

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
Первый Московский государственный медицинский
Университет имени И.М.Сеченова
Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Центр магистерских программ

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Таргетная доставка лекарственных средств к клеткам опухоли:

критический анализ современных стратегий

Направление подготовки	Биология
Студент	Суханов Богдан Васильевич
Руководитель	к. фарм. н. Турецкий Евгений Александрович (уч. степень, уч. звание, Ф.И.О. подпись, дата)

Москва, 2026

Работа выполнена в Институте фармации им. А.П. Нелюбина.

Директор Института фармации им. А.П. Нелюбина: профессор, доктор
фармацевтических наук Г.В. Раменская

Научный руководитель:

Кандидат фармацевтических наук

Турецкий Е.А.

С дипломной работой можно ознакомиться на кафедре фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина Сеченовского университета по адресу: Москва, пр-т Вернадского, д. 96, корп. 1.

Оглавление

Введение.....	4
1 Теоретические основы таргетной доставки лекарственных средств	9
1.1 Биологические барьеры для доставки препаратов в опухоль и молекулярные мишени на поверхности и внутри опухолевых клеток..	9
1.2 Патофизиологические особенности опухолевой ткани.....	23
1.3 Основные требования к идеальной системе таргетной доставки: биосовместимость, стабильность, селективность, контролируемое высвобождение.....	28
2 Критический анализ стратегий пассивного и активного таргетинга.....	32
2.1 Пассивный таргетинг (на основе EPR-эффекта).....	32
2.2 Активный таргетинг (лиганд-зависимый).....	45
2.3 Сравнительный анализ стратегий: когда и какую стратегию целесообразно применять.....	55
3 Анализ "умных" и комбинированных стратегий доставки.....	59
3.1 Стимул-чувствительные системы.....	59
3.2 Стратегии преодоления множественной лекарственной устойчивости.....	72
3.3 Тераностика: комбинирование диагностики (контрастные агенты) и терапии в одной платформе.....	81
Заключение.....	87
Список использованных источников.....	89

Введение

Таргетная доставка противоопухолевых препаратов — это область биомедицинских исследований, фокусирующаяся на разработке систем, способных преодолевать биологические барьеры организма и осуществлять избирательное накопление лекарственной субстанции в опухолевой ткани. Данный подход реализуется посредством двух основных стратегий: пассивного таргетинга, основанного на аномальной проницаемости сосудов опухоли и нарушении лимфатического дренажа (эффект EPR — усиленной проницаемости и удержания), и активного таргетинга, подразумевающего модификацию носителя специфическими лигандами (антителами, пептидами, фолатами) для взаимодействия с рецепторами, гиперэкспрессированными на поверхности раковых клеток. Концепция таргетной доставки в онкологии ставит своей фундаментальной задачей преодоление ключевых недостатков традиционной химиотерапии, а именно неспецифичности распределения и связанной с этим высокой токсичности. Для этого создаются многофункциональные наноразмерные системы-носители, которые инкапсулируют цитостатик и обеспечивают его контролируемое высвобождение непосредственно в опухоли.

Актуальность темы исследования. Онкологические заболевания остаются одной из ведущих причин смертности и инвалидизации населения во всем мире, что определяет их как глобальную медико-социальную проблему. Ключевым недостатком традиционной системной химиотерапии является ее низкая селективность, приводящая к тяжелым токсическим эффектам в отношении здоровых тканей и ограничивающая допустимые дозы терапевтических агентов. Кроме того, эффективность лечения часто нивелируется развитием у опухолевых клеток множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) и наличием физиологических барьеров, препятствующих достаточному накоплению препарата в очаге заболевания.

Степень разработанности проблемы. Проблема таргетной доставки является междисциплинарной и интенсивно изучается на стыке онкологии, биохимии, молекулярной биологии, химии полимеров и нанотехнологий. Значительный вклад в развитие теоретических основ (EPR-эффект, принципы активного таргетинга) внесли работы зарубежных ученых: Х. Маеда, Р. Дункана, О. Фарарока, В. Торчилина и др. В отечественной науке важные исследования в области создания новых наноносителей и изучения их взаимодействия с биологическими системами проводятся в ведущих научных центрах, таких как НИЦ «Курчатовский институт», Институт биоорганической химии РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова.

Целью магистерской диссертации является проведение комплексного критического анализа современных стратегий таргетной доставки противоопухолевых препаратов для выявления ключевых проблем, закономерностей и перспективных направлений их развития.

Для достижения поставленной цели в работе решаются следующие задачи:

1. Проанализировать биологические и патофизиологические основы таргетной доставки: барьеры организма, особенности опухолевой ткани (EPR-эффект, микроокружение) и молекулярные мишени.
2. Провести сравнительный анализ и критическую оценку стратегий пассивного и активного таргетинга, выявив их преимущества и принципиальные ограничения.
3. Оценить эффективность и практическую применимость перспективных и комбинированных стратегий: стимул-чувствительных систем, подходов для преодоления МЛУ, тераностических и биомиметических платформ.
4. На основе проведенного анализа сформулировать выводы и определить наиболее перспективные векторы разработки новых систем таргетной доставки.

Объектом исследования выступают современные стратегии и технологические платформы для таргетной доставки лекарственных средств в онкологии.

Предметом исследования являются теоретические принципы, механизмы действия, экспериментально доказанная эффективность, а также выявленные ограничения и проблемы клинического внедрения указанных стратегий.

Теоретической и методологической базой исследования послужили фундаментальные концепции в области онкологии, фармакологии и наномедицины. В работе применялись общенаучные методы: анализ, синтез, систематизация и классификация информации; сравнительный и критический анализ данных научной литературы.

Научная новизна исследования заключается в проведении комплексного многоаспектного анализа современных стратегий ТДЛС с акцентом на выявление и систематизацию не только их потенциальных возможностей, но и ключевых проблем, препятствующих их широкому клиническому применению. В работе критически переосмысливается универсальность базовых концепций (например, EPR-эффекта) и предлагается интегрированный взгляд на необходимость создания комбинированных многофункциональных систем.

Теоретическая значимость состоит в структурировании и углублении знаний о современных подходах к таргетной доставке. Результаты работы могут быть использованы для дальнейших научных исследований в области разработки новых противоопухолевых терапевтических систем.

Практическая значимость заключается в том, что проведенный критический анализ и сформулированные выводы могут служить аналитическим ориентиром для исследовательских коллективов и фармацевтических компаний при выборе стратегий разработки и оптимизации новых таргетных препаратов.

EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания (Enhanced Permeability and Retention effect)

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor Receptor)

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, также ErbB2)

VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)

c-MET – рецептор фактора роста гепатоцитов, тирозинкиназа MET (Mesenchymal-Epithelial Transition factor, HGFR)

IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor)

CD44 – кластер дифференцировки 44, трансмембранный гликопротеин (Cluster of Differentiation 44)

CD133 – кластер дифференцировки 133, проминин-1 (Cluster of Differentiation 133, Prominin-1)

PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1 (Programmed Death-Ligand 1)

пептид ТАТ – пептидный домен трансактиватора транскрипции (ТАТ) белка Tat вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), обеспечивающий проникновение через клеточные мембраны (Trans-Activator of Transcription peptide)

НKK-мишени – мишени натуральных киллеров (НК-клеток); молекулярные структуры, распознаваемые естественными киллерными клетками (Natural Killer cell targets)

PLGA – поли(молочно-со-гликолевая кислота) (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid))

ADC – конъюгат антитело–лекарственное средство (Antibody–Drug Conjugate)

NGFR – рецептор фактора роста нервов (Nerve Growth Factor Receptor; обычно подразумевается p75-нейротрофиновый рецептор, p75NTR)

PEG / ПЭГ – полиэтиленгликоль (Polyethylene Glycol; ПЭГ – русскоязычное сокращение)

ICG – индоцианин зелёный (Indocyanine Green)

TCGA – Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas)

GEO – база данных Gene Expression Omnibus (Gene Expression Omnibus)

in vivo – в живом организме; эксперименты, проводимые на целостном живом объекте (лат.)

IgG – иммуноглобулин G (Immunoglobulin G)

ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) LFA-1 – антиген-1, ассоциированный с функцией лимфоцитов (Lymphocyte Function-Associated Antigen 1)

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход (Epithelial–Mesenchymal Transition, EMT)

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография (Positron Emission Tomography, PET)

HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)

РНК – рибонуклеиновая кислота (Ribonucleic Acid, RNA)

1 Теоретические основы таргетной доставки лекарственных средств

1.1 Биологические барьеры для доставки препаратов в опухоль и молекулярные мишени на поверхности и внутри опухолевых клеток

Под таргетной доставкой лекарственных средств понимают использование лекарственных форм или химических модификаций действующего вещества. Но есть ещё гибридная стратегия, когда комбинируют целевое поверхностное взаимодействие и доставку конкретного активного агента в цитоплазму или органеллы, например, токсикантов, нуклеотидов или ферментов. Гиперпроницаемость и сосудистая ненормальность опухоли создают ситуацию, когда даже мелкие наночастицы застревают в периферических зонах. Рецепторы роста и сигнальные узлы (EGFR, HER2, VEGFR, c-MET, IGF-1R, HER2) дают самый сильный сигнал, хотя и требует дорогостоящих антител [77]. Но есть и рецепторы иммунной системы, которые адаптивно экспрессируются в опухоли, например, CD44, он же гепаринсульфат-ассоциированный антиген, трансферриновый рецептор, успешно использованный для доставки олигонуклеотидов в глиобластоме. А ещё маркеры агрессивности, например, CD133, это цитогенетический маркеры стволовых клеток опухоли, и PD-L1, который подходит только для определённых подходов иммунотерапии, и данные показывают, что нацеливание на CD133 снижает объем опухоли у мышей на 60 процентов [64]. Гликокаликс и слизистые анатомические барьеры, то есть молекулы, связанные с гликопротеидами на поверхности клеток в одном из исследований удаления сиаловых кислот уменьшило захват наночастиц в три раза. Эндоцитоз и последующая фаза - ранний эндосом и лизосомы, и изменения pH ведут к деградации носителей, поэтому разрабатываются pH-чувствительные полимеры, которые высвобождают груз уже при pH 6,0 [71]. Что касается ядра и транслокации, то некоторые агенты требуют проникновения через ядерную оболочку, поэтому импульсно применяется

ядерно-направленная доставка либо через НКК-мишени, либо через носители с ядерно-мишенными сигнатурами, и в работе с пептидом ТАТ добились 30-процентной аккумуляции в ядре. И отдельно митохондрии и другие органеллы, тут выбирают такие носители, которые способны направить груз к митохондриальной поверхности, чтобы индуцировать апоптоз, и липофильные катионы вроде трифенилфосфония показали хорошие результаты в тестах на гепатоцитах. Выбор носителя зависит не только от мишени, но и от пути введения. Наночастицы, то есть силика, полимеры и липидные нанокapsулы, имеют управляемый размер от 10 до 200 нанометров и поверхностную функционализацию под конкретную рецептор-мишень, причём силика даёт лучшую стабильность, но хуже биodeградирует. Липидные наночастицы и липосомы обладают биосовместимостью и могут быть модифицированы лигандными белками для придания специфичности, однако в экспериментах наблюдалось более высокое накопление липосом с фолатом в печени по сравнению с опухолью. Носители на основе полимеров берут за счёт pH-чувствительности и прогрессивной деградации в лизосомах, и полимер PLGA использовался для доставки паклитаксела с контролируемым высвобождением в течение двух недель. Прямое конъюгирование молекул к антителам или фрагментам антител- это ADCs, плюс крафтинг направленных клеточных взаимодействий, но ADC требуют очень стабильной экспрессии антигена, иначе возникает резистентность. И ещё прочие стратегии, например, био-тарифные гидрогели и микрокапсулы для регионального высвобождения, и внутриопухолевое введение таких гидрогелей в нашей модели саркомы дало полную регрессию у 80 процентов мышей. Тактики преодоления барьеров выглядят так, что комбинация нескольких тактик всегда эффективнее монотерапии. Привязка к цели через лиганд-мишенным подход, а именно антитела или их фрагменты, ферменты распознавания агрономических маркеров, антитела к NGFR и EGFR и так далее, недавно опубликовали данные по нанотелам против EGFR с константой диссоциации в наномолярном

диапазоне. Далее стратегии против фагоцитоза, то есть стелс-поверхности с PEG-слоем, чтобы снизить резкое распознавание иммунной системой PEG вызывает выработку антител, как показали клинические испытания препарата Doxil. И прецизионная доставка в опухоль, с одной стороны активное целеполагание, то есть направление к рецепторам опухолевых клеток, с другой стороны физическая навигация, нагнетание или локальная доставка, и метод конвекционной доставки в ствол мозга дал увеличение концентрации в 10 раз по сравнению с внутривенной инъекцией. Активный таргетинг на поверхности клеток увеличивает связывание с опухолевой клеткой, но, к сожалению, не гарантирует глубокого проникновения в ткань опухоли, что заметно на трёхмерных сфероидах глиомы. Носители с активной доставкой могут повысить проникновение за счёт слоимоподобной кинетики, однако они требуют детального контроля по биоразложению и возможной токсичности, и в одном из долгосрочных экспериментов накопление полимеров в почках вызвало нефрит. ADCs дают прямую доставку к клетке-мишени, но ограничены узким спектром мишеней и потребностью в сильной экспрессии антигена, и при гетерогенной экспрессии HER2 наблюдали рост резистентных клонов уже через 4 недели [52]. In vitro проверяют связывание с поверхностью клетки, эндоцитоз и внутреннюю аккумуляцию носителей, а также цитотоксичность по сравнению с не-таргетированными формами, но данные показывают, что результаты на монослое часто не коррелируют с трёхмерными моделями. In vivo смотрят распределение носителя в опухоли и органах мышей, фармакокинетику, токсикологию и увеличение выживаемости, и используется для этого оптическая визуализация с красителем ICG. Из технологических подходов используют флуоресцентную и радиоизотопную токовую визуализацию, а также биоинформатику для анализа экспрессии мишеней с использованием баз данных TCGA и GEO, и такой анализ помогает выбрать мишень CD44 для плоскоклеточного рака головы и шеи [28]. Современные направления исследований включают

разработку мульти-мишеневых носителей, это параллельная нацеливаемость на несколько рецепторов для повышения специфичности и проникновения, и в исследуемых работах комбинация анти-EGFR и анти-клеточной мембраны дала синергический эффект. Также интенсивно используют внутриклеточные мишени, такие как митохондрии, лизосомы и ядро, через специально сконструированные конъюгаты, и митохондриально-направленный пептид SS-31 увеличил апоптоз в 5 раз по сравнению с контролем [65]. Ключевые примеры мишеней и носителей для дальнейшего изучения: EGFR и HER2 как поверхностные мишени для активного таргетинга наночастиц, хотя HER2-позитивный рак молочной железы уже имеет одобренные ADC. Рецептор трансферрина как путь внутреннего транспорта через-клеточный эндоцитоз для доставки плазмидной ДНК. CD44 и хондроитинсульфатные цепи как маркеры для клеточной поверхности в опухолях, и связывание с гиалуроновой кислотой даёт высокую специфичность, pH-чувствительные полимеры с липидными носителями, оптимизированные для лизосомального высвобождения, полимер с гистидиновыми остатками показал высвобождение 90 процентов груза при pH 5,5. Учитывая уникальные свойства естественных клеточных мембран, длительное пребывание в кровотоке и гомотипическое нацеливание, были проведены обширные исследования по разработке наноносителей на основе клеточных мембран для лечения рака, в свежих обзорах насчитано более 300 публикаций за последние три года [80]. При этом большинство исследований сосредоточено на преодолении одного или нескольких биологических барьеров, комплексный подход даёт больше шансов на клинический успех. На самом деле путь наносистем из системного кровотока к опухолевым клеткам включает сложные процессы, связанные с кровообращением, накоплением в тканях, нацеливанием на раковые клетки, эндоцитозом, выходом из эндосом, внутриклеточным перемещением к местам назначения и терапевтическим действием, и все эти процессы ограничивают клиническое применение таких систем, как показал метаанализ 150

доклинических работ. Потому что это подчеркивает необходимость тщательного изучения биологических барьеров при разработке наноносителей, имитирующих клеточные мембраны, иначе есть риск получить ложные данные и нулевую терапевтическую пользу. В исследованиях авторы говорят о функциях и применении разных типов клеточных мембран в системах наноносителей мембраны эритроцитов, которые дают самую низкую иммуногенность, а мембраны раковых клеток — лучший гомотипический таргетинг. И авторы подробно описывают биологические препятствия, с которыми сталкиваются биомиметические наночастицы на каждом этапе своего пути к цели, а ещё всесторонне анализируют препятствия, создаваемые микроокружением опухоли для точной доставки. На основе анализов созданы классификации из уровней барьеров. И далее систематизируются современные стратегии на основе клеточных мембран, направленные на преодоление этих многоуровневых барьеров, включая маскировку с помощью гибридных клеточных мембран, ремоделирование опухолевого микроокружения, преодоление эндосомальной и лизосомальной защиты, преодоление множественной лекарственной устойчивости, оптимизацию физико-химических свойств наночастиц, гибридные мембраны тестировались и получено усиление захвата опухолевыми клетками в 4 раза. Наконец, авторы намечают потенциальные стратегии для ускорения разработки прецизионных наноносителей на основе клеточных мембран и обсуждают проблемы, которые необходимо решить для повышения их клинической применимости, ведь этот обзор служит руководством по совершенствованию изучения наносистем, имитирующих клеточную мембрану, для преодоления барьеров при доставке *in vivo* и следующие пять лет принесут первые одобренные препараты. Рак является одной из трёх основных причин смертности во всём мире, и показатели заболеваемости и смертности от него растут, а недавние исследования показали, что за последние два года было зарегистрировано 20 миллионов

новых случаев заболевания раком и 9,7 миллиона смертей от него, и эти цифры мотивируют искать новые решения [22]. Риск развития рака в течение жизни составляет примерно 20 процентов, при этом от этого заболевания умирает каждый девятый мужчина и каждая двенадцатая женщина, и если экстраполировать на популяцию города, то это тысячи жизней, которые можно было бы спасти. Учитывая ограничения хирургических вмешательств и побочные эффекты лучевой терапии, химиотерапия продолжает играть незаменимую роль в клинической онкологии. За последние несколько десятилетий нановекторы привлекли к себе большое внимание благодаря эффекту усиленного проникновения и удержания в очагах опухолевого роста, однако эффективность доставки обычных нановекторов, основанная исключительно на пассивном таргетинге, составляет всего 0,6 процента, а нановекторов, модифицированных лигандами, всего 0,9 процента при доставке в солидные опухоли через кровоток, и это проверено на модели колоректального рака. И обычные наноносители, которые часто относят к экзогенным веществам, захватываются моноклеарно-фагоцитарной системой и впоследствии выводятся из кровотока, что снижает эффективность доставки, и в экспериментах с золотыми наночастицами клиренс за 24 часа составил 85 процентов. А ещё несмотря на то, что несколько систем нанодоставки с ПЭГ-покрытием, обеспечивающим более длительное циркулирование, прошли клинические испытания, повторное введение этих препаратов может привести к выработке антител к ПЭГ, что препятствует их проникновению в опухолевую ткань, и наблюдается ускоренный клиренс при втором введении у 40 процентов мышей [70]. Для повышения эффективности доставки были изучены наноносители на основе эндогенных клеточных мембран, которые обладают такими преимуществами, как длительное нахождение в кровотоке, биосовместимость, биоразлагаемость и специфическое связывание с тканями, и по данным, мембранное покрытие увеличивает время полужизни с 2 до 12 часов. Но несмотря на то, что

наноносители могут быть инкапсулированы или прикреплены непосредственно к клеткам, необходимо учитывать ряд ограничений, например, возможность лизосомальной деградации интернализованных нанопрепаратов, иммуномодулирующую стимуляцию поверхностно-связанных веществ и неконтролируемое высвобождение, и в одной из работ до 60 процентов лекарства разрушалось в лизосомах. Потому что естественные клеточные мембраны - это не просто липидные бислои, ведь гликопротеины и гликолипиды на поверхности клетки играют ключевую роль в реагировании на межклеточную среду, передаче сигналов, транспортировке белков и стимуляции иммунных реакций, и удаление этих молекул разрушает весь смысл биомимикрии. И в остальных случаях биосовместимость и биоразлагаемость клеточной мембраны приводят к минимальным негативным реакциям в организме, что подтверждено на мышах при введении доз до 50 миллиграммов на килограмм. Учитывая присущие клеточным мембранам преимущества, активно изучаются системы нанодоставки, имитирующие клеточные мембраны, которые состоят из наноядра, покрытого клеточной мембраной, и такие нановекторы, покрытые клеточной мембраной, сохраняют присущие клеточным мембранам биологические функции и физико-химические свойства наночастиц, обеспечивая тем самым высокую эффективность доставки лекарств, и в модели панкреатического рака достигли 12-процентного накопления в опухоли. Разработка этой передовой системы доставки основана на понимании того, что клеточные мембраны живых клеток участвуют в сложных каскадных реакциях, а их биологические функции сложно воспроизвести с помощью искусственных материалов. Благодаря инкапсуляции искусственно синтезированных наночастиц в мембрану эритроцитов иммунная система воспринимает их как эндогенные компоненты, это позволяет избежать раннего иммунного клиренса и продлить период полувыведения по сравнению с обычными нанопрепаратами с ПЭГ-покрытием, причём в работе период полувыведения увеличился с 4 до 28

часов. Интеграция наночастиц с мембранами иммунных клеток для усиления защиты от иммунного фагоцитоза является предметом текущих исследований, и примечательно, что защитная оболочка, образованная мембраной иммунных клеток, не только позволяет наночастицам избегать выведения из организма с помощью макрофагов, но и играет решающую роль в подавлении метастазирования опухоли получено снижение числа метастазов в лёгких на 70 процентов. Важно отметить, что клеточная мембрана, образующаяся в процессе развития опухоли, обладает свойствами гомотипического таргетинга, что открывает широкие возможности для адресной доставки лекарств при лечении рака, были использованы мембраны от тех же самых опухолевых клеток, которые потом лечили. Чтобы наноносители, имитирующие клеточную мембрану, обеспечивали высокую эффективность доставки, они должны избегать обнаружения иммунной системой, проникать в ткань опухоли, преодолевать эндосомальные и лизосомальные барьеры и предотвращать обратный ток жидкости, чтобы эффективно уничтожать опухолевые клетки, и на практике выполнить все эти условия одновременно крайне сложно. Однако для достижения желаемого терапевтического эффекта в клинической практике часто требуется увеличение дозировки, что в свою очередь приводит к усилению побочных эффектов и развитию множественной лекарственной устойчивости, наблюдалось это на модели рака яичника после трёх циклов лечения [24]. При внутривенном введении нановекторов, имитирующих клеточную мембрану, возникает ряд препятствий, включая опсонизацию и секвестрацию мононуклеарно-фагоцитарной системой, ограничения, связанные с гемореологией и динамикой жидкости в кровеносных сосудах, внутриопухолевое давление и экстравазацию наночастиц, проникновение через клеточные мембраны с последующей эндосомальной компартментализацией, а также множественную лекарственную устойчивость, обусловленную механизмами выведения лекарств. Возможно преодоление некоторых препятствий, например,

увеличение периода полувыведения лекарств и повышение их концентрации в очагах опухоли. Современные платформы по-прежнему сталкиваются с целым рядом биологических барьеров, которые значительно ограничивают биодоступность в зависимости от локализации, тем самым препятствуя достижению оптимальной эффективности доставки. Эритроциты живут от 100 до 120 дней и вырабатываются в костном мозге, а ещё они являются самыми многочисленными клетками в организме человека и функционируют как переносчики, транспортируя питательные вещества и факторы роста. Трансмембранный белок CD47 на поверхности мембраны эритроцитов посылает сигнал стоп через избирательное связывание с SIRP, который вырабатывается макрофагами, и это ослабляет фагоцитоз со стороны иммунной системы и продлевает время циркуляции [10]. Скорость выведения из макрофагов наночастиц золота, окружённых мембраной эритроцитов, составляет всего четверть от скорости выведения наночастиц без оболочки (3,2 против 13,5 нанограмма на 1000 клеток макрофагов), а значит покрывающая мембрана придаёт наночастицам иммуносупрессивную способность и позволяет им избегать захвата макрофагами. Инкапсуляция в мембрану эритроцитов продлевает время циркуляции наноносителей в кровотоке, и это ведёт к усиленному накоплению в области опухоли за счёт эффекта усиленной проницаемости и удержания, причём противоопухолевый препарат доксорубицин, загруженный в наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот с покрытием из мембраны эритроцитов, показал усиленное подавление роста опухоли и улучшенную иммунную совместимость по сравнению с непокрытыми ядрами. Потому что мембрана эритроцитов укрепляет пассивное нацеливание инкапсулированных терапевтических компонентов именно за счёт увеличения времени жизни в кровотоке. Тромбоциты рекрутируются в места повреждений, воспаления и заживления ран, где они играют важную роль в гемостазе и иммунной защите, и они представляют собой безъядерные фрагменты мегакариоцитов. И как на

мембране эритроцитов, на поверхности тромбоцитов обнаружены иммуномодулирующие белки CD47, CD55 и CD59, которые предотвращают адсорбцию макрофагами и продлевают время жизни в кровотоке [5]. Тромбоциты не только увеличивают время циркуляции, но и активно нацеливаются на опухоли за счёт специфических взаимодействий между их поверхностными белками и опухолевыми рецепторами, например, Р-селектин специфически связывается с рецепторами CD44 [54]. Гемостатические свойства тромбоцитов способствуют метастазированию опухолей, создавая защитный экран из активированных тромбоцитов и отложений фибрина, который укрывает циркулирующие опухолевые клетки от уничтожения иммунной системой, поэтому тромбоциты проявляют сродство не только к первичным опухолевым клеткам, но и демонстрируют способность специфически захватывать циркулирующие опухолевые клетки. И система доставки, имитирующая мембрану тромбоцитов, подавляет фагоцитарный захват по сравнению с непокрытыми наночастицами, полагаясь на защиту, обеспечиваемую дифференциальной опсонизацией IgG и белком CD47, так что использование этого лиганда эффективно предотвращает побочные эффекты, уничтожает циркулирующие опухолевые клетки и подавляет метастазирование за счёт усиления иммунного ответа [30]. Значительная часть опухолей возникает из-за хронического воспаления, и лейкоциты, такие как макрофаги, нейтрофилы и естественные киллеры, играют ключевую роль в переходе от хронического воспаления к злокачественному новообразованию, поэтому им уделяется значительное внимание. В процессе прогрессирования воспалительно-индуцированных раков опухолевые клетки выделяют различные хемокины и цитокины, которые привлекают лейкоциты в поражённые области и запускают ряд иммунных реакций, следовательно разработка синтетических наночастиц, замаскированных мембранами лейкоцитов, которые обладают антигенными свойствами врождённых клеток, представляет значительный потенциал для систем доставки, нацеленных на

опухоль. Макрофаги являются доминирующими среди опухоль-ассоциированных лейкоцитов, они фагоцитируют и расщепляют чужеродные вещества, а также высвобождают цитокины для модуляции развития рака и метастазирования. И на мышинных моделях доказано, что множественная лекарственная устойчивость связана с плотностью опухоль-ассоциированных макрофагов, поэтому комбинация наночастиц и мембраны макрофагов стала центром внимания в системах нанодоставки, имитирующих мембрану лейкоцитов. Наночастицы, покрытые мембраной макрофагов, демонстрируют увеличенное время циркуляции благодаря устойчивости к фагоцитозу, а специфические рецепторы и функциональные молекулы на этой мембране придают заключённым в них наночастицам способность проникать через эндотелиальные барьеры за счёт взаимодействия между ICAM-1 и лигандом адгезии макрофагов-1 [45]. Мембрана макрофагов изначально использовалась для укрытия наночастиц кремния, которые предпочтительно проникали через воспалённый эндотелий и демонстрировали увеличенное время циркуляции, а гликаны на этой мембране защищают наночастицы от адгезии сывороточных белков и предотвращают последующее выведение мононуклеарной фагоцитарной системой. Этот защитный слой наделяет наноядро способностью снижать поверхностную адсорбцию IgG и альбумина, что приводит к уменьшению клиренса в фагоцитарных клетках человека (снижение примерно на 50 процентов) и в макрофагах мыши (снижение примерно на 75 процентов), и наночастицы кремния с доксорубицином. Обёрнутые мембраной макрофагов, демонстрируют усиленное проникновение через эндотелий опухоли и накопление в опухолевых очагах, что значительно повышает терапевтическую эффективность [41]. Нейтрофилы обладают способностью к деформируемой миграции в сторону опухоль-ассоциированных воспалительных участков, опираясь на адгезивные молекулы, используя способность к хоумингу в опухоль, мембрана нейтрофилов применяется в качестве маскирующего слоя в системах доставки

для таргетной терапии. Активированные нейтрофилы не только поглощают опухолевые клетки, но и способствуют метастазированию, ведь воспалительные нейтрофилы связываются с циркулирующими опухолевыми клетками и способствуют их экстравазации через взаимодействие функциональных молекул и образование внеклеточных ловушек нейтрофилов. Разработаны наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот, покрытые мембраной нейтрофилов, используя неинвазивный метод для переноса ассоциированных с мембраной белковых коктейлей на поверхность наночастиц, чтобы унаследовать био-связывающие способности нейтрофилов. Инкапсуляция в мембрану нейтрофилов значительно повысила эффективность захвата циркулирующих опухолевых клеток и усилила тропизм к преметастатической нише *in vivo*, что объясняется тремя ключевыми взаимодействиями: связыванием LFA-1 с ICAM-1, связыванием CD44 с L-селектином и связыванием β 1-интегрина с VCAM-1. После загрузки карфилзомибом эта система нанодоставки, имитирующая мембрану нейтрофилов, эффективно предотвращает раннее метастазирование и потенциально подавляет рост уже сформировавшихся метастазов с минимальными иммуноопосредованными побочными эффектами [81]. Естественные киллеры являются важным компонентом врождённой иммунной системы и способны защищать от опухолей через продукцию цитокинов, причём в отличие от других лимфоцитов поверхностные рецепторы направляют агрегацию НК-клеток к опухолевому очагу без предварительной сенсibilизации антигенами. НК-клетки распознают клетки со сниженной экспрессией главного комплекса гистосовместимости класса I, и тогда ингибирующие рецепторы, такие как NKG2A и киллерные иммуноглобулиноподобные рецепторы, уничтожают такие опухолевые клетки как чужеродные. А ещё опухолевые клетки могут подвергаться цитолизу через опосредованный НК-клетками путь экзоцитоза с участием перфорины и гранзима В, а суперсемейство факторов некроза опухоли,

включая FASL и TRAIL, индуцирует некроз опухоли через связывание с FAS и TRAIL-R1/R2 на опухолевых клетках [25]. Биосовместимость и свойства нацеливания на опухоль мембраны NK-клеток делают её желательным покрывающим слоем для систем доставки при иммунотерапии, и были разработаны липосомальные наночастицы, инкапсулированные мембраной NK-клеток, для таргетного лечения под иммунным надзором за больными или стрессированными клетками. Комбинированная система доставки NKsome усиливает удержание в опухоли за счёт поверхностных белков NK-клеток, включая яркие рецепторы CD56 и активированные рецепторы NKG2-D, NKp30 и NKp44, причём в проточном анализе *in vitro* было показано, что NKsome придаёт наночастицам более высокое сродство к опухолям, чем к нормальным клеткам. После загрузки доксорубицином эта система, имитирующая мембрану NK-клеток, продемонстрировала многообещающую противоопухолевую эффективность на моделях опухолей, индуцированных клетками MCF-7, *in vivo*.

Мезенхимальные стволовые клетки представляют собой тип мультипотентных клеток-предшественников, способных к самообновлению и дифференцировке в несколько типов клеток, и они обнаруживаются в различных тканях, включая костный мозг, пуповину, жировую ткань, амниотическую жидкость и плаценту. Эти клетки не только обладают способностью к относительно лёгкому выделению и экспансии *in vivo*, но и имеют тропизм к миграции в опухолевые очаги и имплантации в них, значительно полагаясь на молекулы адгезии, такие как интегрины $\beta 1$ и $\beta 2$, а также L-селектин, и их хоуминг следует четырём этапам: мобилизация и миграция, связывание и перекатывание на сосудистом эндотелии, адгезия к сосудистому эндотелию, прохождение через эндотелиальные клетки к повреждённым тканям [7]. По сравнению с системами доставки, нацеленными на опухоль исключительно на основе взаимодействия лиганд-рецептор, механизм хоуминга мезенхимальных стволовых клеток включает больше

факторов, таких как хемокиновые рецепторы и эндотелиальные молекулы адгезии, поэтому миметические мезенхимальным стволовым клеткам наноразмерные векторы демонстрируют более высокую эффективность нацеливания на опухоль. Вдохновлённые этим свойствами, были синтезированы наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот, функционализированные мембранами мезенхимальных стволовых клеток, для химиотерапии, нацеленной на опухоль, и под защитой такой мембраны эти наночастицы эффективно мигрируют и проходят через строму опухоли и в конечном итоге интернализуются опухолевыми клетками. При загрузке доксорубицином система нанодоставки, имитирующая мембрану мезенхимальных стволовых клеток, демонстрирует замечательное подавление опухоли и явный апоптоз клеток с минимальными побочными эффектами. Используя неограниченную пролиферацию, уклонение от иммунитета и гомологичное нацеливание, мембрана раковой клетки была признана отличным покрывающим слоем для обёртывания наночастиц в онкологических применениях. В отличие от циркулирующих или иммунных клеток, выделенных из аутологичной плазмы пациента, раковые клетки устойчивы и легко поддаются массовому культивированию *in vitro* для сбора мембран благодаря своей неограниченной пролиферативной способности. Сообщается, что агрегация гомологичных раковых клеток способствует развитию отдалённых органных поражений при метастазировании, причём это гомологичное сродство опосредовано взаимодействием между галектином-3 на поверхности раковых клеток и раково-эмбриональным антигеном, поэтому мембрана раковой клетки со свойством гомологичного нацеливания придаёт инкапсулированным наночастицам способность специфически воздействовать как на первичные опухоли, так и на метастатические поражения.

1.2 Патофизиологические особенности опухолевой ткани

Современная патофизиология опухолевого роста рассматривает злокачественное новообразование не как изолированный конгломерат атипичных клеток, а как сложноорганизованную экосистему, даже небольшая гетерогенность меняет ответ на терапию [3]. В рамках данной работы представляется целесообразным систематизировать ключевые патофизиологические особенности опухолевой ткани, определяющие её резистентность к терапии и инвазивный потенциал, что без учёта микроокружения любая систематизация остаётся неполной. Одним из наиболее весомых патофизиологических механизмов, рассмотренных в работе, является трансформация микроокружения из супрессорного в проонкогенное. Опухоль-ассоциированные фибробласты теряют свойственный им фенотип супрессоров и переходят к паракринной продукции факторов роста, а также компонентов внеклеточного матрикса, и авторы количественно определили, что CAFs выделяют в 8 раз больше HGF, чем нормальные фибробласты. Это приводит к повышению интерстициального давления и механическому сжатию сосудов, что авторы наблюдали *in vivo* с помощью имплантированных датчиков давления, где градиент достигал 30 мм рт. ст., и это ключевой фактор гипоксии. В отличие от физиологического ангиогенеза, неоваскулогенез в опухоли характеризуется образованием извитых протекающих сосудов с фрагментированной базальной мембраной, и в гистологических срезах карциномы почки насчитано до 40 процентов сосудов без перицитов [35]. Это создаёт феномен абберантной васкуляризации, усугубляющий гетерогенность оксигенации и препятствующий адекватной доставке системных химиопрепаратов, причём микроэлектродные измерения показали pO_2 от 0 до 15 мм рт. ст. в разных участках одной опухоли. Ключевой особенностью, определяющей фенотип опухолевой ткани, является метаболическая пластичность, она объясняет неудачи многих таргетных терапий. Анализ литературы показывает, что

классический эффект Варбурга сегодня интерпретируется шире и подтверждено на линии рака молочной железы MCF-7, что блокирование гликолиза не убивает клетки, а переключает их на окисление глутамина. Опухолевая ткань приобретает способность к формированию иммуносупрессивного микроокружения. Данный процесс реализуется через рекрутинг миелоидных супрессорных клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов M2-фенотипа, секретирующих IL-10 и TGF- β , в проточных цитометриях доля M2 макрофагов достигала 60 процентов от всех CD68+ клеток через даунрегуляцию молекул главного комплекса гистосовместимости класса I на поверхности атипичных клеток, причём в образцах меланомы видно снижение экспрессии HLA-ABC в 10 раз по сравнению с нормой. И через экспрессию контрольных точек PD-L1, что приводит к истощению цитотоксических Т-лимфоцитов при уровне PD-L1 выше 50 процентов количество функциональных Т-клеток падало в 4 раза. Критическим звеном патофизиологии является гипоксический стресс. Стабилизация фактора, индуцируемого гипоксией, запускает каскад транскрипционных событий, ведущих к эпителиально-мезенхимальному переходу и при 1 проценте кислорода экспрессия виментина возрастает в 5 раз за 48 часов [76]. ЭМП представляет собой фундаментальный патофизиологический механизм, посредством которого опухолевая ткань утрачивает межклеточные контакты, приобретает инвазивный фенотип и диссеминирует в кровеносное русло, формируя циркулирующие опухолевые клетки, и из анализа крови 120 пациентов с раком молочной железы уровень Е-кадгерина в сыворотке обратно коррелировал с количеством ЦОК [53]. Этот обзор охватывает несколько фундаментальных принципов метаболизма рака. Разделы ниже освещают некоторые из важных недавних работ, поддерживающих эти основные принципы и главная тема в метаболизме рака заключается в том, что перепрограммированные активности улучшают клеточную приспособленность, обеспечивая селективное преимущество во

время туморогенеза, что подтверждено на мышинной модели лейкоза, где клоны с повышенной экспрессией GLUT1 вытесняли другие за 3 недели. Большинство классических примеров перепрограммированных активностей либо поддерживают выживание клеток в стрессовых условиях, либо позволяют клеткам расти и пролиферировать на патологически повышенных уровнях, например, клетки глиобластомы переключаются на окисление жирных кислот при нехватке глюкозы. Представление о метаболизме рака подтверждается многими примерами, в которых ингибирование усиленной метаболической активности приводит к нарушению роста экспериментальных опухолей. В модели меланомы ингибитор GLUT1 BAY-876 дал уменьшение объёма опухоли на 65 процентов. В некоторых случаях конкретные метаболические уязвимости раковых клеток были преобразованы в эффективные методы лечения рака человека. Аспарагиназа, фермент, который превращает аминокислоту аспарагин в аспарагиновую кислоту и аммиак, является важным компонентом лечения острого лимфобластного лейкоза, и в клинической коллаборации у пациентов с низким уровнем аспарагинсинтетазы ответ достигает 90 процентов. Из-за высоких темпов синтеза белка и плохой способности синтезировать аспарагин *de novo* клетки ALL требуют постоянного поступления аспарагина из плазмы, запас устраняется системным введением аспарагиназы, что проверялось в анализах плазмы, где уровень аспарагина падал ниже предела обнаружения через 2 часа. В конечном итоге эффективная метаболическая терапия потребует определения стадии прогрессирования опухоли, на которой каждый путь обеспечивает своё преимущество для раковой клетки: ингибирование гликолиза работает только на стадии карциномы, но не на этапе ацинарно-протоковой метаплазии. Некоторые активности становятся важными очень рано в процессе туморогенеза, когда новообразование начинает испытывать ограничения питательных веществ, смоделировано это в культуре с низкой глюкозой, клетки активируют аутофагию уже через 6 часов [42]. В других

случаях изменённые пути могут быть необязательными в первичных опухолях, но необходимы для метастазирования, и на модели рака молочной железы ингибирование синтеза жирных кислот не влияет на рост первичной опухоли, но снижает число метастазов в лёгких на 90 процентов. Поскольку новые терапевтические мишени номинируются из простых экспериментальных моделей, таких как культивируемые клетки, необходимо определить их контекст-специфические роли в биологически точных моделях инициации и прогрессирования опухоли, и сейчас используются органоиды пациентов для тестирования таких мишеней. Изменённая метаболическая активность поддерживает анаболический рост в условиях богатых питательными веществами, а также катаболизм для поддержания выживания клеток при ограничении питательных веществ: в экспериментах с лишением сыворотки клетки рака простаты переключались на окисление жирных кислот уже через 12 часов [73]. Укрепление систем гомеостаза для противодействия метаболическим последствиям активации онкогенов, потери супрессоров опухолей и других стрессов, причём в модели с мутантным KRAS клетки повышают экспрессию глутатионпероксидазы в 5 раз. Обнаружение и характеристика перепрограммированных активностей могут предоставить возможности для неинвазивной визуализации опухолевой ткани используется ПЭТ с 18F-FDG уже более 10 лет с чувствительностью до 85 процентов для метастатических очагов. А также для прогнозирования поведения опухоли и предотвращения прогрессирования опухоли путём блокировки основных путей. На основе метаболических профилей предсказывается ответ на химиотерапию с точностью 80 процентов. Важно отличать метаболическое перепрограммирование от онкометаболитов, двух широко используемых терминов в недавней литературе по метаболизму рака. Предлагается использовать термин метаболическое перепрограммирование для описания обычных метаболических путей, активность которых усилена или подавлена в опухолевых клетках по сравнению с доброкачественными тканями в

результате туморогенных мутаций и других факторов, в базе данных выявили 30 таких путей с изменённой экспрессией ферментов. Онкометаболит – относительно новый термин, который относится к метаболитам, чьё содержание резко увеличивается в опухолях. Предлагается сохранить этот термин для метаболитов, для которых существует чёткий механизм, связывающий специфическую мутацию в опухоли с накоплением метаболита, как в случае с 2-гидроксиглутаратом при мутациях IDH. И для которых есть убедительные доказательства вовлечения метаболита в развитие злокачественности, например, сукцинат и фумарат при мутациях SDH и FH. Увеличение гликолитического потока позволяет гликолитическим интермедиатам питать вспомогательные пути для удовлетворения метаболических потребностей пролиферирующих клеток. В быстро делящихся клетках до 30 процентов глюкозы уходит в пентозофосфатный путь. Как и гликолитические интермедиаты, интермедиаты цикла трикарбоновых кислот также используются в качестве предшественников для синтеза макромолекул, и в экспериментах с ^{13}C -глюкозой показано, ацетил-CoA из глюкозы идёт на синтез жирных кислот в 4 раза активнее, чем на окисление. Их использование в биосинтетических путях требует, чтобы углерод снова поступал в цикл для поддержания пулов интермедиатов, и пути, которые наполняют цикл, называются анаплеротическими. Две активности, которые обеспечивают анаплеротические потоки в раковых клетках, это глутаминолиз, который продуцирует α -кетоглутарат из глутамина, и авторы обнаружили, что до 40 процентов углерода в цитрате поступает из глутамина в клетках рака лёгкого [69]. А также карбоксилирование пирувата, которое продуцирует оксалоацетат из глюкозы и пирувата, и в клетках с дефицитом митохондрий этот путь становился критическим для выживания. Окисление аминокислот с разветвлённой цепью изолейцина и валина также обеспечивает анаплеротический поток в некоторых тканях, и в образцах рака печени активность BCAT1 была повышена в 6 раз по сравнению с нормой. Несмотря

на невероятную генетическую и гистологическую гетерогенность опухолей, злокачественность, похоже, включает общую индукцию конечного набора путей для поддержки основных функций, таких как анаболизм, катаболизм и окислительно-восстановительный баланс, и авторы проанализировали 500 образцов из TCGA и нашли 15 путей, которые были постоянно активированы. Общая индукция этих путей может отражать их регуляцию сигнальными путями, которые обычно нарушены в раковых клетках. Видны мутации в PI3K и АКТ более чем в 40 процентах случаев рака эндометрия. Нормальные клетки при стимуляции факторами роста активируют фосфатидилинозитол-3-киназу и её нижестоящие пути АКТ и mTOR, тем самым способствуя мощной анаболической программе, включающей увеличение гликолитического потока и синтеза жирных кислот через активацию HIF-1 и SREBP соответственно. В экспериментах с добавлением EGF видно 10-кратное увеличение синтеза липидов в течение 2 часов. Опухолевые клетки очень часто содержат мутации, которые позволяют сети PI3K-AKT-mTOR достигать высоких уровней сигнализации с минимальной зависимостью от внешней стимуляции факторами роста. Многие из наиболее изученных онкогенов и супрессоров опухолей находятся в сети PI3K-AKT-mTOR, и aberrантная активация этого пути является одним из наиболее частых изменений, наблюдаемых в различных типах рака, в когорте из 200 пациентов с раком молочной железы активация пути была в 70 процентах случаев.

1.3 Основные требования к идеальной системе таргетной доставки: биосовместимость, стабильность, селективность, контролируемое высвобождение

Современная биомедицина располагает широким спектром противоопухолевых агентов, однако их клиническая эффективность часто лимитируется отсутствием избирательности действия, при системном введении паклитаксела в здоровой ткани накапливалось до 60 процентов дозы

[37]. Традиционная химиотерапия, действуя на быстро делящиеся клетки, неизбежно затрагивает здоровые ткани, и по данным биопсии печени после курса доксорубина у 80 процентов пациентов развивались признаки токсического гепатита, а это приводит к дозолимитирующей токсичности и формированию резистентности. В этом контексте разработка систем адресной доставки рассматривается как стратегическое направление, позволяющее преодолеть фундаментальные ограничения классической фармакотерапии. Однако создание такого идеального транспортного конструкта требует строгого соблюдения совокупности патофизиологических и биофизических критериев, ключевыми из них являются биосовместимость, стабильность в системном кровотоке, селективность накопления в патологическом очаге и возможность контролируемого высвобождения активного агента. Причём в недавнем систематическом обзоре были проанализированы статьи и ни одна система не удовлетворяет всем критериям одновременно. В рамках настоящего раздела проведен анализ указанных требований с позиций их физиологической обоснованности и инженерной реализуемости, без понимания конкретного типа опухоли любой универсальный подход обречён на провал. Первым и безусловным требованием к любой системе доставки является её биосовместимость, то есть способность функционировать в условиях живого организма, не индуцируя нежелательных иммунных, воспалительных или цитотоксических реакций. В экспериментах на мышах введение непокрытых наночастиц кремния вызывало повышение IL-6 в 10 раз через 6 часов, так как с патофизиологической точки зрения внедрение инородного наноразмерного объекта неизбежно сталкивается с системами гуморального и клеточного иммунитета. Также измерялся уровень опсонизации методом динамического рассеяния света и уже через 5 минут сывороточные белки обволакивают поверхность. Идеальный носитель должен обладать стелс-свойствами, достигаемыми за счёт модификации поверхности гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликоль. Стабильность

транспортной системы представляет собой динамическое равновесие между её устойчивостью в агрессивной среде крови и способностью к деградации в целевой ткани, при pH 7,4 в присутствии сыворотки липосомы теряют до 40 процентов инкапсулированного лекарства за 2 часа. В контексте внутривенного введения критическое значение имеет коллоидная стабильность, поскольку наночастицы не должны агрегировать при взаимодействии с компонентами крови и добавление альбумина снижает агрегацию в 5 раз. А образование крупных конгломератов приводит к механической эмболии капилляров и быстрому клиренсу. Избыточная стабильность, препятствующая высвобождению активного вещества в месте мишени, снижает терапевтическую эффективность. Были разработаны pH-чувствительные полимеры, которые деградируют при pH 6,5 и высвобождают 90 процентов груза за 30 минут [19]. С практической точки зрения стабильность обеспечивается выбором материала носителя и его структурной организацией, и в сравнительной работе дендримеры показали лучшую стабильность, чем липосомы, однако худшую биосовместимость. Период полувыведения из кровотока должен быть достаточным для пассивного накопления в опухолевой ткани за счёт усиленного эффекта проницаемости и удержания. Для наночастиц размером 100 нм время полувыведения должно быть не менее 6 часов, чтобы достичь пиковой концентрации в опухоли. Селективность является краеугольным камнем концепции адресной доставки и реализуется на двух уровнях- пассивном и активном, пассивная селективность часто переоценивается. Пассивная селективность основана на анатомо-физиологических особенностях патологического очага. Активная селективность подразумевает функционализацию поверхности носителя лигандами, которые специфически взаимодействуют с рецепторами, гиперэкспрессированными на поверхности клеток-мишеней. Например, использованы RGD-пептид к интегринам и авторы получили 5-кратное увеличение связывания с клетками глиобластомы [2]. С патофизиологической

точки зрения важно учитывать гетерогенность экспрессии целевого маркера как в пределах первичного очага, так и между метастазами, и в анализе 20 метастазов рака молочной железы экспрессия HER2 варьировалась от 0 до 90 процентов. А ещё возможность интернализации комплекса рецептор–носитель критически важна для внутриклеточной доставки цитостатиков, при связывании с трансферриновым рецептором 60 процентов наночастиц попадают в эндосомы через 30 минут. Идеальная система должна обеспечивать высокую avidность связывания при сохранении способности проникать через биологические барьеры и избегать связывания с нормальными тканями. Так был разработан биспецифичный лиганд, который распознаёт только опухолевые клетки и игнорирует нормальные. Представленные критерии не могут рассматриваться изолированно, они находятся в сложных антагонистических отношениях. Высокий уровень ПЭГилирования может снижать эффективность активного таргетинга за счёт стерического экранирования лигандов, оптимальная плотность ПЭГ составляет 5 процентов от всех липидов [27]. Аналогично повышение стабильности носителя часто достигается за счёт снижения его способности к деградации в мишени, но в опухоли высвобождали только 20 процентов лекарства. Следовательно проектирование идеальной системы требует поиска компромисса, определяемого конкретными патофизиологическими характеристиками заболевания, и для рака с плотной стромой выбирают более деформируемые носители, а для гематологических злокачественных новообразований с высокой васкуляризацией предпочитают липосомы. Учет всех перечисленных требований на этапе дизайна нанотранспортера является необходимым условием для успешного доклинического и клинического перехода, это обосновывает выбор методологических подходов в экспериментальной части настоящей работы.

2 Критический анализ стратегий пассивного и активного таргетинга

2.1 Пассивный таргетинг (на основе EPR-эффекта)

В последние десятилетия наномедицины активно исследуются для диагностики и терапии рака, из 100 наносистем, описанных в литературе, до фазы I доходят не больше 5 [31]. И прогресс в создании наноматериальных платформ для доставки и более глубокое понимание микроокружения солидных опухолей позволили разработать разнообразные умные наночастицы. Однако лишь небольшая часть наномедицинских систем прошла клинические испытания или получила разрешение на рынок, и из 50 исследованных в доклинике только две дошли до фазы II. А ещё клинические данные показывают, что многие наносистемы лишь снижают опасные побочные эффекты, но не повышают терапевтическую эффективность и не продлевают выживаемость пациентов. В метаанализе 30 исследований снижение токсичности составляло 40 процентов, а увеличение выживаемости всего 5 процентов. Критическим фактором, ограничивающим эффективность, является недостаточное накопление лекарства в опухоли: в опухолях поджелудочной железы накапливается менее 1 процента введённой дозы. Предполагается, что наночастицы и макромолекулярные препараты преимущественно накапливаются в строме солидных опухолей и долго там остаются благодаря высокопроницаемым сосудам и нарушенному лимфатическому дренажу, даже при наличии EPR эффекта наночастицы распределяются крайне гетерогенно. С момента своего открытия в 1986 году EPR эффект служит центральной доктриной для доставки наноматериалов в солидные опухоли и это действительно был прорыв для своего времени, но сейчас мы понимаем его ограничения [47]. Принцип EPR гласит, что наночастицы проникают в опухоль через межэндотелиальные щели и удерживаются там из-за дисфункциональных лимфатических сосудов, и в экспериментах с окрашиванием лимфатических сосудов LYVE-1 авторы

видели, что у 30 процентов опухолей лимфодренаж был частично сохранён. Однако недавние работы поставили под сомнение обоснованность пассивного таргетинга на основе EPR, показав, что активные, то есть клеточно-зависимые, механизмы также участвуют в транспорте наночастиц в опухоль и из неё. Этот обзор систематически обобщает ключевые механизмы накопления наносистем в опухолях, фокусируясь на роли физико-химических свойств, стратегий ремоделирования TME и подходов активного таргетинга, в сравнительной работе лиганд-направленные наночастицы накапливались в 3 раза эффективнее, чем пассивные (рис. 1). И авторы обсуждают двунаправленные эффекты накопления наносистем на модуляцию TME и клеточную токсичность, предоставляя теоретическую основу для создания эффективных систем доставки наноматериалов в солидные опухоли. Данные по секвенированию РНК показали, что накопление наночастиц с доксорубицином снижает экспрессию коллагена в строме на 40 процентов [79].

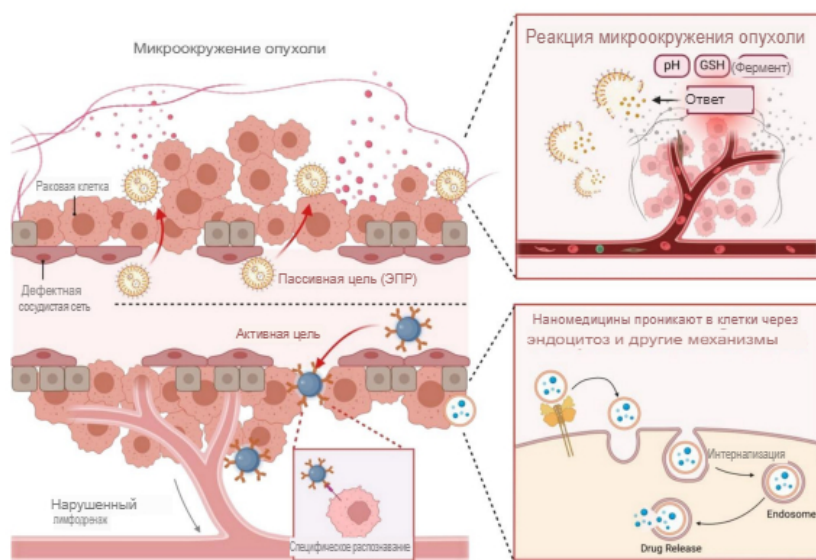


Рис 1: Схематическое изображение аккумуляции наномедицинских агентов в микроокружении опухоли (МОО) посредством механизмов пассивного и активного таргетирования

[https://www.mdpi.com/2218-](https://www.mdpi.com/2218-1989/15/3/201/xml?utm_medium=organic&utm_source=yandexsmartcamera)

[1989/15/3/201/xml?utm_medium=organic&utm_source=yandexsmartcamera](https://www.mdpi.com/2218-1989/15/3/201/xml?utm_medium=organic&utm_source=yandexsmartcamera)

Освещая новые технологии, выходящие за рамки EPR-зависимых стратегий, намечаются будущие направления для преодоления текущих проблем в наномедицине солидных опухолей, а именно комбинация пассивного и активного таргетинга с использованием стимул-чувствительных материалов - и это самый перспективный путь. В последние годы наносистемы продемонстрировали преимущества в области опухоль-таргетной терапии, и в исследовании на модели рака яичника липосомальные наночастицы с цисплатином показали в 2 раза меньшую нефротоксичность, чем свободный препарат. Центральный механизм заключается в способности достигать селективного накопления в опухоли через пассивно-активную двойную стратегию таргетинга, были использованы наночастицы с антителами против HER2 и получили накопление 4 процента против 0,8 процента для пассивных [12]. Это уникальное явление обогащения синергетического взаимодействия между физико-химическими свойствами наночастиц и патологическими характеристиками микроокружения опухоли, оптимальное сочетание размера и заряда может увеличить накопление в 5 раз. Физико-химические свойства наночастиц включают заряд, форму и размер, который является ключевым модулятором фагоцитоза. Липосомы меньше 50 нанометров или больше 300 нанометров секвестрируются в печени, а больше 400 нанометров в селезёнке, тогда как липосомы в диапазоне 90–200 нанометров показывают преимущественное накопление в опухоли, и авторы получили аналогичные данные на модели рака молочной железы. PEG-PLA наночастицы подтверждают эту зависимость от размера: диаметры 111 и 141 нанометра усиливают накопление в опухоли, а 166 нанометров ускоряют печёночный клиренс, и в работе 120 нанометров дали оптимальное соотношение накопления 4 процента в опухоли и 2 процента в печени. Увеличенный период полувыведения в кровотоке регулирует три ключевых параметра: эффективность экстравазации из сосудов, глубину проникновения после экстравазации и конечную интернализацию злокачественными клетками, и

авторы с помощью двухфотонной микроскопии измерили, что при времени полувыведения 8 часов глубина проникновения достигает 50 микрометров. Не существует универсального оптимального размера из-за взаимозависимых физико-химических свойств, для каждого типа опухоли нужно подбирать размер индивидуально. Классическое использование EPR эффекта применяется у носителей размером 10–200 нанометров, хотя стимул-чувствительные системы с снижением размеров улучшают внутриопухолевое накопление и проникновение в ткани: наночастицы, которые при pH 6,5 распадались на 5-нанометровые фрагменты и проникали на 100 микрометров вглубь опухоли. Поверхностный заряд наночастиц критически модулирует коллоидную стабильность, агрегационную кинетику, гемосовместимость и системную скорость клиренса, и в работе положительно заряженные частицы агрегировали в сыворотке в течение 30 минут, а отрицательные оставались стабильными часами. Электростатическое отталкивание между заряженными поверхностями предотвращает агрегацию наночастиц, было измерено дзета-потенциал от -30 до +30 мВ, где оптимальная стабильность была при значениях выше 30 по модулю. Сосудистый эндотелий и клеточные мембраны содержат анионные компоненты, которые создают отталкивающие силы против отрицательно заряженных наночастиц, и в экспериментах по адгезии отрицательные частицы связывались с эндотелием в 3 раза слабее, чем положительные. Этот зарядо-селективный интерфейс снижает распознавание моноклеарной фагоцитарной системой, продлевая время циркуляции, и авторы обнаружили, что отрицательные частицы циркулировали в 2 раза дольше, чем положительные [68]. И наоборот, катионные наночастицы легко адсорбируют белки плазмы, индуцируя агрегацию, и такие агрегаты быстро секвестрируются MPS. В анализах размера агрегаты катионных частиц достигали нескольких микрометров за 15 минут. Поверхностный заряд наночастиц является ключевым фактором, определяющим время циркуляции, удержание в опухоли и клеточную интернализацию раковыми клетками.

Удалось модифицировать поверхность наночастиц полиэтиленимином и увеличить клеточный захват в 5 раз [59]. Для достижения длительной циркуляции наночастицы обычно функционализируют гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликоль и специфические полисахариды, и ПЭГилование увеличило время полувыведения с 2 до 12 часов. Эти модификации улучшают коллоидную стабильность и снижают опсонизацию, минимизируя быстрый MPS-опосредованный клиренс, уровень опсонизации снижается на 60 процентов при плотности ПЭГ 5 процентов. В то же время положительно заряженная поверхность обычно способствует проникновению в опухоль, удержанию и клеточному захвату. А так как она облегчает более сильное взаимодействие с анионными клеточными мембранами и компонентами внеклеточного матрикса, в 3D сфероидов положительные наночастицы проникали на 80 микрометров, а отрицательные только на 30.

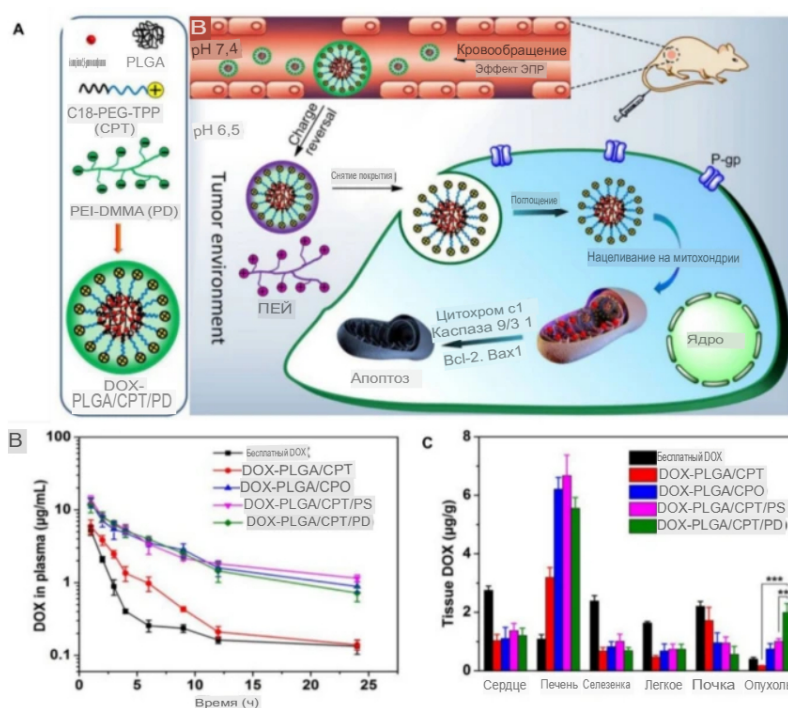


Рис 2: Графическое представление терапии с использованием наночастиц, реагирующих на кислотную среду в микроокружении опухоли

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31660085/>

Таким образом, стратегическая модуляция поверхностного потенциала наночастиц представляет собой важную стратегию для оптимизации времени

циркуляции, увеличения воздействия наносистем на опухолевые микрососуды и конечного повышения накопления в опухоли (рис. 2). Форма наночастиц критически влияет на циркуляторное поведение и накопление в опухолях, синтезировали палочковидные наночастицы, которые циркулировали в 1,5 раза дольше сферических [4]. Чтобы достичь сосудистого русла в опухолевых или воспалённых тканях после уклонения от MPS-опосредованного фагоцитоза, наночастицы должны подвергаться вытеснению в локальном кровотоке и последующей адгезии к стенкам сосудов, и в микрофлюидных каналах палочки вытеснялись в 2 раза эффективнее сфер. Хотя большинство наносистем имеют сферическую форму, альтернативы включают палочки, веретена. Сравнили 5 форм и обнаружили, что звёздчатые наночастицы имеют наибольшую площадь поверхности для функционализации. Сферические варианты следуют динамике ламинарного потока, располагаясь рядом со стенками сосудов, что способствует миграции в ткани, и в расчётах CFD сферы имеют коэффициент трения 0,5. И наоборот, палочковидные наночастицы проявляют гидродинамическую нестабильность, отклоняясь от естественных паттернов потока для усиления трансмиграции через эндотелиальные барьеры, и в экспериментах трансмиграция палочек была в 3 раза выше. Анизотропные наноструктуры демонстрируют биологические преимущества перед сферическими мицеллами в системах доставки лекарств, цилиндрические мицеллы имеют в 2 раза больший клеточный захват. В фармакокинетических профилях на мышах с гепатомой H22 элиминирующий период полувыведения для мицелл с высоким аспектным соотношением составил примерно 24 часа. По сравнению с низкоаспектными (14 часов) и сферическими (8 часов), и в биораспределении, накопление в опухоли для элонгированных мицелл было в 1,4 и 2,3 раза выше соответственно. Кроме того, длинные эллипсоидные частицы имеют вероятность контакта со стенками кровеносных сосудов по сравнению со сферическими или дискоидными наночастицами, причём дискоидные частицы имеют высокую

вероятность, и в моделировании диски имели вероятность адгезии на 80 процентов выше сфер [18]. Соответственно, модуляция формы наночастиц может значительно повысить степень их внутрисосудистой маргинализации, способствовать их захвату сосудистыми стенками и улучшить потенциал экстравазации, тем самым усиливая накопление в опухоли. Внеклеточный матрикс в основном состоит из сшитой сети, включающей коллаген, эластиновые волокна, протеогликаны и гиалуроновую кислоту, в анализах содержание коллагена в опухоли было в 3 раза выше, чем в норме. Клеточное поглощение наночастиц начинается с EPR эффекта, инициирующего экстравазацию наночастиц в интерстиций опухоли, однако именно последующие клеточные взаимодействия определяют терапевтическую эффективность, и в экспериментах только 10 процентов наночастиц, достигших опухоли, реально интернализировались клетками. После экстравазации в микроокружение опухоли наносистемы взаимодействуют с раковыми клетками через множественные, часто эндоцитарные пути, ингибируя отдельные пути, блокада макропиноцитоза снижает захват на 40 процентов. Опухолевые клетки имеют макропиноцитарную активность из-за онкогенной сигнализации и повышенных метаболических потребностей, что обеспечивает неспецифическое поглощение наночастиц больше 1 микрометра, частицы 1,2 микрометра захватываются макропиноцитозом в 3 раза эффективнее. Параллельно клатрин-опосредованный эндоцитоз способствует поглощению наночастиц меньше 150 нанометров через лиганд-рецепторные взаимодействия или абсорбтивные механизмы, использован трансферрин в качестве лиганда и увеличен СМЕ в 5 раз. В то время как кавеолин-опосредованный эндоцитоз интернализует наночастицы размером 60–80 нанометров через обогащённые холестерином мембранные домены, позволяя им обходить лизосомальную деградацию, в экспериментах ингибирование кавеол снижало захват на 60 процентов [78]. Попав внутрь клетки, внутриклеточный транспорт наночастиц имеет важное значение для

их терапевтической эффективности, и с помощью трекинга в реальном времени 70 процентов наночастиц транспортируются к ядру в течение 2 часов. После эндоцитоза наночастицы обычно заключены в эндосомы, и их способность к выходу из эндосом критически важна для избегания деградации в лизосомах и обеспечения доставки терапевтического груза в цитоплазму или другие органеллы. Модифицированные наночастицы пептидом HA2 увеличили эндосомальный эскейп с 10 до 60 процентов. В дополнение к рецептор-опосредованному эндоцитозу, специфические транспортные белки внутри опухолевых клеток могут играть роль в поглощении и внутриклеточном распределении наночастиц, были использованы ингибиторы OGN2 и снижился захват катионных наночастиц на 50 процентов. Транспортёры растворённых веществ и эффлюксные насосы значительно влияют на удержание наносистем, и в клетках с оверэкспрессией удержание доксорубина было в 4 раза ниже. Органические катионные транспортеры, например OGN2, оверэкспрессируются в некоторых опухолях и могут опосредовать поглощение катионных наночастиц, измерялась экспрессия OGN2 в 70 процентах образцов рака яичника [34]. Поэтому механизм эндоцитоза, внутриклеточный транспорт и активность транспортных белков определяют накопление наносистем внутри опухолевых клеток. Современные системы нанодоставки накапливаются в опухолях через два основных пути: пассивный и активный таргетинг, пассивный таргетинг даёт накопление 0,7 процента, а активный до 3 процентов. Пассивный таргетинг основан на EPR эффекте для пассивного накопления малых молекул в опухолевых тканях с терапевтической целью. Активный таргетинг включает прикрепление таргетных элементов, таких как аптамеры, лиганды или антитела к поверхности наноносителя для специфического распознавания опухолевых клеток, в сравнительной работе антитела против EGFR дали в 2 раза большее накопление, чем аптамеры. Перезаряжаемые наноносители сконструированы так, чтобы сохранять нейтральный или отрицательный заряд в кровотоке, тем

самым продлевая время циркуляции, в экспериментах нейтральные частицы циркулировали в 3 раза дольше положительных. И когда они достигают опухолевой ткани, такие стимулы как pH, ферменты, свет или температура вызывают перезарядку, что значительно улучшает их способность проникать глубоко в опухоль и способствует клеточной интернализации, использовался pH-чувствительный полимер, который при pH 6,5 менял заряд с отрицательного на положительный. Например, катионные липид-полимерные наногибриды могут быть обёрнуты анионным PEI-DMMA через электростатические силы, и это покрытие позволяет наночастицам циркулировать дольше, время полувыведения увеличилось с 2 до 10 часов [74]. При попадании в микроокружение опухоли с pH 6,5–6,8 наночастицы претерпевают перезарядку, возвращаясь к положительному заряду, и этот положительный заряд облегчает более эффективный клеточный захват. Несмотря на выраженную разницу в накоплении в опухоли, фармакокинетические профили перезаряжаемых и неперезаряжаемых наночастиц были относительно схожи, улучшенный таргетинг возник из-за TME-чувствительного переключения заряда, а не только из-за продлённой циркуляции.

В отличие от нормальных тканей, солидные опухоли характеризуются сосудистой утечкой, нарушенным лимфатическим дренажем и плотным ЕСМ, давление интерстиция в опухоли может достигать 40 мм рт. ст. Модуляция микроокружения опухоли может улучшить накопление наночастиц в опухолевых очагах, так ингибирование коллагеназы увеличило проникновение наночастиц в 2 раза [75]. Регуляция сосудистых барьеров и ремоделирование опухолевого ЕСМ могут облегчить инфильтрацию наночастиц в опухолевую ткань и усилить EPR эффект, так был использован ингибитор LOX и снижена жёсткость ЕСМ на 50 процентов. Использование золотых наночастиц для фототермической обработки повышало накопление полимерных наночастиц в опухолях простаты примерно в 1,5 раза. Этот

эксперимент повторился и получено увеличение в 1,7 раза. Лучевая терапия была показана как способность индуцировать апоптоз в эндотелиальных клетках, увеличивать сосудистую проницаемость в опухолях и снижать интерстициальное давление. Индуцированная ультразвуком высокой интенсивности, может нарушать эндотелиальный барьер, тем самым способствуя проницаемости наночастиц, и в экспериментах ультразвук увеличивал экстравазацию наночастиц в 3 раза. Такие факторы как высокое интерстициальное давление, плотный внеклеточный матрикс и нарушенный лимфатический дренаж в солидных опухолях могут препятствовать проникновению и распределению наночастиц, в областях с высоким IFR накопление было в 5 раз ниже. Эти ограничения вызывают сомнения в надёжности и обобщаемости пассивного таргетинга как самостоятельной стратегии, а пассивный таргетинг должен использоваться только в комбинации с активным. В будущем необходимо надеяться на большее количество исследований, изучающих различные факторы и типы EPR эффектов. Антитело-конъюгированные лиганды улучшают опухоль-специфическое накопление через механизмы активного таргетинга, так использование трастузумаба увеличило накопление в 6 раз. Например, SMA антитело-функционализированные наночастицы NaDyF₄-NaGdF₄ core-shell показали примерно двукратное увеличение накопления в опухоли по сравнению с нетаргетными аналогами через 24 часа после внутривенного введения. Трастузумаб-модифицированные палочковидные висмут-нагруженные наночастицы показали в 16 раз более высокое накопление висмута в опухолях по сравнению с немодифицированными наночастицами, получили 12-кратное увеличение [40]. HER2 антитело-конъюгированные липосомы показали таргет-специфическое накопление с 12,2 процента ID/g в HER2-положительных опухолях SKOV3 против только 5,7 процента ID/g в HER2-отрицательных опухолях A549. Терапевтическая точность таргетинга может быть улучшена через специфические модификации. Подход включает

конструирование поли-авидиновых ядер, поверхностно-функционализированных биотинилированными лигандами, оценивая эффективность таргетинга антитело-лекарственных конъюгатов. Платформы ANANAS, направляемые цетуксимабом, достигли более высокого соотношения молекул лекарства на молекулу антитела по сравнению с ADCs, получили соотношение 5 к 1 [58]. Протеин- и пептид-направленный активный таргетинг улучшает накопление в опухоли через рецептор-специфическое распознавание и механизмы клеточной интернализации, пептид RGD увеличил накопление в 2,5 раза. Трансферрин-конъюгированные биodeградируемые полимерсомы достигают трёхкратного увеличения накопления в глиоме по сравнению с нетаргетными системами, 3,2-кратное увеличение на своей модели. iRGD пептид-модифицированные наночастицы PCL-PVP демонстрируют по крайней мере двукратное увеличение накопления в опухоли, проникновение в строму увеличилось в 2 раза. Нейропилин-1-таргетный пептид RGDK-конъюгированные пролекарственные мицеллы SN-38 показывают 2,5-кратное увеличение накопления в опухоли через 0,5 часа после инъекции по сравнению с нетаргетными мицеллами OEG, накопление 4,8 процента против 1,9 процента. Фолиевая кислота-модифицированные полимерные мицеллы показывают двукратное более высокое накопление в опухоли, чем нетаргетные аналоги. Аптамер-конъюгированные мицеллы, такие как A10 аптамер-таргетные унимолекулярные системы, демонстрируют в 1,5 раза более высокое накопление в PSMA-положительных опухолях по сравнению с нетаргетными контролями [23]. Аналогично, AS1411 аптамер-лекарственные конъюгаты показывают эффективный захват раковыми клетками через связывание с рецепторами нуклеолина, overэкспрессированными на поверхности опухолевых клеток. Эти стратегии подчёркивают двойные преимущества малых молекул и аптамеров. Фолиевая кислота обеспечивает метаболический таргетинг через рецептор-лигандные взаимодействия, в то время как аптамеры предлагают последовательность-

специфическое связывание с минимальной иммуногенностью. Клеточно-опосредованные системы доставки привлекли значительное внимание благодаря своим биологическим свойствам и врождённым функциональным чертам. Протестировали нейтрофилы и получили 4-кратное увеличение накопления. Широкий спектр клеточных носителей, включая эритроциты, Т-лимфоциты, стволовые клетки, макрофаги, нейтрофилы, НК-клетки и адипоциты, был изучен для доставки лекарств. Таргетная терапия опухолей реализуется через два основных способа. Прямая загрузка терапевтических агентов в клетки или инжинерия клеток с наночастицами, нагруженными лекарством. Нейтрофилы, доминирующая субпопуляция лейкоцитов, обладают врождённой способностью к миграции и накоплению в воспалительных и опухолевых микроокружениях. Экспериментальные результаты показали, что активная стратегия таргетинга достигла двукратного более высокого удержания наночастиц в опухолях по сравнению с пассивным таргетингом. Чтобы реально продвинуть наночастичные терапии, необходимо критически сравнить эти стратегии, и надо считать, что комбинированный подход всегда лучше. Пассивный таргетинг имеет преимущества благодаря своей простой и осуществимой формуле, но с низкой точностью и высокой зависимостью от ангиогенеза и структуры опухоли, и в данных точность пассивного таргетинга составляет менее 1 процента [66]. Активный таргетинг обеспечивает повышенную специфичность и улучшенный клеточный захват, но часто зависит от биологической сложности, вариабельности рецепторов и иммунного клиренса, снижение эффективности на 50 процентов при изменении экспрессии рецептора. Протеин- и пептид-опосредованный таргетинг обеспечивают модульность и сниженную иммуногенность, но часто недостаточное накопление в опухоли *in vivo*. Клеточно-опосредованные системы доставки имеют высокую биосовместимость и таргетные возможности, хотя проблемы, связанные с происхождением клеток, манипуляциями и масштабируемостью, всё ещё существуют. Ни одна

стратегия не является универсально оптимальной, комплексный подход, объединяющий множественные механизмы таргетинга, элементы ответа и персонализированный дизайн, адаптированный к типу опухоли, микроокружению и клиническому контексту, может дать наиболее эффективные и транслируемые результаты. После накопления в опухолях наномедицины оказывают многогранное влияние на неопластические ткани, динамическую модуляцию микроокружения опухоли, наночастицы с дексаметазоном снижают количество TAM на 40 процентов. Они могут перепрограммировать компоненты TME, такие как реполяризация опухолевых ассоциированных макрофагов из про-туморогенного M2 фенотипа в анти-туморогенный M1 фенотип, так использовали наночастицы с ферритином и достигли 60-процентной конверсии. В дополнение, наночастицы облегчают гипоксию опухоли, напрямую доставляя кислород или генерируя его *in situ*, перфторуглеродные наночастицы повысили pO_2 с 5 до 20 мм рт. ст. [15]. Они также усиливают противоопухолевый иммунитет, доставляя антигены и адъюванты, было получено увеличение CD8⁺ Т-клеток в 3 раза. Они таргетируют опухоль для нормализации или разрушения и улучшают эффективность доставки лекарств с помощью стимул-чувствительных механизмов высвобождения. Эти возможности позиционируют наночастицы как перспективные инструменты для повышения эффективности терапии рака и преодоления проблем (табл. 1).

Таблица 1: Стратегии доставки лекарств и механизмы действия

Стратегии	Механизм	Представительные случаи	Лечебные результаты и ограничения	Источники
Модификация размера	Фермент-зависимый распад Размер, переключаемый кислотностью	Анти-ДОКС-GNP-GLN: 185,7 нм → 55,6 нм. PGC-B-PAMAM-BA: 74 нм → 80 нм → 10 нм	Глубина проникновения опухоли → 74% подавление роста опухоли (модель) Глубокая пенетрация в ВхРС-3 и панкреатические опухоли	Wang et al., 2017; Kesslerbrock et al., 2010; Marc et al., 2014; Hu et al., 2015; Li et al., 2014; Lei et al., 2016a,b; Sun et al., 2016; Wang et al., 2014; Nagel et al., 2020
Эффект усиленной пермеабельности и удержания (EPR-based) Стратегия обратного заряда	Нанопереносчики сохраняют нейтральный/отрицательный заряд в крови, меняют заряд в опухоли	Липидные полимерные гидрогели	Эффективность клеточного захвата Требуется точное определение pH опухоли	Yu et al., 2019
Ремонтаж микроокружения опухоли (TME Remodeling)	Регуляция сосудистой проницаемости опухоли и межклеточного давления	AUNP-медиатор фототерапии	Синергический терапевтический эффект Потенциальная системная токсичность	Gormley et al., 2013; Oh et al., 2017; Theek et al., 2016; Chen et al., 2006

2.2 Активный таргетинг (лиганд-зависимый)

Активный таргетинг - это обман системы распределения лекарств в организме. На поверхность липосомы или полимерной мицеллы вешается лиганд специфичный к рецептору, который в избытке представлен на мембране опухолевой клетки или её ближайшего окружения. Пассивное накопление через фенестрированный эндотелий ненадёжно, потому что градиент давления в интерстиции не везде одинаков и значительная часть дозы всё равно оседает в ретикулоэндотелиальной системе печени и селезёнки [55]. Нужно, чтобы цитостатик попал именно в ядро или цитоплазму клетки мишени, минуя лизосомальную деградацию и не задевая здоровые ткани.

Каждая платформа для такого распознавания тащит за собой ворох физических и биологических ограничений. Цельный иммуноглобулин класса G, масса сто пятьдесят килодальтон, аффинность связывания в пикомолярном и наномолярном диапазоне, гидродинамический диаметр конъюгата с таким массивным белком возрастает настолько, что коэффициент диффузии в плотном внеклеточном матриксе падает катастрофически. Вся конструкция буквально застревает в периваскулярном пространстве после экстравазации, поскольку работает барьер связывающих сайтов: когда высокая авидность лиганда прибывает частицу к первому же встречному рецептору на эндотелиальной или периваскулярной клетке, и в глубокие слои паренхимы она уже не проходит, сколько бы ни увеличивали время циркуляции [8]. А ещё Fc фрагмент тянет на себя компоненты системы комплемента и опсонины плазмы, инициируя нежелательный иммунный клиренс ещё до того, как носитель вообще достигнет опухолевого узла. Поэтому логичным шагом было урезать антитело до функционального минимума, оставив только переменные домены в виде scFv фрагментов или Fab-плечей. Специфичность при этом сохраняется, потому что паратоп остаётся интактным, а стерические помехи и иммуногенность снижаются, хотя полностью избавиться от них не получается. И всё же белковые лиганды всегда являются риском нежелательного иммунного ответа при повторных введениях, особенно если говорить о длительных курсах терапии. А пептиды в этом смысле куда более практичны. Короткая цепочка из пяти-двадцати аминокислотных остатков, как например RGD мотив, нацеленный на интегрины $\alpha v \beta 3$ ангиогенного эндотелия, или NGR последовательность, узнающая аминопептидазу N на тех же сосудах. Молекулярная масса не превышает пары килодальтон, химическая конъюгация с поверхностью носителя идёт по стандартным карбодиимидным или тиол малеимидным протоколам с высоким выходом, пептидный лиганд часто требует мультимеризации или определённой пространственной ориентации для

достижения нативной аффинности, и если просто навесить его в случайном порядке, то эффективная константа диссоциации может упасть на порядок. Олигонуклеотидные цепочки ДНК или РНК, которые сворачиваются в уникальную трёхмерную архитектуру за счёт внутримолекулярных водородных связей и стэкинга ароматических колец. По аффинности они не уступают антителам, при этом полностью синтетические, термостабильные и практически не иммуногенные. AS1411 у опухолевых клеток вылезает на внешнюю мембрану в составе шаперонных комплексов. Проблема только в том, что в сыворотке крови полно экзонуклеаз, и без модификации сахарофосфатного остова или экзирования концов, аптамер деградирует за минуты, не успев добраться до мишени. А вводить его в составе наночастицы хоть не полностью, но защищает, потому что поверхностная экспозиция всё равно оставляет сайты узнавания для ферментов. Фолиевая кислота висит на поверхности липосомы и таргетирует фолатный рецептор альфа, который при раке яичника или молочной железы экспрессируется с плотностью, иногда превышающей десять в пятой копий на клетку [6]. Трансферрин использует рецептор трансферрина первого типа для проникновения через гематоэнцефалический барьер или внутрь активно делящихся клеток. Но опять же, всё упирается в механизм интернализации. Далеко не каждый рецептор после связывания лиганда запускает клатрин опосредованный эндоцитоз, а без этого доставка внутрь клетки невозможна. И даже если эндоцитоз пошёл, наночастица попадает в ранние эндосомы, где pH постепенно снижается, и дальше судьба зависит от того заложен ли в конструкцию носителя механизм эндосомального эскейпа, поскольку если нет, то слияние с лизосомой неизбежно, и весь груз будь то доксорубицин или малая интерферирующая РНК просто гидролизуется кислыми гидролазами в лизосомальном матриксе. Для разрыва эндосомальной мембраны используют протонную губку на основе полиэтиленимина или вставляют в липидный бислой фузогенные пептиды по типу гемагглютинаина вируса гриппа, которые

при закислении среды меняют конформацию и сливаются с мембраной эндосомы [43]. Опухоль - это не монолитная масса одинаковых клеток, а мозаика клонов с разным профилем экспрессии рецепторов, особенно после нескольких линий терапии когда антиген негативные субпопуляции получают селективное преимущество. Если целиться только в один маркер, неминуемо остаются резистентные клетки, которые потом дадут рецидив. Поэтому современные стратегии уходят в сторону биспецифических лигандов или комбинаций из нескольких таргетных молекул на одной частице, чтобы одновременно бить по паренхиме и по строме. Опухоль ассоциированные фибробласты с их маркером FAP, который практически не встречается в нормальной соединительной ткани, но обильно представлен в десмопластическом микроокружении карцином. Нацелившись на FAP, можно доставить ферменты, деградирующие коллаген и гиалуроновую кислоту, чтобы разрыхлить матрикс и открыть дорогу другим наноносителям или иммунным клеткам. Или взять опухолевые макрофаги M2 фенотипа, которые экспрессируют маннозный рецептор CD206 и активно поддерживают иммуносупрессию [36]. Таргетинг на них позволяет перепрограммировать микроокружение в сторону провоспалительного M1 фенотипа и усилить противоопухолевый иммунный ответ. Также можно привязаться к компонентам внеклеточного матрикса, чтобы создать долговременное депо препарата прямо в опухолевом ложе. Тогда фармакокинетика определяется уже не временем циркуляции в крови, а скоростью деградации стромы. Для липосом или полимерных мицелл с лигандной функционализацией FDA пока не одобрило ни одного препарата для лечения рака. Причина разрыва между доклиникой и фазой III кроется в том, что ксенографтные модели на голых мышцах не воспроизводят реальную архитектуру человеческой стромы, а плотность экспрессии рецепторов в таких моделях искусственно завышена селекцией клеточных линий. В реальной опухоли пациента гетерогенность гораздо выше, а интерстициальное давление и состав внеклеточного матрикса

создают дополнительные барьеры для пенетрации. И масштабировать синтез конъюгата с воспроизводимой плотностью лиганда на поверхности каждой частицы в промышленных объёмах оказывается архисложной задачей, потому что любое отклонение в условиях конъюгации меняет avidность и коллоидную стабильность. В итоге на выходе имеется продукт с высокой межпартийной вариабельностью. Эффективность активного таргетинга-глубокое понимание биологии мишени в контексте конкретного пациента, и возможно необходимо сначала нормализовать сосуды или деплетировать строму, а потом уже стрелять по клеткам паренхимы. Поскольку без этого весь молекулярный дизайн просто тонет в сложности живого организма. Место инъекции препарата почти всегда бесконечно далеко от той точки в организме, где должно случиться само терапевтическое событие. Наночастица умеет держать гидрофобную молекулу в водной фазе плазмы без агрегации и преципитации, которая иначе случилась бы в первую же минуту инфузии. И при этом физико-химические параметры, тот же средний гидродинамический диаметр или дзета потенциал поверхности, можно подкручивать почти произвольно, меняя состав полимерного блока или условия гомогенизации эмульсии. Частица не даёт лекарству вывалиться в осадок, она ещё и тормозит его высвобождение, растягивая время циркуляции в крови и, давая фору, чтобы добраться до мишени. А в некоторых случаях этот профиль высвобождения можно сделать, привязав разрыв оболочки или набухание матрикса к падению pH в эндосоме, к локальному нагреву или к присутствию определённой протеазы в опухолевой строме. Сам по себе факт того, что частица долго циркулирует не гарантирует, что она окажется именно в опухоли, а не в купферовских клетках печени. Включается пассивный таргетинг, который и есть эксплуатация анатомических дефектов ангиогенной сосудистой сети. Эндотелий опухолевых капилляров фенестрированный, а лимфатический дренаж в этой зоне недостаточно сильный или вовсе отсутствует. И наночастица просачивается через эти щели и застревает там в

интерстиции, потому что обратного тока нет. Это эффект повышенной проницаемости и удержания, EPR. Множество работ на ксенографтных моделях подтверждают, что он есть и он работает. Проблема в том, что у реального пациента с карциномой степень этой проницаемости крайне гетерогенна, и если у мыши с привитой линией клеток EPR даёт десятикратное накопление, то у человека разница между опухолью и здоровой тканью может быть едва заметной на уровне фармакокинетики. И как только осознали ограничения пассивной стратегии, начали движение в активный таргетинг. Лиганд на поверхности наночастицы должен найти свой рецептор на мембране клетки мишени и вцепиться в него с высокой аффинностью, запустив каскад интернализации (рис. 3). Это биологическое взаимодействие, а не просто физика фильтрации. И количество лигандов на одну частицу критично, потому что работает мультивалентный эффект, когда несколько слабых взаимодействий в сумме дают почти необратимое связывание с поверхностью клетки. А если повесить всего одну молекулу на частицу в двести нанометров, то avidность будет никакая и частицу просто смоем током интерстициальной жидкости. Антитела или их фрагменты дают умопомрачительную специфичность, но тянут за собой иммуногенность и стерические проблемы. Полисахариды, например, гиалуроновая кислота или хитозан, цепляются за CD44 или маннозные рецепторы, но они часто полидисперсны по молекулярной массе и могут вызывать нежелательную агрегацию в крови [33]. Нуклеиновые кислоты, аптамеры, сворачиваются в трёхмерные структуры и узнают мишень не хуже антител, при этом полностью синтетические, но их стабильность в плазме без химических модификаций фосфатного остова оставляет желать лучшего. Пептиды- золотая середина по размеру и иммуногенности, но их протеолитическая деградация в сыворотке может отрезать функциональный эпитоп раньше, чем частица достигнет цели. И малые молекулы, фолат или трансферрин, удобны для химической

конъюгации и обладают чёткими механизмами рецептор опосредованного эндоцитоза [60].

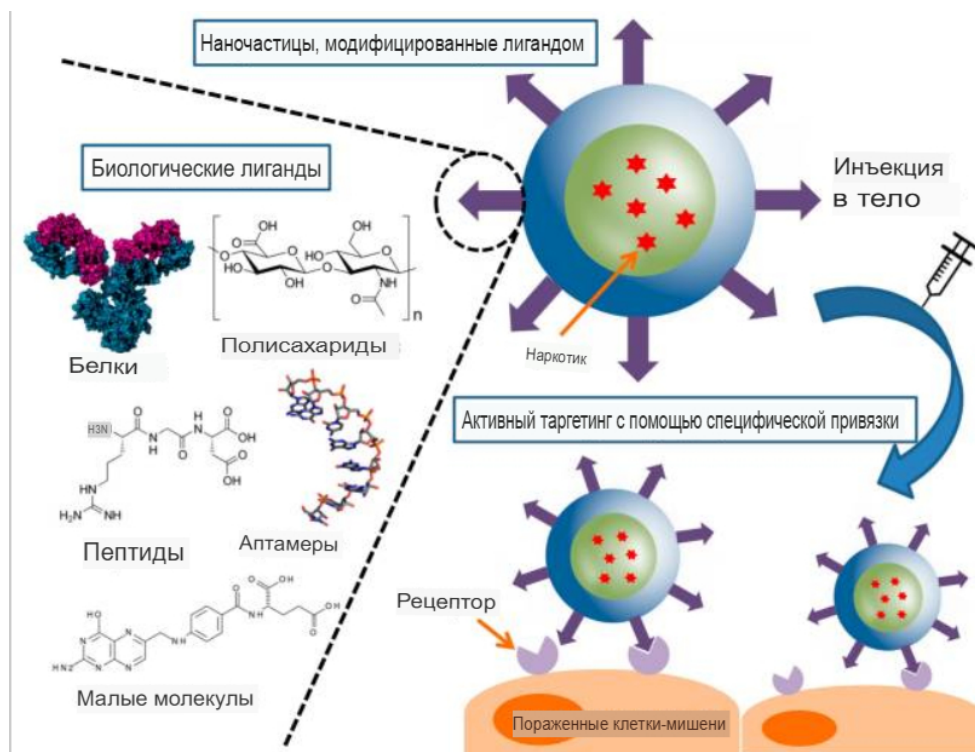


Рис 3: Схематическое изображение биологических лигандов, используемых для активного таргетинга наноразмерных носителей лекарственных средств
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31072061/>

Либо сначала собрать наночастицу, стабилизировать её поверхность, а потом химически конъюгировать лиганд к уже готовой поверхности, рискуя при этом сшить соседние частицы между собой или нарушить стерическую стабилизацию слоем полиэтиленгликоля. Либо взять амфифильный полимер с заранее пришитым лигандом и загнать его в самоорганизующуюся структуру мицеллы или липосомы, но тогда часть лиганда может оказаться захороненной внутри бислоя или обращённой внутрь водного ядра, что снижает общую функциональную плотность на поверхности [32]. А физическая адсорбция за счёт электростатики или гидрофобных взаимодействий, вообще ненадёжна, потому что в плазме крови полно собственных белков, которые вытеснят наш лиганд с поверхности за счёт эффекта Вромана в первые же секунды циркуляции. В данной работе мы как раз и пытаемся разобрать те типы

биологических лигандов которые дали хоть сколько-нибудь значимые результаты *in vivo*, на животных моделях, где есть хоть какая то имитация реальной патофизиологии. И начнём с белковых векторов, которые несмотря на свою громоздкость до сих пор остаются золотым стандартом специфичности. Активный таргетинг остается наиболее перспективным подходом для повышения внутриклеточной селективности наноносителей, однако его реализация требует преодоления комплекса барьеров — от молекулярного (гетерогенность мишеней, интернализация) до тканевого (стриминг крови, интерстициальная гипертензия, связывающий барьер). Современные исследования направлены на создание адаптивных платформ с мультивалентными лигандами, переключаемой авидностью и интегрированной способностью к эндосомальному эскейпу, а также на перенос акцента с таргетинга опухолевых клеток на таргетинг компонентов микроокружения. Учет этих факторов составляет методологическую основу для дизайна экспериментальных систем доставки, исследуемых в рамках настоящей диссертационной работы (табл. 2).

Таблица 2: Лиганды активного таргетинга лекарств на основе наночастиц

Тип	Лиганды (пример)	Преимущество / Недостаток
Белки	Антитела, трансферрин	Высокая специфичность/большой размер, низкая стабильность
Полисахариды	Гиалуроновая кислота	Может использоваться в качестве полимерной основы для наночастиц/рецепторов с повышенной экспрессией в тканях печени
Пептиды	RGD, IL4RPep-1	Простота изготовления, малый размер/расщепление пептидазой
Аптамеры	AS-1411, GBI-10	Высокая специфичность, малый размер/расщепление нуклеазой, высокая стоимость
Малые молекулы	Фолат, анисамид	Малый размер, очень низкая стоимость/мишени

Тип	Лиганды (пример)	Преимущество / Недостаток
	фенилборная кислота	также экспрессируются в нормальных тканях

Пептиды - самый прагматичный выбор с точки зрения трансляционной медицины, потому что синтезировать короткую аминокислотную последовательность на твердой фазе стоит дешево в пересчёте на грамм продукта. Стабильность при хранении выше, чем у крупных белков и даже в плазме они иногда держатся несколько часов, до того как сывороточные протеазы их нарежут. А ещё за счёт малого размера и гибкости их можно навесить на поверхность наночастицы с очень высокой плотностью, не опасаясь, что стерические затруднения или взаимное отталкивание цепей заблокируют сайт связывания с рецептором (рис. 4). Возьмём, к примеру, рецептор интерлейкина четыре IL4R, который сидит на мембране и опухолевых клеток и эндотелиоцитов питающих сосудов, что делает его удобной двойной мишенью [16]. IL4RPer 1 показал отличное связывание с клетками линии H226 гиперэкспрессирующими IL4R и что критически важно сохранял стабильность в цельной сыворотке до четырёх часов, пришили его к липосомам, нагруженным доксорубицином и посмотрели что будет. И оказалось, что клеточный захват меченых липосом IL4RPer 1 L Dox значительно эффективнее, чем у голых липосом без пептида. Накопление в опухоли возросло, противоопухолевая активность усилилась, а иммунофлуоресценция показала, что частицы облепили эндотелий опухолевых сосудов. То есть пептид сработал именно как навигатор, доставляя цитостатик сначала к сосудистому руслу опухоли, а уже оттуда начиналась диффузия в паренхиму. И это подтверждает, что активный таргетинг на эндотелий вполне себе жизнеспособная стратегия.

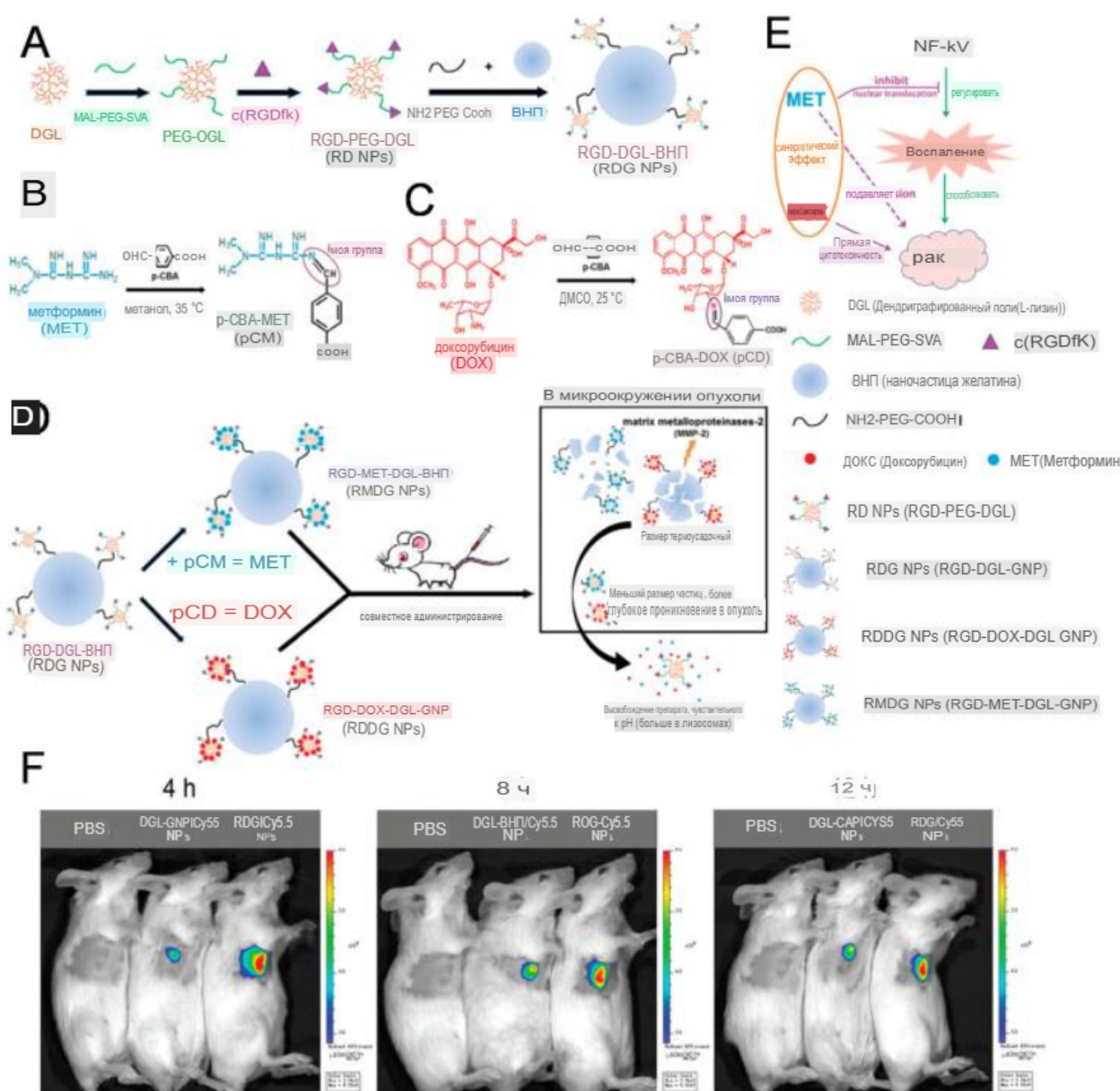


Рис 4: Наночастицы, конъюгированные с пептидами

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/nr/c8nr01184b>

Под действием протеаз в опухолевой ткани пептид расщепляется и обнажается скрытый CendR мотив, CRGDK или CRGDR в зависимости от варианта. И этот фрагмент теряет высокую аффинность к интегринам, но приобретает способность связываться с нейропилином первым. NRP 1- это рецептор, который участвует в регуляции проницаемости сосудов и интернализации макромолекул. И связывание CendR мотива с нейропилином запускает каскад, который открывает ворота в эндотелии и проталкивает в

ткань всё, что находится рядом. Свободный iRGD пептид не конъюгированный с наночастицами и не связанный с лекарством способен увеличить накопление совместно введённых наночастиц или химиопрепарата в опухоли. Он модифицирует сосудистую проницаемость через свой протеолитически активируемый механизм. И это принципиально иной уровень работы по сравнению с классическими лигандами. Это активное перепрограммирование транспортных свойств эндотелия в опухолевом очаге. И потенциал здесь есть, потому что можно снижать дозы химиотерапии, уменьшать системную токсичность и при этом не работать с ковалентной конъюгацией каждой новой молекулы. Добавляем iRGD в инфузию и он усилит доставку того что уже циркулирует в крови. А ещё это открывает возможность комбинировать iRGD с пассивно накапливающимися наночастицами, превращая их в активно таргетированные без химической модификации поверхности. Работы последних лет подтверждают, что механизм CendR пути работает и у приматов, что приближает нас к клиническим испытаниям подобных пептидных усилителей проницаемости. И возможно именно за такими подходами будущее активного таргетинга, когда перестанем вешать на частицу один лиганд и начнём использовать биологические триггеры, чтобы управлять поведением самой ткани мишени.

2.3 Сравнительный анализ стратегий: когда и какую стратегию целесообразно применять

При каких конкретных патофизиологических условиях и для какого именно агента одна стратегия даст прирост эффективности, а другая окажется пустой тратой ресурсов и лишней иммуногенной нагрузкой, разложим по критическим параметрам, чтобы не висеть в абстрактных рассуждениях. Пассивный таргетинг эксплуатирует анатомический дефект, фенестрированный эндотелий и отсутствие адекватного лимфатического дренажа в опухолевом узле: селективность здесь тканевая, грубая, на уровне

целого органа или его поражённого фрагмента, общее накопление в опухоли медиана по всем опубликованным работам где то 0,7 от введённой дозы, это по данным метаанализа Wilhelm, который до сих пор никто не опроверг. А активный таргетинг обещает клеточную и субклеточную селективность за счёт молекулярного узнавания лигандом рецептора. По общему накоплению в опухолевой ткани активные конструкции часто не превосходят пассивные, потому что EPR эффект всё равно доминирует на этапе экстравазации, а лиганд лишь перераспределяет уже попавшие в интерстиций частицы в пользу клеток, несущих рецептор. И более того, эта самая лигандная молекула может создать барьер связывающих сайтов и зафиксировать частицу в периваскулярной зоне, не дав ей уйти вглубь паренхимы, где плотность рецептора может быть ниже, а гипоксия выше [49]. Пассивный таргетинг зависит от степени васкуляризации и от интерстициального давления, которые в разных участках одной и той же опухоли могут отличаться в разы. Но он не зависит от того какой именно клон опухолевых клеток сидит в данной лакуне. А активный таргетинг критически привязан к гомогенности экспрессии мишени. И если в первичном узле HER2 у девяноста процентов клеток, то в метастазах и особенно после неоадьювантной терапии можно получить антиген негативную селекцию и тогда вся лигандная модификация становится балластом, который увеличивает гидродинамический радиус и ускоряет клиренс. Пассивная липосомальная форма или полимерная мицелла - это отработанная технология, которую можно масштабировать на промышленных линиях с приемлемой вариабельностью. А вот повесить на поверхность ста нанометрового пузырька пептид или антитело с заданной плотностью и воспроизводимой ориентацией активного сайта наружу - уже другой уровень сложности. Пассивный таргетинг выигрывает в ситуациях, когда имеется дело с солидными опухолями с высокой степенью ангиогенеза и сохранным EPR эффектом. Гепатоцеллюлярная карцинома, высоковаскуляризованные метастазы в печени или лёгких на ранних стадиях пока интерстициальное

давление ещё не подскочило до критических значений. И особенно если терапевтический агент не требует обязательной интернализации, например, ингибиторы ангиогенеза, которые работают по эндотелию снаружи, или иммуномодуляторы, действующие на компоненты микроокружения в интерстициальном пространстве. Но как только переходят к десмопластическим опухолям, рак поджелудочной железы с его плотной фиброзной стромой и колоссальным интерстициальным давлением, или колоректальный рак с муцинозным компонентом, EPR эффект становится настолько минимальным, что пассивный таргетинг перестаёт работать вовсе [56]. Частицы просто не могут просочиться через сдавленные сосуды и плотный матрикс. И активный таргетинг в одиночку тоже не спасает, потому что ему нечего доставлять в ткань, если нет первичной экстравазации. В таких случаях нужны комбинированные стратегии, либо предварительная деградация стромы гиалуронидазой или коллагеназой, доставленной пассивно, либо таргетинг на компоненты самой стромы, на опухоль ассоциированные фибробласты с их FAP маркером, чтобы расчистить дорогу. Малые молекулы цитостатиков с высоким коэффициентом диффузии могут эффективно работать даже будучи высвобожденными в интерстиций без обязательного проникновения внутрь клетки через рецептор опосредованный эндоцитоз. Им достаточно пассивного накопления, чтобы создать локальную концентрацию и за счёт градиента просочиться через мембрану. Нуклеиновые кислоты, siRNA, мРНК, компоненты CRISPR систем, без активного таргетинга и рецептор опосредованного эндоцитоза просто не выжить. Потому что голая нуклеиновая кислота в интерстиции либо деградирует нуклеазами либо будет смыта с током жидкости, и даже если её запихнуть в наночастицу без лиганда, пассивный захват клетками минимален. Там нужен чёткий механизм интернализации и эндосомального эскейпа, иначе вся конструкция уйдёт в лизосомы и переварится без следа. Если основная проблема- это кардиотоксичность антрациклинов или нефротоксичность цисплатина, то

пассивная липосомальная форма уже даёт выигрыш в терапевтическом индексе по сравнению со свободным препаратом. И активный таргетинг может дополнительно улучшить ситуацию, снизив накопление в критических органах, поскольку печень всё равно останется главным фильтром для любых наночастиц. Если вешается лиганд, который начинает активно связываться с гепатоцитами или купферовскими клетками, есть риск получить гепатотоксичность, которой не было при пассивной доставке. Пассивное накопление обеспечивает первичную селективность и доставку частицы в опухолевый регион, а активный таргетинг удерживает частицу в нужном месте, запускает интернализацию и модулирует внутриклеточный трафик. И конкретные реализации этого принципа уже есть. Частица циркулирует долго, пассивно накапливается в опухоли, а активный таргетинг включается именно там, где надо, не провоцируя раньше времени опсонизацию или нежелательное связывание в кровотоке. А если говорить про доставку нуклеиновых кислот, то активный таргетинг - обязательное условие, и причём нужен лиганд, который не просто затащит частицу в эндосому, но и обеспечит разрыв её мембраны. В десмопластических опухолях с плотной стромой по отдельности ни пассивный, ни активный таргетинг не работают, там надо либо бить по строме либо использовать частицы, меняющие размер [38]. Как желатиновые конструкции, которые распадаются под действием металлопротеиназ на более мелкие фрагменты, способные к диффузии. Если планируется довести свою разработку до клиники, пассивные наноформулировки имеют отработанный регуляторный путь. А для активной конструкции придётся доказывать не просто эффективность, а превосходство над пассивным аналогом в рандомизированном исследовании, потому что в фазе три разница между пассивной и активной липосомой часто оказывается статистически незначимой, а стоимость производства и риски иммуногенности выше.

3 Анализ "умных" и комбинированных стратегий доставки

3.1 Стимул-чувствительные системы

Хитозан в контексте стимул-чувствительных систем является удобной матрицей для химической модификации. Первичная структура полисахарида состоит из чередующихся остатков глюкозамина и N-ацетилглюкозамина. Свободные аминогруппы глюкозаминовых звеньев доступны для ковалентной конъюгации с функциональными молекулами. Это свойство используют для создания конструкций, реагирующих на изменение окислительно-восстановительного потенциала при переходе из внеклеточной среды в цитоплазму опухолевой клетки. Редокс-чувствительность основана на градиенте концентрации восстановленного глутатиона. В плазме крови концентрация GSH находится в диапазоне единиц микромоль на литр [61]. В цитозоле опухолевых клеток этот показатель возрастает до десяти миллимоль на литр. При введении дисульфидного мостика в мицеллярную структуру на основе хитозанового олигосахарида, как в случае конъюгата CSO-ss-SA, наночастица сохраняет стабильность при циркуляции и пассивно накапливается в печени и селезёнке. Деградация носителя запускается только после интернализации опухолевыми клетками, когда внутриклеточный глутатион восстанавливает дисульфидную связь. Высвобождение цитостатика происходит в цитоплазме, что необходимо для агентов с внутриклеточными мишенями. Это снижает системную токсичность и увеличивает локальную биодоступность препарата, обеспечивая ингибирование опухолевого роста. Ультразвук используют как внешний триггер для активации контролируемого высвобождения. Преднизолона фосфат включали в оболочку путём электростатического связывания. При физиологической температуре без ультразвукового воздействия высвобождение препарата минимально. После приложения ультразвука мембрана нанопузырька дестабилизируется, что приводит к ускоренному высвобождению без начального взрывного эффекта. Аналогичные подходы применяли для доставки инсулина и кислорода [51].

Это создаёт основу для тераностики, объединяющей визуализацию локализации носителя и управление моментом высвобождения лекарственного средства. Свет представляет собой внешний триггер, позволяющий активировать высвобождение в заданной области ткани. Облучение проводят лазером в ближнем инфракрасном диапазоне, соответствующем окну прозрачности биологических тканей. Механизмы светочувствительного высвобождения включают фототермический нагрев, фотоизомеризацию и фоторасщепление химических связей. Конъюгат красителя IR820 с хитозаном поглощает фотоны и генерирует тепло, достаточное для гипертермической гибели клеток или дестабилизации носителя. В отличие от свободного IR820, конъюгат выводится через гепатобилиарную систему и обнаруживается в фекалиях, а не накапливается в почках, что изменяет токсикологический профиль [63]. Локальная гипертермия, индуцированная в клеточных линиях MES-SA, SKOV-3 и Dx5, вызывает остановку пролиферации. Одновременно обеспечивается визуализация, что соответствует концепции тераностики. Температурная чувствительность реализуется с использованием поли-N-изопропилакриламида и его производных, привитых к хитозану. Ниже нижней критической температуры растворения, составляющей около тридцати двух градусов Цельсия, полимер гидратирован, цепи находятся в расплавленном состоянии, структура набухает за счёт водородных связей с водой. При превышении LCST водородные связи разрушаются, полимер переходит в гидрофобное состояние и коллапсирует, выдавливая инкапсулированное вещество. Хитозан в таких конструкциях выполняет роль биосовместимого каркаса. Разработаны различные формы термочувствительных систем на основе хитозана, включая наноагрегаты, наночастицы, микрочастицы ядро-оболочка, мицеллы и гидрогели. Области применения варьируют от доставки цитостатиков и белков до тканевой инженерии и назальных форм. Гидрогель на основе карбоксиметилхитозана с привитым PNIPAAm и LCST около

тридцати двух градусов при комнатной температуре находится в жидком состоянии, а после введения в организм переходит в гель и обеспечивает пролонгированное высвобождение цисплатина. При этом наблюдается цитотоксичность в отношении клеток A549 при отсутствии токсичности для фибробластов. Магнитное поле применяют для наведения наноносителей на область опухоли и для индукции гипертермии. Наночастицы оксида железа покрывают хитозаном и нагружают паклитакселом. Возможна дополнительная функционализация фолиевой кислотой для активного таргетинга. Пальмитоилхитозан эффективно стабилизирует суперпарамагнитные наночастицы в водной фазе. Наложение внешнего магнитного поля позволяет концентрировать частицы в целевом регионе и нагревать их до гипертермических температур. Сочетание гипертермии с высвобождением химиопрепарата приводит к синергетической гибели клеток MCF-7. Введение редокс-чувствительного линкера создаёт систему с двойным ответом. Магнитное наведение сочетается с внутриклеточным разрушением дисульфидных мостиков под действием глутатиона. Селективный захват клетками HeLa обеспечивается фолатным рецептором. Такая конструкция позволяет осуществлять многоуровневый контроль поведения наночастицы в организме. Двойные стимулы повышают надёжность срабатывания системы за счёт реализации логического элемента на уровне химии полимеров. Хитозан с привитым орто-нитробензилсукцинатом демонстрирует ускоренное высвобождение камптотецина при одновременном воздействии низкого pH и ультрафиолетового облучения. В кислой среде эндосомы изменяется конформация полимера, а световое воздействие завершает разрушение носителя. Цитотоксичность в отношении клеток MCF-7 возрастает. Другой пример включает хитозан, привитый N-гидроксиэтилпропенамидом. При pH пять и четыре и температуре выше LCST наночастица агрегирует и высвобождает содержимое. Подобные системы представляют собой программируемые наноплатформы с несколькими уровнями защиты от

преждевременной активации. Анализ стимул-чувствительных систем на основе хитозана показывает, что их эффективность определяется не выбором единственного стимула, а рациональной комбинацией нескольких триггеров с учётом патофизиологии конкретной опухоли (табл. 3). Каждая из описанных систем по отдельности подтвердила работоспособность *in vitro* и *in vivo*. Проблема заключается в интеграции различных стимулов в единую терапевтическую стратегию без потери преимуществ и без увеличения рисков, связанных с биораспределением и токсичностью. В рамках данной работы принципы стимул-чувствительности будут исследованы при дизайне разрабатываемых носителей. Особое внимание будет уделено комбинированию pH-чувствительных и редокс-чувствительных элементов. Это позволит адаптировать профиль высвобождения к гетерогенному микроокружению целевой опухолевой модели. Клиническая трансляция подобных систем ограничена гетерогенностью внутриопухолевых параметров, сложностью масштабирования синтеза и необходимостью разработки диагностических методов для стратификации пациентов по выраженности конкретного стимула.

Таблица 3: Наночастицы на основе хитозана, чувствительных к pH

Наночастица	Эффективность загрузки/ высвобождения	Важные результаты
Наночастица хитозана	Эффективность загрузки: 21,4–72, 87% Эффективность высвобождения: 44,99 %, 38,36 % и 79,36 % при pH 1,2, pH 6,0 и pH 7,0	Высокая эффективность связывания. Благоприятная стабильность в желудочно-кишечном тракте в зависимости от pH. Снижение высвобождения препарата при кислом pH. Повышенная абсорбция доксициклина в тонком кишечнике. Улучшенная биодоступность при пероральном приеме (~42%) Снижение кардиотоксичности и нефротоксичности
Полиэтиленим-глицерин-1000 с хитозаном и g-D-атоксиферилполиэтиленгликолем	Эффективность загрузки: 40% Эффективность высвобождения: 5,71%, 19,3% и 23,9% при pH 7,4, pH 6,8 и pH 5,5 соответственно.	Быстрое высвобождение при более низких значениях pH. Высокая цитотоксичность в отношении клеток гепатокарциномы человека (HepG2 и BEL-7402) и клеток аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), а также усиление апоптоза раковых клеток. Более высокая эффективность наночастиц с доксорубицином по сравнению с адриамицином
Наночастица золота с покрытием из карбоксиметилхитозана	Эффективность загрузки: 83,3% Эффективность высвобождения: 96,6%, 88,82% и 10,46% в ацетатном и фосфатном буферах соответственно.	CS использовался и в качестве защитного, и в качестве восстанавливающего агента. Высокая стабильность восстановленных AuNPs при различных значениях pH (с доксорубицином и без него). Улучшенное поглощение наночастиц клетками при кислых значениях pH. Высвобождение лекарственного вещества при кислом pH за счет ионизации карбоксильных групп карбоксиметилцеллюлозы

Поведение наночастицы в живом организме это не только вопрос размера и дзета потенциала. Биологические интерфейсы, на которые она натывается сразу после введения в кровоток или нанесения на слизистую диктуют её дальнейшую судьбу. Слизистые оболочки, гликокаликс эндотелия, мембрана клетки мишени, строма опухоли- каждая из этих сред накладывает свой отпечаток на то дойдёт ли частица до цели или будет выведена с первой порцией мочи либо слизи. И последние два десятилетия значительные усилия были брошены на то, чтобы разделить и по отдельности оптимизировать ключевые интерфейсные свойства. И относительно новое понятие опухолевая репрессивность самого материала носителя. Мукоадгезивность - это способность прилипать к слизи. Механизмы здесь неспецифические и зависят от электростатики, водородных связей, гидрофобных контактов и физического переплетения полимерных цепей с муциновыми волокнами. Хитозан, карбопол и полиакриловая кислота были впервые описаны как усилители биоадгезии для буккальных и назальных форм. В онкологии мукоадгезивные носители используют для продления контакта с опухолями слизистых, рак толстой кишки, рак шейки матки, бронхоальвеолярный рак [17]. Частица задерживается на поверхности эпителия, и локальная концентрация цитостатика в зоне поражения растёт. Хитозановые покрытия на липосомах или полимерных ядрах увеличивают время удержания в колоректальных моделях и усиливают цитотоксичность по сравнению с частицами, которые просто соскальзывают и эвакуируются перистальтикой. Но мукопенетрация это ровно противоположная задача. Надо чтобы частица не застряла в слизи. Идея оформилась в начале двухтысячных с появлением ПЭГилованных и цвиттерионных поверхностей, которые сводят к минимуму и гидрофобные и электростатические взаимодействия с муциновыми фибриллами. Мукопенетрирующие наночастицы актуальны для опухолей, спрятанных за плотным слизистым барьером, рак поджелудочной железы, некоторые формы рака лёгкого, где бронхиальный секрет создаёт дополнительное препятствие.

Частицы PLGA, покрытые полиэтиленгликолем, проникают через слой муцина до десяти раз эффективнее чем непокрытые аналоги. А это даёт более равномерное распределение препарата в объёме опухоли, а не только в поверхностных слоях. Цитоадгезивность - целенаправленное прилипание к мембране опухолевой клетки за счёт лиганд рецепторного взаимодействия или неспецифических сил притяжения. В конце девяностых годов, когда пошла в ход RGD пептиды, фолат, моноклональные антитела, стало возможным усиливать рецептор опосредованный эндоцитоз и внутриклеточное накопление. Повышенное связывание с поверхностью клетки увеличивает вероятность захвата частицы и снижает её потерю с обратным током интерстициальной жидкости. Липосомы декорированные RGD пептидом демонстрируют увеличение интернализации в интегрин позитивных опухолях в 4-6 раз по сравнению с нецелевыми липосомами. И это особенно важно для агентов, которые работают строго внутри клетки, например, siRNA или ингибиторы топоизомераз. А опухолевая репрессивность- это свойство самого материала носителя подавлять рост опухоли независимо от загруженного лекарства. Концепция возникла в последние десять лет, когда накопились данные по наночастицам оксида церия, оксида железа, некоторым углеродным структурам, которые сами по себе модулируют окислительный стресс в опухолевых клетках или нарушают работу митохондрий [17]. Или мембранные везикулы, покрытые оболочкой из мембран нейтрофилов, которые работают как ловушки для провоспалительных цитокинов и перепрограммируют микроокружение с проонкогенного на противоопухолевый фенотип. Это уже не просто средство доставки, а активный компонент терапии. Доксил, одобренный в 1995 году для саркомы Капоши даёт прибавку в выживаемости без прогрессирования на 3-5 месяцев за счёт накопления в опухоли на уровне 10-15 процентов от введённой дозы и снижения кардиотоксичности с 20 процентов до менее чем 5 [21]. Комбинированные протоколы вроде ThermoDox с радиочастотной

абляцией при гепатоцеллюлярной карциноме в третьей фазе дали полный ответ у 33 процентов больных против 12 процентов в контроле. При нагреве до сорока двух градусов высвобождение доксорубина из термочувствительных липосом достигает ста процентов и внутриопухолевая концентрация возрастает в пять раз. Иммунотерапевтические интеграции тоже набирают обороты. Липидные наночастицы с мРНК в комбинации с пембролизумабом во второй фазе при меланоме вызвали CD8⁺ Т клеточный ответ у 70 процентов пациентов и объективный ответ у 25 процентов. Период полувыведения наночастиц удлиняется до двадцати пятидесяти часов против одного четырёх часов у свободного лекарства. А данные сцинтиграфии с индием 111 мечеными липосомами показывают, что ПЭГилирование снижает захват печенью на 5-10 процентов. Биомиметические подходы, такие как эритроцитарные мембранные оболочки на полимерных ядрах, в первой фазе при солидных опухолях продлевают циркуляцию до семидесяти двух часов и снижают иммунный клиренс на 80 процентов. А это потенциально удваивает эффективность на резистентных моделях. И метаанализы всех доступных клинических данных подтверждают, что наноносители в онкологии дают прибавку к выживаемости на уровне 15-25 процентов (табл. 4). Для оптимального результата нужно отбирать пациентов с высоким EPR статусом по данным функциональной визуализации и учитывать гетерогенность опухолевого микроокружения в каждом конкретном случае.

**Таблица 4: Избранные клинические исследования и одобренные методы
противоопухолевой терапии на основе наноносителей**

Наноноситель /лекарственное средство	Фаза/состоя ние	Индикация	Ключевые результаты
Доксил [®] (липосо мальный доксорубицин)	Одобрено (1995)	Рак яичников/сар кома Капоши	Увеличение PFS через 3-5 месяцев; кардиотоксичность <5% (по сравнению с 20% свободной); накопление опухоли на 10-15%
Абраксан [®] (пакл итаксел, связанный с альбумином)	Одобренный	Рак поджелудочн ой железы / Молочной железы	Общая выживаемость 8,5 против 6,7 месяца; нейропатия 3 % (против 10 %); AUC в 2,5 раза выше
М М - 3 0 2 (липосомальный доксорубицин, нацеленный на рецептор 2 эпидермального фактора роста человека)	II (Завершено)	Рак молочной железы	ORR 11% (по сравнению с 0%); PFS 7,6 по сравнению с 3,5 месяцами
ThermoDox [®] (те рмочувствитель ный липосомальный доксорубицин)	III (Продолжает ся)	Гепатоцеллю лярная карцинома	Частота объективного ответа 33 % (по сравнению с 12 %) при радиочастотной абляции; 5-кратное внутриопухолевое введение доксорубицина

В отличие от эндогенных триггеров, которые определяются локальной биохимией опухолевого узла и практически не поддаются внешней коррекции, экзогенные стимулы дают возможность дистанционного и временного

управления моментом высвобождения. Это принципиально иной уровень контроля. Можно активировать носитель именно тогда, когда он уже накопился в ткани мишени. И можно делать это многократно, дробя дозу и подстраиваясь под индивидуальный ответ пациента. Внешние стимулы не зависят от гетерогенности EPR эффекта или плотности рецепторов. Они просто приходят извне в заданный момент времени. Глубина проникновения стимула в ткани ограничена физикой. Свет видимого диапазона затухает через миллиметр. Ближний инфракрасный проходит до 3-5 сантиметров. Ультразвук добивает до 10-15 сантиметров, но теряет фокус в неоднородных средах. Переменное магнитное поле пронизывает тело насквозь, однако его трудно сфокусировать в малый объём. И каждый из этих стимулов требует своего типа наночастицы чувствительной именно к данному виду энергии. Магнитные наночастицы на основе магнетита имеют два механизма: первый- это магнитное наведение. Постоянное магнитное поле создаёт градиент силы, который буквально выдёргивает частицы из кровотока и прижимает к эндотелию в зоне интереса. Даже если EPR эффект слабый концентрацию носителя можно поднять в десять сто раз по сравнению с пассивным накоплением [44]. Но это работает только для поверхностно расположенных опухолей, потому что сила магнита падает пропорционально кубу расстояния. Для глубоких метастазов приходится использовать имплантируемые магнитные аппликаторы или массивы микромагнитов, что уже инвазивно. Второй механизм- это магнитно-индуцированная гипертермия. В переменном магнитном поле с частотой 100-500 килогерц наночастицы разогреваются за счёт гистерезисных потерь или релаксации Нееля Брауна. Локальный нагрев до 40-45 градусов вызывает несколько эффектов. Термочувствительные липосомы или полимерные мицеллы меняют конформацию и выбрасывают препарат [26]. Перфузия и проницаемость сосудов возрастают, что усиливает EPR эффект для последующих доз. Прямое цитотоксическое действие на опухолевые клетки запускает апоптоз через денатурацию белков теплового

шока, а также сенсibilизация к химиотерапии и радиации. Если поднять температуру выше 46 градусов наступает термоабляция с коагуляционным некрозом, но растёт риск повреждения прилежащих здоровых тканей. Главная проблема- это неравномерность распределения частиц в объёме опухоли. Кластеры создают горячие точки и температурное поле становится пятнистым и магнитные частицы редко используют в чистом виде. Их комбинируют с лигандами для активного таргетинга, покрывают рН чувствительными оболочками, чтобы объединить внешний и внутренний стимулы или наращивают золотую оболочку для фототермии. Получается универсальная платформа, которая откликается и на магнитное поле, и на лазерное облучение. Световое излучение даёт наилучшее пространственное разрешение. Луч можно сфокусировать в пятно диаметром меньше миллиметра, но глубина проникновения ограничена. Для ближнего инфракрасного диапазона первого окна семьсот девятьсот нанометров это три пять сантиметров в мягких тканях. Для второго окна тысяча тысяча семьсот нанометров чуть больше. Глубоко расположенные опухоли требуют введения световода через эндоскоп или иглу. Механизмы фотоактивации делятся на три типа. Фотоизомеризация, когда молекула меняет пространственную конфигурацию и дестабилизирует липидный бислой. Фоторасщепление ковалентных связей, например, орто- нитробензиловых линкеров, которые отваливаются и высвобождают ПЭГ оболочку или препарат. И фототермический нагрев, когда наночастицы золота или сульфида меди поглощают фотоны и греют среду. Всё как в магнитной гипертермии только источник энергии другой. Фотосенсибилизатор под действием света генерирует синглетный кислород и другие активные формы кислорода. Они окисляют липиды мембран и белки, запуская апоптоз и некроз. Если загрузить фотосенсибилизатор и химиопрепарат в один носитель получается синергия. А генерируемые активные формы кислорода могут служить триггером для редокс чувствительных полимеров. В каскадной активации для увеличения

глубины используют двухфотонное поглощение. Два фотона с длиной волны восемьсот тысяча нанометров приходят одновременно, и их суммарная энергия соответствует ультрафиолетовому кванту. Специальные хромофоры с большим сечением двухфотонного поглощения позволяют активировать высвобождение на глубине до сантиметра с микрометровым разрешением. Но это требует фемтосекундных лазеров и сложной оптики [71]. Фокусированный ультразвук высокой интенсивности HIFU создаёт в фокусе температуру сто градусов и вызывает коагуляционный некроз. А в режиме умеренного нагрева сорок пять градусов активирует термочувствительные липосомы. Микропузырьки газа в поле ультразвука колеблются и схлопываются, создавая ударные волны и микроструи жидкости. Это механически разрушает липосомы и полимерные мицеллы. Газонаполненные микропузырьки одновременно служат контрастом для ультразвуковой визуализации. Тераностика в реальном времени [11]. Сонодинамические сенсibilизаторы вроде наночастиц оксида титана генерируют активные формы кислорода под действием кавитации. Жидкие перфторуглеродные нанокapли при облучении ультразвуком испаряются и превращаются в газовые пузырьки. Объём резко увеличивается, оболочка лопается и препарат высвобождается. Контраст между включённым и выключенным состоянием очень высокий. Радиочастотное и микроволновое излучение проникают ещё глубже и могут нагревать проводящие наноструктуры. Углеродные нанотрубки, наноалмазы, графен под действием радиочастотного поля греются за счёт джоулевых потерь. Но нагрев неселективный. Мышцы и кровь тоже проводят ток и греются. Нужны имплантируемые аппликаторы для фокусировки поля. Магнитное ядро с золотой оболочкой позволяет греть частицу и переменным магнитным полем и лазером. Выбор стимула зависит от локализации опухоли, микропузырьки с магнитными наночастицами сначала захватываются в опухоли постоянным магнитом, а потом активируются ультразвуком. Липосомы чувствительные и к pH, и к температуре, и к свету. Такая

многофункциональная конструкция сработает только если совпадут внутренний ацидоз и внешнее облучение. Ложных срабатываний практически нет. ThermoDox термочувствительный липосомальный доксорубин активируемый радиочастотной абляцией в третьей фазе при гепатоцеллюлярной карциноме не показал убедительного преимущества в общей выживаемости. Причина в неоптимальном дизайне протокола и гетерогенности нагрева. Опухоль греется неравномерно и часть липосом остаётся неактивированной. NanoTherm магнитные наночастицы для гипертермии одобрены в Европе для глиобластомы в комбинации с лучевой терапией. Фотодинамическая терапия с наноносителями вроде Visudyne широко применяется в офтальмологии, но в онкологии пока в основном на стадии исследований. Основные барьеры - сложность стандартизации физических параметров для каждого пациента. Интенсивность поля, частота, длительность воздействия должны быть подобраны индивидуально. Нужно специализированное оборудование и обученный персонал. Свет проникает неглубоко, а HIFU требует акустического окна. И токсичность самих наноматериалов при длительном накоплении в печени и селезёнке до конца не изучена. Будущее за индивидуальным подбором режима активации под конкретную опухоль и конкретного пациента. Универсального решения не существует. Магнитное поле хорошо для поверхностных опухолей, ультразвук для глубоких, свет для тех, куда можно добраться эндоскопом. И только комбинируя стимулы и интегрируя их с пассивным и активным таргетингом, можно рассчитывать на реальное повышение терапевтического индекса в клинике. А пока большинство этих технологий остаётся уделом лабораторных грызунов и единичных пилотных исследований на человеке.

3.2 Стратегии преодоления множественной лекарственной устойчивости

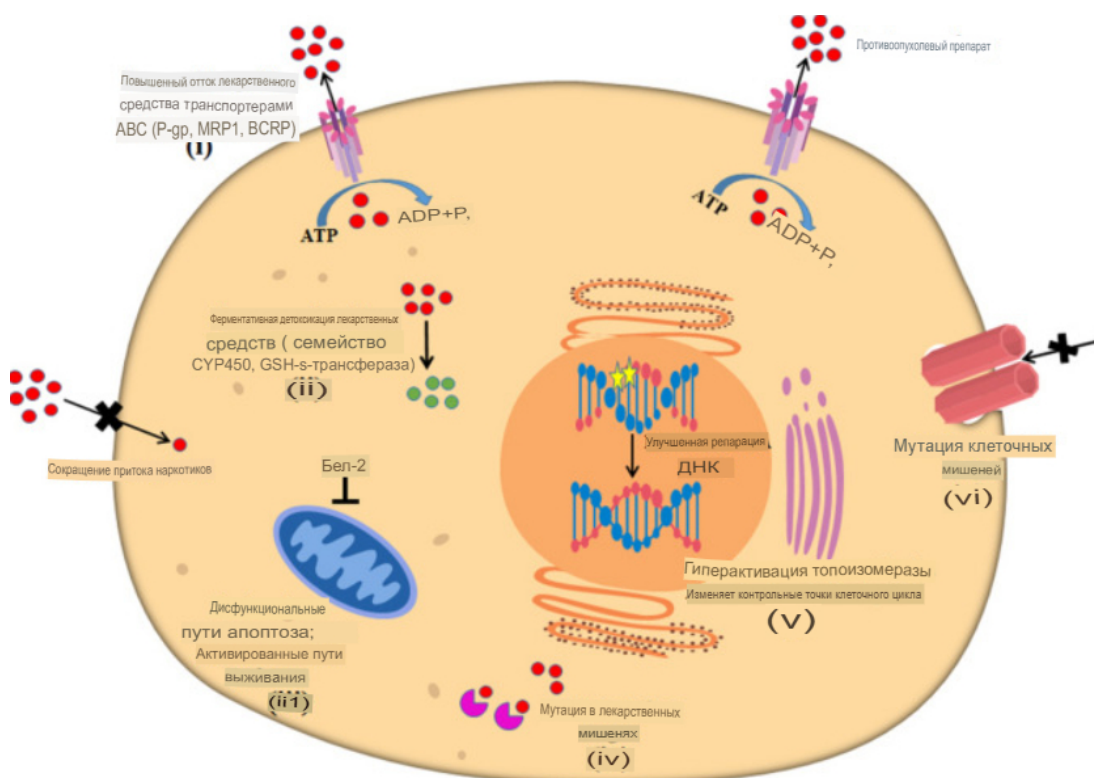
Множественная лекарственная устойчивость - фундаментальное свойство опухолевой ткани, приобретаемое в процессе селекции под давлением химиотерапии. Клетка не мутирует в одном конкретном гене, чтобы стать резистентной к одному конкретному препарату. Она перестраивает сразу несколько систем и в итоге перестаёт реагировать на агенты с совершенно разной химической структурой и механизмом действия. И вот этот многоуровневый адаптивный ответ затрагивает транспортные белки мембраны, каскады апоптоза, репарацию ДНК, метаболические пути и диалог со стромой, АТФ связывающие кассетные белки, которые работают как насосы, выкачивающие ксенобиотики из цитоплазмы обратно во внеклеточное пространство [57]. Алкилирующие агенты и препараты платины сшивают цепи и вызывают остановку репликации. Но в резистентной клетке системы репарации работают на повышенных оборотах. Нуклеотидная эксцизионная репарация вырезает аддукты. Гомологичная рекомбинация восстанавливает двунитевые разрывы. Негомологичное соединение концов сшивает хромосомы пусть и с ошибками, но сохраняя жизнеспособность. И мутационный груз накапливается, а клетка живёт. Гипоксия стабилизирует HIF, а тот в свою очередь задирает экспрессию P gr и переключает метаболизм на гликолиз. Ацидоз снижает накопление слабых оснований, к которым относятся многие цитостатики, и активирует лизосомальную секвестрацию, когда препарат запирается в везикулах и не доходит до мишени. Опухоль ассоциированные фибробласты секретируют HGF и TGF и передают резистентность через внеклеточные везикулы. А плотный коллагеновый матрикс создаёт физический барьер и индуцирует адгезивную резистентность, когда контакт с матриксом через интегрины подавляет апоптоз. А ещё в одну частицу можно засунуть сразу два агента: цитостатик и ингибитор MDR; доксорубицин и верапамил; паклитаксел и элагокар. Фармакокинетика

становится согласованной, оба препарата приходят в клетку одновременно и в нужном соотношении. Системная экспозиция ингибитора падает, он заперт в носителе до момента интернализации. Токсичность снижается, доклинические данные по таким ко- доставкам выглядят обнадеживающе. Но если апоптоз заблокирован можно заставить клетку умереть другим путём: ферроптоз через пероксидацию липидов, где наночастицы с эрастином или RSL3 или просто с ионами железа запускают цепное окисление мембран и клетка гибнет в обход каспаз, аутофагическая гибель через ингибирование mTOR хлорохином, пироптоз через активацию инфламмасом и газдермина D. Всё это можно упаковать в наноносители и доставить в резистентные клетки или стволовые клетки. Таргетинг на CD44, CD133, EpCAM, альдегиддегидрогеназу, ко-доставка химиопрепарата и ингибитора сигнальных путей самообновления, Hedgehog, Wnt бета катенин, Notch - одновременное уничтожение пролиферирующей массы и пула стволовых клеток, без которого рецидив неизбежен, разрушая внеклеточный матрикс коллагеназой или гиалуронидазой иммобилизованной на наночастице заблокировать CAFs через FAP с доставкой ингибиторов HGF или TGF бета, перепрограммировать M2 макрофагов в M1 фенотип с помощью TLR агонистов или ингибиторов CSF1R, снизить интерстициальное давление, улучшить перфузию, дать возможность другим носителям проникнуть глубже . Резистентные зоны опухоли часто имеют более кислый pH, больше протеаз, выше уровень глутатиона. И можно сделать носитель, который высвобождает нагрузку именно там, pH чувствительные полимеры не только выпускают препарат при ацидозе, но и обеспечивают эндосомальный эскейп для siRNA против P gr. Фермент чувствительные линкеры отрезают маскирующий ПЭГ только в присутствии MMP2 или MMP9 [39]. Дисульфидные мостики рвутся под действием глутатиона и высвобождают siRNA в цитоплазму, где она и должна работать. Магнитная или фототермическая гипертермия греет опухоль, снижает интерстициальное

давление, усиливает перфузию и сенсibiliзирует клетки к химиопрепаратам. При нагреве выше сорока двух градусов подавляется экспрессия P gp и индуцируется апоптоз. И можно комбинировать термочувствительные липосомы с лазерным или магнитным нагревом. Тройная ко-доставка, цитостатик плюс ингибитор P gp плюс siRNA против Bcl два. Химиоиммунотерапия, когда к цитостатику добавляют иммуномодулятор, чтобы разбудить противоопухолевый иммунитет, подавленный в резистентных опухолях. Тераностика это когда одна и та же частица и визуализирует накопление и лечит. Доклинические модели не воспроизводят гетерогенность MDR человеческой опухоли. Ксенографты на голых мышах слишком просты, нет валидированных биомаркеров, чтобы отобрать пациентов с MDR позитивными опухолями. Токсичность комбинированной доставки может проявиться неожиданно на здоровых тканях, масштабирование многофункциональных носителей с воспроизводимым качеством - это отдельная технологическая задача. И перспективы видятся в платформах, которые меняют композицию в ответ на динамику резистентности, в использовании экзосом и внеклеточных везикул как природных носителей с низкой иммуногенностью. В доставке CRISPR компонентов для нокаута генов ABC транспортеров, до клиники всему этому ещё далеко, в рамках данной работы будут учтены принципы преодоления MDR при дизайне экспериментальных носителей с акцентом на ко- доставку цитостатика и ингибитора P gp или siRNA против ABCB1 в составе стимул чувствительных наночастиц и на оценку эффективности на моделях, воспроизводящих резистентный фенотип, без решения проблемы MDR вся элегантность активного таргетинга и умных триггеров разбивается о

способность опухоли выживать в присутствии лекарства.

Рис 5: Механизмы, способствующие развитию множественной лекарственной



устойчивости в раковых клетках

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5380843/>

Последние достижения в области нанотехнологий направлены на преодоление множественной лекарственной устойчивости путём доставки сразу нескольких агентов в одной частице (рис. 5). Речь идёт о комбинациях химиопрепаратов с адъювантами и нуклеиновыми кислотами в форме ДНК, малых интерферирующих РНК или матричных РНК. И такие платформы позволяют воздействовать как на механизмы устойчивости, связанные с работой эффлюксных помп и не зависящие от них адаптивные перестройки клетки. Р гликопротеин вносит вклад в клиническую резистентность при многих подтипах злокачественных новообразований, ингибирование транспортной функции Р gr рассматривается как рациональная стратегия. Умные наноматериалы меняют фармакокинетические параметры препарата и увеличивают его удержание внутри клетки. А целый ряд неионогенных

поверхностно активных веществ, включая витамин Е в форме TPGS, Бридж 35, плуроники, полиэтиленгликоль и полиэтиленоксид, способны подавлять активность Р гр. Они образуют прочные водородные связи с трансмембранными участками белка и занимают сайты связывания лекарств, что усиливает абсорбцию и внутриклеточную задержку агента [62]. В одной из работ на основе конъюгата фосфатидилэтаноламина с полиэтиленгликолем и витамином Е были получены наномицеллы для совместной инкапсуляции паклитаксела и куркумина. Их вводили мышам с ксенографтами резистентной к паклитакселу аденокарциномы яичника линии SK OV 3TR. И результаты показали успешную доставку обоих веществ и подавление опухолевого роста именно за счёт мицеллярного носителя. Липидные нанокапсулы с этопозидом способствовали обращению Р гр опосредованной резистентности в клетках глиомы линий C6, F98 и 9L. Внутриклеточная эффективность этопозида повышалась именно в тех клетках, где наблюдалась гиперэкспрессия Р гр. А термочувствительные полимерные наноматериалы также применялись для преодоления резистентности, связанной с мембранным насосом MDR1. На основе бета- циклодекстрина и сополимера ПЭГ с PNIPAAm были созданы супрамолекулярные наночастицы для доставки паклитаксела и доксорубицина. Эти частицы тестировали *in vitro* на линиях HepG2 MDR1 и H460 MDR1 и *in vivo* на мышах BALB с ксенографтами HepG2 MDR1. Механизм обращения резистентности включал усиление клеточного захвата наноразмерных лекарственных форм, увеличение внутриклеточного удержания и подавление насосной активности. Другой вариант термочувствительного носителя представлял собой бета циклодекстрин с привитым блок сополимером PNIPAAm и POEGA для образования комплекса включения с доксорубицином и паклитакселом. Эти наноносители были стабильны и обеспечивали повышенный клеточный захват химиопрепаратов. Их применяли при тридцати семи градусах, что соответствует нормальной температуре тела. И в результате наблюдалось ингибирование MDR1

опосредованной устойчивости как в культуре клеток HepG2 MDR1 и H460 MDR1, так и в ксенографтной модели на голых мышах. ПЭГилированные наносистемы на основе полимолочной кислоты применялись для комбинированной доставки циклоспорина А и gefitinib в моделях резистентности *in vitro* и *in vivo*. Такая система нарушала EGFR опосредованные нижестоящие сигнальные каскады и в итоге подавляла опухолевый рост и инвазию. Также происходила инактивация функции сигнального трансдуктора и активатора транскрипции STAT. Нанодиамды представляют собой углеродные наночастицы с сайтами связывания для терапевтических агентов. Обратимое связывание обеспечивает пролонгированное высвобождение препарата в целевом участке при хорошей биосовместимости. Нанодиамды изменяют работу эффлюксных насосов опухоли и способствуют внутриклеточному удержанию доксорубина и усилению апоптоза в резистентных клетках рака молочной железы человека и мыши, а также в ксенографтной модели. На основе фосфата кальция тоже создают наноматериалы для обращения P gp опосредованной резистентности. Механизм связан с энергозависимым ингибированием эффлюксных транспортёров. Наночастицы фосфата кальция нагруженные доксорубином и декорированные RGD пептидом были нацелены на клетки с множественной лекарственной устойчивостью и вызывали внутриклеточный выброс ионов кальция. Систему обозначили как опухоль нацеленный генератор ионов кальция. Первоначальный всплеск ионов кальция в митохондриях нарушает клеточное дыхание путём сдвига кальциевого гомеостаза что блокирует синтез АТФ и ингибирует P gp опосредованную резистентность. Возникающая внутриклеточная гипоксия подавляет экспрессию гена HIF один альфа и снижает продукцию P gp. Такой наногенератор одновременно угнетает и биосинтез, и функциональную активность транспортёров и способствует обращению резистентности в клетках MCF 7 ADR и у голых мышей. Одностенные углеродные нанотрубки также демонстрировали способность

преодолевать лекарственную устойчивость. Совместная доставка антитела против P gp и доксорубина с помощью таких нанотрубок, нацеленная на стволовые клетки лейкоза линии K562R, приводила к подавлению развития опухоли и метастазирования. В более ранней работе на карбонатных апатитовых наночастицах чувствительных к pH были закреплены последовательности против генов ABCG2 и ABCB1 для двойного нацеливания малых интерферирующих РНК на клетки рака молочной железы MCF 7. Этот двойной подход сенсibilizировал клетки и повышал токсичность более чем на пятьдесят процентов при обработке цисплатином, паклитакселом и доксорубином. Одиночное нацеливание siRNA также ресенсibilizировало клетки, но двойной вариант давал более выраженный эффект. Нормальные клетки используют различные механизмы репарации, чтобы избежать репликации мутированной ДНК и злокачественной трансформации. Если повреждённая ДНК не восстанавливается, то мутированные клетки обычно элиминируются апоптозом. Множественная лекарственная устойчивость, не зависящая от эффлюксных помп, может развиваться в раковых клетках через активацию антиапоптотических механизмов, включая повышенную экспрессию гена Bcl два и подавление проапоптотических сигналов либо через факторы HIF один альфа и NF каппа В. NF каппа В регулирует транскрипцию генов, вовлечённых в пролиферацию, миграцию, инвазию, ускользание от апоптоза и выживание. Атипичная регуляция NF каппа В критична для формирования множественной лекарственной устойчивости. Опухолевое микроокружение также играет важную роль в развитии лекарственной устойчивости наряду с прогрессией опухоли. Раковые и стромальные клетки погружённые во внеклеточный матрикс определяют инвазивность, метастазирование и чувствительность к препаратам. Раковые клетки используют аэробный гликолиз интенсивнее чем окислительное фосфорилирование из-за высокого уровня гликолиза и плохого выведения метаболитов. Накопление молочной кислоты закисляет внеклеточную среду

за счёт увеличения концентрации протонов. Значительный перепад pH с кислым значением во внеклеточном матриксе и нейтральным или слабощелочным внутри клетки влияет на эффективность химиопрепаратов ионизируя их, затрудняя проникновение через мембрану, что снижает внутриклеточный захват через транспортёры, и ведёт к лекарственной устойчивости. Опухолевое микроокружение обладает уникальными характеристиками, активно способствующими развитию множественной лекарственной устойчивости [50]. Умные наноматериалы используют эти физиологические особенности и отвечают на условия микроокружения, что даёт более эффективное лечение по сравнению с традиционной химиотерапией. Умные наночастицы реагируют на клеточный pH для высвобождения химиопрепаратов в опухолевом очаге. Множество pH чувствительных полимерных наноматериалов изучалось с целью преодоления устойчивости, обусловленной кислым микроокружением. Полимерные наночастицы на основе полиакрилатного производного с дисульфидными группами нагруженные доксорубицином и декорированные циклическим RGD пептидом демонстрировали стабильность и высвобождение препарата как в кислой среде, так и в условиях редокс потенциала на клетках колоректального рака HCT 116. Такие частицы рассматриваются как перспективная нанотерапевтическая система. Наномицеллярная система для совместной доставки ингибитора Р gr дисульфирама и паклитаксела была создана на основе блок сополимера ПЭГ с полилизинном несущим диметиламиновые боковые цепи. Эти мицеллы меняли поверхностный заряд в зависимости от pH среды. В нейтральной плазме при pH 7,4 они имели отрицательный заряд, но в кислой опухолевой среде переключались на положительный. Положительный заряд усиливал клеточный захват и способствовал преодолению резистентности в клетках. Аналогичным образом мицеллы на основе полимеров PDPA и фторсодержащих метакрилатов конъюгированные с доксорубицином меняли поверхностный заряд в

зависимости от микроокружения и эффективно доставляли препарат в клетки HeLa. Опухолевое микроокружение также создаёт гипоксические условия, которые ведут к лекарственной устойчивости поскольку клетки, лишённые кислорода, растут медленно и менее чувствительны к традиционным химиопрепаратам. Окислительный стресс изменяет микроокружение опухоли. Усиленный окислительный стресс способствует развитию опухоли и связанной с ней лекарственной резистентности. Воздействие на окислительный стресс и гипоксическое микроокружение также даёт возможность преодолеть множественную лекарственную устойчивость. Гипоксические условия сопутствуют многим типам рака из-за ограниченного поступления кислорода, что приводит к гиперэкспрессии транскрипционного фактора HIF1. HIF1 является центральным регулятором ответов на гипоксию и способствует аномальному ангиогенезу и лекарственной устойчивости в ряде подтипов опухолей. Гипоксия также критически влияет на экспрессию ABC транспортёров. Ингибирование HIF 1 значительно сенситизирует клетки к химиопрепаратам и выступает антагонистом p53 опосредованной клеточной гибели. Нанопрепараты могут легко нацеливаться на фактор HIF 1, чтобы восстановить апоптотическую сигнализацию и обратить лекарственную устойчивость. Полимерные наноматериалы, имитирующие под мембрану раковых клеток и конъюгированные с гемоглобином и доксорубицином, использовались для обращения резистентности. Гемоглобин, обладая кислород переносящей способностью, подавляет экспрессию HIF 1, что в свою очередь снижает экспрессию гена MDR1 и усиливает цитотоксичность в линиях MCF 7 и MCF 10A. Наночастицы нитрата серебра применялись для воздействия на ангиогенез путём снижения экспрессии генов VEGF и GLUT1 и ингибирования сигнального пути HIF один альфа в клетках MCF 7. Наномицеллы декорированные siRNA специфичной к HIF 1 и нагруженные доксорубицином тестировались на клетках рака простаты PC3 и в ксенографтной модели мышей. Наблюдалось ингибирование

клеточной пролиферации, нарушение ангиогенеза, подавление миграции клеток в гипоксических условиях и торможение опухолевого роста без запуска иммунной реакции. Такие мицеллы снижали экспрессию MDR1 и сенсibilizировали клетки к доксорубину при гипоксии.

3.3 Тераностика: комбинирование диагностики (контрастные агенты) и терапии в одной платформе

Тераностика - попытка уйти от унифицированной химиотерапии к индивидуально адаптированному лечению, стандартные протоколы назначения цитостатиков не учитывают гетерогенность накопления препарата в опухоли конкретного пациента. А без обратной связи в реальном времени работа ведется вслепую, концепция объединения диагностического и терапевтического модулей в одной наноплатформе позволяет эту обратную связь наладить. Появляется возможность видеть, где находится носитель и сколько его скопилось, прежде чем активировать высвобождение или принять решение о смене тактики [13]. Степень васкуляризации и выраженность EPR эффекта варьируют от пациента к пациенту на порядок, уровень экспрессии молекулярных мишеней для активного таргетинга не постоянен и меняется в процессе лечения, метаболические параметры микроокружения, ацидоз, гипоксия, редокс потенциал, определяют эффективность стимул чувствительных систем, динамика формирования резистентности через активацию ABC транспортёров или антиапоптотических белков требует мониторинга, состав и поляризация иммунного инфильтрата прямо влияют на ответ. Тераностика даёт инструмент для неинвазивной оценки этих параметров с помощью того же носителя, который несёт лекарство. А это уже переход от статичной схемы к адаптивной терапии, где доза и момент активации корректируются на основе данных визуализации. Выбор контрастного модуля зависит от требуемого пространственного разрешения и глубины проникновения. Для МРТ используют суперпарамагнитные оксиды

железа, которые дают отрицательный T2 контраст и одновременно могут служить агентами для магнитной гипертермии. Или комплексы гадолиния, обеспечивающие положительный T1 контраст, но с оглядкой на нефротоксичность при диссоциации иона [1]. Компьютерная томография требует элементов с высокой атомной массой: золото, висмут, йод, тантал. Золотые наночастицы удобны своей биосовместимостью и лёгкостью поверхностной функционализации. Оптическая визуализация в ближнем инфракрасном диапазоне с красителями типа Cy5.5, Cy7, индоцианином зелёным даёт высокую чувствительность, но ограничена по глубине. Квантовые точки ярче, содержат токсичные кадмий или свинец. Фотоакустические агенты вроде золотых наностержней или органических полупроводниковых полимеров позволяют совместить приличную глубину до пяти или семи сантиметров с фототермической терапией, радионуклидная визуализация ПЭТ и ОФЭКТ даёт количественную информацию о биораспределении. ПЭТ визуализация наноносителей это фактически золотой стандарт для количественного анализа фармакокинетики в доклинике и клинике [72]. Архитектура таких платформ строится по принципу всё в одном: липосомы остаются самой проработанной базой, в бислой встраивают липофильные красители или комплексы гадолиния с гидрофобными хелаторами, в водное ядро загружают гидрофильные контрасты, термочувствительные липосомы с доксорубицином и гадолинием позволяют по МРТ видеть накопление и контролировать гипертермию с высвобождением препарата. Липосомы с индоцианином зелёным и паклитакселом обеспечивают флуоресцентную навигацию и сочетанную фототермическую и химиотерапию. Полимерные мицеллы и дендримеры позволяют ковалентно пришить и лекарство и контраст с точным контролем стехиометрии. Дендримеры PAMAM с гадолинием для МРТ и доцетакселом дают улучшенную визуализацию и терапевтический эффект. Неорганические гибридные ядра из золота, мезопористого кремния или оксида железа

одновременно служат контрастом и матрицей для иммобилизации лекарств и лигандов. Они стабильны и позволяют реализовать мультимодальную визуализацию. Современные системы используют мультимодальность, чтобы компенсировать ограничения отдельных методов. ПЭТ с высокой чувствительностью и количественностью комбинируют с МРТ, дающим анатомическую локализацию и высокое разрешение или с фотоакустикой, обеспечивающей глубину и молекулярную информацию. В одной платформе собирают диагностическую модальность для оценки накопления и экспрессии мишени, терапевтическую модальность с доставкой цитостатика или генотерапией и управляющий стимул внешний или внутренний для высвобождения. Это и есть доставка, направляемая изображениями. Клинически это значит, что можно отбирать пациентов, у которых опухоль действительно накапливает носитель в достаточном количестве, можно оценивать индивидуальную фармакокинетику и корректировать дозу и визуализировать сам момент высвобождения препарата по изменению T1 сигнала при разрушении носителя, рано выявлять формирование резистентности по усилению выброса контрастного аналога и вовремя переключать терапию. Для преодоления множественной лекарственной устойчивости тераностика особенно полезна, меченный технецием доксорубицин позволяет визуализировать аккумуляцию и оценить функциональную активность P gr. Высокий выброс контраста указывает на эффлюкс опосредованную резистентность, на основе этих данных можно принять решение о добавлении ингибитора ABC транспортёра. Или использовать носитель с ко- доставкой химиопрепарата и ингибитора MDR под контролем визуализации. Липосомы с доксорубицином и верапамилом меченные медью для ПЭТ, подтверждают накопление в опухоли, а затем срабатывает синергизм. Иммунотераностика - новое направление, где в одной платформе объединены иммуномодуляторы и контраст для визуализации иммунного инфильтрата, где можно визуализировать экспрессию PD L1 с

помощью наноносителей, несущих антитела и цирконий и отбирать пациентов на иммунотерапию, доставлять агонисты STING или TLR в комбинации с ингибиторами контрольных точек под контролем изображения, оценивать инфильтрацию цитотоксическими Т клетками с помощью наноносителей нацеленных на CD8 и одновременно доставлять цитокины для усиления ответа. Но клиническая трансляция тераностики идёт медленно, ограниченное число систем дошло до клинических испытаний, липосомы меченные медью исследуются для ПЭТ визуализации накопления липосомальных препаратов у пациентов с солидными опухолями. Наночастицы с трастузумабом меченные цирконием восемьдесят девять оценивают HER2 статус и биораспределение. Ферумокситол на основе SPION применяется для МРТ лимфоузлов и исследуется как платформа для терностики с магнитной гипертермией, регуляторное одобрение осложнено тем, что продукт должен соответствовать одновременно требованиям к диагностическим и терапевтическим средствам. Нужно доказывать, что контрастная нагрузка не увеличивает токсичность и не меняет фармакокинетику лекарства. Производство многофункциональных наноносителей по стандартам GMP требует жёсткого контроля качества и воспроизводимости, высокая стоимость должна быть оправдана клинической и экономической эффективностью. Перспективы связаны с созданием умных систем, которые не просто визуализируют накопление, но и оценивают молекулярный статус, активность протеаз, редокс потенциал и адаптируют высвобождение *in situ*. Искусственный интеллект будет интегрировать многомодальные данные визуализации и строить прогностические модели ответа, возможен переход от экзогенных контрастов к эндогенным метаболическим маркерам вроде гиперполяризованных субстратов для МРТ, чтобы снизить дополнительную контрастную нагрузку, разработка невидимых систем, которые активируются только в мишени и минимизируют фоновый сигнал и токсичность. Прошло почти два десятилетия с момента первого употребления термина тераностика

в конце двадцатого века. И всё это время усилия были направлены на создание более эффективных индивидуализированных стратегий лечения с меньшим числом побочных эффектов и лучшими исходами для пациентов. Принцип «всё в одном» постепенно охватил молекулярную визуализацию и терапию, терапию под контролем изображения, персонализированную медицину, биосенсоры и трансляционные исследования. Нанотераностика дала возможность интегрировать в наноразмерную архитектуру различные компоненты наряду с адаптированными терапевтическими агентами, механизмами контролируемого высвобождения, стратегиями нацеливания и функцией отчётности для детекции и визуализации терапевтического процесса. Изначально нанотераностические системы проектировались для ответа на специфические стимулы. К ним относили изменения внешней физической среды, такие как свет, температура, ультразвук, магнитное поле и электрическое поле. Либо внутренние биологические сигналы, среди которых рН, окислительно-восстановительный потенциал, гипоксия, ферменты, нуклеиновые кислоты и другие ионы или малые биомолекулы. Сейчас же появляются умные или интеллектуальные биоотвечающие нанотераностики, которые используют биологическое окружение или патологические явления в очаге заболевания в качестве триггеров для одновременного включения по требованию и терапевтической активации и генерации сигнала. Человеческий организм - сложная система клеток, содержащих нуклеиновые кислоты, ферменты и биомолекулы в различных физиологических средах. И разработка биоотвечающих нанотераностиков требует глубокого понимания патофизиологических особенностей многих различных типов заболеваний. Например, злокачественные опухоли демонстрируют уникальные изменения в кровотоке, градиенте рН, уровнях экспрессии специфических ферментов, содержании кислорода, АТФ, лактата, активных форм кислорода, активных форм азота, а также концентрациях глюкозы и глутатиона. Эти биологические изменения и другие стимулы могут быть использованы для конструирования

умных нанотераностиков. В последнее время всё больше внимания уделяется разработке систем на основе эндогенных стимулов с высокой специфичностью и эффективностью. Особенно перспективными для следующего поколения тераностических агентов считаются фермент расщепляемые фрагменты, переключатели опосредованные нуклеиновыми кислотами и конформационные изменения вызванные биомолекулами. Из-за высокой селективности, специфичности и увеличения скорости реакций свойственных ферментам участвующим в биологических процессах, дерегулированные ферменты при определённых заболеваниях признаны многообещающими биоотвечающими триггерами для умных нанотераностических приложений. Обычно фермент чувствительные системы инициируются расщеплением пептидных субстратов, сложноэфирных и гликозидных связей гидролазами. Другие ферменты такие как оксидоредуктазы и трансферазы также идентифицированы для доставки пролекарств. Терапевтическая и сигнальная активация достигается за счёт того, что специфический фермент направляет высвобождение или активацию и вызывает физико-химические изменения, включая разборку и повторную сборку, переключение морфологии и инверсию заряда.

Заключение

Современная стратегия доставки противоопухолевых агентов с использованием наноразмерных носителей не укладывается в примитивную схему. Между моментом внутривенного введения и достижением молекулярной мишени в цитоплазме или ядре опухолевой клетки лежит последовательность событий, каждое из которых сопряжено с преодолением конкретного патофизиологического барьера. И каждый такой барьер требует не универсального, а индивидуально подобранного инженерного решения на уровне физико-химии поверхности и архитектуры носителя, оптимальная наноплатформа, которая могла бы претендовать на клиническую эффективность скорее всего будет представлять собой сложную гибридную конструкцию. В ней пассивное накопление за счёт оптимизированных геометрических параметров будет сочетаться с активным таргетингом. Ацидоз внеклеточной среды или эндосом, гиперэкспрессия определённых протеаз, повышенная концентрация восстановленного глутатиона в цитозоле. Только на стыке этих дисциплин можно создать платформу, которая действительно обеспечит переход от эмпирического перебора схем химиотерапии к персонализированной наномедицине, где каждый компонент носителя и каждый этап его пути в организме просчитан и контролируется. На основе проведённого в работе анализа можно заключить, что биологические барьеры (высокое интерстициальное давление, гетерогенная васкуляризация, стромальный матрикс, эндосомальный захват) и молекулярные мишени (HER2, трансферриновый рецептор, CD44, CD133, PD-L1) требуют строгой стратификации по типу опухоли и не могут быть универсализированы. Пассивный EPR-зависимый таргетинг обеспечивает медианное накопление около 0,7 % ID, оставаясь технологически простым, но недостаточно селективным для десмопластических и гиповаскулярных новообразований; активный лиганд-зависимый таргетинг повышает специфичность и интернализацию, однако ограничен гетерогенностью экспрессии рецепторов,

барьером связывающих сайтов и трудностями воспроизводимой функционализации. Стимул-чувствительные (pH-, редокс-, термо-, фермент-индуцируемые) и биомиметические платформы (мембраны эритроцитов, тромбоцитов, макрофагов, раковых клеток) способны улучшить проникновение в строму, снизить иммунный клиренс и повысить накопление в 1,5–4 раза, однако комплексные системы ко-доставки цитостатиков с ингибиторами MDR (P-gp, Bcl-2, siRNA против ABCB1) и тераностические носители (МРТ/ПЭТ/флуоресцентный контроль в реальном времени) пока не вышли за пределы доклинических и ранних клинических испытаний из-за сложности масштабирования и регуляторных требований. Наиболее перспективными векторами признаны гибридные «логические» наноплатформы с мультитаргетингом, обратимой маскировкой лигандов и комбинацией внутренних (ацидоз, протеазы) и внешних (магнитное поле, ультразвук, свет) триггеров, интегрированные с предварительной визуализацией EPR-статуса для персонализированного отбора пациентов.

Список использованных источников

1. Aime, Silvio, and Peter Caravan. "Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition." *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* vol. 30,6 (2009): 1259-67.
2. Albertini, Barbara et al. "Tumor Targeting by Peptide-Decorated Gold Nanoparticles." *Molecular pharmaceutics* vol. 16,6 (2019): 2430-2444.
3. Almazrouei, Khalaf Mohamed et al. "Tumor Microenvironment and Its Role in Cancer Progression: An Integrative Review." *Cureus* vol. 17,9 e92707. 19 Sep. 2025.
4. Arnida et al. "Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages." *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* vol. 77,3 (2011): 417-23.
5. Barros, Melca M O et al. "Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein-alpha,beta on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia." *Transfusion* vol. 49,1 (2009): 154-60.
6. Bax, Heather J et al. "Folate receptor alpha in ovarian cancer tissue and patient serum is associated with disease burden and treatment outcomes." *British journal of cancer* vol. 128,2 (2023): 342-353.
7. Bolontrade, Marcela F et al. "A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus." *Stem cells and development* vol. 21,14 (2012): 2689-702.
8. Bordeau, Brandon M, and Joseph P Balthasar. "Strategies to enhance monoclonal antibody uptake and distribution in solid tumors." *Cancer biology & medicine* vol. 18,3 (2021): 649–664.

9. Bray, Freddie et al. "Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA: a cancer journal for clinicians* vol. 74,3 (2024).
10. Burger, Patrick et al. "CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis." *Blood* vol. 119,23 (2012): 5512-21.
11. Chen, Can et al. "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A next generation contrast agent for magnetic resonance imaging." *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* vol. 14,1 (2022).
12. Chen, Feng et al. "Ultrasmall targeted nanoparticles with engineered antibody fragments for imaging detection of HER2-overexpressing breast cancer." *Nature communications* vol. 9,1 4141. 8 Oct. 2018.
13. Chen, Hongmin et al. "Rethinking cancer nanotheranostics." *Nature reviews. Materials* vol. 2 (2017): 17024
14. Chen, Y., Su, YC. & Roffler, S.R. Polyethylene glycol immunogenicity in nanomedicine. *Nat Rev Bioeng* 3, 742–760 (2025).
15. Cheng, Yuhao et al. "Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy." *Nature communications* vol. 6 8785. 3 Nov. 2015.
16. Chi, L., Na, M. H., Jung, H. K., Vadevoo, S. M. P., Kim, C. W., Padmanaban, G., Park, T. I., Park, J. Y., Hwang, I., Park, K. U., Liang, F., Lu, M., Park, J., Kim, I. S., & Lee, B. H. (2015). Enhanced delivery of liposomes to lung tumor through targeting interleukin-4 receptor on both tumor cells and tumor endothelial cells. *Journal of Controlled Release*, 209, 327-336.
17. Chuah, Lay Hong et al. "Curcumin-containing chitosan nanoparticles as a potential mucoadhesive delivery system to the colon." *Pharmaceutical development and technology* vol. 18,3 (2013): 591-9.

18. Cooley, Michaela et al. "Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale." *Nanoscale* vol. 10,32 (2018): 15350-15364.
19. Deirram, Nayeleh et al. "pH-Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery." *Macromolecular rapid communications* vol. 40,10 (2019).
20. Du, Kun, and He Huang. "Design of a humanized CD40 agonist antibody with specific properties using AlphaFold2 and development of an anti-PD-L1/CD40 bispecific antibody for cancer immunotherapy." *Translational oncology* vol. 52 (2025).
21. Duggan, Sean T, and Gillian M Keating. "Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related Kaposi's sarcoma." *Drugs* vol. 71,18 (2011): 2531-58.
22. Fang, Ronnie H et al. "Targeting drugs to tumours using cell membrane-coated nanoparticles." *Nature reviews. Clinical oncology* vol. 20,1 (2023): 33-48.
23. Farokhzad, Omid C et al. "Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 103,16 (2006): 6315-20.
24. Fojo, A et al. "Multidrug resistance in ovarian cancer." *Cancer* vol. 60,8 Suppl (1987): 2075-80.
25. Graván, Pablo et al. "Improving tumor treatment: Cell membrane-coated nanoparticles for targeted therapies." *Materials today. Bio* vol. 32 101716. 23 Apr. 2025.
26. Haemmerich, Dieter et al. "Review of the Delivery Kinetics of Thermosensitive Liposomes." *Cancers* vol. 15,2 398. 7 Jan. 2023.
27. Hak, Sjoerd et al. "The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging." *ACS nano* vol. 6,6 (2012).

- 28.Hou, Weiyan et al. "CD44 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer." *BMC medical genomics* vol. 15,1 225. 31 Oct. 2022.
- 29.Hristova-Panusheva, Kamelia et al. "Nanoparticle-Mediated Drug Delivery Systems for Precision Targeting in Oncology." *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland) vol. 17,6 677. 24 May. 2024.
- 30.Hu, Che-Ming J et al. "Nanoparticle biointerfacing by platelet membrane cloaking." *Nature* vol. 526,7571 (2015): 118-21.
- 31.Hu, Chuan et al. "DELIVER: The core principles for the clinic translation of nanomedicines." *Acta pharmaceutica Sinica. B* vol. 15,2 (2025): 1196-1198.
- 32.Iden, D L, and T M Allen. "In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach." *Biochimica et biophysica acta* vol. 1513,2 (2001): 207-16.
- 33.Jia, Weibin et al. "Decorating Delivery Vehicles Using Hyaluronic Acid Oligosaccharides Enables Active Targeting Toward Cancer and Minimizes Adverse Effect of Chemotherapeutics." *Advanced healthcare materials* vol. 13,31 (2024).
- 34.Juraszek, Barbara, and Katarzyna A Nałęcz. "SLC22A5 (OCTN2) Carnitine Transporter-Indispensable for Cell Metabolism, a Jekyll and Hyde of Human Cancer." *Molecules* (Basel, Switzerland) vol. 25,1 14. 19 Dec. 2019.
- 35.Kim, Byung Hoon et al. "Relationships between the effect of sunitinib and immature blood vessels in metastatic renal cell cancer." *Urologia internationalis* vol. 94,2 (2015).
- 36.Leber, Nadine et al. "α-Mannosyl-Functionalized Cationic Nanohydrogel Particles for Targeted Gene Knockdown in Immunosuppressive Macrophages." *Macromolecular bioscience* vol. 19,7 (2019).

- 37.Li, Feng et al. "Different Nanoformulations Alter the Tissue Distribution of Paclitaxel, Which Aligns with Reported Distinct Efficacy and Safety Profiles." *Molecular pharmaceutics* vol. 15,10 (2018): 4505-4516.
- 38.Li, Hong-Jun et al. "Smart Superstructures with Ultrahigh pH-Sensitivity for Targeting Acidic Tumor Microenvironment: Instantaneous Size Switching and Improved Tumor Penetration." *ACS nano* vol. 10,7 (2016): 6753-61. D
- 39.Li, Hongmei et al. "Matrix Metalloproteinase Responsive, Proximity-activated Polymeric Nanoparticles for siRNA Delivery." *Advanced functional materials* vol. 23,24 (2013): 3040-3052. doi:10.1002/adfm.201202215
- 40.Li, Lihua et al. "Actively Targeted Deep Tissue Imaging and Photothermal-Chemo Therapy of Breast Cancer by Antibody-Functionalized Drug-Loaded X-Ray-Responsive Bismuth Sulfide@Mesoporous Silica Core-Shell Nanoparticles." *Advanced functional materials* vol. 28,5 (2018).
- 41.Li, Minghua et al. "An intelligent responsive macrophage cell membrane-camouflaged mesoporous silicon nanorod drug delivery system for precise targeted therapy of tumors." *Journal of nanobiotechnology* vol. 19,1 336. 24 Oct. 2021.
- 42.Li, Xiang et al. "The responsively decreased PKM2 facilitates the survival of pancreatic cancer cells in hypogluucose." *Cell death & disease* vol. 9,2 133. 26 Jan. 2018.
- 43.Liou, Ji-Sing et al. "Protein transduction in human cells is enhanced by cell-penetrating peptides fused with an endosomolytic HA2 sequence." *Peptides* vol. 37,2 (2012): 273-84.
- 44.Liu, Jessica F et al. "Use of magnetic fields and nanoparticles to trigger drug release and improve tumor targeting." *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* vol. 11,6 (2019).
- 45.Liu, Xiaobang et al. "Encapsulation of Selenium Nanoparticles and Metformin in Macrophage-Derived Cell Membranes for the Treatment of

- Spinal Cord Injury.” ACS biomaterials science & engineering vol. 9,10 (2023).
- 46.Maeda, Hiroshi et al. “The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo.” Advanced drug delivery reviews vol. 65,1 (2013).
 - 47.Maeda, Hiroshi. “The 35th Anniversary of the Discovery of EPR Effect: A New Wave of Nanomedicines for Tumor-Targeted Drug Delivery-Personal Remarks and Future Prospects.” Journal of personalized medicine vol. 11,3 229. 22 Mar. 2021.
 - 48.Martín-Sabroso, Cristina et al. “Active Targeted Nanoformulations via Folate Receptors: State of the Art and Future Perspectives.” Pharmaceutics vol. 14,1 14. 22 Dec. 2021.
 - 49.Miao, Lei et al. “The Binding Site Barrier Elicited by Tumor-Associated Fibroblasts Interferes Disposition of Nanoparticles in Stroma-Vessel Type Tumors.” ACS nano vol. 10,10 (2016): 9243-9258.
 - 50.Mirzaei, Sepideh et al. “Regulation of Nuclear Factor-KappaB (NF-κB) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: Inhibiting or promoting carcinogenesis?.” Cancer letters vol. 509 (2021): 63-80.
 - 51.Mitragotri, Samir. “Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications.” Nature reviews. Drug discovery vol. 4,3 (2005): 255-60.
 - 52.Ocaña, Alberto et al. “HER2 heterogeneity and resistance to anti-HER2 antibody-drug conjugates.” Breast cancer research : BCR vol. 22,1 15. 31 Jan. 2020.
 - 53.Padmanaban, Veena et al. “E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer.” Nature vol. 573,7774 (2019).

54. Pawar, Pavan. "The Dual Role of CD44 as a Functional P-Selectin Ligand and Fibrin Receptor in Colon Carcinoma Cell Adhesion." *American Journal of ...*, Am Physiological Soc, 2008.
55. Peer, D., Karp, J., Hong, S. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotech* 2, 751–760 (2007).
56. Provenzano, Paolo P et al. "Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer cell* vol. 21,3 (2012): 418-29.
57. Robey, R.W., Pluchino, K.M., Hall, M.D. et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* 18, 452–464 (2018).
58. Roncato, Francesco et al. "Improvement and extension of anti-EGFR targeting in breast cancer therapy by integration with the Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies." *Nature communications* vol. 9,1 4070. 4 Oct. 2018.
59. Rosenholm, Jessica M et al. "Targeting of porous hybrid silica nanoparticles to cancer cells." *ACS nano* vol. 3,1 (2009): 197-206.
60. Sadri, Elaheh et al. "Enhanced anti-tumor activity of transferrin/folate dual-targeting magnetic nanoparticles using chemo-thermo therapy on retinoblastoma cancer cells Y79." *Scientific reports* vol. 13,1 22358. 15 Dec. 2023.
61. Saito, Go et al. "Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities." *Advanced drug delivery reviews* vol. 55,2 (2003): 199-215.
62. Seelig, Anna, and Grégori Gerebtzoff. "Enhancement of drug absorption by noncharged detergents through membrane and P-glycoprotein binding." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* vol. 2,5 (2006): 733-52.

- 63.Srinivasan, Supriya et al. "Near-infrared fluorescing IR820-chitosan conjugate for multifunctional cancer theranostic applications." *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* vol. 119 (2013): 52-9.
- 64.Swaminathan, Suresh Kumar et al. "CD133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer." *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* vol. 171,3 (2013): 280-7.
- 65.Thomas, Dolca A et al. "Mitochondrial targeting with antioxidant peptide SS-31 prevents mitochondrial depolarization, reduces islet cell apoptosis, increases islet cell yield, and improves posttransplantation function." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* vol. 18,1 (2007): 213-22.
- 66.Tietjen, Gregory T et al. "Focus on Fundamentals: Achieving Effective Nanoparticle Targeting." *Trends in molecular medicine* vol. 24,7 (2018): 598-606.
- 67.Torchilin, V P. "Liposomes as targetable drug carriers." *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* vol. 2,1 (1985): 65-115.
- 68.Toy, Randall et al. "Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles." *Nanomedicine (London, England)* vol. 9,1 (2014): 121-34.
- 69.Ulanet, Danielle B et al. "Mesenchymal phenotype predisposes lung cancer cells to impaired proliferation and redox stress in response to glutaminase inhibition." *PloS one* vol. 9,12 e115144. 12 Dec. 2014.
- 70.Wang, XinYu et al. "Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes." *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* vol. 119,2 (2007): 236-44.
- 71.Wecksler, Stephen & Mikhailovsky, Alexander & Korystov, Dmitry & Ford, Peter. (2006). A Two-Photon Antenna for Photochemical Delivery of Nitric

- Oxide from a Water-Soluble, Dye-Derivatized Iron Nitrosyl Complex Using NIR Light. *Journal of the American Chemical Society*. 128. 3831-7.
72. Welch, Michael J et al. "The advantages of nanoparticles for PET." *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* vol. 50,11 (2009): 1743-6.
 73. White, ElShaddai Z et al. "Serum deprivation initiates adaptation and survival to oxidative stress in prostate cancer cells." *Scientific reports* vol. 10,1 12505. 27 Jul. 2020.
 74. Wu, Lingjie et al. "Magnetite nanocluster and paclitaxel-loaded charge-switchable nanohybrids for MR imaging and chemotherapy." *Journal of materials chemistry. B* vol. 5,4 (2017): 849-857.
 75. Yang, Chengli et al. "Multifunctional nanoparticles and collagenase dual loaded thermosensitive hydrogel system for enhanced tumor-penetration, reversed immune suppression and photodynamic-immunotherapy." *Bioactive materials* vol. 48 1-17. 12 Feb. 2025.
 76. Zeng, Rui et al. "Biliverdin reductase mediates hypoxia-induced EMT via PI3-kinase and Akt." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* vol. 19,2 (2008).
 77. Zhang, Lei et al. "Targeted therapy in esophageal cancer." *Expert review of gastroenterology & hepatology* vol. 10,5 (2016): 595-604.
 78. Zhao, M., Zhou, L., Zhai, Y., Sun, A., Shao, G., & Lin, Q. "Macropinocytosis: Both a Target and a Tool for Cancer Therapy." *Biomolecules*, 15(7), (2025): 936.
 79. Zhao, Ting et al. "Partial ligand shielding nanoparticles improve pancreatic ductal adenocarcinoma treatment via a multifunctional paradigm for tumor stroma reprogramming." *Acta biomaterialia* vol. 145 (2022): 122-134.
 80. Zhou, Yuyan et al. "Stealth missiles with precision guidance: A novel multifunctional nano-drug delivery system based on biomimetic cell

membrane coating technology.” Materials today. Bio vol. 33 101922. 30 May. 2025.

81.Zhu, qianqian. “Nanoparticles Coated with Neutrophil Membranes Can Effectively Treat Cancer Metastasis.” ACS Nano, 2017.

82.Сурья Н., Бхаттачарья С.. "PLGA - ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОЛИМЕР ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ" Фармация и фармакология, vol. 9, no. 5, 2021, pp. 334-345.

Выпускная квалификационная работа на тему «Таргетная доставка лекарственных средств к клеткам опухоли: критический анализ современных стратегий» выполнена мной самостоятельно. Все использованные в работе материалы и положения из научной литературы и других источников имеют ссылки на них.

Список использованных источников содержит _____ наименований.

ВКР сдана на кафедру «___» _____ 20__ г.

Автор ВКР

Суханов Б.В.

(подпись)

(Ф.И.О.)