



**ПОЛИТЕХ**  
Санкт-Петербургский  
политехнический университет  
Петра Великого

На правах рукописи

*Тимин*

**ТИМИН**

**Александр Сергеевич**

**Новый класс невирусных средств доставки на основе нано- и микрочастиц комплексного состава для диагностики и терапии злокачественных новообразований**

1.5.2. Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

**Научный консультант:**

**Власова Ольга Леонардовна**, доцент, доктор физико-математических наук

**Официальные оппоненты:**

**Маслов Михаил Александрович**, доктор химических наук, доцент, директор института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет»

**Тенникова Татьяна Борисовна**, доктор химических наук, профессор, заведующая межкафедральной лабораторией биомедицинской химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Торопова Яна Геннадьевна**, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе института экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской Академии наук, г. Санкт-Петербург

Защита состоится « **5** » **декабря 2024** г. в 14:30 на заседании диссертационного совета **У.1.5.2.22** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (ФГАОУ ВО СПбПУ) (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/independent-award-academic-degrees/defences-calendar/> ФГАОУ ВО СПбПУ.

Автореферат разослан: « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Эффективность многих биологически активных веществ (БАВ) ограничена низкой биологической и фармакологической активностью. В связи с этим для достижения терапевтического эффекта необходимо обеспечить создание их высоких локальных концентраций непосредственно в зоне поражения, что может вызвать серьезные побочные действия, связанные с системной токсичностью. Решить данную проблему можно с помощью использования систем адресной доставки БАВ, способных осуществить транспорт биомолекул непосредственно в необходимую область интереса с последующим их высвобождением. Это позволяет существенно повысить эффективность имеющихся БАВ при общем снижении дозы вводимого препарата. Особенно это актуально в случае стандартных схем терапии злокачественных новообразований (ЗНО) с возможными негативными последствиями.

На данный момент вирусные векторы являются одной из самых распространённых систем доставки генетического материала в клетку. Однако основные недостатки вирусных систем, связанные с иммуногенностью и цитотоксичностью, сильно ограничивают их использование для доставки БАВ. Особенно это актуально для безопасной и эффективной внутриклеточной доставки различных противоопухолевых препаратов, инструментов РНК-интерференции и редактирования генома (CRISPR-Cas9). Использование невирусных транспортных систем является альтернативой для преодоления основных недостатков вирусных аналогов. Основной задачей таких транспортных систем является обеспечение направленной доставки БАВ непосредственно в область интереса (опухолевого очага) или в определённый тип клеток. Невирусные системы доставки на основе нано- и микрочастиц комплексного состава позволяют изолировать БАВ от внешних биологических факторов, доставлять их к месту назначения и обеспечивать контролируемое их высвобождение в область интереса. Разработка невирусных систем нового поколения и их биологическое применение с целью доставки БАВ к месту назначения и обеспечения его высвобождения является комплексной задачей, требующей значительных фундаментальных и прикладных исследований на стыке биологии, физики, химии и клинической медицины. Основная сложность в первую очередь связана с выявлением закономерностей влияния физико-химических свойств невирусных систем на их взаимодействие с живыми системами на клеточном и организменном уровне. Установление данных закономерностей делает возможным осуществление направленной доставки БАВ за счет выбора необходимого типа невирусного носителя с оптимальными параметрами биораспределения, клеточного захвата, биodeградации и высвобождения БАВ. Таким образом, получение нового класса невирусных транспортных систем для доставки и высвобождения БАВ с целью диагностики и терапии ЗНО является крайне актуальной и своевременной задачей.

**Степень разработанности темы.** Разработкой и апробацией невирусных транспортных систем БАВ на основе нано- и микроносителей комплексного состава занимаются достаточно много российских и, особенно, международных научных групп, а также фармацевтических компаний. Вместе с тем, несмотря на большое количество исследований в данном направлении, до сих пор не существует систем доставки БАВ, отвечающих большинству из следующих критериев: 1) простая технология синтеза, совместимая с упаковкой БАВ, включая ДНК, мРНК и/или белки, а также низкомолекулярные лекарственные препараты; 2) высокая биосовместимость; 3) адресный транспорт БАВ *in vitro* и *in vivo*; 4) способность к эффективному высвобождению БАВ вовнутрь клеток и в межклеточное пространство; 5) предотвращение деградации БАВ эндосомальными и/или внутриклеточными нуклеазами и протеазами. Объём имеющейся информации и научных данных по исследованию механизмов доставки и высвобождения БАВ с использованием различных типов невирусных систем до настоящего времени не систематизирован. В Российской Федерации имеются диссертационные работы, посвященные дизайну различных невирусных систем доставки БАВ и их применению для терапии ЗНО. Однако, среди них отсутствуют систематизированные исследования, посвященные оценке влияния физико-химических свойств различных невирусных транспортных систем на процессы доставки и высвобождения БАВ для диагностики и терапии ЗНО.

В настоящем исследовании были разработаны новые и развиты существующие подходы к дизайну и функционализации нового класса невирусных транспортных систем на основе нано- и микроразмерных носителей комплексного состава для контролируемой доставки БАВ, разработаны методики инкапсуляции БАВ и исследованы процессы высвобождения БАВ под воздействием различных физических и химических стимулов в биологических средах, исследованы механизмы взаимодействия нано- и микроносителей с эукариотическими клетками *in vitro*, проведен анализ влияния физико-химических характеристик нано- и микроносителей (размер, заряд поверхности, функциональная группа на поверхности и т. д.) на параметры биораспределения носителей *in vivo*.

Кроме того, данные по влиянию выбора схемы лечения с использованием невирусных транспортных систем и анализ эффективности терапии на ингибирование роста опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* не получили до наших работ подробного освещения в текущих российских и зарубежных источниках.

**Связь темы с плановыми исследованиями и финансовая поддержка темы.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (22-75-10011 «Разработка новой лекарственной формы на основе наноразмерного ватерита для системной комбинированной фотодинамической терапии рака молочной железы», 21-75-10044 «Разработка комбинированного способа лечения рака молочной железы с помощью таргетной радионуклидной терапии в

сочетании с иммунотерапией», 20-45-01012 «Разработка гибридных микро- и наноносителей нуклеиновых кислот с целью создания терапевтических мРНК вакцин против вируса иммунодефицита человека», 19-75-10010 «Разработка подходов к созданию радиофармацевтических препаратов направленного действия на основе полимерных нано- и микроносителей комплексного состава», 17-73-10023 «Фундаментальные основы создания мультифункциональных гибридных нано- и микроносителей для таргетной внутриклеточной доставки биологически активных соединений»), Российского фонда фундаментальных исследований (19-29-04025 «Фундаментальные основы редактирования генома гемопоэтических стволовых клеток и Т-лимфоцитов нуклеазами TALEN и CRISPR/Cas9», 19-015-00098 «Разработка гибридных микро- и наноносителей в качестве универсальной платформы для доставки дизайнерских нуклеаз в терапевтически релевантные популяции клеток *in vitro* и *in vivo*», 18-33-20076 «Новые подходы к созданию гибридных биodeградируемых скэффолдов на основе пьезополимеров с включением мультифункциональных нано- и микроносителей для контролируемого высвобождения биологически активных соединений», 18-015-00100 «Новые подходы к направленной доставке лекарственных препаратов для лечения злокачественных новообразований, основанные на внутриклеточной интернализации мультифункциональных микрокапсул», 16-33-00966 «Органо-модифицированные "core-shell"-наночастицы кремнезема как эффективные носители противораковых препаратов в адресных системах их доставки в клетки-мишени», 15-43-03214 «Самособирающиеся мицеллы для очистки и солюбилизации мембранных белков, увеличения растворимости и адресной доставки лекарственных препаратов и гидрофобных люминофоров типа Bodipy»). Исследования выполнялись в рамках стратегической программы «Приоритет-2030» (122022400328-2 «Разработка фармпрепаратов, в том числе радиофармпрепаратов на основе технологии нано- и микрокапсулирования», 123031300015-3 «Разработка фармпрепаратов на основе технологии нано- и микрокапсулирования»), государственного задания на создание молодежной лаборатории (122122100157-8, «Разработка лекарственного препарата на основе противоопухолевых средств, инкапсулированных в наноконтейнеры, состоящих из биоразлагаемых полимеров»), а также грантов и программ развития Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», университета ИТМО и Томского Политехнического университета.

**Цели и задачи работы.** Разработка и изучение физико-химических свойств нового класса невирусных транспортных систем БАВ *in vitro* и *in vivo* для направленной доставки в опухолевые клетки с целью диагностики и терапии ЗНО. Для достижения поставленной цели решались следующие практические задачи:

- Дизайн и функционализация нано- и микроразмерных невирусных транспортных систем для контролируемой доставки БАВ;
- Инкапсуляция низко- и высокомолекулярных БАВ для контролируемого их высвобождения под действием различных физических и химических стимулов в биологических средах;
- Исследование процессов клеточного захвата нано- и микроносителей с использованием эукариотических клеток *in vitro*;
- Исследование влияния типа и структуры нано- и микроносителей на жизнеспособность клеточных культур;
- Исследование закономерностей физико-химических характеристик нано- и микроносителей (размер, заряд поверхности, функциональная группа на поверхности и т. д.) на параметры биораспределения носителей в живых системах (лабораторных животных);
- Демонстрация контролируемой доставки БАВ и терапии на моделях экспериментально индуцированных новообразований с использованием нано- и микроносителей комплексного состава.

**Научная новизна.** Получены новые мультифункциональные гибридные системы на основе нано- и микроносителей комплексного состава, у которых ядро представляет собой неорганическую матрицу, а оболочка состоит из полимерных слоёв с включенными в их структуру варьируемыми в зависимости от задачи исследования нанообъектами. В зависимости от архитектуры данные носители могут быть использованы для эффективной и безопасной доставки ряда противоопухолевых препаратов, противовирусных малых интерферирующих РНК, инструментов редактирования генома (CRISPR/Cas9) в клетки-мишени и другие области интереса. Исследована фармакокинетика высвобождения БАВ из разработанных носителей под действием различных видов физических (ультразвук, свет) и химических (ферменты) стимулов, а также разработаны подходы модификации нано- и микроносителей с помощью магнитных наночастиц, биологических лигандов для осуществления селективной внутриклеточной доставки под действием магнитного поля.

Созданы принципиально новые подходы включения терапевтических и диагностических радионуклидов в структуру нано- и микроразмерных носителей на основе частиц карбоната кальция. Подтверждение направленности доставки нано- и микроносителей комплексного состава, несущих радионуклид, было впервые продемонстрировано с использованием методов визуализации, таких как позитронно-эмиссионная компьютерная томография (ПЭТ-КТ) и однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ).

Проведена оценка возможности использования разработанных носителей комплексного состава для адресной доставки ряда диагностических и терапевтических агентов в область

опухолевого роста на примере меланомы в виде солидного и метастазирующего новообразования. Разработана и апробирована методика комбинированного лечения метастазирующего рака легких, включающая проведение радионуклидной терапии в сочетании с химиотерапией.

**Теоретическая значимость.** Разработанные методы функционализации нано- и микроносителей комплексного состава дают возможность осуществить направленную доставку диагностических и терапевтических агентов в целевые клетки *in vitro* и *in vivo*, что позволяет повысить эффективность многих существующих методов терапии ЗНО. Кроме того, разработаны новые подходы к инкапсуляции диагностических радионуклидов в структуру нано- и микроносителей, что обеспечит дистанционную визуализацию с использованием ПЭТ-КТ и ОФЭКТ. Решение научных задач, описанных в диссертационной работе, потенциально можно использовать для разработки инновационных лекарственных препаратов тераностического действия и последующего применения в терапии пациентов с различными формами ЗНО. Результаты, полученные в рамках диссертационного исследования, могут быть также применены для терапии онкологических больных в комбинированной схеме лечения ЗНО.

**Практическая значимость.** Научные результаты, описанные в рамках диссертационной работы, позволят сформировать более глубокое понимание в подходах комбинированной терапии метастазирующего рака легких. Тесное сотрудничество с медицинскими организациями позволяет в кратчайшие сроки разработать прототип лекарственной формы для комбинированной терапии онкологического заболевания и получить соответствующие рекомендации от врачей с целью дальнейшего продвижения разрабатываемых технологий в медицинскую практику.

Разработанные научно-исследовательские подходы и технологии к диагностике и терапии онкологических заболеваний, а также методики получения различных типов невирусных транспортных систем БАВ были включены в рабочие программы "Цифровые ресурсы в научном исследовании" (на английском языке), "Медицинская биохимия", Лабораторные занятия "Медицинская биохимия" на базе ИБСиБ СПбПУ Петра Великого.

**Методология и методы исследования.** Для решения научных задач, поставленных в рамках диссертационной работы, были использованы различные методы и исследовательские подходы, которые основаны на практике ведущих российских и международных научных групп в области адресной доставки БАВ. Все задачи, связанные с синтезом полученных нано- и микроносителей комплексного состава были реализованы на базе лаборатории нано- и микрокапсулирования биологически активных соединений СПбПУ и ТПУ, включая проведение *in vitro* экспериментов по оценке агрегативной устойчивости разрабатываемых носителей в биологических средах (плазмы крови), дисперсности, размерности и т. д. На базе коллективного центра СПбГУ были проведены ряд исследований по характеристике морфологии и размерных характеристик невирусных транспортных систем БАВ. Проведение клеточных экспериментов по

оценке *in vitro* токсичности и захвату носителей эукариотическими клетками было осуществлено на базе ПСПБГМУ им. И. П. Павлова. Работы по тестированию разработанных лекарственных форм на лабораторных животных осуществлялись в РНЦ РХТ им. Гранова и ЦДТИ НМИЦ им. В. А. Алмазова.

Для характеристики морфологии и размеров нано- и микроносителей использованы методы электронной сканирующей микроскопии (СЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для определения структуры и композиционного состава полученных наночастиц использован метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (метод элементного анализа). Для определения гидродинамического радиуса частиц в водных растворах и проведения *in vitro* экспериментов по оценке агрегативной устойчивости разрабатываемых носителей в плазме крови использован метод динамического светорассеяния. Для проведения *in vitro* экспериментов по оценке взаимодействия нано- и микроносителей с клеточными культурами использовали методы конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии и проточной цитометрии (ПЦ). Исследование биораспределения нано- и микроносителей проводили с использованием флуоресцентного биоимиджинга (ФБ), ПЭТ-КТ и ОФЭКТ.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1) Разработаны и апробированы методики синтеза невирусных систем доставки на основе полиэлектролитных капсул, неорганических и полимерных наночастиц для инкапсуляции БАВ (флуоресцентных агентов, противоопухолевых препаратов, РНК/ДНК, инструментов геномного редактирования CRISPR-Cas9), их высвобождения из матрицы носителей в биологических средах *in vitro*. Отработана технология воспроизводимого получения нано- и микроразмерных носителей комплексного состава с высокой агрегативной устойчивостью в биологических средах и низкой токсичностью *in vitro* и *in vivo*.

2) Сформирована полноценная библиотека данных по физико-химическим свойствам нано- и микроразмерных невирусных систем доставки БАВ, которые представляют собой наноструктурированные объекты с различными размерными характеристиками: наночастицы (от 50 до 150 нм), субмикронные частицы (200-500 нм) и микронные частицы (1-5 мкм) со структурой «ядро-оболочка», где ядро представляет собой неорганическую матрицу карбоната кальция (CaCO<sub>3</sub>) или диоксида кремния (SiO<sub>2</sub>), покрытых полимерной оболочкой из природных или синтетических полимеров (декстран сульфат, полиаргинин, полимолочная кислота, полиакриловая кислота, полипиплиламин, полистирол сульфат, бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин).

3) Выявлены закономерности влияния внешних физических (ультразвук, лазерное излучение) и химических стимулов (ферментативное расщепление) на процессы высвобождения

БАВ из нано- и микроразмерных носителей в биологических средах. Варьируя тип физического воздействия (ультразвук, лазерное излучение), можно контролировать скорость и степень высвобождения БАВ из нано- и микроносителей *in vitro* и *in vivo*.

4) Исследовано влияние физико-химических параметров нано- и микроносителей комплексного состава, включающих в себя полимерные структуры (декстран сульфат, полиаргинин, полимолочная кислота, полиакриловая кислота, полипиламин, полистирол сульфат), белковые структуры (бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин), неорганические структуры (диоксид кремния, карбонат кальция, оксид титана), на фагоцитарную активность и жизнеспособность модельных эукариотических и первичных клеточных культур.

5) Апробированы различные транспортные системы, полученные с использованием метода послойного нанесения полиэлектролитов, для широкого спектра применения в биовизуализации. В частности, осуществлен подбор параметров инкапсулирования различных типов флуоресцентных красителей для ФБ, определены условия включения диагностических радионуклидов для ПЭТ-КТ ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ) и ОФЭКТ ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ). Продемонстрированы возможности качественной и количественной оценки биораспределения нано- и микроносителей с использованием ФБ, ПЭТ-КТ и ОФЭКТ-КТ.

6) Продемонстрирована адресная доставка ряда диагностических и терапевтических агентов с помощью нано- и микроносителей комплексного состава в целевые клетки посредством пассивной доставки и с учетом физико-химических особенностей выбранных носителей. Установлено влияние типов схемы терапии с использованием выбранных носителей на эффективность ингибирования роста опухолевых клеток. Локальная радионуклидная терапия обеспечивает максимальное ингибирование опухолевых клеток (> 90%) в случае солидного новообразования благодаря созданию высокой локальной дозы в области опухолевого очага. Комбинированная терапия, заключающаяся в сочетании химиотерапии и радионуклидной терапии, позволяет повысить эффективность лечения в случае метастазирующего рака легких по сравнению с лечением в моно-режиме.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты диссертационной работы были представлены на различных российских и международных конференциях в виде 40 устных и стендовых докладов на Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус. Бiotех» (2023, Сочи), LXXXIII Научно-практической конференции, посвященной 125-летию юбилею ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2022» (2022, Санкт-Петербург), X Российской конференции РАДИОХИМИЯ-2022 (2022, Санкт-Петербург), Второй всероссийской научной конференции молодых ученых «LifeSciencePolytech» (2022, Санкт-Петербург), шестом Форуме молодых ученых стран БРИКС

(2021, Индия), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (2021, Санкт-Петербург), XV международном симпозиуме «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и Клеточная терапия» (2021, Санкт-Петербург), IV Международной научно-практической конференции «РАДИОФАРМА-2021», (2021, г. Переславль-Залесский), UK-Russia Workshop «Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery» (2019, Англия), METANANO 2019 - IV International Conference on Metamaterials and Nanophotonics (2019, Санкт-Петербург), XLVII «Неделя науки - 2018 СПбПУ» (2018, Санкт-Петербург), Международной научно-технической молодежной конференции «Перспективные материалы конструкционного и медицинского назначения» (2018, Томск).

**Вклад автора.** В рамках диссертационной работы представлены основные результаты, которые были получены при участии автора на базе научно-исследовательской лаборатории микрокапсулирования и управляемой доставки СПбПУ Петра Великого, Томского Политехнического университета (ТПУ), а также ПСПбГМУ им. И. П. Павлова в период с 2016 по 2022 годы. Автором диссертации проводились работы по планированию и дизайну экспериментальных работ, постановке задач с последующим анализом полученных данных, написание текстов научных публикаций, а также выбор и развитие собственного научного направления. Также в диссертационную работу вошли экспериментальные данные, полученные при подготовке бакалаврских и магистерских квалификационных работ студентов ИБСиБ и ВШБСиТ СПбПУ Петра Великого (Рогова А., Ахметова Д., Якубова А., Айя Дарбиш, Постовалова А., Карпов Т., Букреева А., Хуторян И., Некрашевич П., Пельтек А., Сергеев И.), у которых автор диссертационной работы являлся или является научным руководителем.

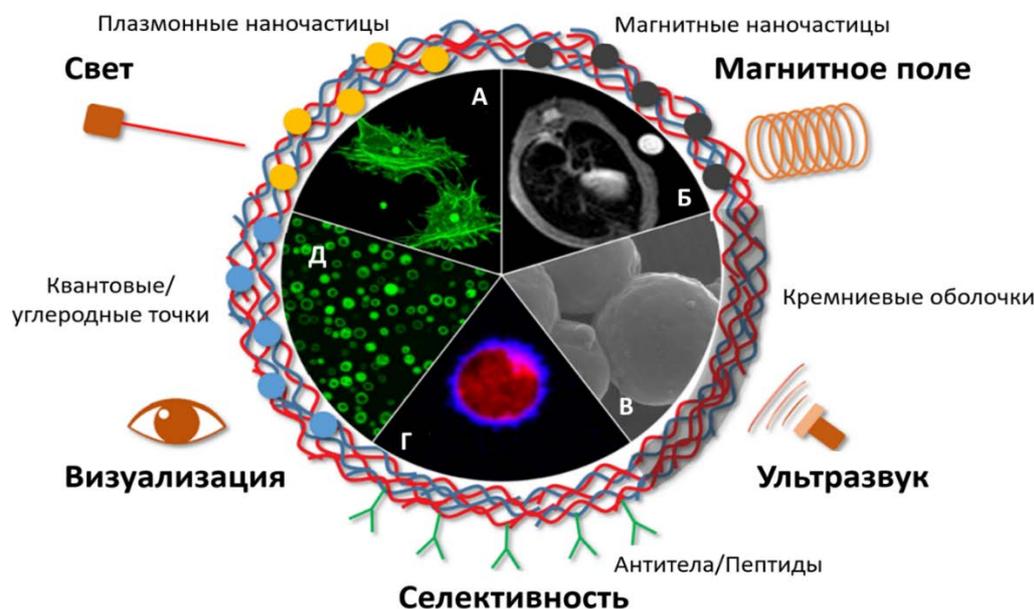
**Публикации.** Основное содержание работы опубликовано в 22 статьях, в том числе 8 обзорных, в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования материалов диссертации, включая базы данных Scopus и Web of Science. Результаты диссертации включены в отчеты о НИР/НИОКР по грантам РФФИ, РФФИ, государственным заданиям от Министерства науки и высшего образования РФ и Министерства здравоохранения РФ, указанным в разделе «Связь темы с плановыми исследованиями и финансовая поддержка работы».

**Структура и объём диссертации.** Диссертационное исследование состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы, включающего в себя 609 источников. Каждая глава включает результаты из научной литературы и полученных собственных экспериментальных данных. Презентация результатов из научной литературы сопровождается соответствующей библиографической ссылкой в подрисуночной подписи. Диссертация изложена на 284 страницах, содержит 79 рисунков, 3 таблицы, список сокращений и условных обозначений и приложение А.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Нано- и микроразмерные носители комплексного состава для контролируемой доставки БАВ

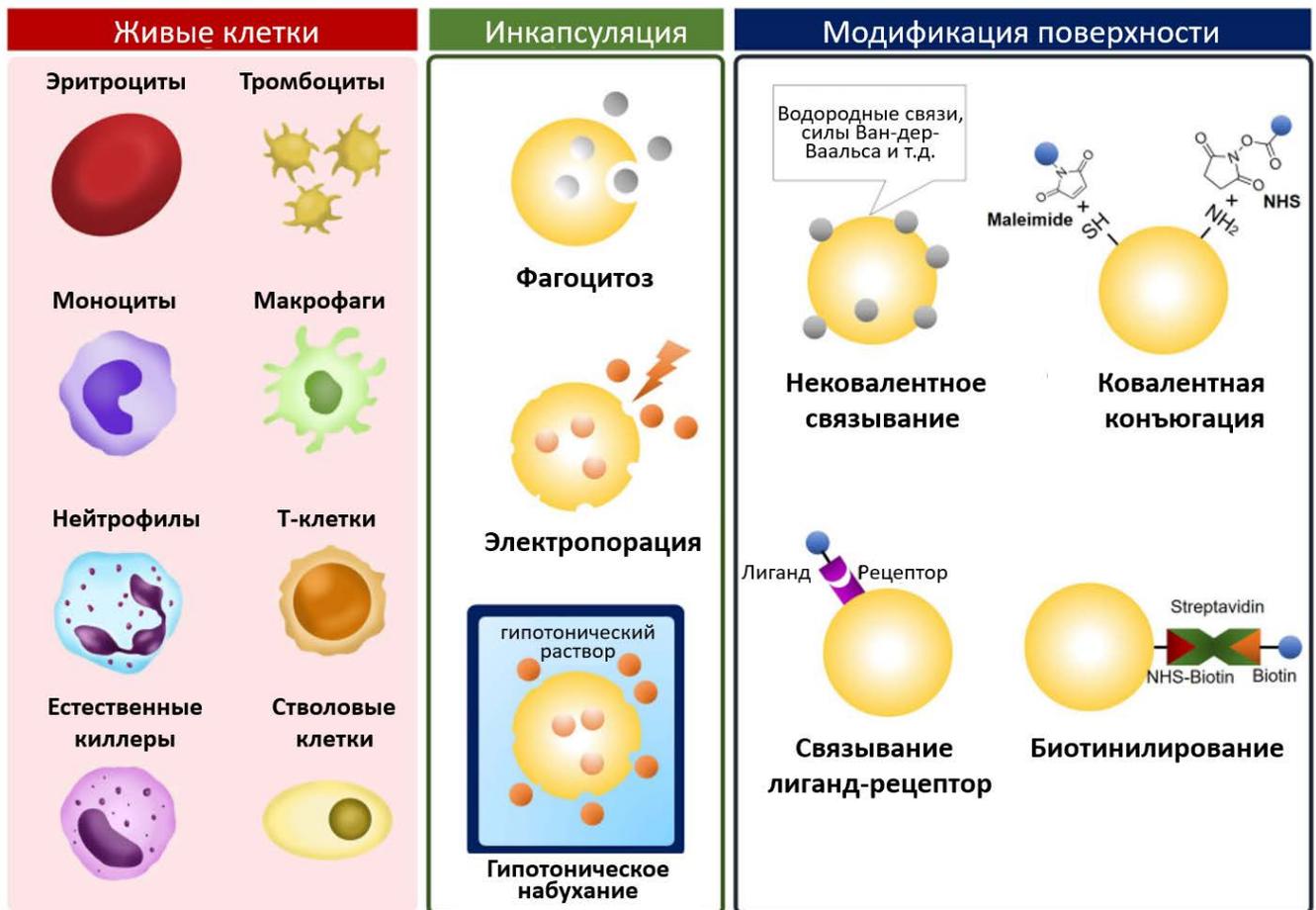
Представлены результаты из научной литературы и полученных собственных экспериментальных данных по синтезу и модификации различных типов невирусных средств доставки на основе нано- и микроносителей комплексного состава. В частности, рассмотрены наноструктурированные системы доставки БАВ, такие как липидные, полимерные, неорганические, углеродные наночастицы, полимерные мультислойные нано- и микрокапсулы, магнитоуправляемые системы доставки, клеточные системы доставки на основе клеток крови и стволовых клеток. Среди вышеперечисленных систем доставки особый интерес представляют собой полимерные мультислойные нано- и микрокапсулы, которые дополнительно можно модифицировать различными функциональными наночастицами (**Рисунок 1**). Такой тип модификации обеспечивает дистанционное высвобождение БАВ под действием различных физических и химических стимулов (например, световое воздействие, магнитное воздействие, ультразвуковое). При этом скорость и степень высвобождения БАВ определяется характером и степенью интенсивности данного воздействия.



**Рисунок 1** – Общая схема функционализации капсул: (А) Полимерные капсулы, модифицированные плазмонными наночастицами для дистанционно контролируемого высвобождения БАВ при лазерном облучении в ближней инфракрасной области. (Б) Полимерные капсулы, модифицированные наночастицами оксида железа для визуализации с помощью МРТ. (В) SiO<sub>2</sub>-покрытие капсулы, которые чувствительны к ультразвуку. (Г) Функционализация поверхности капсулы специфическими молекулами для придания капсуле свойств адресности. (Д) Модификация капсулы флуоресцентными квантовыми точками для их последующей визуализации.

Применение клеточных систем доставки БАВ имеет ряд преимуществ в медицине, где эритроциты, нейтрофилы, макрофаги, Т-клетки и стволовые клетки обладают уникальными миграционными свойствами (**Рисунок 2**). Системы доставки на основе клинически релевантных клеток демонстрируют длительную циркуляцию, специфический тканевой тропизм, подвижность, низкую иммуногенность и не обладают цитотоксичностью. Кроме того, клеточные системы доставки по своей сути являются биоразлагаемыми и биосовместимыми. Способность вышеперечисленных клеток мигрировать к поврежденным тканям позволяет доставлять терапевтические агенты в зону интереса с минимальным побочным действием [Choi et al., 2023]. Очень важным требованием к клеточным системам доставки является прочное связывание лекарственного препарата с клеточной мембраной. В настоящее время существует несколько методов модификации клеток лекарственными средствами, которые можно разделить на две категории: 1) инкапсулирование терапевтических агентов внутрь клеток и 2) связывание БАВ с клеточной мембраной. Клетки содержат биомолекулы с различными функциональными группами, которые могут взаимодействовать с низкомолекулярными лекарственными конъюгатами [Hu et al., 2012]. На **Рисунке 2** представлены способы модификации клеток с использованием физических методов (электропорации) и ковалентной сшивки.

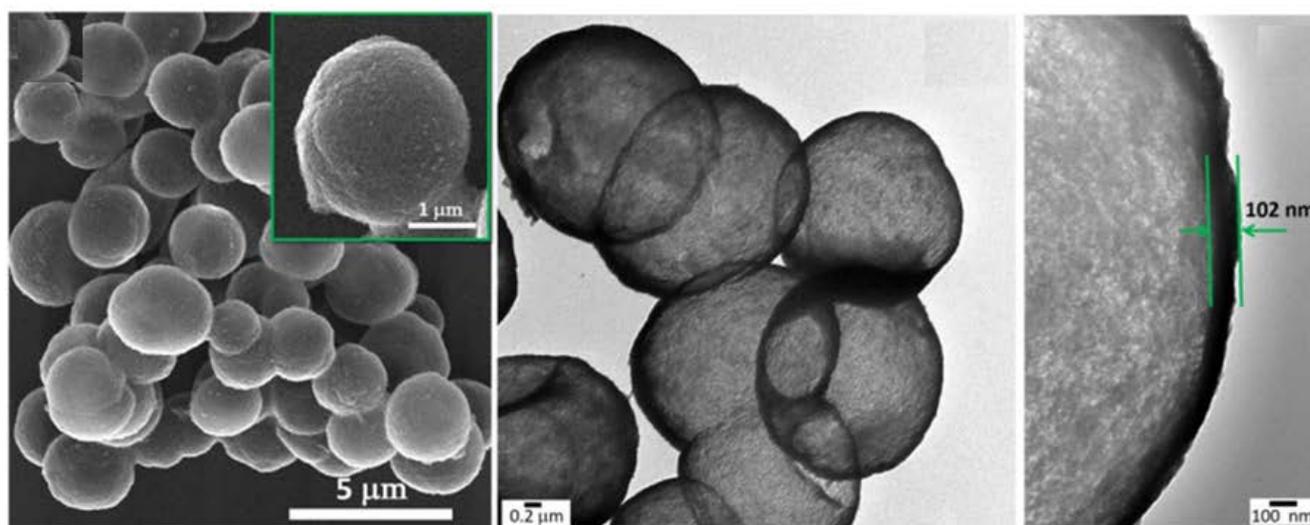
В результате клеточно-опосредованные системы доставки лекарств являются многообещающей стратегией для максимизации терапевтических результатов и минимизации побочных эффектов при медикаментозном лечении различных ЗНО.



**Рисунок 2** – Системы доставки лекарств на основе клинически релевантных клеток, способы инкапсуляции БАВ и модификация поверхности клеток [Choi et al., 2023].

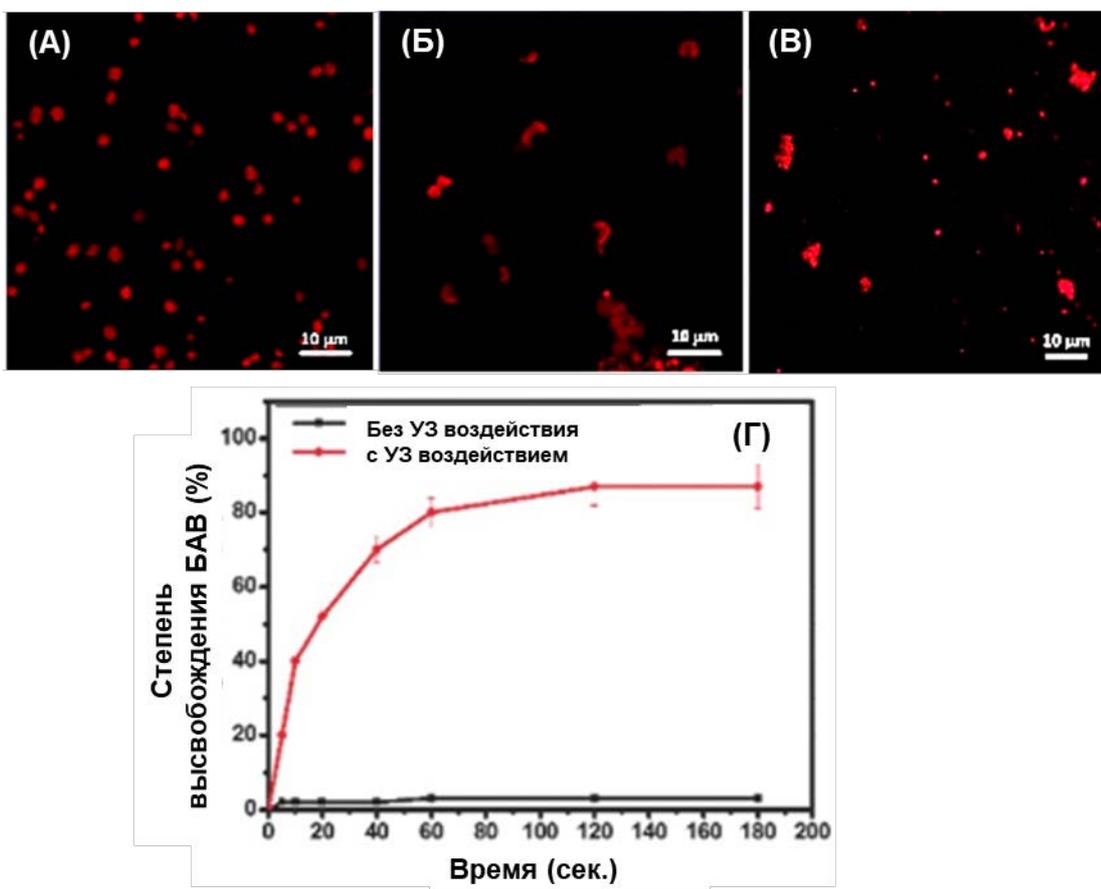
## Глава 2. Инкапсуляция и высвобождение БАВ из нано- и микроразмерных носителей

Рассмотрены основные подходы к инкапсуляции и высвобождению БАВ из нано- и микроразмерных носителей. Для инкапсуляции низкомолекулярных БАВ есть определённые требования к нано- и микрочастицам, а именно они должны обладать низкой проницаемостью и способны пролонгировано высвобождать БАВ в течение длительного периода времени. Существует несколько подходов к инкапсуляции низкомолекулярных БАВ. Одним из них является уменьшение проницаемости оболочки нано- и микрочастиц для малых молекул за счет использования золь-гель подхода, что позволяет покрыть поверхность носителей тонкой непроницаемой оболочкой неорганической матрицы из  $\text{SiO}_2$ . С использованием золь-гель метода нами были получены гибридные капсулы комплексного состава, покрытые неорганической оболочкой из  $\text{SiO}_2$  (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – СЭМ и ПЭМ изображения гибридных капсул, покрытые неорганической оболочкой из  $\text{SiO}_2$ .

Для исследования процессов инкапсуляции и высвобождения низкомолекулярных БАВ в гибридные капсулы, покрытые неорганической оболочкой из  $\text{SiO}_2$ , был использован низкомолекулярный флуоресцентный краситель родамин Б. Полученные КЛСМ изображения демонстрируют успешное включение родамина Б в полость капсул (**Рисунок 4А**). Далее, исследование процесса высвобождения родамина Б из таких гибридных капсул осуществляли под действием ультразвука (УЗ) с частотой УЗ колебаний 37 кГц и мощностью 0.12 кВт. Для этого суспензию капсул с родамином обрабатывали УЗ в разные промежутки времени (0–180 сек.). Установлено, что уже через несколько секунд (10 сек.) наблюдается разрушение оболочки капсул (**Рисунок 4Б**). Через 60 сек. все капсулы разрушились на мелкие фрагменты (**Рисунок 4В**). УЗ обработка приводит к быстрому разрушению капсул и высвобождению флуоресцентного красителя. На **Рисунке 4Г** представлена кривая высвобождения родамина Б из капсул. В первые 80 сек. наблюдается рост процентного высвобождения родамина в окружающую среду. Затем кривая выходит на плато после 80 сек., и дальнейшее изменение процентного высвобождения родамина не наблюдается, что связано с полным разрушением структуры капсулы под действием УЗ.

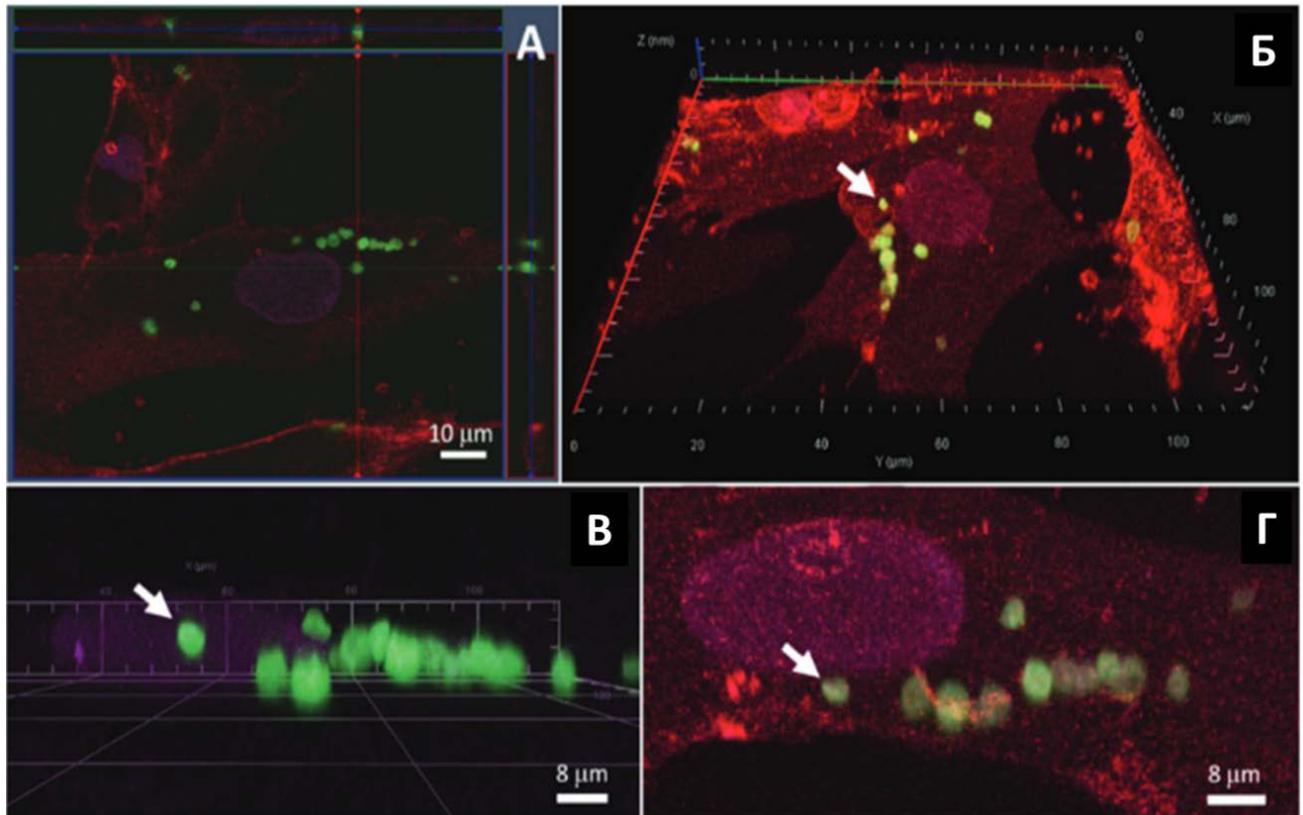


**Рисунок 4** – КЛСМ изображения гибридных микрокапсул, покрытых неорганической оболочкой из  $\text{SiO}_2$ , до (А) и после УЗ воздействия (Б – 30 сек., В – 60 сек.). (Г) Кинетическая кривая высвобождения родамина при УЗ и без УЗ воздействия.

### Глава 3. Взаимодействие нано- и микроконтейнеров с эукариотическими клетками *in vitro*

Рассмотрены основные аспекты взаимодействия нано- и микроконтейнеров с эукариотическими клетками *in vitro*. В частности, проведено исследование эффективности захвата микрокапсул мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) человека. В данном случае МСК были взяты из костного мозга пациентов, которые подписали согласие на добровольное предоставление клеточного материала. Для изучения процессов интернализации микрокапсулы инкубировали с МСК в течение 24 ч. Затем клетки фиксировали, ядра окрашивали 7-аминоактиномицином D (7-AAD), клеточную мембрану - анти-CD90-аллофикоцианином (анти-CD90-APC), а сами капсулы были мечены флуоресцентным красителем флуоресцеином изоцианатом (ФИ). Для исследования процесса интернализации использовали КЛСМ. Полученные КЛСМ изображения демонстрируют высокую эффективность клеточного захвата микрокапсул МСК (**Рисунок 5А-Г**). В процессе взаимодействия МСК с микрокапсулами была обнаружена некоторая деформация микрокапсул по форме, что обусловлено в основном действующими внутриклеточными силами (**Рисунок 5В, Г**). При этом морфология клеток существенно не изменилась. Оптимальный период инкубации МСК

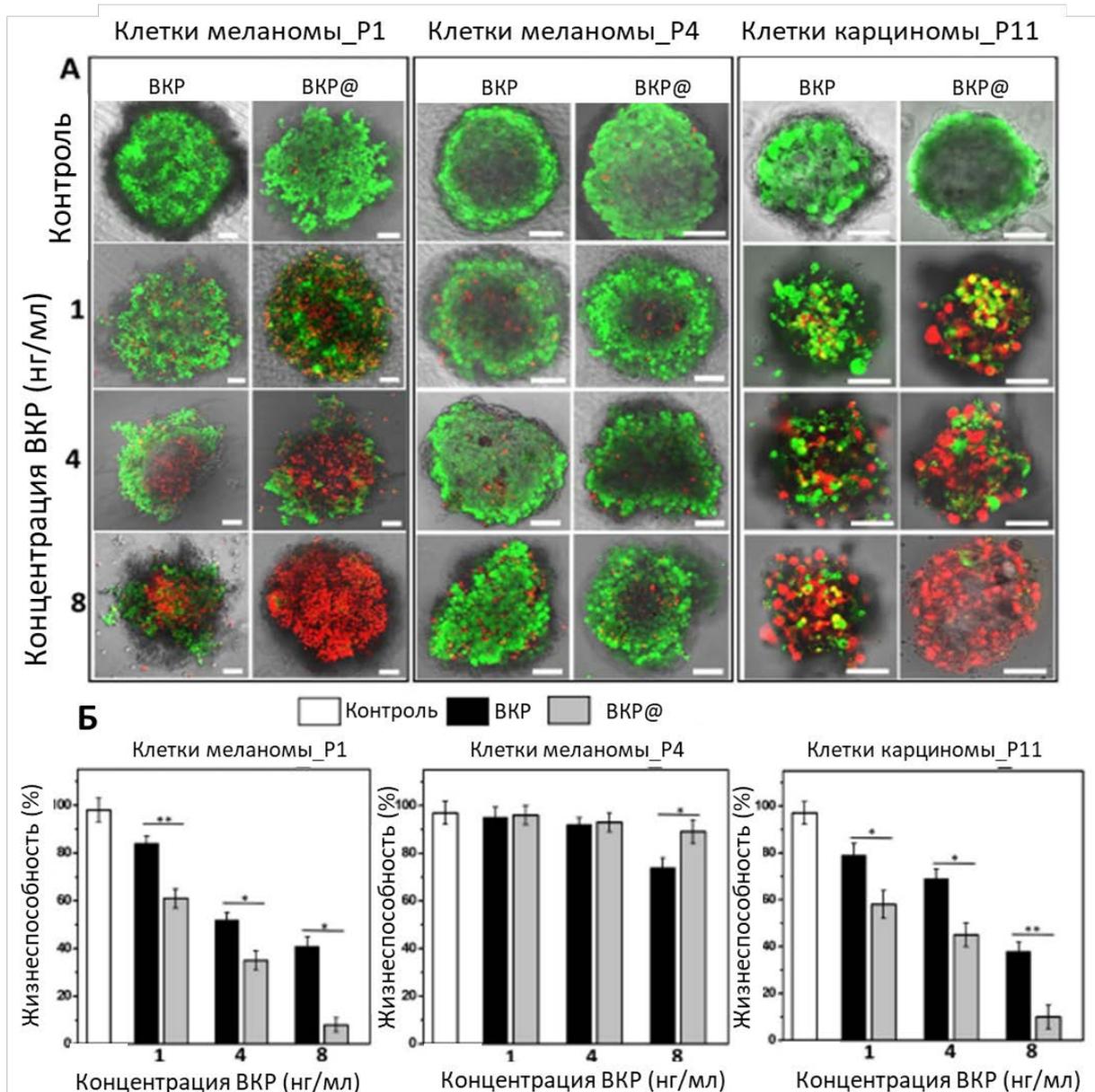
с микрокапсулами составлял 16–24 часа. На главной панели показано КЛСМ изображение МСК в поперечном сечении  $x - y$  в заданном месте  $z$ . (**Рисунок 5А**). Две другие панели показывают срез клетки в сечениях  $x - z$  (верхняя панель) и  $y - z$  (правая боковая панель). Установлено, что выбранная капсула (зеленая) расположена между двумя красными слоями клеточной мембраны. Для доказательства внутриклеточной локализации капсул в МСК дополнительно была построена 3Д реконструкция клетки (**Рисунок 5Б-Г**). Как показано на **Рисунке 5В** окрашенные в зеленый цвет капсулы сгруппированы возле ядра клетки в копланарном положении. Они интернализированы внутри клетки, что подтверждает высокую эффективность поглощения капсул МСК.



**Рисунок 5** – А, Б) КЛСМ изображения МСК, модифицированных микрокапсулами. В, Г) 3Д реконструкция МСК человека с интернализированными микрокапсулами.

Для исследования терапевтического потенциала МСК, модифицированных микрокапсулами, были использованы первичные опухолевые клетки меланомы и карциномы, сформированные в трехмерные сфероиды. В микрокапсулы был инкапсулирован противоопухолевый препарат – винкристин. Жизнеспособность опухолевых клеток определяли с помощью витальных флуоресцентных красителей (кальцеина и йодида пропидия) после 48 ч. инкубации МСК-капсулы со сфероидом. На **Рисунке 6** показано влияние МСК с капсулами, содержащих винкристин, на жизнеспособность опухолевых сфероидов. Из полученных экспериментальных данных следует, что с увеличением концентрации винкрестина жизнеспособность клеток меланомы и карциномы в сфероиде резко снижается. Вследствие чего

большинство опухолевых клеток окрашиваются йодидом пропидия. При самой высокой концентрации винкристина (8 нг/мл) жизнеспособность опухолевых клеток составляет менее 10%. Следует отметить, что винкристин, доставленный с помощью МСК, модифицированных капсулами, демонстрирует более выраженный цитотоксический эффект по сравнению с винкристином в свободной форме. Более высокий терапевтический эффект такой системы доставки связан с более высокой степенью проникновения МСК в глубь опухолевого сфероида. Из-за плотного межклеточного контакта в опухолевом сфероиде свободный противоопухолевый препарат в меньшей степени диффундирует вглубь сфероида. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о перспективе использования клеточной системы доставки на основе МСК, модифицированных микрокапсулами, для адресной доставки противоопухолевых препаратов. Важно отметить, что размеры капсул влияют на клеточную интернализацию и скорость миграции МСК. Данные капсулы демонстрируют высокую биосовместимость и повышенную эффективность интернализации при соотношении клеток и частиц 1:10.

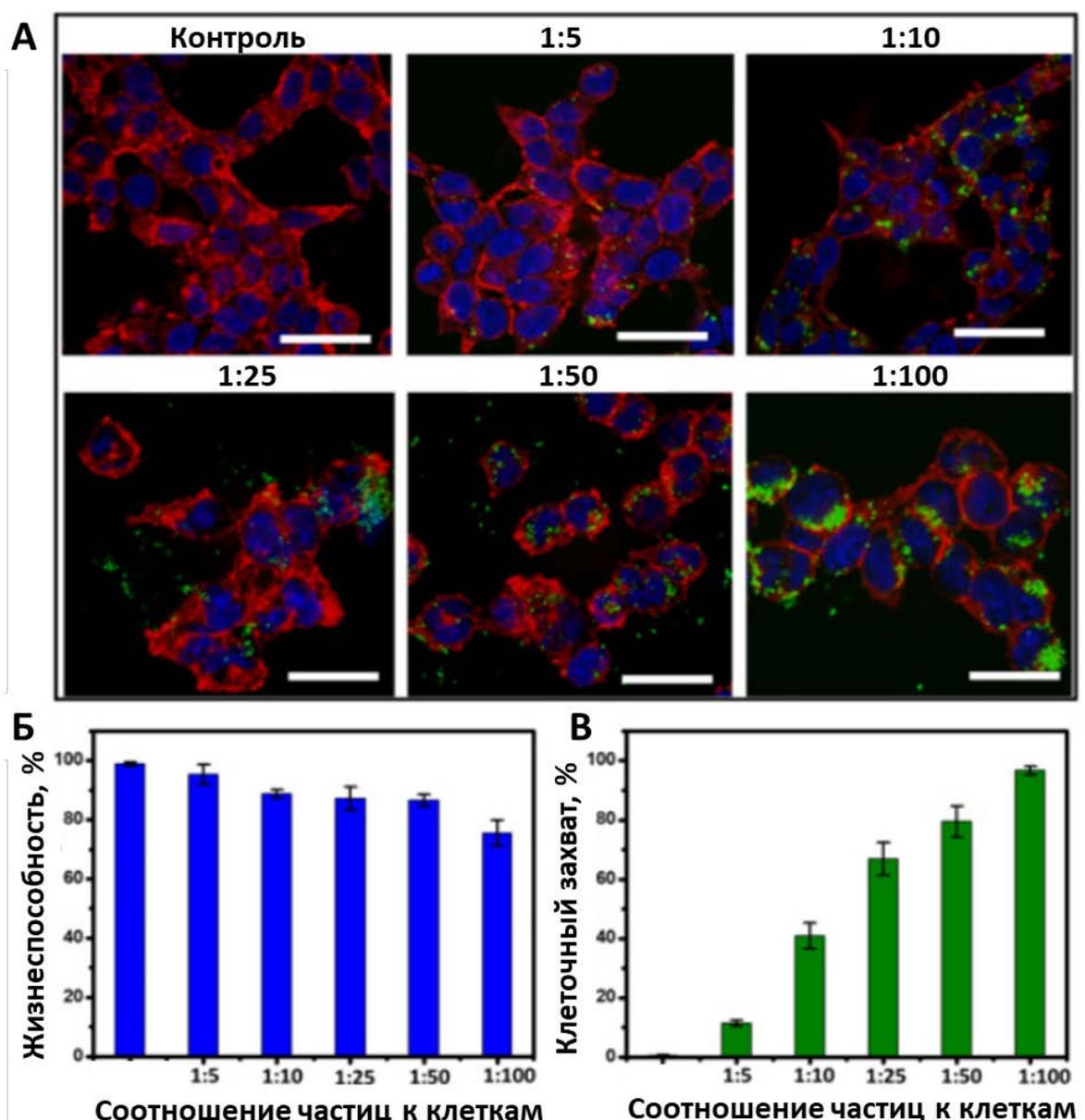


**Рисунок 6** – Сравнение противоопухолевой эффективности индивидуального лекарственного средства (винкристин – сокр. ВКР) и МСК, модифицированных с нано- и микроносителями (сокр. ВКР@), на примере опухолевых сфероидов меланомы: А) КЛСМ изображения опухолевых сфероидов, покрашенных витальными флуоресцентными красителями (кальцеин АМ и йодидом пропидия). Живые клетки окрасились кальцеином АМ, мертвые клетки – йодом пропидия; Б) Количественная оценка жизнеспособности клеток в сфероидах. (Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, \* представляет  $p < 0.05$  и \*\* представляет  $p < 0.005$ ).

Отдельно в данной главе необходимо выделить раздел, посвященный применению невирусных систем доставки нуклеиновых кислот – ДНК. Для исследования процесса трансфекции ДНК обычно используют модельные клеточные линии НЕК293Т. Взаимодействие данных клеточных культур с нано- и микрочастицами для определения механизма внутриклеточного захвата является важной задачей для оптимизации протокола эксперимента по трансфекции. Кроме того, разрабатываемые носители ДНК должны обладать способностью защищать генетический материал от преждевременной деградации в биологических средах. Существует несколько подходов защиты генетического материала от внешних факторов биологической среды и индуцирования эндосомального высвобождения, необходимого для эффективной трансфекции. В первом случае данный подход осуществляется путем модификации структуры нано- и микроносителей для эффективного захвата клетками НЕК293Т и высвобождения ДНК в цитоплазму клетки. Второй способ заключается в использовании органических добавок, которые повышают стабильность ДНК в структуре самого носителя. В научной литературе описан пример использования ряда органических добавок для повышения эффективности трансфекции ДНК: человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), декстран сульфат (ДС), глутатион (ГЛТ), поли-L-аргинин (ПАГ), протамин сульфат (ПС), дубильная кислота (ДК) и ингибитор ДНКазы II [Tarakanchikova et al., 2021]. ЧСА применяется для усиления липоплекс-опосредованной трансфекции ДНК, защиты носителей от агрессивных факторов биологических жидкостей и индуцирования эндоцитоза. ЧСА также, вероятно, дестабилизирует эндосомы в кислых условиях, что приводит к уменьшению промежутка времени, в течение которого ДНК может разрушаться в кислых условиях [Simoes et al., 2000]. Включение ДС позволяет сформировать стабильный комплекс с молекулами ДНК, предотвращая их преждевременную деградацию во время клеточного захвата [Vocelle et al., 2016]. ГЛТ может снижать уровень активных форм кислорода (АФК), которые образуются во время окислительного стресса, индуцируемого поликатионами в полимерных носителях [Vocelle et al., 2016], что может существенно снизить эффективность трансфекции. Большая буферная емкость гидрофильных полимеров, таких как ПАГ, может

опосредовать так называемый эффект “протонной губки”, ответственный за механизмы эндосомального выхода молекул ДНК [Aboelmaatri et al., 2021]. ПС является еще одним катионным полимером, который эффективно связывается с ДНК и демонстрирует мембранно-транслоцирующую активность благодаря наличию последовательностей ядерной локализации, обеспечивающих ядерный транспорт генетического материала. ДК может конденсировать ДНК и защищать ее от ферментативно-опосредованной деградации в процессе трансфекции [Wu et al., 2019]. Ингибирование ферментативно-опосредованной деградации ДНК в эндосомах может увеличить количество нуклеиновой кислоты, транспортируемой в цитоплазму клетки, а затем в клеточное ядро. Использование ингибитора ДНКазы II inh. (SLRLLQWFLWAC) увеличивает эффективность липоплекс-опосредованной трансфекции [Sperinde et al., 2001]. Вариация физико-химических свойств носителей и включение органических добавок в структуру этих носителей позволяет повысить эффективность трансфекции клеток НЕК293Т. Кроме того, немаловажным фактором является изменение условий инкубации клеток и частиц в концентрационном соотношении [Sperinde et al., 2001].

Нашей научной группой было продемонстрировано влияние условий инкубации частиц с dTomato-экспрессирующими НЕК293Т клетками на их эффективность трансфекции и жизнеспособность. Исследование взаимодействия (поглощения и токсичности) субмикронных частиц (<500 нм) с клетками НЕК293Т осуществляли при различных соотношениях клеток к частицам = 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100. Время инкубации составляло 24 ч. Визуализацию процесса взаимодействия частиц с клетками осуществляли с помощью КЛСМ. Для этого клетки фиксировали, ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем 4',6-диамидино-2-фенилиндолом ДФ (синий цвет), в то время как сами носители были мечены флуоресцентным красителем ФИ (зеленым), а клетки НЕК293Т экспрессируют красный флуоресцентный белок dTomato (**Рисунок 7А**). Токсичность носителей дополнительно подтверждали с помощью анализа реакции на резазурин. Полученные данные демонстрируют, что существенной цитотоксичности не наблюдается даже при самом высоком соотношении клеток к частицам (1:100) (**Рисунок 7Б**). Количественные данные по клеточной ассоциации наноносителей клетками НЕК293Т получили с помощью ПЦ. Согласно полученным данным, с увеличением количества частиц, добавляемых к клеткам, процент ассоциированных клеток с частицами увеличивается, достигая плато при наибольшем количестве добавляемых наноконтейнеров (1:100) (**Рисунок 7В**).



**Рисунок 7** – Оценка клеточной ассоциации и токсичности: КЛСМ изображения *dTomato*-экспрессирующих клеток НЕК293Т с частицами после их инкубации в течение 24 ч (А). Ядра клеток окрашивали ДФ (синим), наноконтейнеры были мечены ФИ (зеленым), и клетки экспрессировали флуоресцентный *dTomato* белок (красный). Масштабная линейка: 20 мкм. Жизнеспособность клеток (Б) и гистограммы клеточной ассоциации (В) определяли с помощью ПЦ.

Подтверждая высокий процент захвата частиц клетками НЕК293Т, следующим шагом является оптимизация загрузки ДНК внутрь частиц и установление влияния условий инкубации на эффективность трансфекции клеток НЕК293Т. Для этого используются три стратегии запаковки ДНК:

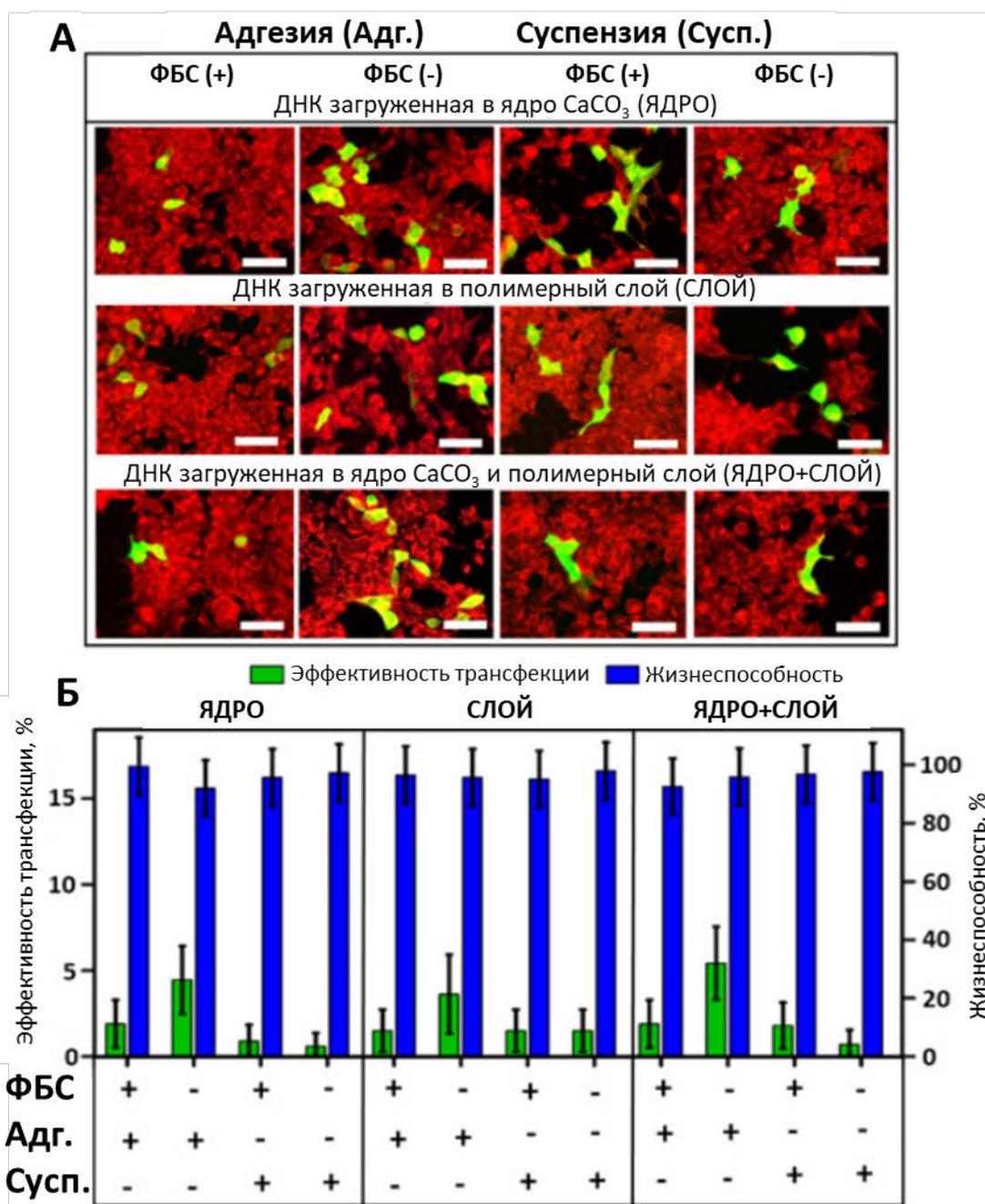
- Совместное соосаждение ДНК в ядрах наноконтейнеров;
- Физическая адсорбция ДНК на поверхность наноконтейнеров;

- Одновременное соосаждение и физическая адсорбция ДНК.

Различные способы инкубации частиц с клетками может существенно повлиять на эффективность трансфекции и токсичность клеток [Rashid et al., 2019]. Поэтому необходимо исследовать различные параметры инкубации клеток/частиц, таких, как сывороточное голодание (фетальная бычья сыворотка, ФБС) и состояние клеточной культуры (адгезивные клетки или суспензионные клетки):

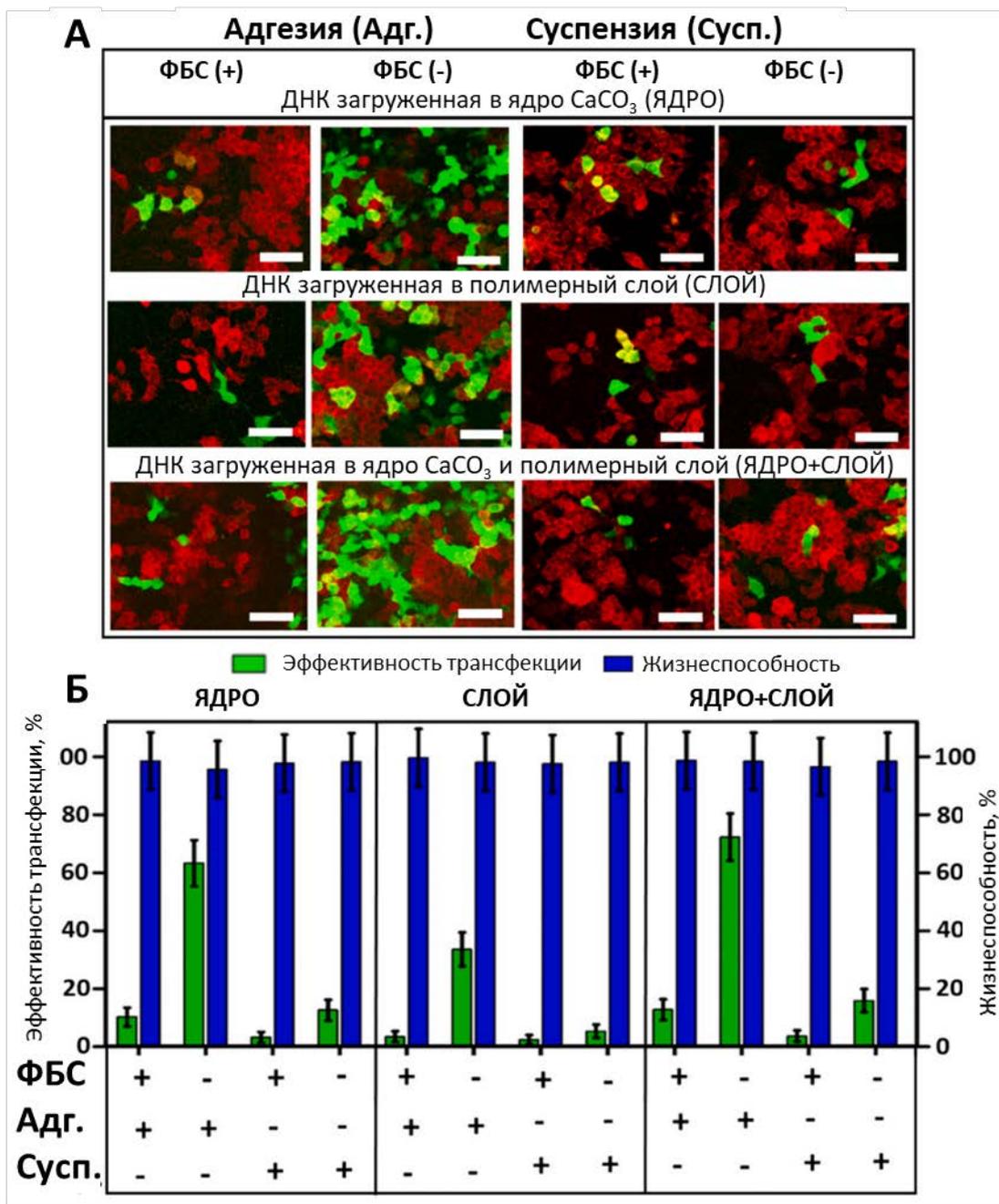
- наноконтейнеры добавляли к культуре адгезивных клеток в присутствии ФБС (адгезия, ФБС +) и без ФБС (адгезия, ФБС -).
- наноконтейнеры инкубировали с суспензией клеток в присутствии ФБС (суспензия, ФБС +) и без ФБС (суспензия, ФБС -).

Для проведения эксперимента использовали методы КЛСМ и ПЦ. На **Рисунке 8А** представлены КЛСМ изображения клеток после добавления частиц. Из полученных изображений следует, что все разработанные протоколы трансфекции клеток продемонстрировали относительно низкую эффективность трансфекции, т. е. процент трансфицированных клеток не превышал  $5,5\% \pm 2\%$  (количественные данные ПЦ, **Рисунок 8В**). Однако существует общая тенденция к тому, что эффективность трансфекции зависит от адгезивного состояния клеток и присутствия ФБС в клеточной среде.



**Рисунок 8** – Исследование влияние стратегии загрузки ДНК и условий инкубации клеток НЕК293Т на их эффективность трансфекции: Изображения КЛСМ через 48 ч после трансфекции ДНК с использованием наноконтейнеров. Красный (dTomato), зеленый (GFP). Линейка шкалы составляет 100 мкм. (А). Процент GFP-положительных клеток НЕК293Т и жизнеспособность клеток при различных подходах. Данные ПЦ, представленные в виде гистограмм (В).

Совершенно противоположная картинка наблюдается в случае использования ингибитора ДНКазы II inh. при инкубации клеток с частицами. В этом случае наблюдается существенный рост количества трансфицированных клеток НЕК293Т (> 60%) в отсутствии ФБС (-) для адгезионных клеточных культур (**Рисунок 9**).

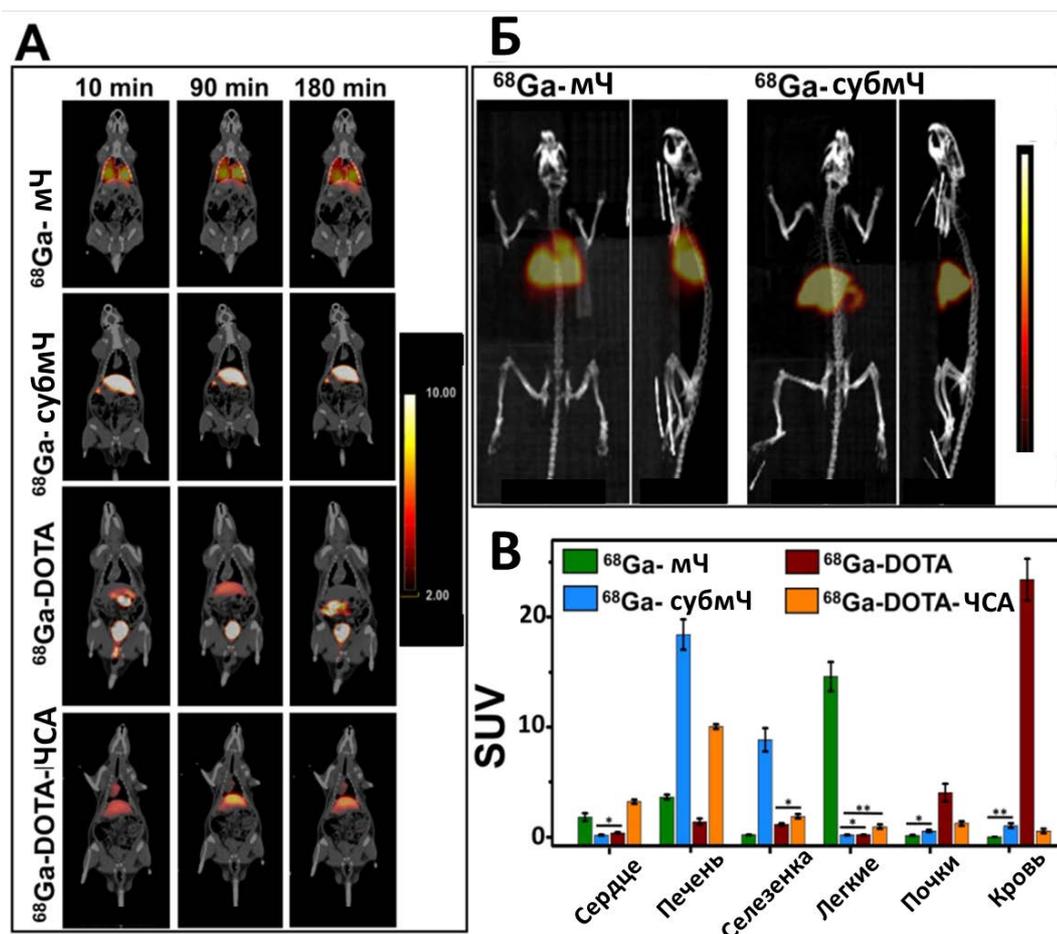


**Рисунок 9** – Исследование влияние стратегии загрузки ДНК и условий инкубации клеток НЕК293Т в присутствии ингибитора ДНКазы II *inh.* на эффективность трансфекции: Изображения КЛСМ через 48 ч. после трансфекции ДНК с использованием наноконтейнеров. Красный (*dTomato*), зеленый (*GFP*). Линейка шкалы составляет 100 мкм. (А). Процент *GFP*-положительных клеток НЕК293Т и жизнеспособность клеток при различных подходах. Данные ПЦ, представленные в виде гистограмм (В).

Таким образом, нами было продемонстрировано влияние различных факторов, включая разные способы загрузки ДНК и условий инкубации наноконтейнеров с клетками на эффективность доставки ДНК и трансфекции клеток НЕК293Т. Установлено, что эффективность захвата частиц и трансфекции клеток в значительной степени зависит от способа загрузки ДНК и используемых условий инкубации клеток/частиц. Оптимальные условия для проведения трансфекции являются следующие: 1) включение ДНК в структуру наноносителей, 2) инкубация с адгезионными клетками при соотношении клеток к частицам 1:10, 3) клеточная среда не должна содержать ФБС. Эти параметры являются ключевыми в случае, когда ДНК вводится в комбинации с ингибитором ДНКазы II inh. Применение комбинации органических добавок с ДНК и оптимизация условий инкубации клеток/частиц (среда без сыворотки, адгезивные клетки) приводят к наиболее эффективному протоколу трансфекции, при котором наблюдается более 60 % трансфицированных клеток.

#### **Глава 4. Биораспределение и визуализация нано- и микроконтейнеров в лабораторных животных для осуществления контролируемой доставки БАВ *in vivo***

Представлены результаты биораспределения  $^{68}\text{Ga}$ -меченных субмикронных и микронных частиц  $\text{CaCO}_3$  при внутривенном введении крысам линии Whistar с использованием ПЭТ-КТ (**Рисунок 10**). По полученным ПЭТ-КТ изображениям следует, что в случае  $^{68}\text{Ga}$ -меченных микронных частиц  $\text{CaCO}_3$  (3–4 мкм) большая их часть накапливается в легких. Размер самих частиц не позволяет им пройти через легочные артерии и, следовательно, застревают в легочном капиллярном русле. Нами было показано, что эти носители не вызывают существенных морфологических изменений или токсичности легочной ткани, локализуясь в просвете кровеносных сосудов. Этот тип носителей может также захватываться макрофагами и эпителиальными клетками легких. При этом  $^{68}\text{Ga}$ -меченные субмикронные частицы  $\text{CaCO}_3$  (<500 нм) локализуются в печени и селезенке.

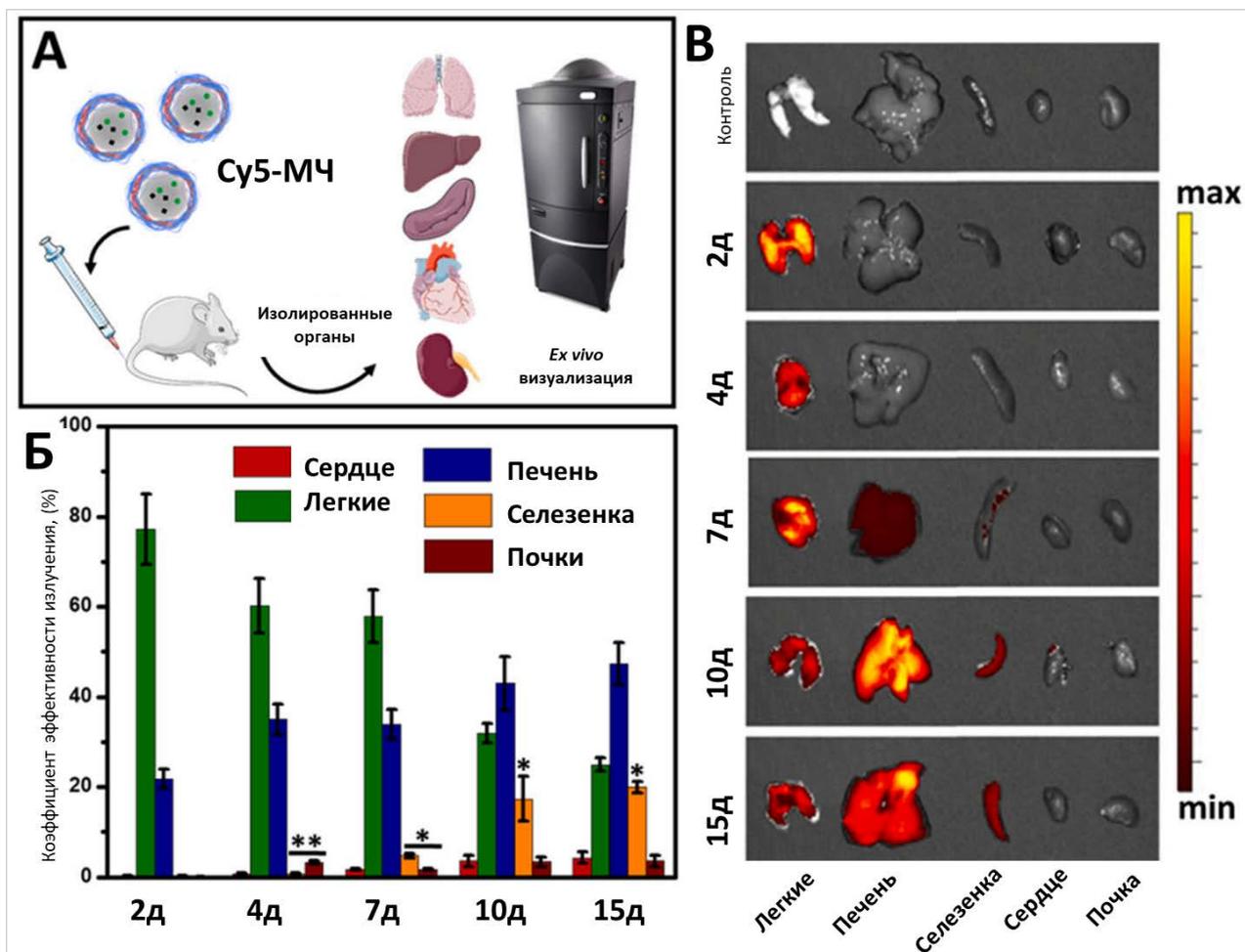


**Рисунок 10** – Исследование биораспределения субмикронных и микронных частиц  $\text{CaCO}_3$ , меченных изотопом  $^{68}\text{Ga}$ , при внутривенном введении крысам линии *Whistar* с использованием ПЭТ-КТ : А, Б) изображения ПЭТ-КТ крыс после внутривенного введения препарата, В) график значений сигнала, снятых с ПЭТ изображений органов интереса, выраженных в стандартных единицах. Результаты представлены в усреднении  $\pm$  стандартное отклонение,  $n = 3$ , \*соответствует  $p < 0.05$ , \*\*соответствует  $p < 0.005$ .

Данные результаты хорошо согласуются с другими нашими работами, в которых биоразлагаемые носители аналогичного размера использовали для пассивной доставки БАВ мышам *Valb/c*. В своей работе для оценки пассивного накопления микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  в легких мы использовали метод ФБ. Результаты биораспределения флуоресцентно меченых микрочастиц в органах животных (легких, печени, селезенке, сердце и почках) представлены на **Рисунке 11**. Согласно полученным данным микрочастицы локализуются преимущественно в легких на 2-е сутки после внутривенного введения. На 4-й день наблюдалось аналогичное распределение. На 7-й день часть флуоресцентного сигнала от носителей локализуется в печени и легких. Количественная оценка распределения микрочастиц в органах представлена в виде гистограмм (**Рисунок 11Б**). Из полученных гистограмм следует, что суммарное накопление микрочастиц в

легких снижалось с течением времени и флуоресцентный сигнал постепенно локализовался в печени и селезенке.

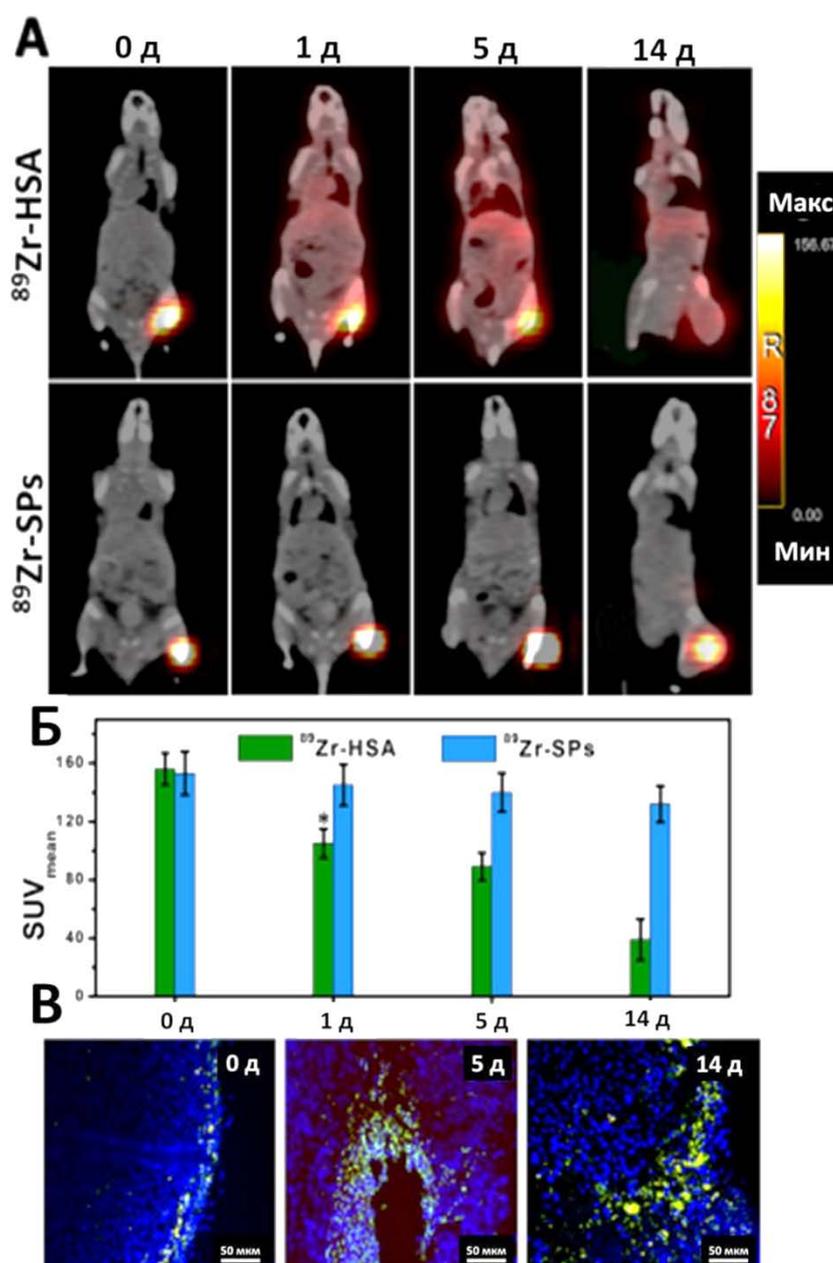
Таким образом, можно сделать вывод, что в зависимости от размерных характеристик носителей, мы наблюдаем различный профиль распределения их в органах и тканях. Эти данные хорошо согласуются с предыдущими работами [Ohlsson et al., 2003, Xiong et al., 2012]. Частицы на основе  $\text{CaCO}_3$  полностью деградировали в течение 12 недель *in vivo*, не вызывая значительных морфологических изменений или токсичности легочной ткани [Mirković et al., 2019].



**Рисунок 11** – Исследование биораспределения микрочастиц  $\text{CaCO}_3$ , модифицированных красителем Cy5, с использованием ФБ: (А) Схема эксперимента, (Б) График интенсивности флуоресцентного сигнала в зависимости от органов интереса (сердце, легкое, печень, селезенка, почка) после внутривенного введения частиц, (В) Изображение органов интереса после внутривенного введения частиц. Результаты представлены в усреднении  $\pm$  стандартное отклонение,  $n = 3$ .

## **Глава 5. Демонстрация контролируемой доставки БАВ на моделях экспериментально индуцированных новообразований**

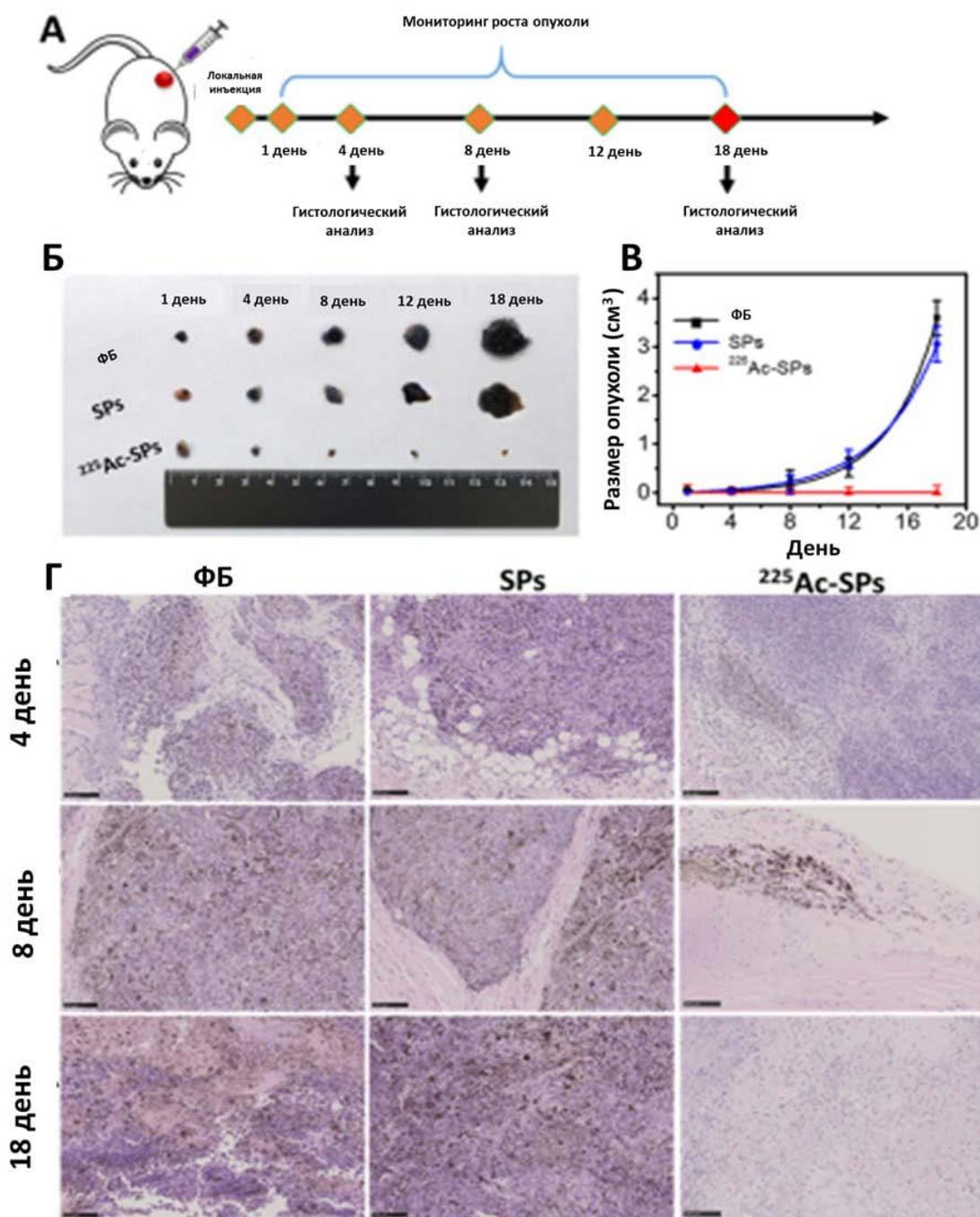
Представлены результаты *in vivo* терапии ЗНО с использованием нано- и микроносителей комплексного состава. Эффективность терапии во много определяется типом введения. Различают локальное (местное) и системного введение лекарственных препаратов. При локальном введении необходимо установить локализацию нано- и микрочастиц в области опухолевого очага. Исследование внутриопухолевого распределения и стабильности субмикронных частиц на основе  $\text{CaCO}_3$  (SPs) было проведено с помощью ПЭТ-КТ на модели мышинной меланомы (B16-F10 клетки, мыши линии C57/black). В качестве  $\gamma$ -излучающего диагностического радионуклида был выбран  $^{89}\text{Zr}$  из-за его длительного периода полураспада ( $T_{1/2} = 3.2$  дня). После внутриопухолевого введения  $^{89}\text{Zr}$ -SPs показал значительное накопление в области опухоли в течение всего периода времени (14 дней) (**Рисунок 12А,Б**). Полученные данные показали локализацию инкапсулированной формы радионуклида ( $^{89}\text{Zr}$ -SPs) в течение длительного времени в области опухоли. Гистологический анализ также подтвердил, что частицы были обнаружены в тканях опухоли в течение 14 дней (**Рисунок 12Г**).



**Рисунок 12** – Исследование биораспределения  $^{89}\text{Zr}$ -SPs после внутриопухолевого введения мышам C57/black с меланомой B16-F10: ПЭТ-КТ изображения мышей, получивших  $^{89}\text{Zr}$ -HSA (0,5 мкКи,  $V = 50$  мкл) и  $^{89}\text{Zr}$ -SPs (0,5 мкКи,  $V = 50$  мкл,  $C_{SPs} = 50$  мкг/мл,  $N_{SPs} \approx 18 \times 10^7$ ) (А). Биораспределение тестируемых образцов в виде гистограмм SUV (Б). КЛСМ изображения опухолевой ткани после внутриопухолевого введения FITC-меченых частиц (синий цвет соответствует ядрам клеток, окрашенных DAPI, зеленый цвет - SPs) (В).

Далее нами была исследована эффективность локальной терапии с использованием альфа-эмиттера  $^{225}\text{Ac}$ . Для введения композиции с терапевтическим радиоизотопом  $^{225}\text{Ac}$  был использован тот же подход, что и для  $^{89}\text{Zr}$ , но с другим хелатором (вместо ДФО использовался ДОТА), что в результате приводит к образованию  $^{225}\text{Ac}$ -SPs. Эффективность терапии оценивали на мышах C57/black с привитой B16-F10 меланомой, которым в опухоль однократно вводили

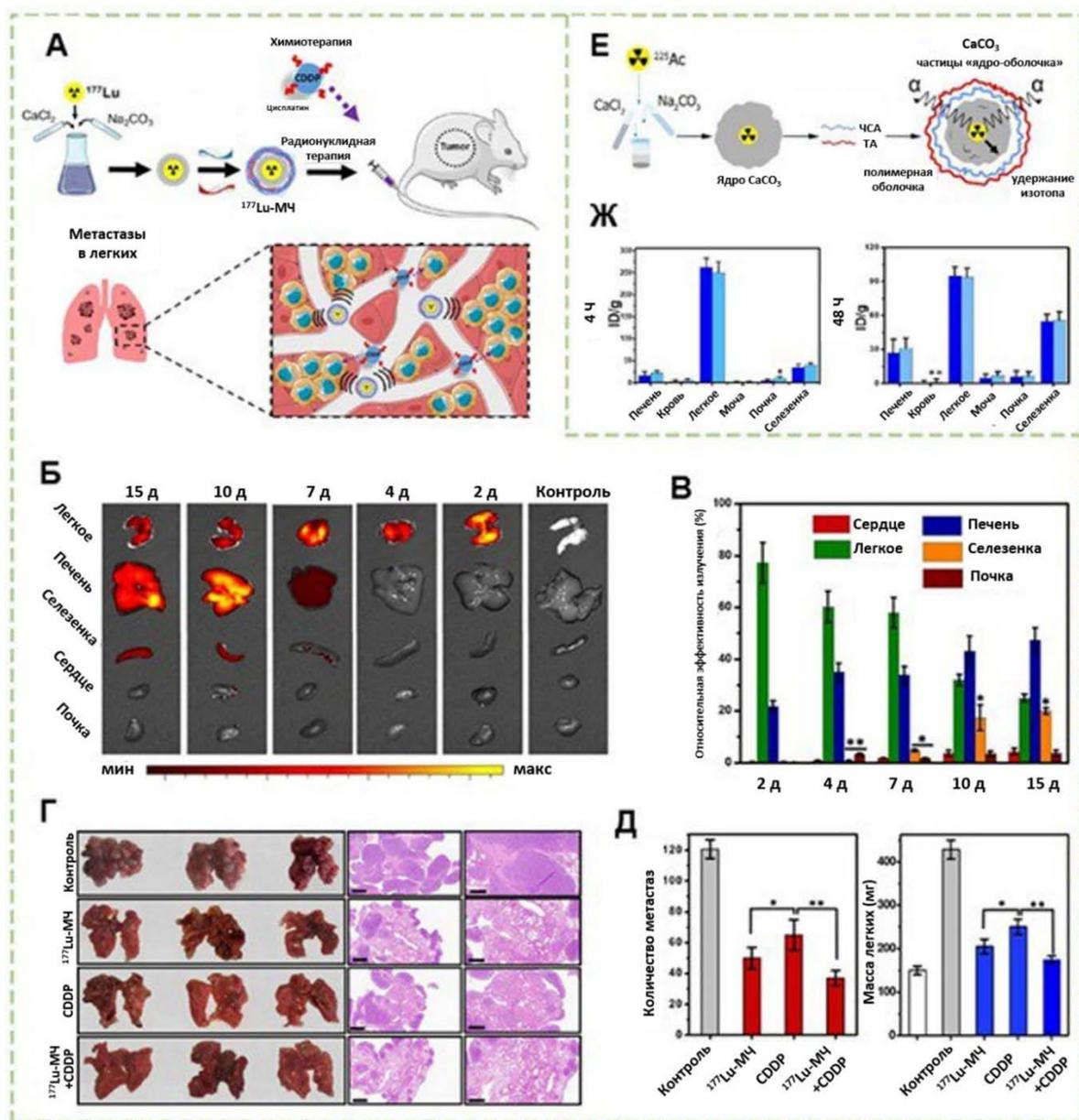
препарат  $^{225}\text{Ac-SPs}$  (**Рисунок 13А**). В качестве контроля использовали фосфатный буфер (ФБ) и частицы без изотопа (SPs). По полученным данным наблюдалось уменьшение объема опухоли у мышей, получавших  $^{225}\text{Ac-SPs}$  (размер опухоли не превышал  $0.1\text{ см}^3$ ). В то время как в случае контрольных групп (ФБ и SPs) наблюдали значительный рост опухоли (размер опухоли составлял  $3.5\text{--}4\text{ см}^3$ ) (**Рисунок 13Б, В**). Для оценки морфологии опухоли было проведено окрашивание образцов биопсии гематоксилином и эозином (**Рисунок 13Г**). Образцы опухолей из контрольных групп мышей (ФБ, SPs) продемонстрировали агрессивный и инвазивный рост опухоли. На 18-й день в контрольных группах наблюдались множественные митозы и агрессивный инвазивный рост опухоли. Ткань содержала большое количество меланина. Напротив, образцы опухолей, полученные от мышей с  $^{225}\text{Ac-SPs}$ , показали стабилизацию процесса онкогенеза и отсутствие инвазивной пролиферации злокачественных меланобластов. Показатели выживаемости мышей с опухолью B16-F10, получавших фосфатный буфер, SPs и  $^{225}\text{Ac-SPs}$ , оценивали в течение 30 дней. Улучшенная медиана выживаемости наблюдалась у мышей, получавших  $^{225}\text{Ac-SPs}$ , по сравнению с мышами, получавшими SPs и фосфатный буфер. На 30-й день средняя выживаемость мышей, получавших  $^{225}\text{Ac-SPs}$ , составила 85%, тогда как всего 20% мышей выжили в случае SPs и 15% для ФБ.



**Рисунок 13** – Оценка эффективности локальной радионуклидной терапии с использованием частиц  $\text{CaCO}_3$ , меченных  $^{225}\text{Ac}$ : Схема лечения и мониторинг роста опухоли (А). Изображения опухолей тестируемых образцов (Б). Объем опухоли мышей с меланомой B16-F10, получавших  $^{225}\text{Ac}$ -SPs ( $1 \text{ мкКи}$ ,  $V = 50 \text{ мкл}$ ,  $C_{\text{SPs}} = 50 \text{ мкг/мл}$ ,  $N_{\text{SPs}} \approx 18 \times 10^7$ ). В качестве контроля использовали мышей, получавших частицы без изотопа ( $V = 50 \text{ мкл}$ ,  $c_{\text{SPs}} = 50 \text{ мкг/мл}$ ,  $N_{\text{SPs}} \approx 18 \times 10^7$ ) и фосфатный буфер ( $V =$  использовали  $50 \text{ мкл}$ ) (С). Гистопатология в рамках терапии опухолей (D). Шкала  $100 \text{ мкм}$ .

Были проведены исследования, доказывающие перспективность применения микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  для комбинированной терапии метастатического рака легких. Для этого была

верифицирована комбинированная схема лечения, основанная на использовании инкапсулированного терапевтического изотопа  $^{177}\text{Lu}$  в микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  ( $^{177}\text{Lu}$ -МЧ) и химиотерапевтического агента – цисплатина (CDDP).  $^{177}\text{Lu}$  испускает электрон высокой энергии с относительно низкой линейной передачей энергии (0.497 МэВ/мм), с большой длиной пробега (несколько мм) и относительно длительным периодом полураспада 6.71 суток, что позволяет рекомендовать данный тип радионуклида в качестве терапевтического для лечения метастаз в легких [Vichis-Juzrez et al., 2014]. CDDP рассматривается как противоопухолевый препарат для химиотерапии. Недавнее исследование выявило эффективность цисплатина, применяемого в комбинированной терапии [Tieche et al., 2016]. Таким образом, комбинированное лечение метастаз легких осуществлялось за счет синергетического эффекта от радионуклидной терапии и химиотерапии (**Рисунок 514А**). Разработанные микрочастицы  $\text{CaCO}_3$  типа “ядро-оболочка” способны эффективно образовывать комплексы с терапевтическим радионуклидом  $^{177}\text{Lu}$  и обладают хорошей радиохимической стабильностью в течение длительного периода времени. В данном случае  $^{177}\text{Lu}$ -МЧ продемонстрировали селективное накопление в легких за счет их размерных характеристик (**Рисунок 14Б-В**). Биораспределение разработанных носителей было верифицировано методом ФБ. Было установлено, что радионуклидная терапия с использованием  $^{177}\text{Lu}$ -МЧ частиц в сочетании с CDDP приводит к значительному уменьшению количества метастаз по сравнению с монотерапией (**Рисунок 14Г-Д**): количество метастаз для  $^{177}\text{Lu}$ -МЧ составляло  $50 \pm 7$  и  $65 \pm 10$  для CDDP и  $37 \pm 5$  для  $^{177}\text{Lu}$ -МЧ+CDDP. При выборе типа радионуклида для терапии важным фактором являются характеристики распада самого изотопа: энергия альфа-, бета-частиц, а также образование дочерних изотопов, высвобождение и распространение которых по организму может представлять опасность для здоровых органов и тканей [Porty et al., 2018]. Поэтому при разработке системы доставки терапевтических радионуклидов необходимо изучить возможность удержания продуктов альфа-, бета-распада в области опухолевого роста [Muslimov et al., 2021]. Нами было продемонстрировано, что использование  $\text{CaCO}_3$  для инкапсуляции  $^{225}\text{Ac}$  показало высокую эффективность удержания как основного терапевтического изотопа, так и его продуктов распада ( $^{221}\text{Fr}$  и  $^{213}\text{Bi}$ ) (**Рисунок 14Е**). Также были выявлены минимальные значения радиоактивности в нецелевых органах и тканях (печень, почки, селезенка, кровь и моча), что свидетельствует об отсутствии высвобождения дочерних изотопов из частиц (**Рисунок 14Ж**). При комбинированной терапии наблюдается повышенная выживаемость у животных (80%, 27-й день) по сравнению с мышами, получавшими монотерапию (50–60%, 27-й день), и контрольной группой (0%, 27-й день).



**Рисунок 14** – Схема комбинированной терапии метастатического рака легких с использованием  $^{177}\text{Lu}$ -меченных микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  ( $^{177}\text{Lu}$ -МЧ) и цисплатина (CDDP) (А). Исследование биораспределения микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  (Б-В); Комбинированная терапия метастатического рака легких (Г-Д). Схема радиомечения микрочастиц  $\text{CaCO}_3$  типа «ядро-оболочка» терапевтическим изотопом  $^{225}\text{Ac}$  (Е). Распределение активности при введении изотопа в комплексе с микрочастицами (Ж).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы внесен общий вклад в развитие современной биологии и медицинской биофизики в области адресной доставки БАВ для целей диагностики и терапии различных форм ЗНО (от солидных новообразований до образования микрометастаз). Описанные в данной работе концепции позволили сформировать полноценную библиотеку данных по

выявлению физико-химических свойств и апробации нано- и микроносителей комплексного состава для доставки и высвобождения БАВ с целью повышения их биологической активности *in vitro* (в случае генетического материала: РНК, ДНК, CRISPR-Cas9) и *in vivo* (химиотерапевтические препараты цитостатического действия, диагностические и терапевтические радионуклиды). К наиболее значимым результатам работы можно отнести следующее:

1. На базе литературных данных и разработанных автором методик синтеза были получены нано- и микроносители комплексного состава с возможностью варьирования размера частиц, их формы, заряда на поверхности для инкапсуляции и высвобождения определённого типа БАВ с целью конкретного биологического применения. Размеры и формы частиц были тщательно изучены в различных биологических состояниях, и в некоторых случаях были выявлены тенденции, которые можно использовать для интеллектуального проектирования носителей.

2. Разработаны и апробированы методики инкапсуляции различных типов БАВ в нано- и микроносители комплексного состава (от низкомолекулярных до высокомолекулярных, генетического материала и т. д.).

- Установлено, что методика инкапсуляции БАВ во многом определяется физическими свойствами данных соединений, а именно их молекулярным весом, растворимостью в воде, устойчивостью в биологических средах и т. д.
- Выявлено, что условия инкапсуляции БАВ могут влиять на биологическую активность инкапсулированных соединений, особенно это актуально в случае включения генетического материала (РНК, ДНК) в структуру нано- и микроносителей.

3. Проведен комплексный анализ по исследованию процессов высвобождения различных БАВ из нано- и микроносителей в биологических средах под воздействием физических и химических стимулов. Установлено, что ультразвуковое воздействие вызывает высвобождение БАВ в течение нескольких секунд, тогда как в случае светового воздействия степень и время высвобождения БАВ определяются типом светового воздействия и глубиной проникновения этого света как *in vitro*, так и *in vivo*. Продемонстрировано, что рН чувствительные нано- и микроносители способны осуществлять пролонгированное высвобождение БАВ после их захвата клеточными культурами. Установлены ключевые биологические факторы, оказывающие влияние на эффективность клеточного захвата и последующей трансфекции клеток в случае доставки генетического материала.

- Впервые проведено исследование по упаковке и доставке инструментов редактирования генома CRISPR-Cas9 с использованием гибридных капсул. За счет защиты CRISPR-Cas9 от внешних факторов биологической среды путем инкапсуляции в гибридные капсулы удалось

достигнуть высокой эффективности трансфекции (> 70%) и редактирования гена dTomato (> 25%).

- Впервые проведено системное исследование по выявлению влияния органических добавок в нано- и микроносители на эффективность трансфекции клеток. В частности установлено, что совместная инкапсуляция плазмидной ДНК с ингибитором ДНК II приводит к увеличению эффективности трансфекции с 10% до 55%.

4. Физико-химические характеристики (размер, заряд поверхности, морфология частиц нано- и микроносителей) полностью определяют механизмы клеточного захвата. Дополнительная модификация частиц полимерной оболочкой оказывает действие на связывание с рецепторами на поверхности клеток-мишеней. Такое связывание активирует или, наоборот, блокирует определенные цепочки регуляторных биохимических реакций напрямую. Также тип механизма клеточного захвата частиц (эндоцитоз, фагоцитоз и макропиноцитоз) определяют скорость высвобождения БАВ и его биологическую активность, что особенно важно в случае РНК/ДНК и инструментов генетического материала CRISPR-Cas9.

5. Показаны закономерности влияния типа и структуры материала нано- и микроносителей на жизнеспособность клеточных культур.

- Установлено, что токсичность может меняться в зависимости от типа клеток: молельные иммортализованные клеточные культуры проявляют более устойчивую резистентность к нано- и микроносителям по сравнению с первичными клетками человека.
- Показано, что пассивный транспорт носителей БАВ в клетку недостаточно эффективен или сопряжен с токсичностью для нецелевых клеток. Часть этих БАВ характеризуется тем, что их действие может происходить только в строго определенном компартменте клеток. К ним можно отнести, генотерапевтические препараты на основе ДНК. Другая часть представляет собой БАВ, действие которых наиболее эффективно в определенном компартменте, например, фотосенсибилизаторы и радионуклиды, излучающие частицы с малой длиной пробега. Представлена полноценная библиотека данных по биораспределению различных нано- и микроносителей в животном организме, полученных с использованием различных методов визуализации. Для этого была осуществлена дополнительная модификация поверхности носителей диагностическими агентами. Некоторые носители за счет использования материала, из которого они синтезированы, сами обладают уникальными оптическими свойствами для оптических систем визуализации.
- Установлено, что тип введения нано- и микроносителей является одним из ключевых факторов, который отвечает за их дальнейшее биораспределение. Физико-химические характеристики (размер, заряд поверхности, морфология частиц нано- и микроносителей) полностью определяют биораспределение частиц и их накопление в органах-мишенях. При

локальном введении частицы локализуются в области опухолевого роста. В случае системного (внутривенного) введения используемые носители инертны к клеткам иммунной системы без их агрегации в плазме крови и обладают максимально длительной циркуляцией в кровотоке.

6. Показана принципиальная возможность использования нано- и микроносителей БАВ для радионуклидной терапии, химиотерапии и комбинированной терапии ЗНО.

- Показано, что при локальном введении нано- и микроносителей эффективность терапии ЗНО определяется возможностью максимального распределения терапевтического агента внутри опухолевого очага с минимальным высвобождением в другие нецелевые органы. Пролонгированное высвобождение лекарственного препарата позволяет постоянно поддерживать необходимую дозу препарата в опухолевом узле.
- При системном введении нано- и микроносителей необходимо дополнительно модифицировать поверхность носителей для их защиты от клеток иммунной системы.
- В случае радионуклидной терапии использование нано- и микроносителей на основе частиц  $\text{CaCO}_3$ , покрытых белковой оболочкой, позволяет инкапсулировать ряд терапевтических изотопов для терапии ЗНО, удерживая продукты распада изотопов, что снижает ряд побочных эффектов от применения данной терапии, особенно в случае использования альфа-эмиттеров ( $^{225}\text{Ac}$ ).
- Показано, что использование нано- и микроносителей на основе полимерных капсул в целом позволяет повысить эффективность терапии на более, чем 40% по сравнению со стандартной химиотерапией.
- Комбинированная терапия с применением разного типа механизма противоопухолевого воздействия позволяет существенно повысить эффективность лечения по сравнению с терапией в моно-режиме и ингибировать рост как солидного новообразования, так и распространения метастаз.

С точки зрения прикладной науки полученные результаты расширили возможное применение систем доставки БАВ на основе нано- и микроносителей для диагностики и терапии различных форм ЗНО. Для фундаментальной науки установленные закономерности и представленные научные выводы могут быть в дальнейшем применены для дизайна и модификации новых нано- и микроносителей БАВ с улучшенными характеристиками, изучения новых уникальных биологических процессов, протекающих внутри клетки и животном организме. Полученные данные могут быть использованы для последующего проведения доклинических испытаний, а перечень характеристик структурных и биохимических свойств опухоли, полученных в результате работы, могут быть использованы для рекомендаций по формированию групп риска, алгоритма диагностики, отбора и подготовки больных с целью их включения в клинические исследования с отработанной схемой лечения.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- [1] Y. Zhu, R. Zhao, L. Feng, C. Wang, S. Dong, M. V. Zyuzin, A. Timin, N. Hu, B. Liu, P. Yang, Dual Nanozyme-Driven PtSn Bimetallic Nanoclusters for Metal-Enhanced Tumor Photothermal and Catalytic Therapy, *ACS Nano*. 17 (2023) 6833–6848. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00423>.
- [2] O.O. Peltek, T.E. Karpov, A. Rogova, A. Postovalova, E. Ageev, A. Petrov, D. Antuganov, A.A. Stanzhevsky, D.N. Maistrenko, D. Zuev, A.R. Muslimov, A.S. Timin, M. V. Zyuzin, Development of Nanocarrier-Based Radionuclide and Photothermal Therapy in Combination with Chemotherapy in Melanoma Cancer Treatment, *ACS Appl Mater Interfaces*. 15 (2023) 13460–13471. <https://doi.org/10.1021/acsaami.2c20619>.
- [3] A.S. Timin, A.S. Postovalova, T.E. Karpov, D. Antuganov, A.S. Bukreeva, D.R. Akhmetova, A.S. Rogova, A.R. Muslimov, S.A. Rodimova, D.S. Kuznetsova, M. V. Zyuzin, Calcium carbonate carriers for combined chemo- and radionuclide therapy of metastatic lung cancer, *Journal of Controlled Release*. 344 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.02.021>.
- [4] H. Bahrom, A.A. Goncharenko, L.I. Fatkhutdinova, O.O. Peltek, A.R. Muslimov, O.Yu. Koval, I.E. Eliseev, A. Manchev, D. Gorin, I.I. Shishkin, R.E. Noskov, A.S. Timin, P. Ginzburg, M. V. Zyuzin, Controllable Synthesis of Calcium Carbonate with Different Geometry: Comprehensive Analysis of Particle Formation, Cellular Uptake, and Biocompatibility, *ACS Sustain Chem Eng*. 7 (2019) 19142–19156. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05128>.
- [5] Y. V. Tarakanchikova, D.S. Linnik, T. Mashel, A.R. Muslimov, S. Pavlov, K. V. Lepik, M. V. Zyuzin, G.B. Sukhorukov, A.S. Timin, Boosting transfection efficiency: A systematic study using layer-by-layer based gene delivery platform, *Materials Science and Engineering: C*. 126 (2021) 112161. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112161>.
- [6] A.R. Muslimov, D.O. Antuganov, Y. V. Tarakanchikova, M. V. Zhukov, M.A. Nadporojskii, M. V. Zyuzin, A.S. Timin, Calcium Carbonate Core–Shell Particles for Incorporation of  $^{225}\text{Ac}$  and Their Application in Local  $\alpha$ -Radionuclide Therapy, *ACS Appl Mater Interfaces*. 13 (2021) 25599–25610. <https://doi.org/10.1021/acsaami.1c02155>.
- [7] D.S. Linnik, Y. V. Tarakanchikova, M. V. Zyuzin, K. V. Lepik, J.L. Aerts, G. Sukhorukov, A.S. Timin, Layer-by-Layer technique as a versatile tool for gene delivery applications, *Expert Opin Drug Deliv*. 18 (2021) 1047–1066. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1879790>.
- [8] A.G. Pershina, O.Ya. Brikunova, A.M. Demin, M.A. Abakumov, A.N. Vaneev, V.A. Naumenko, A.S. Erofeev, P. V. Gorelkin, T.R. Nizamov, A.R. Muslimov, A.S. Timin, D. Malkeyeva, E. Kiseleva, S. V. Vtorushin, I. V. Larionova, E.A. Gereng, A.S. Minin, A.M. Murzakaev, V.P. Krasnov, A.G. Majouga, L.M. Ogorodova, Variation in tumor pH affects pH-triggered delivery of peptide-modified magnetic nanoparticles, *Nanomedicine*. 32 (2021) 102317. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102317>.

- [9] A.R. Muslimov, D. Antuganov, Y. V. Tarakanchikova, T.E. Karpov, M. V. Zhukov, M. V. Zyuzin, A.S. Timin, An investigation of calcium carbonate core-shell particles for incorporation of  $^{225}\text{Ac}$  and sequester of daughter radionuclides: in vitro and in vivo studies, *Journal of Controlled Release*. 330 (2021) 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.008>.
- [10] T. V. Mashel, Y. V. Tarakanchikova, A.R. Muslimov, M. V. Zyuzin, A.S. Timin, K. V. Lepik, B. Fehse, Overcoming the delivery problem for therapeutic genome editing: Current status and perspective of non-viral methods, *Biomaterials*. 258 (2020) 120282. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120282>.
- [11] M. V. Zyuzin, D. Antuganov, Y. V. Tarakanchikova, T.E. Karpov, T. V. Mashel, E.N. Gerasimova, O.O. Peltek, N. Alexandre, S. Bruyere, Y.A. Kondratenko, A.R. Muslimov, A.S. Timin, Radiolabeling Strategies of Micron- and Submicron-Sized Core–Shell Carriers for *In Vivo* Studies, *ACS Appl Mater Interfaces*. 12 (2020) 31137–31147. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c06996>.
- [12] O.O. Peltek, A.R. Muslimov, M. V. Zyuzin, A.S. Timin, Current outlook on radionuclide delivery systems: from design consideration to translation into clinics, *J Nanobiotechnology*. 17 (2019) 90. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0524-9>.
- [13] A.S. Timin, O.O. Peltek, M. V. Zyuzin, A.R. Muslimov, T.E. Karpov, O.S. Epifanovskaya, A.I. Shakirova, M. V. Zhukov, Y. V. Tarakanchikova, K. V. Lepik, V.S. Sergeev, G.B. Sukhorukov, B. V. Afanasyev, Safe and Effective Delivery of Antitumor Drug Using Mesenchymal Stem Cells Impregnated with Submicron Carriers, *ACS Appl Mater Interfaces*. 11 (2019) 13091–13104. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b22685>.
- [14] M. V. Zyuzin, A.S. Timin, G.B. Sukhorukov, Multilayer Capsules Inside Biological Systems: State-of-the-Art and Open Challenges, *Langmuir*. 35 (2019) 4747–4762. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b04280>.
- [15] A. Trofimov, A. Ivanova, M. Zyuzin, A. Timin, Porous Inorganic Carriers Based on Silica, Calcium Carbonate and Calcium Phosphate for Controlled/Modulated Drug Delivery: Fresh Outlook and Future Perspectives, *Pharmaceutics*. 10 (2018) 167. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040167>.
- [16] A.S. Timin, M.M. Litvak, D.A. Gorin, E.N. Atochina-Vasserman, D.N. Atochin, G.B. Sukhorukov, Cell-Based Drug Delivery and Use of Nano-and Microcarriers for Cell Functionalization, *Adv Healthc Mater*. 7 (2018). <https://doi.org/10.1002/adhm.201700818>.
- [17] A.R. Muslimov, A.S. Timin, A. V. Petrova, O.S. Epifanovskaya, A.I. Shakirova, K. V. Lepik, A. Gorshkov, E. V. Il'inskaja, A. V. Vasin, B. V. Afanasyev, B. Fehse, G.B. Sukhorukov, Mesenchymal Stem Cells Engineering: Microcapsules-Assisted Gene Transfection and Magnetic Cell Separation, *ACS Biomater Sci Eng*. 3 (2017) 2314–2324. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.7b00482>.
- [18] A.S. Timin, A.R. Muslimov, A. V. Petrova, K. V. Lepik, M. V. Okilova, A. V. Vasin, B. V. Afanasyev, G.B. Sukhorukov, Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of

novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection, *Sci Rep.* 7 (2017) 102. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00200-0>.

[19] A.S. Timin, D.J. Gould, G.B. Sukhorukov, Multi-layer microcapsules: fresh insights and new applications, *Expert Opin Drug Deliv.* 14 (2017) 583–587. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1285279>.

[20] K. V. Lepik, A.R. Muslimov, A.S. Timin, V.S. Sergeev, D.S. Romanyuk, I.S. Moiseev, E. V. Popova, I.L. Radchenko, A.D. Vilesov, O. V. Galibin, G.B. Sukhorukov, B. V. Afanasyev, Mesenchymal Stem Cell Magnetization: Magnetic Multilayer Microcapsule Uptake, Toxicity, Impact on Functional Properties, and Perspectives for Magnetic Delivery, *Adv Healthc Mater.* 5 (2016) 3182–3190. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600843>.

[21] A.S. Timin, K. V. Lepik, A.R. Muslimov, D.A. Gorin, B. V. Afanasyev, G.B. Sukhorukov, Intracellular redox induced drug release in cancerous and mesenchymal stem cells, *Colloids Surf B Biointerfaces.* 147 (2016) 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.034>.

[22] A.S. Timin, H. Gao, D. V. Voronin, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, Inorganic/Organic Multilayer Capsule Composition for Improved Functionality and External Triggering, *Adv Mater Interfaces.* 4 (2017). <https://doi.org/10.1002/admi.201600338>.