПМК <sub>300</sub> -DR5-B | 72,4 ± 8,3                | 42,1 ± 3,8   | 10,7 ± 3,4 | 96,0 ± 7,7                | 77,9 ± 5,2 | 19,3 ± 1,6   | >1000,0                   |      |              | >1000,0                   |      |      |
| ПМК <sub>500</sub> -DR5-B | 519,8 ± 38,5              | 111,7 ± 10,9 | 24,2 ± 3,1 | >1000,0                   |            | 109,5 ± 18,2 | >1000,0                   |      | 980,1 ± 61,0 | >1000,0                   |      |      |
| Контроли:                 |                           |              |            |                           |            |              |                           |      |              |                           |      |      |
| ПМК <sub>300</sub>        | >1000,0                   |              |            |                           |            |              |                           |      |              |                           |      |      |
| ПМК <sub>500</sub>        |                           |              |            |                           |            |              |                           |      |              |                           |      |      |
| свободный DR5-B           | 31,4 ± 2,6                | 27,0 ± 3,2   | 10,1 ± 0,7 | 39,7 ± 4,0                | 33,5 ± 2,4 | 28,5 ± 5,1   | >1000,0                   |      | 627,4 ± 43,9 | >1000,0                   |      |      |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Таблица 7 – Значения IC50 для образцов капсул, модифицированных DR5-B и/или загруженных DOX. MTT–тест

| Образцы                         | Значения IC50, нг/мл      |            |              |                           |              |             |                           |              |              |                           |              |              |
|---------------------------------|---------------------------|------------|--------------|---------------------------|--------------|-------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|--------------|--------------|
|                                 | HCT116                    |            |              |                           |              |             | MCF-7                     |              |              |                           |              |              |
|                                 | 2D модель <i>in vitro</i> |            |              | 3D модель <i>in vitro</i> |              |             | 2D модель <i>in vitro</i> |              |              | 3D модель <i>in vitro</i> |              |              |
|                                 | 24 ч                      | 48 ч       | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч        | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч         | 24 ч                      | 48 ч         | 72 ч         |
| ПМК <sub>300</sub> + DOX        | >1000,0                   |            | 678,4 ± 50,5 | >1000,0                   |              |             | >1000,0                   |              |              |                           |              |              |
| ПМК <sub>300</sub> -DR5-B       | 145,8 ± 11,8              | 98,0 ± 9,7 | 18,1 ± 4,8   | 246,1 ± 41,5              | 167,2 ± 21,0 | 75,3 ± 12,4 | >1000,0                   |              | 535,8 ± 31,5 | >1000,0                   |              |              |
| ПМК <sub>300</sub> -DR5-B + DOX | 106,5 ± 9,0               | 47,3 ± 4,0 | 10,6 ± 1,7   | 148,0 ± 12,2              | 49,6 ± 6,6   | 20,9 ± 1,8  | >1000,0                   | 341,2 ± 17,8 | 98,1 ± 9,9   | >1000,0                   | 227,4 ± 13,4 |              |
| <b>Контроли:</b>                |                           |            |              |                           |              |             |                           |              |              |                           |              |              |
| ПМК <sub>300</sub>              | >1000,0                   |            |              |                           |              |             |                           |              |              |                           |              |              |
| свободный DR5-B                 | 52,7 ± 5,5                | 45,0 ± 6,1 | 14,7 ± 3,2   | 69,1 ± 9,3                | 52,6 ± 7,1   | 46,8 ± 7,0  | >1000,0                   |              | 663,3 ± 56,4 | >1000,0                   |              |              |
| свободный DOX + свободный DR5-B | 21,1 ± 1,8                | 8,0 ± 2,3  | 4,5 ± 0,9    | 56,5 ± 8,4                | 34,7 ± 5,0   | 11,2 ± 2,7  | 804,8 ± 30,7              | 279,6 ± 22,0 | 87,4 ± 10,5  | >1000,0                   | 732,0 ± 28,1 | 186,5 ± 16,6 |
| свободный DOX                   | >1000,0                   |            | 836,1 ± 37,4 | 702,5 ± 35,2              | >1000,0      |             | 956,3 ± 64,8              | >1000,0      |              |                           |              |              |

IC50 - полуингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток.

Отсутствие токсичности **ПМК<sub>300</sub>-DR5-B+DOX** для нормальных (нераковых) клеток было продемонстрировано методом МТТ-теста на клетках Вj-5ta. Все образцы оставались нетоксичными как в 2D, так и в 3D модели *in vitro* (IC<sub>50</sub> > 1000 нг/мл), что подтверждает таргетную доставку капсул только в раковые клетки.

Таким образом, разработаны ПМК, загруженные DOX и модифицированные белком DR5-B, и показана их таргетная доставка в клетки HCT116 (чувствительные к DR5-B) и MCF-7 (резистентные к DR5-B). При этом комбинация DR5-B и субтоксичных концентраций DOX, реализованная в ПМК, позволила преодолеть резистентность клеток MCF-7 как в 2D, так и в 3D моделях *in vitro*. Следовательно, ПМК могут быть предложены в качестве новой системы адресной доставки, которая позволяет преодолеть резистентность некоторых типов раковых клеток благодаря синергетическому эффекту DR5-B и DOX.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны наноносители на основе катионных липопептидов (липосомы, в том числе модифицированные различными производными ПЭГ, и керасомы). На основе катионных ПЭГилированных липоплексов разработана система доставки ДНК и миРНК. Методом пост-модификации получены фолатные липосомы для таргетной доставки доксорубина в опухолевые клетки.
2. Получены полимерные наноносители на основе природных биоразлагаемых полисахаридов и/или синтетических пептидов, в частности наноконтейнеры для пассивной доставки липофильного препарата тимохинона и полиэлектролитные мультислойные капсулы с доксорубином, модифицированные белком DR5-B, индуцирующим апоптоз раковых клеток, для таргетной доставки.
3. Изучены физико-химические свойства всех липосомальных и полимерных наноносителей. Показано, что в зависимости от их состава и метода получения можно варьировать их параметры (средний диаметр и ζ-потенциал, стабильность при хранении, время высвобождения препарата и др). Так, различные модификации поверхности липосом позволили увеличить их стабильность при хранении с 14 дней (немодифицированные липосомы) до 90 дней (ПЭГилированные липосомы) и 120 дней (керасомы).
4. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии изучена эффективность накопления и особенности локализации наноносителей в клетках в 2D (монослойная культура) и 3D (сфероиды) моделях *in vitro* с использованием 8 линий опухолевых клеток (HEK293T, HepG2, MCF-7, HeLa, U-87MG, C6, M3, HCT116) и 2 линий нормальных клеток (MSC, Вj-5ta). Показано, что уровни накопления наноносителей в сфероидах были в 2 и более раз меньше, чем в монослойной культуре клеток. При этом локализация наноносителей внутри сфероидов зависела от состава и/или размера носителя.

5. Установлено, что при переходе от 2D к 3D модели *in vitro* цитотоксичность всех наноносителей снижалась, что подтверждает более высокую резистентность клеток в сфероидах. Так, для образца капсул ПМК<sub>500</sub>-DR5-B при инкубации (48 ч) с клетками НСТ116 значения IC<sub>50</sub> составляли  $111,7 \pm 10,9$  нг/мл и  $>1000$  нг/мл для 2D и 3D моделей *in vitro*, соответственно. Показано, что комбинация субтоксичных концентраций DOX (0,002 мкг DOX на капсулу) с белком DR5-B позволила преодолеть резистентность клеток MCF-7 благодаря синергетическому эффекту (IC<sub>50</sub>  $98,1 \pm 9,9$  нг/мл против  $535,8 \pm 31,5$  нг/мл для капсул с DR5-B без DOX). Продемонстрирована таргетная доставка капсул только в опухолевые клетки.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в рецензируемых журналах*

1. Trushina D., **Gileva A.**, Yagolovich A., Gasparian M., Kurbanova L., Burov S., Bukreeva T., Borodina T.N., Artemov V., Oleinikov V., Markvicheva E., Synergistic effect of DR5-targeted capsules loaded with doxorubicin in drug-resistant 3D tumour spheroids // Journal of Microencapsulation. 2025. 42(7): 736–751 [IF 3.35, Q2, WoS]
2. Afanasyeva K.A., Budanova U.A., Sebyakin Yu. L., **Gileva A.M.**, Drozdova M.G., Markvicheva E., Fluorescently labeled cationic liposomes with sunitinib and the BODIPY-FL/L-carnitine conjugate for theranostics // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2025. 51: 2812–2822 [IF 1.88, Q4, WoS]
3. **Гилева А.М.**, Куликова Д.И., Куковьякина Е.В., Яголович А.В., Кушнерёв К.С., Кусков А.Н., Марквичева Е.А., Исследование цитотоксичности наночастиц на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона, загруженных куркумином, на 2D- и 3D-моделях *in vitro* аденокарциномы яичника человека // Российский онкологический журнал. 2024. 29(3): 93–104 [IF 0.20, Q2, РИНЦ]
4. Afanasyeva K.A., **Gileva A.M.**, Markvicheva E.A., Budanova U.A., Sebyakin Y.L., Glycolipotriptide (N-Lactitol-Gly)2-LysC16 and its fluorescently labeled analog for visualizing vector systems for the delivery of biologically active substances to target cells // Moscow University Chemistry Bulletin. 2023. 78(5): 283–291 [IF 0.62, Q4, WoS]
5. **Gileva A.M.**, Koloskova O.O., Nosova A.S., Vishniakova L.I., Simonova V.A., Kurbanova L.S., Egorenkov E.A., Smirnov V.V., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L., Suzina N.E., Khaitov M.R., Markvicheva E.A., Transfection efficacy and drug release depends upon the PEG derivative in cationic lipoplexes: Evaluation in 3D *in vitro* model and *in vivo* // Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials. 2023. 111(9): 1614–1628 [IF 3.43, Q2, WoS]
6. Denieva Z.G., Koloskova O.O., **Gileva A.M.**, Budanova U.A., Sebyakin Y.L., Mixed cationic liposomes based on L-amino acids as efficient delivery systems of therapeutic molecules into cells // Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2023. 17(2): 136–147 [IF 1.40, Q4, WoS]
7. Agapova I., Efimov A.E., Mochalov K.E., Solovyeva D.O., **Gileva A.M.**, Markvicheva E.A., Yakovlev D.V., Lyundup A.V., Oleinikov V.A., Agapov I.I., Gautier S.V., Correlative fluorescent scanning probe nanotomography used to study the intracellular distribution of

- doxorubicin in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells // *Doklady Biological Sciences*. 2023. 509(1): 103–106 [IF 0.78, Q3]
8. **Gileva A.**, Trushina D., Yagolovich A., Gasparian M., Kurbanova L., Smirnov I., Burov S., Markvicheva E., Doxorubicin-loaded polyelectrolyte multilayer capsules modified with antitumor DR5-specific TRAIL variant for targeted drug delivery to tumor cells // *Nanomaterials (Basel)*. 2023. 13(5): 902 [IF 5.44, Q2, WoS]
  9. Yagolovich A., Isakova A., Artykov A., Vorontsova Y., Mazur D., Antipova N., Pavlyukov M., Shakhparonov M., **Gileva A.**, Markvicheva E., Plotnikova E., Pankratov A., Kirpichnikov M., Gasparian M., Dolgikh D., DR5-selective TRAIL variant DR5-B functionalized with tumor-penetrating iRGD peptide for enhanced antitumor activity against glioblastoma // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. 23(20): 12687 [IF 4.91, Q1, WoS]
  10. Yagolovich A., Kuskov A., Kulikov P., Kurbanova L., **Gileva A.**, Markvicheva E., Antitumor cytokine DR5-B-conjugated polymeric poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles with enhanced cytotoxicity in human colon carcinoma 3D cell spheroids // *Materials Proceedings*. 2021. 7(1):8 [IF 1.78, Q3, WoS]
  11. Yagolovich A., Kuskov A., Kulikov P., Kurbanova L., Bagrov D., Artykov A., Gasparian M., Sizova S., Oleinikov V., **Gileva A.**, Kirpichnikov M., Dolgikh D., Markvicheva E., Amphiphilic poly(N-vinylpyrrolidone) nanoparticles conjugated with DR5-specific antitumor cytokine DR5-B for targeted delivery to cancer cells // *Pharmaceutics*. 2021. 13(9): 1413 [IF 6.29, Q1, WoS]
  12. **Gileva A.**, Borodina T., Akasov R., Trushina D., Burov S., Klyachko N., González-Alfaro Y., Bukreeva T., Markvicheva E., Fabrication and evaluation of nanocontainers for lipophilic anticancer drug delivery in 3D in vitro model // *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2021. 109(4): 527–537 [IF 3.43, Q2, WoS]
  13. **Gileva A.**, Sarychev G., Kondrya U., Mironova M., Sapach A., Selina O., Budanova U., Burov S., Sebyakin Yu., Markvicheva E., Lipoamino acid-based cerasomes for doxorubicin delivery: preparation and in vitro evaluation // *Materials Science and Engineering C*. 2019. 100: 724–734 [IF 8.32, Q1, WoS]
  14. Koloskova O.O., Suzina N.E., Grechihina M.V., **Gileva A.M.**, Drozdova M.G., Markvicheva E.A., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L., Shilovskiy I.P., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I., Khaitov M.R., Effect of lipopeptide structure on gene delivery system properties: evaluation in 2D and 3D in vitro models // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018. 167: 328–336 [IF 5.79, Q1, WoS]
  15. Akasov R., **Gileva A.**, Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva E., 3D in vitro co-culture models based on normal cells and tumor spheroids formed by cyclic RGD-peptide induced cell self-assembly // *Biotechnology Letters*. 2017. 39(1): 45–53 [IF 2.87, Q2, WoS]
  16. Akasov R., Borodina T., Zaytseva E., **Sumina (Gileva) A.**, Bukreeva T., Burov S., Markvicheva E., Ultrasonically assisted polysaccharide microcontainers for delivery of lipophilic antitumor drugs: preparation and in vitro evaluation // *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015. 5, 7(30): 16581–16589 [IF 9.23, Q1, WoS]
  17. Koloskova O.O., Budanova U.A., **Sumina (Gileva) A.M.**, Sarychev G.A., Sebyakin Yu.L., Ornithine and lysine based lipotripeptides: synthesis and comparison of transfection efficiency // *Mendelev Communications*. 2014. 24: 262–263 [IF 1.77, Q3, WoS]