

*на правах рукописи*

СЛАСТНИКОВА ТАТЬЯНА АЛЕКСАНДРОВНА

Исследование специфичности и эффективности противоопухолевых препаратов,  
доставляемых модульными нанотранспортерами

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук и на биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Соболев Александр Сергеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Гурский Георгий Валерианович**, доктор физико-математических наук, член-корреспондент РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория ДНК-белковых взаимодействий, заведующий лабораторией

**Антонов Валерий Федорович**, доктор биологических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра медицинской и биологической физики, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук

Защита диссертации состоится 18 апреля 2013 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 на базе Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ, биологический факультет, аудитория 389.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан

2013 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Страховская М.Г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы**

Рак – одна из основных причин преждевременной смертности в развитых странах. Несмотря на огромное количество затрачиваемых на борьбу с этим заболеванием сил и средств, проблема остается пока далекой от решения. Поэтому поиск новых подходов лечения рака не перестает быть актуальным.

Из ряда существующих подходов к лечению рака можно выделить использование физических факторов с локальным повреждающим действием, эффективность которых в отличие от биохимического подхода, опирающегося на особенности метаболизма или регуляции чрезвычайно гетерогенных раковых клеток, определяется лишь местом проявления этого действия.

Так, в последнее время всё больший интерес приобретают такие цитотоксические физические факторы, которые действуют на малые расстояния, тем самым не повреждая «немишенные» клетки, при этом их действие обычно ограничено достаточно коротким, лучше всего – наперед заданным периодом времени. Примером могут служить: 1) фотосенсибилизаторы (ФС), генерирующие активные формы кислорода с пробегом не более 40 нм (Sobolev, 2008) лишь пока они возбуждаются светом нужной длины волны; 2) короткоживущие радионуклиды, испускающие электроны Оже (с пробегом 2-500 нм) (Kassis, 2008) или  $\alpha$ -частицы (с пробегом в десятки мкм) (Vaidyanathan and Zalutsky, 2011); 3) изотопы, используемые для нейтрон-захватной терапии, в ходе которой – пока идет облучение нейтронами – происходит ядерная реакция с образованием  $\alpha$ -частиц (Byvaltsev et al., 2012). Эффективность действия физических факторов, обладающих такими свойствами, принципиально зависит от места их локализации в клетке. Для всех этих агентов показано, что наиболее чувствительным к их поражающему действию компартментом является клеточное ядро (Sobolev, 2009). Таким образом, для обеспечения максимально эффективного функционирования, подобные физические агенты должны быть селективно узнаны клеткой-мишенью, поглощены внутрь клетки и доставлены в ядро.

Однако сами по себе ни известные свободные ФС, ни эмиттеры электронов Оже обычно не обладают ни необходимой клеточной специфичностью, ни способностью

накапливаться в ядре в заметном количестве (Соболев и др., 2004, Wiseman and Halliwell, 1996).

Таким образом, высокоспецифическая внутриклеточная доставка таких локально действующих противоопухолевых физических факторов, как эмиттеры электронов Оже и ФС, в ядра раковых клеток представляет собой актуальную задачу биофизики клетки, решение которой представляется важным для повышения эффективности противоопухолевой терапии. Будучи направленной на увеличение эффективности и снижение побочных эффектов проводимой терапии, адресная доставка лекарств является чрезвычайно актуальной задачей современной молекулярной биомедицины и фармакологии.

Одним из многообещающих подходов для направленной доставки локально действующих физических факторов в ядра клеток-мишеней является использование естественной клеточной машинерии внутриклеточного транспорта и сортировки макромолекул. Этот принцип заложен в основу разработанных в нашей лаборатории модульных нанотранспортеров (МНТ). Функциональные модули, входящие в состав МНТ, обеспечивают последовательное взаимодействие транспортера со специфическими клеточными системами, обеспечивающими тот или иной этап внутриклеточного транспорта присоединенного к транспортеру цитотоксического агента от поверхности в ядро клетки-мишени (Sobolev, 2009).

Ранее, на примере ФС и  $\alpha$ -эмиттеров было показано значительное (до нескольких тысяч раз) увеличение их эффективности в экспериментах на культурах клеток в результате их присоединения к МНТ (Gilyazova et al., 2006, Rosenkranz et al., 2008). Однако, важные вопросы эффективности *in vivo* ФС, доставляемых МНТ, оставались нерешенными.

Эмиттеры электронов Оже обладают значительно меньшим радиусом действия по сравнению с эмиттерами  $\alpha$ -частиц и, как и последние, не требуют дополнительного облучения видимым светом для активации, – а, значит, в отличие от ФС, не имеют ограничений по глубине залегания опухолей и метастазов. Поэтому представляются актуальными характеристика кинетики внутриклеточного транспорта и исследование возможности увеличения эффективности эмиттеров электронов Оже, присоединенных к МНТ.

Для случаев с незначительными различиями в экспрессии поверхностных рецепторов у раковых и нормальных клеток, а также в целях повышения избирательности действия в принципе, в МНТ, благодаря его модульной структуре, был заложен модуль, направленный на придание МНТ дополнительного – внутриклеточного – уровня

специфичности. Исследование принципиальной перспективности подобного подхода увеличения специфичности систем адресной доставки противораковых веществ с коротким радиусом летального физического воздействия представляет собой важную задачу.

Вышеизложенное приводит к заключению, что исследование транспорта и цитотоксического действия препаратов, вызывающих локальные летальные физические воздействия в наиболее чувствительных к ним компартментах клеток-мишеней, является актуальной задачей.

**Цель и задачи исследования.** Целью настоящей работы было исследование специфичности и эффективности на уровне клетки и целого организма модульных нанотранспортеров, специфически доставляющих противоопухолевые физические факторы (ФС и эмиттеры электронов Оже) в раковые клетки-мишени и их ядра.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие **практические задачи:**

1. На ряде животных моделей *in vivo* исследовать специфичность накопления и особенности внутриклеточной локализации МНТ в раковых клетках и охарактеризовать эффективность фотодинамического действия ФС, доставляемых МНТ, имеющими своими мишенями различные раковые клетки.
2. Исследовать взаимодействие МНТ с рецепторами-мишенями на поверхности клеток-мишеней, кинетические характеристики внутриклеточного транспорта и эффективность цитотоксического действия эмиттеров электронов Оже, доставляемых МНТ.
3. Исследовать кинетику связывания и внутриклеточного накопления, а также эффективность цитотоксического действия эмиттеров электронов Оже, доставляемых МНТ с дополнительным внутриклеточным уровнем специфичности.

### **Научная новизна и практическая значимость**

Настоящая работа посвящена исследованию специфичности и эффективности на уровне клетки и целого организма МНТ, доставляющих локально действующие противоопухолевые физические факторы в ядра клеток-мишеней.

Результаты, полученные в ходе выполнения данной работы, впервые показали, что адресная направленная доставка таких противоопухолевых локально действующих физических факторов, как эмиттеры электронов Оже, в ядра злокачественных клеток-мишеней с помощью МНТ значительно увеличивает их эффективность. При этом

выявлено, что усиление эффективности действия эмиттера электронов Оже, доставляемого при помощи МНТ, почти на 2 порядка более выражено в случае доставки радионуклида иода-125, испускающего преимущественно электроны Оже с меньшими длинами пробега (и энергией), чем большинство электронов Оже, испускаемых галлием-67. Более того, впервые показано, что цитотоксическому действию доставляемого локально действующего физического фактора можно придать дополнительную специфичность к ядрам раковых клеток, не зависящую от разницы в экспрессии мишенного рецептора между раковыми и нераковыми клетками, используя МНТ с двойным уровнем специфичности. Наконец, обнаружено высокоизбирательное накопление МНТ в опухоли по сравнению с окружающей здоровой тканью и его значительная концентрация в ядрах опухолевых клеток *in vivo*. При этом впервые показано, что опосредованная МНТ адресная доставка приводит к значительному, ранее не достигавшемуся (вплоть до излечения большинства животных) усилению терапевтического эффекта доставляемого МНТ локально действующего физического агента *in vivo*.

Таким образом, полученные в ходе работы результаты показывают перспективность разработанного подхода для терапии онкологических заболеваний, а также пути дальнейшего улучшения имеющихся систем адресной доставки.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были представлены на конференциях: 1) «Химическая биология – Фундаментальные проблемы бионанотехнологии», 10-14 июня 2009 г., Новосибирск, Россия; 2) «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах», 29 июня - 4 июля 2009 г., Москва, Россия; 3) AACR 101st Annual Meeting April 17-20, 2010, USA; 4) Первая международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 17-19 ноября 2010 г., Москва, Россия; 5) International Symposium «Control of Gene Expression», 21-25 июня 2010 г., Москва, Россия; 6) Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011», 11 – 15 апреля 2011 года, Москва, Россия; 7) SNM Annual Meeting June 9-13, 2012; Miami, Florida, USA. 8) IV Съезд биофизиков России, 20-26 августа 2012 г., Нижний Новгород, Россия. Работа была представлена на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2012 г.), а также на семинаре кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 12 печатных работ. Из них 4 статьи в международных и российских рецензируемых журналах и 8 тезисов докладов и материалов конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 145 страницах, включает 12 таблиц и 33 рисунка и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 160 источников.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследованные в работе МНТ представляют собой рекомбинантные белки, включающие в себя последовательности эпидермального фактора роста человека (ЭФР) или  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона ( $\alpha$ МСГ), которые связываются с интернализуемыми клеточными рецепторами, сверхэкспрессия которых характерна для ряда раковых опухолей; транслокационного домена дифтерийного токсина (ДТокс), обеспечивающего выход транспортеров из замкнутых внутриклеточных компартментов; одного из сигналов ядерной локализации – большого Т-антигена вируса SV-40 (СЯЛ) или неизменённого С-концевого фрагмента апоптоина (апоСЯЛ); а также бактериального гемоглобиноподобного белка (НМР), служащего носителем для действующего агента. Были исследованы следующие МНТ: ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ и ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР.

### **ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе были использованы следующие методы: конфокальная лазерная сканирующая микроскопия иммуофлуоресцентно окрашенных срезов тканей, анализ изображений методом линейного разделения спектров, фотодинамическая терапия экспериментальных опухолей лабораторных животных *in vivo*, исследование межмолекулярных взаимодействий методом регистрации поверхностного плазмонного резонанса, анализ взаимодействия МНТ с клетками при помощи радиолигандного анализа с расчетом констант скоростей взаимодействия с клеточными рецепторами при помощи нелинейного оценивания параметров, методы культивирования клеток, рутинные биофизические, биохимические и радиохимические методы.

### **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ**

1. МНТ *in vivo* избирательно накапливается в раковых клетках опухолей и их ядрах
2. Адресная доставка ФС в ядра раковых клеток *in vivo* значительно увеличивает их эффективность

3. Адресная доставка эмиттеров электронов Оже в ядра раковых клеток-мишеней с помощью МНТ значительно увеличивает их эффективность *in vitro*

4. Включение С-концевого домена апоптоина в состав МНТ способствует дальнейшему улучшению специфичности МНТ

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ**

### **Специфичность и эффективность противоопухолевых препаратов, доставляемых МНТ *in vivo***

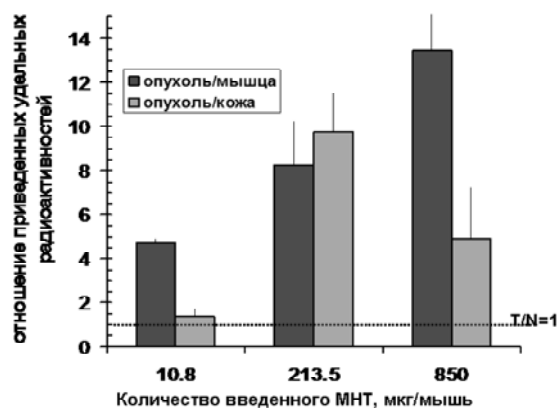
В предыдущих работах с ФС и  $\alpha$ -эмиттерами в качестве доставляемых локально действующих лекарств, было показано значительное (до нескольких тысяч раз) увеличение их эффективности в экспериментах на культурах клеток в результате их присоединения к транспортерам (Gilyazova et al., 2006; Rosenkranz et al., 2008). Однако нерешенными оставались важные вопросы эффективности *in vivo* ФС, доставляемых МНТ.

#### ***Исследование специфичности накопления МНТ *in vivo****

Ранее специфичность фотоцитотоксического действия ФС, доставляемых МНТ, на раковые клетки, экспрессирующие соответствующие рецепторы, а также накопление МНТ в ядрах раковых клеток были показаны *in vitro* (Gilyazova et al., 2006). Однако, на уровне организма препятствий на пути доставляемого агента значительно больше (Sui et al., 2011). Поскольку доставляемый ФС проявляет свое фотоцитотоксическое действие лишь в пределах облучаемого участка, наиболее значимым для ФДТ является специфичность накопления ФС в опухоли по сравнению с ее непосредственным окружением.

Показано избирательное накопление радиоактивно меченного МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ в опухоли по сравнению с окружающими здоровыми тканями уже спустя три часа после его внутривенного введения мышам С57Black/6J с привитой меланомой В16-F1 (Рис. 1).

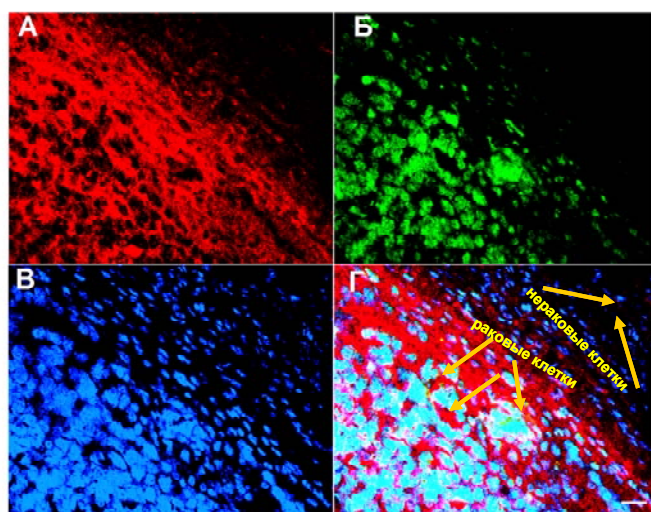




**Рис. 1.** Распределение радиоактивно меченного МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ в меланоме В16-F1 и окружающих тканях спустя 3 часа после внутривенного введения.

Для того чтобы выявлять опухолевые клетки на фоне окружающих неопухолевых, применили клетки меланомы Клаудмана S91, клон М-3 (получены из лаборатории акад. С.А. Лукьянова, ИБХ РАН), трансфицированные зеленым флуоресцентным белом (GFP). Затем эти клетки использовали для создания экспериментальных опухолей у мышей DBA/2. Получали срезы опухоли и окружающих тканей, после чего методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии исследовали внутриклеточную локализацию МНТ, а также специфичность его накопления в опухолевых клетках *in vivo*.

Спустя 3 часа после внутривенного введения МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ отмечено хорошо видимое специфическое накопление МНТ (флуоресценция в канале Alexa 555) в клетках меланомы Клаудмана S91 (флуоресценция в канале GFP) относительно клеток окружающей нормальной ткани (наличие флуоресценции в канале DAPI, выявляющего ядра клеток, и отсутствие флуоресценции в канале GFP) (см. Рис. 2)



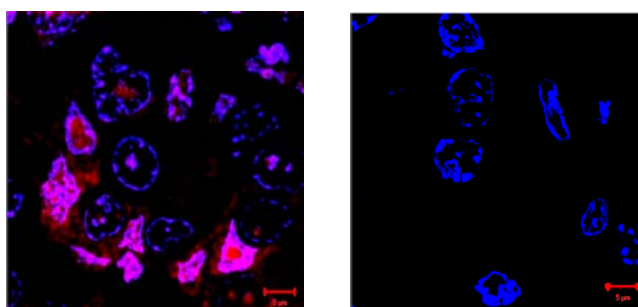
**Рис. 2.** Распределение МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ в меланоме мыши и прилегающей ткани через 3 часа после третьего внутривенного введения: А – оптический срез препарата ткани, результат регистрации непрямои иммунофлуоресценции клеток, окрашенных антителами к МНТ; Б – оптический срез препарата ткани, результат регистрации флуоресценции зеленого

флуоресцентного белка, экспрессирующегося в опухолевой ткани; В – выявление ядер с помощью ДНК-специфичного флуоресцентного красителя DAPI; Г – результат наложения всех трех каналов флуоресценции.

Для того, чтобы охарактеризовать внутриклеточное распределение МНТ *in vivo* были получены изображения срезов тканей с бóльшим увеличением.

Проведенная нами количественная оценка специфичности накопления МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ в опухолевых клетках, а также способности МНТ накапливаться в ядрах этих клеток *in vivo*, показала, что МНТ оказывается практически в 100% клеток меланомы, а из них 84% аккумулируют МНТ в своих ядрах.

Подобные результаты были получены и для МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР на модели эпидермоидной карциномы человека, привитой бестимусным мышам. На рисунке 3 представлены изображения срезов эпидермоидной карциномы человека, полученных спустя 3 часа после внутривенного введения (хлорин  $e_6$ )-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР или контрольного физиологического раствора. Изображения срезов опухолей эпидермоидной карциномы человека обладали высоким уровнем автофлуоресценции в канале регистрации флуоресценции Alexa 555. Для выявления целевого сигнала был проведен анализ спектров флуоресценции срезов ткани в диапазоне 564-704 нм с использованием МЕТА-системы микроскопа. Далее при помощи программного пакета Zeiss LSM 5 Software Version 3.2 была проведена процедура линейного разделения полученных спектров по предварительно снятым по отдельности спектрам автофлуоресценции опухоли и Alexa 555.



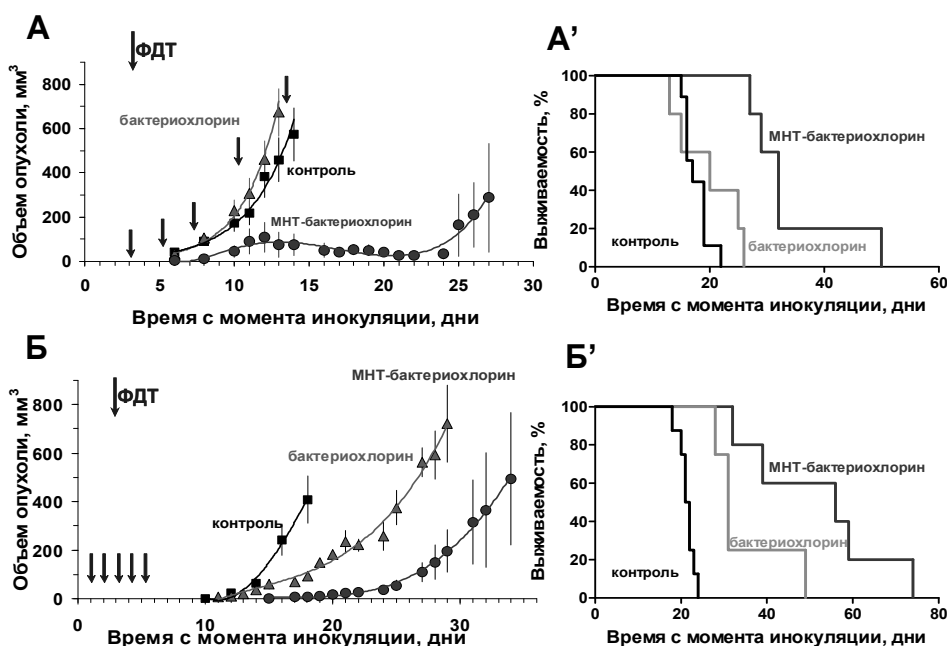
**Рис. 3.** Внутриклеточное распределение МНТ в 2-3-мкм срезах опухолей (объектив 63 $\times$ ), полученных от мышей линии Balb/c VuJco-*nu/nu* с привитой эпидермоидной карциномой человека A431 через 3 часа после внутривенного введения (хлорин  $e_6$ )-ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР (слева) или физиологического раствора (справа). Приведены наложения каналов флуоресцентных изображений ядер (синий) и непрямого иммунофлуоресценции МНТ (красный).

### **Эффективность ФДТ мышинных меланом *in vivo* с применением бактериохлорина $p$ , доставляемого МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ**

Для оценки эффективности локально действующих противоопухолевых физических факторов, доставляемых МНТ, *in vivo* мы выбрали ФС, используемые в ФДТ. Образующиеся при переносе энергии от молекулы ФС, перешедшей под действием света

в возбужденное триплетное состояние, АФК обладают радиусом действия менее 20 нм от места их образования (Соболев и др., 2004), при этом наиболее чувствительным к их поражающему действию является клеточное ядро (Liang et al., 2000). Более того, активируясь только под действием света, ФС являются физическим фактором, действующим лишь в течение определенного времени в строго заданном месте.

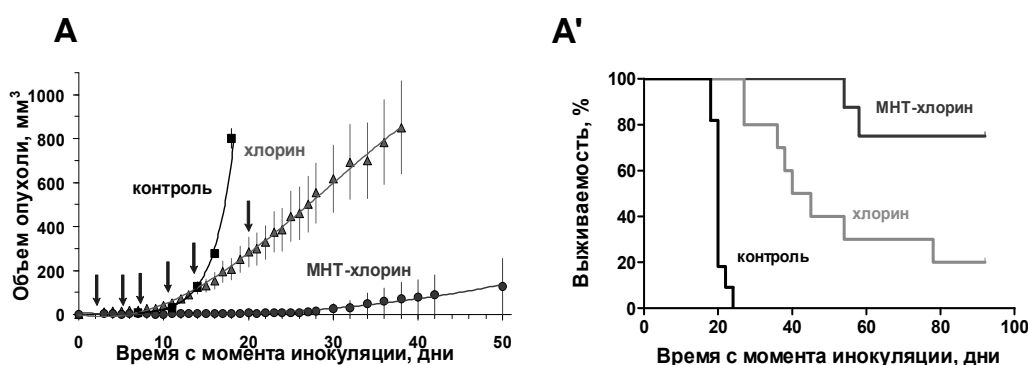
Пигментированные меланомы считаются трудно поддающимися ФДТ из-за того, что обуславливающий их пигментацию меланин сильно поглощает свет, затрудняя его проникновение в более глубокие слои ткани (Lim et al., 2004). Однако, опираясь на значительный эффект МНТ, полученный в опытах с ФС бактериохлорина *p* на клетках меланомы в культуре, а также спектральные особенности этого ФС (максимум поглощения при 761 нм, т.е. в области более глубокого проникновения света в ткани, чем у большинства ФС), мы поставили эксперименты по ФДТ на мышинной меланоме *in vivo*. В результате мы наблюдали значительный эффект ФДТ при использовании ФС, конъюгированного с МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ. Так, на мышинной меланоме В16-F1, при полном отсутствии какого-либо эффекта свободного ФС и в идентичных условиях проведения ФДТ, мы наблюдали как значительное ингибирование (до 89%) роста опухоли, так и достоверное увеличение средней продолжительности жизни животных, леченных ФС, конъюгированным с МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ, относительно группы, леченной свободным ФС и нелеченого контроля (Рис. 4 А, А'). Ещё более выраженное ингибирование роста опухолей и увеличение средней продолжительности жизни мышей, леченных ФС, конъюгированным с МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ, были получены с использованием менее пигментированной меланомы Клаудмана S91 (Рис. 4 Б, Б').



**Рис. 4.** Сравнительная эффективность ФДТ с использованием конъюгата МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ с ФС бактериохлорином  $p$  и свободного ФС. (А)-(А') ФДТ мышей линии C57Black/6J с привитой сингенной меланомой B16-F1; (Б)-(Б') ФДТ мышей линии DBA/2 с привитой сингенной меланомой Клаудмана S91, клон М-3; (А), (Б) кинетики роста опухолей, среднее  $\pm$  ст. ош.; (А'), (Б') динамики продолжительности жизни (кривые выживаемости Каплана-Мейера). Стрелками обозначены дни проведения сеансов ФДТ.

### **Эффективность ФС хлорина $e_6$ , доставляемого МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, на модели эпидермоидной карциномы человека *in vivo***

На два порядка большее количество специфических мест связывания на клетках эпидермоидной карциномы может облегчить селективное связывание МНТ с опухолевыми клетками, необходимое для всех последующих этапов адресного транспорта конъюгированного с МНТ ФС. Так, эффект применения МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР на клетках A431 *in vitro* для доставки ФС был ещё на порядок более выраженным, чем в случае использования конъюгатов ФС с МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ- $\alpha$ МСГ на клетках меланомы (Gilyazova et al., 2006). Более того, проникновение света в ткани карциномы несколько облегчено по сравнению с меланомами за счёт отсутствия пигментации. В соответствии с этим эффективность проводимой ФДТ эпидермоидной карциномы A431, привитой бестимусным мышам линии Balb/c ByJlco-*nu/nu*, с использованием с использованием ФС хлорина  $e_6$ , конъюгированного с МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, оказалась наиболее выраженной, приведя к 75% выживших животных на конец трехмесячного периода наблюдения.



**Рис. 5.** Сравнительная эффективность ФДТ мышей линии Balb/c ByJlco-*nu/nu* с привитой эпидермоидной карциномой человека A431 с использованием конъюгата МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР с ФС хлорином  $e_6$  и свободного ФС. (А) Кинетики роста опухолей, среднее  $\pm$  ст. ош.; (А') динамики продолжительности жизни (кривые выживаемости Каплана-Мейера). Стрелками обозначены дни проведения сеансов ФДТ.

Таким образом, высокоизбирательное накопление МНТ в опухоли по сравнению с окружающей здоровой тканью и его значительная концентрация в ядрах опухолевых клеток, продемонстрированные *in vivo*, привели к значительному (вплоть до 75%

выживаемости на конец срока наблюдения) усилению терапевтического эффекта при адресной доставке локально действующего физического агента *in vivo*.

### **Адресная доставка эмиттеров электронов Оже, с помощью модульного нанотранспортера в ядра раковых клеток *in vitro***

ФС, активируясь только под действием света, являются физическим фактором, действующим лишь в течение определенного времени в строго заданном месте. Подобная локализованность действия, снижает побочные эффекты, и является хорошим решением для лечения опухолей, которые можно тем или иным образом направленно облучить видимым светом. Но это преимущество оборачивается недостатком в случае локализации опухоли в недоступных для облучения светом местах организма, а также при необходимости удаления множественных метастазов и микрометастазов, диссеминированных по организму и имеющих заранее неизвестную локализацию. Поэтому возникает необходимость использования иных противораковых агентов.

В последнее время всё больший интерес проявляется к таким перспективным противораковым физическим факторам, как эмиттеры электронов Оже.

Электроны Оже обладают высокой линейной передачей энергии – 4-26 кэВ/мкм, наряду с чрезвычайно малой длиной пробега в тканях, сравнимой с размерами клеточных компартментов. В отличие от ФС, электроны Оже не требуют облучения видимым светом для своей активации, а потому не накладывают ограничений ни на глубину залегания опухолей, ни на степень диссеминированности раковых клеток по организму. Таким образом, благодаря своим физическим свойствам, эмиттеры электронов Оже представляются очень перспективными для уничтожения отдельных раковых клеток или их небольших скоплений, что может быть использовано, однако, только при условии их доставки в ядра клеток-мишеней (Cornelissen and Vallis, 2010).

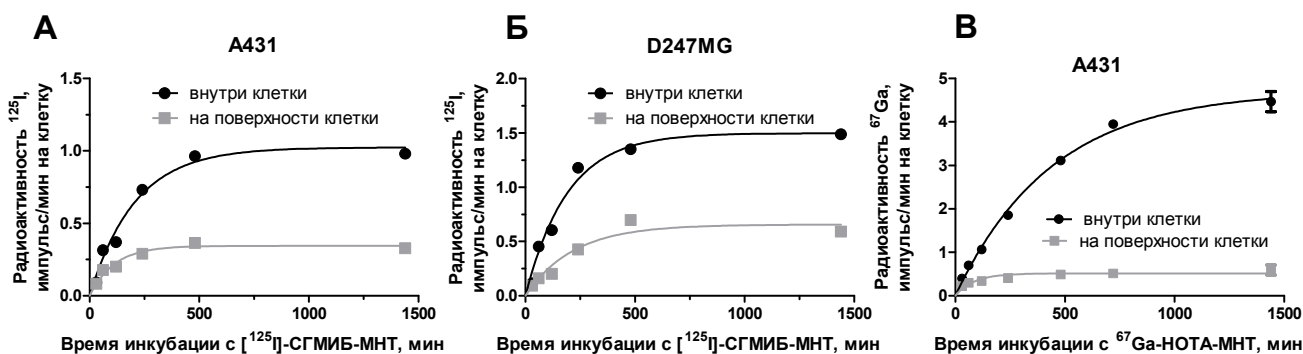
Однако сами по себе радионуклиды, испускающие электроны Оже, не обладают ни клеточной специфичностью, ни способностью накапливаться в наиболее уязвимом клеточном компартменте. Специфичность и эффективность адресной доставки ФС при помощи МНТ, позволяет предполагать перспективность используемого подхода и для обеспечения высокоспецифической внутриклеточной доставки эмиттеров электронов Оже в ядра раковых клеток.

Для присоединения к МНТ были выбраны: 1)  $^{125}\text{I}$  – наиболее изученный и доступный эмиттер электронов Оже, а также 2)  $^{67}\text{Ga}$ , излучающий электроны Оже с большей энергией, а следовательно – большим пробегом в тканях, и обладающий совершенно иными химическими свойствами, а значит, требующий абсолютно иного подхода к способу присоединения.

Мечение иодом проводилось при помощи N-сукцинимидил-4-гуанидинометил-3- $[^{125}\text{I}]$ иодбензоата ( $[^{125}\text{I}]$ СГМИБ), дающего меченый продукт, более устойчивый к деиодированию *in vivo* и значительно лучше удерживающийся в клетке, чем белок, иодированный традиционными методами (Vaidyanathan and Zalutsky, 2007). Для присоединения галлия был выбран хелатирующий агент на основе 1,4,7-триазоциклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (НОТА), образующий чрезвычайно стабильный комплекс с галлием ( $\log K_{\text{уст}} = 31$ ) (Veliky et al., 2008).

**Исследование связывания с поверхностью и внутриклеточного накопления  $[^{67}\text{Ga}]$ НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) и  $[^{125}\text{I}]$ СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) в раковых клетках**

Полученные МНТ, меченные эмиттерами электронов Оже, связывались поверхностью клеток эпидермоидной карциномы человека А431 и глиобластомы человека D247 MG, сверхэкспрессирующими рецепторы ЭФР, и эффективно интернализировались (см. Рис. 6).



**Рис. 6.** Кинетики связывания с поверхностью и внутриклеточного накопления и  $[^{125}\text{I}]$ СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 (А) и глиомы человека D247 MG (Б) и  $[^{67}\text{Ga}]$ НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 (В).

Полученные кривые кинетики связывания на поверхности и поглощения радиоактивной метки клетками А431 и D247 MG (см. Рис. 6) хорошо аппроксимировались ( $R^2=0,90-0,99$ ) при помощи экспоненциальной функции:

$$y = y_{\text{max}} \cdot (1 - e^{-kt}),$$

где:  $y$  – радиоактивность, накопленная внутри клеток;  $t$  – время инкубации клеток после добавления радиоактивной метки в среду;  $y_{\text{max}}$  – «максимальная» радиоактивность, накопленная внутри/на поверхности клеток – асимптота, к которой стремится внутриклеточное накопление/связывание с поверхностью метки при временах инкубации, стремящихся к бесконечности;  $k$  – скорость внутриклеточного накопления/связывания с поверхностью клетки.

Параметры  $u_{\max}$  и  $k$  для были рассчитаны с помощью программы GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad, San Diego, CA). Значения рассчитанных на основе экспериментальных кривых параметров приведены в Таблицах 1 и 2.

**Таблица 1.** Параметры кинетики внутриклеточного накопления и связывания на поверхности клеток A431 и D247MG [ $^{125}\text{I}$ ]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)

A431		
параметр	внутриклеточное накопление	связывание на поверхности
$u_{\max}$ , импульс/мин на клетку	1,024±0,035*	0,345±0,013
$k$ , мин <sup>-1</sup>	0,0048±0,0004	0,0089±0,0010
D247MG		
параметр	внутриклеточное накопление	связывание на поверхности
$u_{\max}$ , импульс/мин на клетку	1,499±0,042	0,656±0,039
$k$ , мин <sup>-1</sup>	0,0052±0,0004	0,0046±0,0007

\* Даны средние значения ± стандартная ошибка (n = 3)

**Таблица 2.** Параметры кинетики внутриклеточного накопления и связывания на поверхности клеток A431 [ $^{67}\text{Ga}$ ]НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)

A431		
параметр	внутриклеточное накопление	связывание на поверхности
$u_{\max}$ , импульс/мин на клетку	4,716±0,128*	0,512±0,028
$k$ , мин <sup>-1</sup>	0,0023±0,0001	0,0118±0,0025

\* Даны средние значения ± стандартная ошибка (n = 3)

### **Исследование кинетики удержания в раковых клетках эмиттеров электронов Оже, доставляемых МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР**

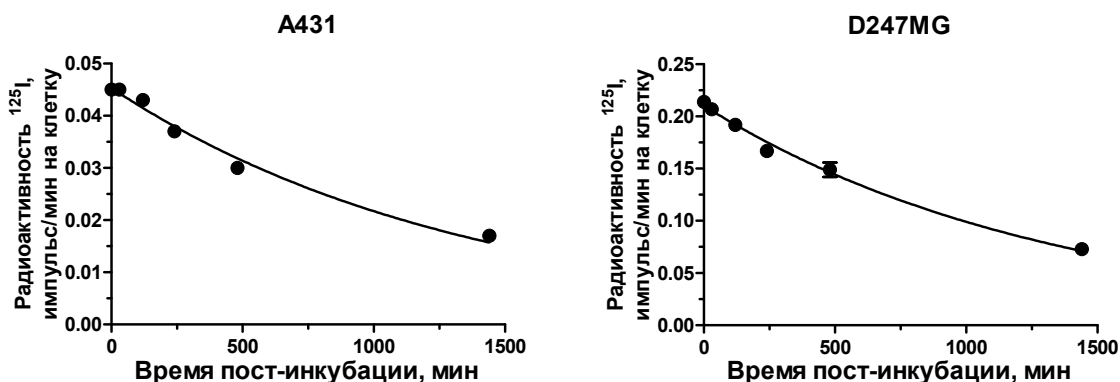
Эксперименты были проведены на клетках эпидермоидной карциномы человека A431 и клетках глиобластомы человека D247 MG. Кинетики удержания [ $^{125}\text{I}$ ]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) в клетках были исследованы трипсина на протяжении 24 часов в свежей среде после суточной инкубации, последующей отмывки клеток и снятия с поверхности клеток радиоактивности 0,05% (для D247 MG) или 0,25% (для A431) раствором.

Кинетики удержания радиоактивной метки клетками A431 и D247 MG (см. Рис. 7) хорошо аппроксимировались ( $R^2=0,97$ ) при помощи экспоненциальной функции:

$$y = u_{\max} \cdot e^{-kt},$$

где  $y$  – удержанная радиоактивность внутри клеток на данный момент времени;  $t$  – время инкубации клеток после отмывки от радиоактивной метки;  $u_{\max}$  – удержанная радиоактивность внутри клеток на момент начала инкубации после отмывки;  $k$  –

параметр, характеризующий скорость выхода кривой внутриклеточного удержания к нулевому значению.



**Рис. 7.** Кинетики удержания радиоактивности в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 и глиомы человека D247 MG после инкубации с [<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)

Параметры  $u_{\max}$  и  $k$  для были рассчитаны с помощью программы GraphPad Prism Version 5.01 (GraphPad, San Diego, CA). Значения рассчитанных на основе экспериментальных кривых параметров приведены в Таблице 3.

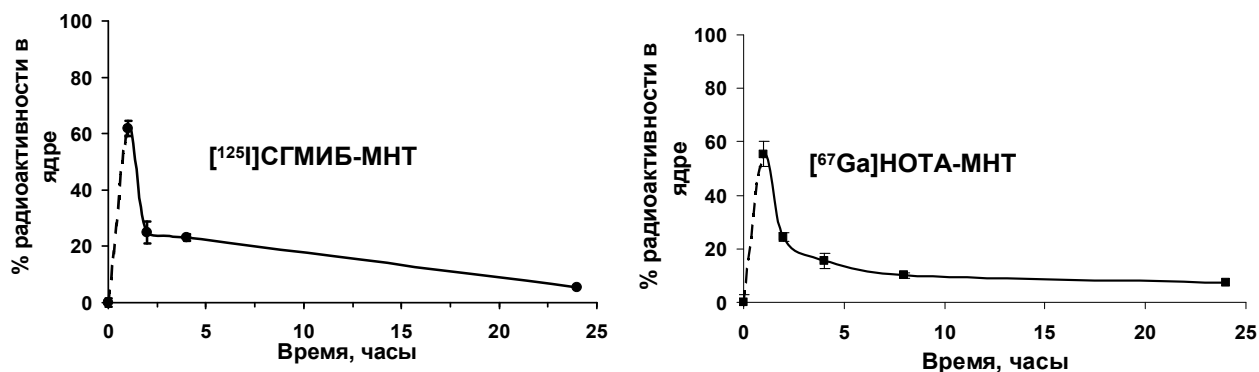
**Таблица 3.** Параметры кинетики внутриклеточного удержания радиоактивности в клетках A431 и D247 MG после инкубации с [<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)

параметр	A431	D247 MG
	значение±ст. ош.	значение±ст. ош.
$u_{\max}$ , импульс/мин на клетку	0,045±0,001	0,210±0,003
$k$ , мин <sup>-1</sup>	0,0007±0,0001	0,0007±0,00001

**Исследование кинетики накопления эмиттеров электронов Оже, доставляемых МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР в ядрах раковых клетках**

Кинетика ядерного накопления [<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) и [<sup>67</sup>Ga]НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) была исследована на протяжении 24 часов инкубации клеток с меченым МНТ (см. Рис. 8). Метка накапливалась в ядрах клеток быстро, уже спустя 1 час инкубации от 55,5 ± 3,0% ([<sup>67</sup>Ga]НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)) до 61,9 ± 1,5% ([<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)) суммарной внутриклеточной радиоактивности было зарегистрировано в ядрах. Далее содержание метки в ядрах падало, оставаясь, однако, на уровне от 7,3 ± 1,0% ([<sup>67</sup>Ga]НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)) до 8,1 ± 1,9% ([<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)) от накопленной внутриклеточной активности спустя 24 часа инкубации.

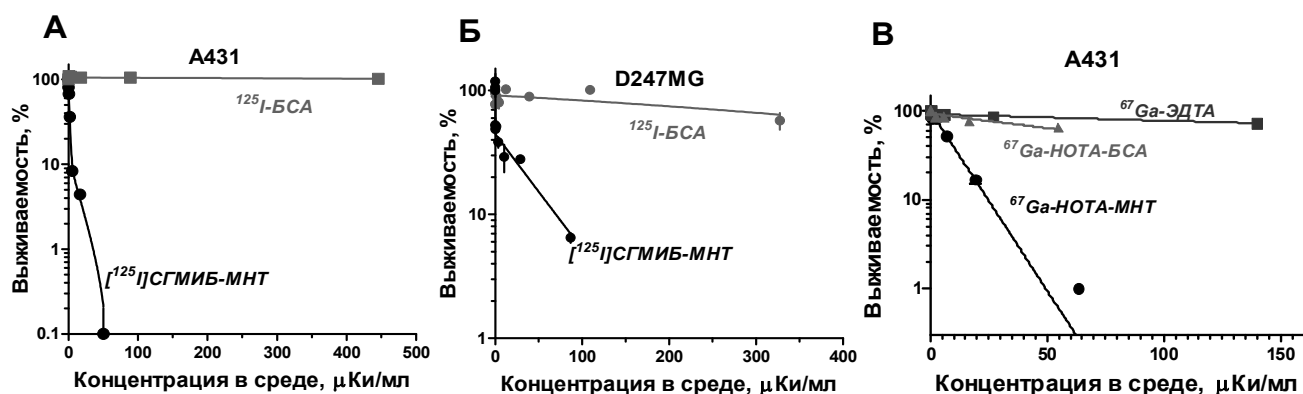




**Рис. 8.** Кинетика ядерного накопления [<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) и [<sup>67</sup>Ga]НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) в клетках эпидермоидной карциномы человека А431.

**Исследование эффективности цитотоксического действия эмиттеров электронов Оже, доставляемых МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР, на раковые клетки в культуре**

По результатам проведенного исследования цитотоксического действия МНТ с присоединенным эмиттером электронов Оже на двух различных линиях раковых клеток в культуре (см. Рис. 9 А, Б), показано, что эффективность цитотоксического действия [<sup>125</sup>I]СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) усиливается до 3950 раз по сравнению с неспецифическим и не накапливающимся в клетках и, соответственно, ядрах, контролем, в качестве которого был использован <sup>125</sup>I-БСА. В случае доставки <sup>67</sup>Ga эффективность цитотоксического действия [<sup>67</sup>Ga]НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР) увеличивается в несколько десятков раз по сравнению с двумя различными неспецифическими контролями (см. Рис. 9 В).



**Рис. 9.** Эффективность цитотоксического действия эмиттера электронов Оже иода-125 (А и Б) и галлия-67 (В), доставляемого МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР (черный) и контрольным БСА или ЭДТА (серый) на клетки эпидермоидной карциномы человека А431 (А и В) и клетки глиобластомы человека D247 MG (Б). На графике приведены репрезентативные кривые из трех (для А431) и двух (для D247 MG) отдельных экспериментов: среднее ± ст. ош. данного эксперимента. Каждый отдельный эксперимент выполнен в трех повторах.

Поскольку эмиттеры электронов Оже практически неэффективны вне клетки (а многие считаются малоэффективными и вне клеточного ядра) (Cornelissen and Vallis, 2010), эффективность их действия часто оценивают величиной  $N_{37}$  – количеством распадов, пришедшихся на клетку/ядро, необходимых для снижения выживаемости клеток до 37%.

Для проведения подобной оценки на основе полученных кривых кинетики накопления и вымывания радиоактивности из клеток было рассчитано общее число распадов, пришедшихся на одну клетку, в соответствии с уравнением:

$$\text{распадов в клетке} = \frac{1}{a} \left( \int_{0 \text{ мин}}^{1440 \text{ мин}} A_1(t) dt + \int_{1440 \text{ мин}}^{+\infty} A_2(t) dt \right)$$

где  $A_1(t)$  и  $A_2(t)$  – накопление и вымывание, соответственно,  $[^{125}\text{I}]\text{СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$  или  $[^{67}\text{Ga}]\text{НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$ , импульс/мин,  $a$  – эффективность счёта

Общее количество распадов, пришедшихся на одно ядро, рассчитывалось следующим образом:

1) Площадь под кривой, отражающая количество распадов, накопленных в ядре за период инкубации с известной концентрацией  $[^{125}\text{I}]\text{СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$  или  $[^{67}\text{Ga}]\text{НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$ , была рассчитана, исходя из кинетики ядерного накопления радиоактивности.

2) Было принято предположение о том, что процент внутриклеточных распадов, пришедшихся на ядро, постоянен во всем диапазоне концентраций, использованных для исследования цитотоксичности.

Тогда:

$$\text{распадов в ядре} = x_{0-24ч} \cdot \int_{0 \text{ мин}}^{1440 \text{ мин}} \frac{1}{a} A_1(t) dt + x_{24ч} \cdot \int_{1440 \text{ мин}}^{+\infty} \frac{1}{a} A_2(t) dt$$

$x_{0-24ч} = \frac{\text{распадов в ядре}}{\text{распадов в клетке}}$ , доля распадов, пришедшихся на ядро за 24 часа инкубации

$x_{24ч} = \frac{\text{распадов в ядре}}{\text{распадов в клетке}}$ , доля распадов, пришедшихся на ядро на момент окончания 24-часовой инкубации.

Эффективности цитотоксического действия  $[^{125}\text{I}]\text{СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$  и  $[^{67}\text{Ga}]\text{НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$ , выраженные в распадах на клетку/ядро, представлены в Таблице 4.

**Таблица 4.** Значения  $N_{37}$  для цитотоксического действия эмиттеров электронов Оже иода-125 и галлия-67, доставляемых МНТ ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР.

$N_{37}$	$[^{125}\text{I}]\text{СГМИБ-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$		$[^{67}\text{Ga}]\text{НОТА-(ДТокс-НМР-СЯЛ-ЭФР)}$
	клетки А431 среднее значение $\pm$ ст. ош.	клетки D247 MG среднее значение $\pm$ ст. ош.	клетки А431 среднее значение $\pm$ ст. ош.
распадов на клетку	3001 $\pm$ 624	3819 $\pm$ 878	28600 $\pm$ 9300
распадов на ядро	317 $\pm$ 66	нет данных	9700 $\pm$ 3100

Таким образом, для летального поражения 63% клеток достаточно, чтобы внутри них произошло около 3 тысяч распадов иода-125 или 30 тысяч распадов галлия-67; если эти изотопы попадают в ядро, то достаточно на порядок (для иода-125) или в 3 раза (для галлия-67) меньшей радиоактивности для достижения такого же эффекта. В то же время, если эти изотопы находятся вне клеток, пусть даже в непосредственной близости, эта же степень поражения достигается при активностях на 2-3 порядка бóльших для иода-125 или в десятки раз больших для галлия-67.

### **МНТ с дополнительным уровнем специфичности**

Описанные ранее МНТ придают доставляемому терапевтическому агенту специфичность только на уровне лиганда. Однако, и рецепторы  $\alpha$ -МСГ, и рецепторы ЭФР экспрессируются не только на соответствующих раковых, но и (в значительно меньшем количестве) на ряде нормальных клеток. Следовательно – особенно при системном введении, транспортер будет оказываться и в каком-то количестве ядер нормальных клеток. Поэтому для придания МНТ дополнительного – внутриклеточного – уровня специфичности по отношению к раковым клеткам (особенно значимого в случае незначительных различий в экспрессии поверхностных рецепторов у раковых и нормальных клеток) входящий в состав МНТ сигнал ядерной локализации был заменен в лаборатории Дэвида Янса (Университет Монаша, Австралия) на С-концевой (74-121) домен апоптина. Апоптин – белок вируса анемии цыплят, обладающий способностью селективно накапливаться в ядрах раковых, но не нормальных клеток (Poou et al., 2005), а также неспецифически связываться с ДНК (Leliveld et al., 2003), что является крайне желательным для доставки таких локально действующих физических факторов, как эмиттеры электронов Оже (Kassis, 2008). В лаборатории Дэвида Янса было показано увеличенное накопление МНТ с С-концевым доменом апоптина в ядрах раковых клеток Saos-2 по сравнению с изогенными им «нормальными» клетками.

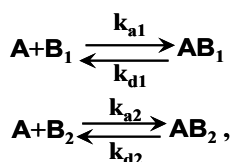
### **Кинетические характеристики связывания МНТ ДТокс-НМР-аноСЯЛ-ЭФР с ДНК**

Мы попытались выяснить, сохраняет ли использованный нами фрагмент апоптина в составе МНТ свою способность связываться с ДНК. Данная характеристика, как уже

упоминалось, является весьма важной для доставляемых ФС и, особенно, для эмиттеров электронов Оже.

Исследование связывания МНТ с ДНК проводили методом регистрации поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием высокочувствительной полуавтоматической микрожидкостной системы для изучения и анализа взаимодействия молекул Viacore X («Viacore», Швеция).

Для аппроксимации экспериментальных данных по изменению сигнала ППР в результате взаимодействия МНТ с ДНК теоретическими кривыми нами была выбрана модель взаимодействия молекулы с двумя местами связывания, которая позволяет учитывать неспецифическое взаимодействие молекул исследуемого МНТ с немодифицированной матрицей:

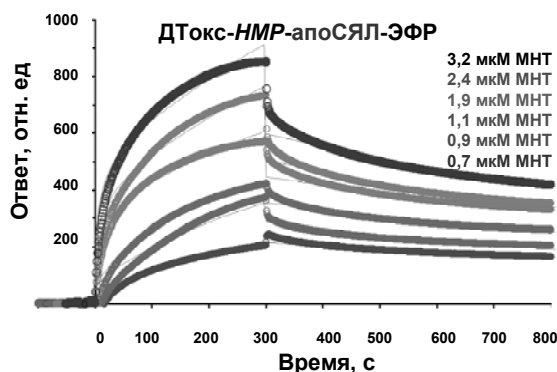


$$\begin{aligned}
 dB_1/dt &= -(k_{a1} \cdot A \cdot B_1 - k_{d1} \cdot A \cdot B_1) \\
 dB_2/dt &= -(k_{a2} \cdot A \cdot B_2 - k_{d2} \cdot A \cdot B_2) \\
 dAB_1/dt &= (k_{a1} \cdot A \cdot B_1 - k_{d1} \cdot A \cdot B_1) \\
 dAB_2/dt &= (k_{a2} \cdot A \cdot B_2 - k_{d2} \cdot A \cdot B_2) \\
 RU &= A \cdot B_1 + A \cdot B_2 + RI
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 B_1[0] &= R_{Max1} \\
 B_2[0] &= R_{Max2} \\
 AB_1[0] &= 0 \\
 AB_2[0] &= 0
 \end{aligned}$$

A – молекулы МНТ  
 B<sub>1</sub> – сайты связывания МНТ непосредственно на материале матрицы (без ДНК)  
 B<sub>2</sub> – ДНК, иммобилизованная на поверхности матрицы  
 AB<sub>1</sub> – образовавшийся комплекс МНТ-матрица  
 AB<sub>2</sub> – комплекс МНТ-ДНК  
 k<sub>a1</sub> и k<sub>d1</sub> – константы скоростей образования и диссоциации комплекса AB<sub>1</sub>,  
 и k<sub>a2</sub> – константы скоростей образования и диссоциации комплекса AB<sub>2</sub>  
 R<sub>Max1</sub>, R<sub>Max2</sub> – максимально возможное связывание МНТ с матрицей и с ДНК, соответственно,  
 RI – вклад изменения коэффициента преломления при смене раствора, в котором вводят образец, в резонансный ответ  
 RU – суммарный резонансный ответ

Кинетические кривые взаимодействия ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР с ДНК и результат аппроксимации кривых двухстадийной моделью приведены на Рис. 10.



**Рис. 10.** Взаимодействие иммобилизованной на матрице ДНК с возрастающими концентрациями МНТ ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР. Экспериментальные данные, использованные в расчетах, обозначены серыми символами, результат аппроксимации – сплошной черной линией.

Оценка констант скоростей прямых и обратных реакций взаимодействия МНТ с матрицей ( $k_{a1}$ ,  $k_{d1}$ ), и с иммобилизованной на матрице ДНК ( $k_{a2}$  и  $k_{d2}$ ), приведена в Таблице 5.

**Таблица 5.** Оценка кинетических характеристик взаимодействия МНТ с ДНК, иммобилизованной на поверхности матрицы, по модели взаимодействия молекулы с двумя местами связывания с помощью программы BIAevaluation 4.1 («BIAcore»). Приведены результаты типичного эксперимента.

МНТ	$k_{a1}$ , $M^{-1} \cdot c^{-1}$	$k_{d1}$ , $c^{-1}$	$k_{a2}$ , $M^{-1} \cdot c^{-1}$	$k_{d2}$ , $c^{-1}$
ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР	$1,75 \cdot 10^4$	$3,48 \cdot 10^{-5}$	148	$1,07 \cdot 10^{-3}$

Рассчитанные на основе выбранной модели константы диссоциации МНТ с ДНК, равные  $(4,4 \pm 1,4) \cdot 10^{-6}$  М ( $n=3$ ) для ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР в сравнении с известной из литературы  $K_{дисс}=(4,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-7}$  М (Leliveld et al., 2004), характеризующей сродство чуть более длинного С-концевого участка апоптина (66-121) к ДНК, позволяют предположить сохранение модулем апоСЯЛ в составе МНТ его ДНК-связывающих свойств.

### **Исследование эффективности цитотоксического действия эмиттеров электронов Оже, доставляемых МНТ ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР**

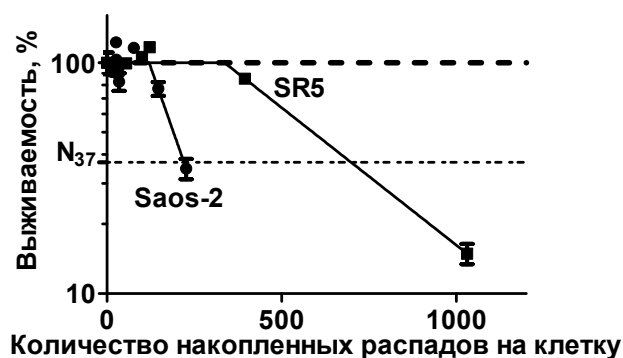
Для проведения экспериментов по исследованию специфичности цитотоксического действия на раковые клетки противоопухолевых локально действующих физических факторов, доставляемых ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР, были выбраны клетки остеосаркомы человека Saos-2, а в качестве контроля – изогенная им пару не образующих опухолей клеток SR5, полученных путём трансфекции Saos-2 геном ретинобластомного белка (Wagstaff and Jans, 2009).

На основе предварительно полученных кривых кинетики накопления радиоактивности в исследуемых клетках, для каждой из клеточных линий было рассчитано общее число распадов, пришедшихся на одну клетку, в соответствии с уравнением:

$$\text{распадов на клетку} = \frac{1}{a} \int_{0 \text{ мин}}^{1440 \text{ мин}} A(t) dt$$

$A(t)$  - функция кинетики накопления [ $^{125}\text{I}$ ]СГМИБ-(ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР) в соответствующей клеточной линии,  $a$  – эффективность счёта

Значения  $N_{37}$  для [ $^{125}\text{I}$ ]СГМИБ-(ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР) для раковых клеток Saos-2 составили 221 распад на клетку, в то время как для изогенных им нераковых клеток  $N_{37}$  оказалось равным 701 распадам на клетку (см. Рис. 11), таким образом эффективность МНТ с С-концевым доменом апоптина для раковых клеток оказалась более чем в три раза выше, чем для изогенных им нераковых.



**Рис. 11.** Эффективность цитотоксического действия эмиттера электронов Оже иода-125, доставляемого МНТ ДТокс-НМР-апоСЯЛ-ЭФР, на клетки остеосаркомы человека Saos-2 (кружки) и изогенные им клетки SR5 (квадраты). На графике приведены кривые отдельных экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка данного эксперимента. Каждый эксперимент выполнен в трех повторах.

Полученные результаты свидетельствуют, что включение С-концевого домена апоптоина в состав МНТ делает доставку локально действующих физических факторов специфичной на внутриклеточном уровне: МНТ приобретают дополнительную избирательность в отношении раковых клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных данных указывает на перспективность разрабатываемого подхода и целесообразность дальнейшего улучшения продемонстрированных в работе опухолевой специфичности и высокой эффективности модульных нанотранспортеров для доставки локально действующих физических агентов.

## ВЫВОДЫ:

- 1) Обнаружено *in vivo* избирательное накопление МНТ с различными лигандными модулями в раковых клетках опухоли и продемонстрирована локализация МНТ в их ядрах.
- 2) Адресная доставка фотосенсибилизаторов с помощью МНТ в ядра раковых клеток *in vivo* приводит к значительному усилению терапевтического эффекта, вплоть до излечения большинства животных-опухоленосителей.
- 3) Впервые показано, что присоединение эмиттера электронов Оже к МНТ увеличивает его цитотоксичность на раковых клетках почти в 4000 раз.
- 4) Показано возможное направление дальнейшего улучшения специфичности и эффективности МНТ путем включения в его состав С-концевого домена апоптоина, способного накапливаться преимущественно в раковых клетках:

- а) методом поверхностного плазмонного резонанса показано, что С-концевой (74-121) домен апоптоина в составе МНТ сохраняет способность к связыванию с ДНК
- б) впервые показано, что фотосенсибилизаторы и эмиттеры электронов Оже, доставляемые МНТ с С-концевым доменом апоптоина, поражают в большей мере раковые клетки Saos-2, чем сингенные «нормальные» клетки.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах:

1. **Slastnikova T.A.**, Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Schiffelers R.M., Lupanova T.N., Khramtsov Y.V., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Modular nanotransporters: a multi-purpose *in vivo* working platform for targeted drug delivery//Int. J. Nanomed. – 2012. – V.7. – P.467-482.
2. Durymanov M.O., Beletkaia E.A., Ulasov A.V., Khramtsov Y.V., Trusov G.A., Rodichenko N.S., **Slastnikova T.A.**, Vinogradova T.V., Uspenskaya N.Y., Kopantsev E.P., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Subcellular trafficking and transfection efficacy of polyethylenimine-polyethylene glycol polyplex nanoparticles with a ligand to melanocortin receptor-1//J. Control. Release – 2012. – V.163(2). – P.211-219.
3. **Сластникова Т.А.**, Розенкранц А.А., Лупанова Т.Н., Гулак П.В., Гнучев Н.В., Соболев А.С. Исследование эффективности модульного транспортера для адресной доставки фотосенсибилизаторов в ядра клеток меланомы *in vivo*//Докл. Акад. Наук РФ – 2012. – Т.446(3). – С.342-344.
4. **Slastnikova T.A.**, Koumariou E.K., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Lupanova T.N., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. Modular Nanotransporters: A Versatile Approach for Enhancing Nuclear Delivery and Cytotoxicity of Auger Electron Emitting <sup>125</sup>I//EJNMMI Research. – 2012. – V.2:59.

### Тезисы конференций:

1. **Сластникова Т.А.**, Розенкранц А.А., Гулак П.В., Скиффелерс Р.М., Соболев А.С. Модульный нанотранспортер для адресной доставки в ядра клеток-мишеней увеличивает эффективность действия фотосенсибилизаторов *in vivo*. Сборник трудов научной конференции «Химическая биология – Фундаментальные проблемы бионанотехнологии», 10-14 июня 2009, Новосибирск. стр.124.
2. **Сластникова Т.А.**, Шевкун Н.А., Розенкранц А.А., Гулак П.В., Скиффелерс Р.М., Соболев А.С. Оценка эффективности модульных нанотранспортеров для адресной доставки лекарств в ядра клеток-мишеней *in vivo*. Стендовый доклад. 1-ая Международная научная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах», 29 июня – 4 июля 2009, стр. 142.
3. Sobolev A.S., **Slastnikova T.A.**, Rosenkranz A.A., Schiffelers R.M., Zalutsky M.R. Modular nanotransporters – a chimeric multi-functional platform for drug delivery *in vivo*. AACR 101st Annual Meeting 2010 April 17-20, 2010.
4. **Slastnikova T.A.**, Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lupanova T.N., Schiffelers R.M., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Efficient therapy of experimental tumors with the use of modular nanotransporters delivering photosensitizers into the nuclei of target cells. In: Proc. Internat. Symp. “Control of gene expression and cancer” June 21-25, 2010, Moscow, Russia.
5. **Сластникова Т.А.**, Лупанова Т.Н., Розенкранц А.А., Соболев А.С. Модульные нанотранспортеры – новая многоцелевая платформа для доставки лекарств *in vivo*. Материалы I Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине, 17-19 ноября 2010 г., Москва.
6. Лупанова Т.Н., **Сластникова Т.А.** Исследование сохранности свойств модульного нанотранспортера для адресной внутриклеточной доставки лекарств. XVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011». Москва. 11 – 15 апреля 2011 года. Секция "Биология", стр. 25.
7. Koumariou E., **Slastnikova T.A.**, Pruszynski M., Zhao X., Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Sobolev A.S., Zalutsky M.R. Modular nanotransporters: A flexible platform forward for targeted Auger electron therapy. SNM Annual Meeting, held at the Miami Beach Convention Center, Miami, Florida, June 9-13, 2012. J Nucl Med. 2012; 53 (Supplement 1):1697
8. **Сластникова Т.А.**, Розенкранц А.А., Кумариану Е., Залутски М.Р., Соболев А.С. Использование модульных нанотранспортеров для эффективной направленной доставки эмиттеров электронов Оже в ядра клеток-мишеней. Съезд биофизиков России. Симпозиум III «Физика - медицине и экологии». Материалы докладов. – Нижний Новгород, 2012, стр. 210.