

©Коллектив авторов

ХЛОРИН е6 В ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ АДРЕСНЫМИ И ПРОНИКАЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ КАК ПЕРСПЕКТИВНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Л.В. Кострюкова^{1*}, А.Д. Плютинская², А.А. Панкратов², Е.И. Короткевич¹,
В.Н. Прозоровский¹, Е.Г. Тихонова¹, Т.И. Торховская^{1,3}, Ю.А. Терешкина¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10, * эл. почта: kostryukova87@gmail.com

²Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена,
125284, Москва, 2-ой Боткинский проезд, 3

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119221, Москва, ул. М. Пироговская, 1а

В системе *in vitro* на культуре клеток фибросаркомы человека НТ-1080 изучена цитотоксическая и фотоиндуцированная активность хлорина е6 (Ce6) в фосфолипидных наночастицах (НЧ), содержащих специфический адресный и клеточно-проникающий пептиды. Показано, что добавление клеточно-проникающего пептида R7 (гептааргинина) – одного или в сочетании с пептидом, содержащим специфический векторный фрагмент NGR (Asn-Gly-Arg), – приводит к 3-х кратному повышению специфической фотоиндуцированной активности Ce6 по сравнению с таковой в НЧ без пептидов (величины ИК₅₀ составляли 0,7 мкг/мл и 2,1 мкг/мл соответственно). Слабое влияние одного NGR – менее 20% (ИК₅₀ 1,7 мкг/мл) и отсутствие его эффекта при дополнении к R7 (ИК₅₀ 0,7 мкг/мл) – указывает на большую значимость в данном случае проникновения Ce6 в клетку, чем обеспечиваемой NGR адресной направленности. Влияние включения пептидов на общую цитотоксичность Ce6 оказалось минимальным (в 10-16 раз меньше, чем на специфическую фотоиндуцируемую активность). Полученные результаты в сочетании с показанным нами ранее улучшением фармакокинетики Ce6 при его включении в фосфолипидные НЧ в системе *in vivo* указывают на перспективность использования полученной системы фосфолипидных НЧ для фотодинамической терапии.

Ключевые слова: хлорин е6; фосфолипидные наночастицы; специфический пептид с NGR-мотивом; гептааргинин; фотоиндуцированная активность

DOI: 10.18097/PBMC20196506507

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия, как метод лечения злокачественных опухолей, основана на введении в организм фотосенсибилизатора (ФС), способного накапливаться в опухолевой ткани, с последующим локальным световым облучением очага поражения. Активация ФС световым воздействием сопровождается генерированием активных форм кислорода и свободных радикалов, обладающих высоким цитотоксическим и цитостатическим потенциалом [1, 2]. В то же время многие ФС плохо растворимы и обладают низкой биодоступностью. Поэтому в настоящее время, наряду с поиском новых соединений, развивается несколько направлений по поиску транспортных систем для ФС с целью увеличения селективности их накопления в опухоли. Они включают конъюгацию с белками, моноклональными антителами, включение в наночастицы (НЧ) и липосомы разного строения [3].

Одним из наиболее распространённых способов доставки ФС и соединений других классов, имеющих ограниченную растворимость в физиологических средах, является их включение в липосомы, что осуществляется как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике [4]. Липосомы обладают значительным потенциалом

в качестве систем доставки как для липофильных, так и гидрофобных соединений, способствуют снижению токсичности, повышению терапевтической эффективности. Наряду с липосомами, разрабатываются другие липид-содержащие транспортные системы с улучшенными свойствами, с доставкой различных лекарств, в том числе и ФС. Одной из них является разработанная нами система с включением хлорина е6 (Ce6) в фосфолипидные НЧ ультрамалого размера (менее 30 нм), обеспечивающая их лучшую биодоступность и фармакокинетику [5, 6].

Дополнительной возможностью, улучшающей оптимизирующее действие систем доставки лекарственных соединений, является присоединение к их поверхности ряда лигандов, способных специфически связываться с антигенами или рецепторами на поверхности клетки, что способствует направленной доставке транспортируемого агента к клеткам-мишеням [7-9]. В качестве специфических лигандов используют так называемые адресные (“таргетные”), векторные пептиды, для которых показана аффинность к некоторым белкам или рецепторам, экспрессирующимся в большей степени на поверхности опухолевых клеток, чем нормальных [10, 11]. Одним из таких видов лигандов могут выступать пептиды, включающие NGR мотив, – последовательность аспарагин-глицин-аргинин

(Asn-Gly-Arg) [12], который показывает высокую аффинность к аминопептидазе N (CD13, APN) – ферменту, гиперэкспрессирующемуся на поверхности многих опухолевых клеток и сосудов ткани опухоли [10].

Другим подходом для улучшения доставки лекарств в транспортных системах является повышение их проникновения внутрь клетки (интернализации). Для этого используют пептиды с иными свойствами, способные проникать в клетку через её мембрану, внося с собой и конъюгированные с ними структуры. Такие пептиды получили название клеточно-проникающих (cell-penetrating) [13]. Известно несколько таких пептидов, многие из которых содержат остаток аргинина; их используют для повышения внутриклеточной доставки лекарственных средств [14]. Положительные результаты получены также при использовании сочетания адресных и проникающих пептидов для направленной внутриклеточной доставки лекарств и транспортирующих их систем к опухолевым клеткам [15].

Ранее нами было показано *in vitro*, что при использовании двух специфических пептидов – клеточно-проникающего R7 [16] и адресного, гексапептида, содержащего NGR-мотив [17], – в качестве компонентов фосфолипидных наночастиц с Ce6, повышается его связывание с опухолевыми клетками, а для гептааргинина (R7) также и проникновение в клетки (интернализация) [16].

Целью данной работы была оценка связывания и проникающей способности композиций Ce6, включенного в фосфолипидные НЧ с добавлением пептидов различного механизма действия (специфического адресного и проникающего), а также изучение их цитотоксической и фотоиндуцированной активности в экспериментах *in vitro* – по сравнению с действием такой же системы без пептидов.

МЕТОДИКА

Исследуемые препараты хлорина е6

Для оценки проникающего и/или специфического влияния пептидов в качестве компонентов системы доставки Ce6 в фосфолипидных наночастицах (НЧ) в экспериментах *in vitro*, были получены образцы Ce6, приготовление и характеристика которых описаны ранее [6, 16, 17]:

- 1) Ce6, встроенный в фосфолипидные НЧ – NPh-Ce6;
- 2) Ce6, встроенный в фосфолипидные НЧ с добавлением проникающего пептида гептааргинина – NPh-Ce6-R7;
- 3) Ce6, встроенный в фосфолипидные НЧ с добавлением специфического пептида с NGR-мотивом, присоединённого через его ассоциат с дистеароил-фосфатидилхолином (DSPE) и полиэтиленгликолем (Peg2000) – NPh-Ce6-DSPE-Peg2000-NGR;
- 4) Ce6, встроенный в фосфолипидные НЧ с добавлением пептида с NGR-мотивом и проникающего пептида гептааргинина – NPh-Ce6-DSPE-Peg2000-NGR-R7.

Культивирование клеток

В исследовании была использована клеточная линия фибросаркомы человека (культура клеток HT-1080), полученная в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва). Культивирование опухолевых клеток проводили согласно рекомендациям, указанным в сертификате культуры клеток, с использованием соответствующих сред с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (“ПанЭко”, Россия) [18]. Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ (CO₂-инкубатор “Binder”, Германия). В работе использовали клеточные линии от 3 до 10 пассажей.

Оценка клеточного связывания и проникающей способности хлорина е6 в исследуемых композициях

Клетки (10⁶ на лунку) рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Далее к клеткам добавляли указанные выше образцы в концентрации 25 мкг/мл (по Ce6) и инкубировали в течение 2-х ч при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония) и при 4°C. После инкубации среду с исследуемыми композициями удаляли и промывали клетки дважды фосфатно-солевым буфером (“ПанЭко”). Определение содержания Ce6 в клетках проводили как описано ранее [6] после его экстракции раствором 0,1% муравьиной кислоты (“Sigma”, США) в метаноле (“Fisher Scientific”, Великобритания) (по 1 мл в лунку). Экстракты переносили в пробирки Eppendorf, центрифугировали при 10000 об/мин 10 мин при 4°C (центрифуга Eppendorf 5810R, ротор FA-45-30-11, “Eppendorf”, Германия), после чего анализировали методом ВЭЖХ с масс-спектрометрией. Использовали хроматографическую систему для ВЭЖХ Agilent 1200 Series с колонкой Eclipse XDB-C18 (“Agilent Technologies”, США) и масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS (“Agilent Technologies”) [6]. Содержание Ce6 в клетках нормировали на уровень белка (мг), определяемого методом Лоури. Полное проникновение Ce6 в клетку (интернализацию) рассчитывали, как и ранее [15], по разности его содержания при 37°C (общее накопление в клетках) и при 4°C; ранее показано, что при 4°C взаимодействие пептида с клеткой ограничивается его ассоциацией с наружной клеточной мембраной, и входит он в клетку только при более высоких температурах [17].

Оценка цитотоксического действия хлорина е6

Клетки (10⁶ на лунку) рассеивали в стерильные 96-луночные культуральные планшеты и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ (CO₂-инкубатор “Binder”) в течение 24-26 ч. Далее в планшеты вносили сравниваемые композиции в концентрациях по Ce6 от 0,016 мкг/мл до 20 мкг/мл (разведение с шагом 5); разведение образцов осуществляли культуральной средой без сыворотки. Клетки инкубировали с образцами 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ теста

(“Sigma”) [18]. Регистрировали поглощение при 550 нм (Multiscan FC, “ThermoSpectronic”, США) и нормировали на необработанный контроль (без Се6).

Уровень ингибирования роста клеток вычисляли по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = [(OD_k - OD_o) / OD_k] \times 100\%,$$

где: ИР – уровень ингибирования роста клеток в культуре; OD_o и OD_k – оптическая плотность раствора формазана (при проведении МТТ теста) в опытных и контрольных лунках соответственно.

Оценка фотоиндуцированной активности

Для оценки специфического фотодинамического действия Се6 в исследуемых фосфолипидных композициях подготовку клеток и инкубацию с исследуемыми композициями проводили, как описано выше для определения цитотоксического эффекта. Далее клетки подвергали облучению светом (источник облучения – галогеновая лампа с широкополосным фильтром КС-13 ($\lambda \geq 640$ нм), мощностью 500 Вт). Доза света составляла 10 Дж/см². После облучения клетки оставляли при стандартных условиях (при 37°C в атмосфере 5% CO₂) на 24-28 ч, затем проводили оценку выживаемости опухолевых клеток с использованием МТТ-теста, как описано выше. Критерием оценки специфической активности являлась величина ИК₅₀ – концентрация Се6, вызывающая 50% гибель опухолевых клеток [18].

Достоверными считали различия при $p < 0,05$. На рисунках представлены данные как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Статистически значимые различия указаны звездочкой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые в работе фосфолипидные транспортные системы представляли собой НЧ с диаметром менее 30 нм; такой размер способствует их лучшему взаимодействию с клеткой по сравнению

с более крупными фосфолипидными частицами – липосомами [5]. В данной работе фосфолипидные НЧ были снабжены векторами, в качестве которых использованы пептиды, содержащие остаток аргинина, меняющий ζ -потенциал НЧ [16]. При этом поверхности НЧ придается положительный заряд, что должно быть существенным для взаимодействия НЧ с опухолевыми клетками [10]. На рисунке 1 показаны результаты исследования проникновения Се6 в клетки HT-1080 после 2 ч инкубации с включающими его фосфолипидными НЧ, содержащими пептид R7, или пептид, включающий последовательность NGR, или их сочетание. Общее накопление Се6 в клетках при инкубации с транспортирующими его фосфолипидными НЧ существенно выше (в среднем в 1,5-2 раза) в случае присутствия в них пептидов по сравнению с исходными НЧ. Особенно выраженным – как для общего накопления, так и для интернализации (проникновение в клетки) – был эффект их сочетания, то есть присутствия и адресного (NGR), и клеточно-проникающего (R7) пептидов (NPh-Ce6-NGR-R7). Интернализация Се6 в клетку была для этой, сочетанной композиции, в 3 раза выше, чем для исходных НЧ, при относительно небольшом эффекте присутствия этих пептидов в отдельности – NPh-Ce6-NGR и особенно NPh-Ce6-R7, в отличие от наблюдаемого нами ранее выраженного влияния каждого из них для клеток Her-G2 [16, 17], что может быть связано с какими-либо особенностями клеточной линии HT-1080. Результаты свидетельствуют о наличии у фосфолипидной композиции с двумя пептидами не только обусловленного NGR адресного [10, 12], но и проникающего действия, усиленного влиянием этого пептида. Более клеточное накопление Се6 при присоединении использованных пептидов к транспортирующим его НЧ, очевидно, обусловлено присутствием в них положительно заряженного остатка аргинина, способствующего как присоединению НЧ к клетке, так и интернализации [14-17].

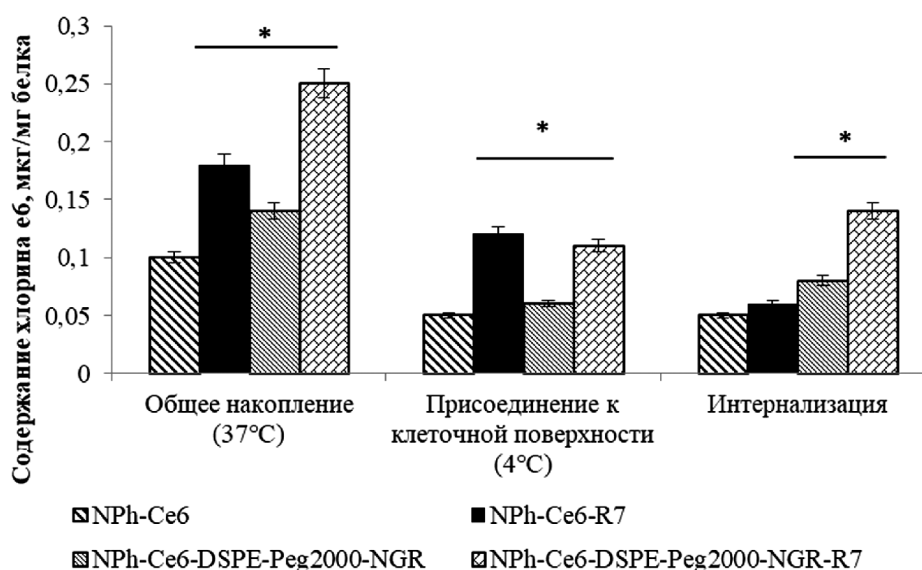


Рисунок 1. Накопление Се6 в клетках культуры HT-1080 после 2 ч инкубации с включающими его фосфолипидными наночастицами. Интернализацию рассчитывали по разности его содержания при 37°C и при 4°C [17].

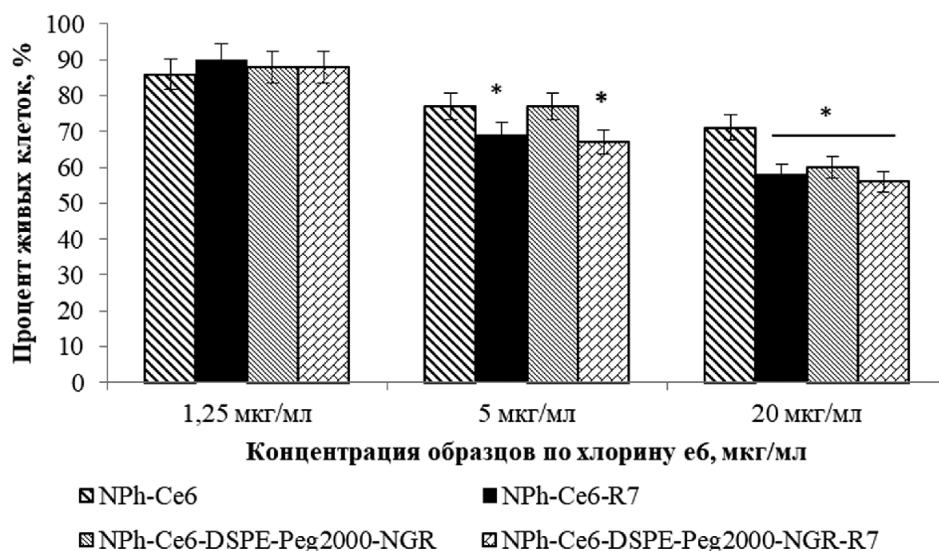


Рисунок 2. Цитотоксическое действие (без воздействия светом) Се6 в различных системах доставки относительно опухолевых клеток культуры HT-1080.

Результаты изучения цитотоксического неспецифического эффекта (без облучения) исследуемых образцов на основе Се6 представлены на рисунке 2. При введении Се6 в составе исходных фосфолипидных НЧ (без пептидов) происходило некоторое снижение процента живых клеток в среде в зависимости от добавляемой его концентрации – до 88-90% от исходного уровня (без Се6) при 1,25 мкг/мл и до 70% при 20 мкг/мл. Добавление всех пептидов при минимальной концентрации (1,25 мкг/мл) не оказывало влияния на цитотоксичность; при 5 мкг/мл наблюдалась некоторая тенденция к увеличению цитотоксического эффекта, а при максимальной используемой (20 мкг/мл) количество живых клеток по сравнению с таковым для исходной системы было достоверно ниже для всех трёх композиций с пептидами по сравнению с исходной системой (NPh-Ce6) – в среднем на 14-15%.

Существенно более выраженным оказался эффект от встраивания пептидов в НЧ с Се6 на его специфическую фотоиндуцированную противоопухолевую активность по отношению к подвергнутым действию этих НЧ клеткам. Результаты фотодинамического воздействия на опухолевые клетки фибросаркомы HT-1080 после их инкубации с исследуемыми фосфолипидными композициями ФС представлены на рисунке 3. Наиболее сильное действие оказывало добавление к содержащим Се6 фосфолипидным НЧ проникающего пептида R7. Как видно из рисунка 3, его добавление существенно повышало фотоиндуцированную противоопухолевую активность Се6 – величина ИК₅₀ оказалась в 3 раза меньше (0,7 мкг/мл), чем для исходных НЧ (2,1 мкг/мл). Адресный пептид с NGR-мотивом оказывал в этом плане лишь небольшое влияние (несмотря на его действие на общее связывание и обусловленную им интернализацию) (рис. 1). При этом добавление его к НЧ с R7 не повышало степени уже индуцированной этим гептапептидом активации. Отсутствие эффекта

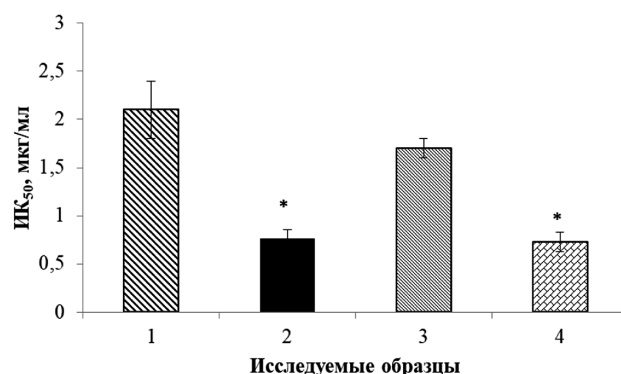


Рисунок 3. Фотоиндуцированная активность композиций Се6 относительно опухолевых клеток культуры HT-1080. (Представлены величины ИК₅₀ Се6, вызывающие 50% гибель клеток). 1 – NPh-Ce6; 2 – NPh-Ce6-R7; 3 – NPh-Ce6-DSPE-Peg2000-NGR; 4 – NPh-Ce6-DSPE-Peg2000-NGR-R7 (“Методика”).

добавления NGR в данном случае может быть связано с какими-либо особенностями принявших его клеточных доменов, в меньшей степени чувствительных к повреждающему действию генерируемых этим ФС активных форм кислорода. По всей вероятности, наблюдаемое выраженное действие R7 обусловлено сочетанием в нем известного проникающего эффекта содержащих аргинин пептидов, которое через влияние гуанидиновой группы аргинина (Arg, R) [14] может способствовать некоторой адресной направленности по отношению к опухолевым клеткам. Её связывают с приданием их поверхности положительного заряда, способствующего взаимодействию с повышенно экспрессирующимся на опухолевых клетках ферментом – карбоангидразой. Это трансмембранный белок с протеогликановым сегментом, для которого показано преобладание отрицательного заряда за счёт высокого уровня дикарбоновых аминокислот [20]. Следует подчеркнуть значительно более выраженное

влияние введения R7 на специфическое противоопухолевое действие ФС (повышение в 3 раза, рис. 3) по сравнению с показанным выше (рис. 2) небольшим (не более 15%), и то лишь при очень высоких концентрациях, увеличением общей цитотоксичности. То есть, разница в степени проявления эффектов в 10-16 раз.

Кроме того, показанная на рисунке 3 выраженная активация противоопухолевого эффекта Се6 при снабжении транспортирующих его НЧ пептидом даёт возможность уменьшить терапевтические дозы препарата в клинике. Это, в свете показанной (рис. 2) концентрационной зависимости воздействия пептидов на цитотоксичность Се6, позволит свести к минимуму или практически устранить свойственное этому ФС цитотоксическое действие. Следует также иметь в виду показанное нами ранее улучшение фармакокинетики Се6 при его включении в фосфолипидные НЧ по сравнению со свободным ФС – более быстрый клиренс (выведение) из организма наряду с повышенным накоплением в ткани опухоли [6]. То есть, Се6 в снабжённых пептидом НЧ меньше время циркулирует в кровотоке, что должно ещё более снизить возможность проявления его побочных цитотоксических эффектов (в дополнение к снижению вводимых доз).

Отсутствие в проведенных экспериментах влияния адресного пептида с NGR-мотивом на действие Се6 после инкубации НЧ с клетками *in vitro* не исключает проявления его избирательного действия в условиях *in vivo* путём возможного снижения поступления в здоровые клетки, не экспрессирующие аффинный к нему фермент, аминопептидазу, APN, для выяснения чего необходимы дальнейшие эксперименты. При этом будут выяснены также такие существенные свойства разработанных транспортных систем, как избирательность и специфичность в отношении раковых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Использование двух пептидов (специфического адресного с NGR-мотивом и проникающего, гептааргинаина R7), присоединённых к содержащим Се6 фосфолипидным НЧ, приводит к увеличению связывания и проникновения Се6 в опухолевые клетки. При этом влияние на цитотоксический эффект проявляется слабо и приблизительно одинаково у всех исследуемых образцов. При исследовании специфического противоопухолевого фотодинамического действия Се6 в фосфолипидных НЧ был показан значительно более выраженный эффект, особенно для проникающего пептида – более чем в 10 раз по сравнению с такими же НЧ без пептидов. Таким образом, исследование возможности использования двух пептидов – R7 и пептида с NGR-мотивом – в качестве дополнения к фосфолипидной системе доставки для Се6 показало перспективность данного направления для дальнейших разработок с целью оптимизации данной композиции в фотодинамической терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят сотрудников лаборатории пептидной инженерии ИБМХ, руководимой проф. Е.Ф. Колесановой, за предоставление синтезированного ими гептааргинаина (R7) и сотруднику лаборатории биосинтеза белка к.б.н. Г.Е. Морозевич за помощь в работе с клеточными культурами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yakubovskaya R.I., Morozova N.B., Pankratov A.A., Kazachkina N.I., Plyutinskaya A.D., Karmakova T.A., Andreeva T.N., Venediktova Yu.B., Plotnikova E.A., Nemtsova E.R., Sokolov V.V., Filonenko E.V., Chissov V.I., Kogan B.Ya., Butenin A.V., Feofanov A.V., Strakhovskaya M.G. (2015) Russ. J. General Chem., **85**(1), 217-239.
2. Moghissi K., Dixon K., Gibbins S. (2015) Surg. J. (NY), **1**(1), 1-15.
3. Мачинская Е.А., Иванова-Радкевич В.И. (2013) Фотодинамическая терапия и фотодиагностика, **2**(4), 28-32. [Machinskaya E.A., Ivanova-Radkevich V.I. (2013) Photodynamic therapy and photodyagnosis, **2**(4), 28-32.]
4. Li M., Du C., Guo N., Teng Y., Meng X., Sun H., Li S., Yu P., Galons H. (2019) Eur. J. Med. Chem., **164**, 640-653.
5. Медведева Н.В., Прохоровский В.Н., Игнатов Д.В., Дружиловская О.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. (2015) Биомед. химия, **61**(2), 219-230. [Medvedeva N.V., Prozorovskiy V.N., Ignatov D.V., Druzilovskaya O.S., Kudinov V.A., Kasatkina E.O., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2015) Biomed. Khimiya, **61**(2), 219-230.]
6. Kostyukova L.V., Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Ipatova O.M. (2018) FEBS Open Bio., **8**(2), 201-210.
7. Daeihamed M., Dadashzadeh S., Haeri A., Akhlaghi M.F. (2017) Curr. Drug Deliv., **14**(2), 289-303.
8. Kloesch B., Gober L., Loebisch S., Vcelar B., Helson L., Steiner G. (2016) In Vivo, **30**(4), 413-419.
9. Толкачева Е.В., Оборотова Е.А. (2006) Российский биотерапевтический журнал, **5**(1), 54-61. [Tolkacheva E.V., Oborotova N.A. (2006) Russian Biotherapeutic Journal, **5**(1), 54-61.]
10. Прохоровский В.Н., Торховская Т.И., Кострюкова Л.В., Ипатова О.М. (2018) Биофармацевтический журнал, **10**(4), 3-18 [Prozorovskiy V.N., Torkhovskaya T.I., Kostyukova L.V., Ipatova O.M. (2018) Russian Journal Biopharmaceuticals, **10**(4), 3-18.]
11. Raucher D. (2019) Curr. Opin. Pharmacol., **47**, 14-19.

12. Ma J., Zhang D., Ying X., Zhao Y., He C., Zhu Q., Han S. (2015) *Curr. Cancer Drug Targets*, **15**(6), 533-541.
13. Ramsey J.D., Flynn N.H. (2015) *Pharmacol Ther.*, **154**, 78-86.
14. Futaki S. (2006) *Biopolymers*, **84**(3), 241-249.
15. Chen J.X., Wang H.Y., Li C., Han K., Zhang X.Z., Zhuo R.X. (2011) *Biomaterials*, **32**(6), 1678-1684.
16. Kostryukova L.V., Korotkevich E.I., Morozovich G.E., Kolesanova E.F., Mel'nikova M.V., Filatova Y.V., Torkhovskaya T.I., Prozorovskiy V.N., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2019) *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**(3), 347-350.
17. Прохоровский В.Н., Кострюкова Л.В., Короткевич Е.И., Торховская Т.И., Морозевич Г.Е., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. (2018) *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **1**(4), e00063, 1-4. [Prozorovskiy V.N., Kostryukova L.V., Korotkevich E.I., Torkhovskaya T.I., Morozovich G.E., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2018) *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **1**(4), e00063.]
18. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А., Морозова Н.Б., Панкратов А.А., Плютинская А.Д., Феофанов А.В., Чиссов В.И., Зебрев А.И., Тихомирова А.В. (2012) *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств* (Под ред. А.Н. Миронова и др.) Гриф и К, Москва, 655-669. ISBN 978-5-8125-1466-3. [Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A., Morozova N.B., Pankratov A.A., Plyutinskaya A.D., Feofanov A.V., Chissov V.I., Zebrev A.I., Tikhomirova A.V. (2012) *Guide to Preclinical Drug Research* (Mironov A.N. et al., eds.), Grif and Co., Moscow, pp. 655-669.
19. Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Gariépy J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(6), 2056-2060.
20. Zavadova Z., Zavada J. (2005) *Oncol. Rep.*, **13**(5), 977-982.

Поступила в редакцию: 21. 10. 2019.
После доработки: 27. 10. 2019.
Принята к печати: 30. 10. 2019.

CHLORINE e6 IN PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES WITH SPECIFIC TARGETING AND PENETRATING PEPTIDES AS PROSPECTIVE COMPOSITION FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF MALIGNANT NEOPLASMS

L.V. Kostryukova^{1*}, A.D. Plyutinskaya², A.A. Pankratov², E.I. Korotkevich¹, V.N. Prozorovskiy¹, E.G. Tikhonova¹, T.I. Torkhovskaya^{1,3}, Yu.A. Teryoshkina¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: kostryukova87@gmail.com

²Herzen Moscow Oncology Research Institute, 3, 2-nd Botkinsky pr., Moscow, 125284 Russia

³Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, 1a M. Pirogovskaya str., Moscow, 119221 Russia

Cytotoxic and photoinduced activity of chlorine e6 (Ce6) in phospholipid nanoparticles with specific tumor targeting and cell-penetrating peptides was studied *in vitro* using human fibrosarcoma cells HT-1080. It was shown, that the binding of cell-penetrating peptide R7 – alone or combined with the peptide containing specific targeting motif NGR (Asn-Gly-Arg) – resulted in 3-fold decrease of Ce6 photoinduced activity as compared with that in nanoparticles without peptides (IC₅₀ values were 0.7 µg/ml and 2.1 µg/ml, respectively). The NGR influence was unexpectedly low – less than 20% (IC₅₀ 1.7 µg/ml). This suggests the more importance of Ce6 cell penetration in this case, than of NGR-mediated targeting. The effect of inclusion of both peptides on the total cytotoxicity of Ce6 was minimal (10-16 times less than on the specific photoinduced activity). The obtained results – together with earlier shown effects on improvement of the pharmacokinetics of Ce6 *in vivo* after its embedding into phospholipid nanoparticles – indicate the prospects of using the obtained phospholipid nanoparticles system for photodynamic therapy.

Key words: chlorin e6; phospholipid nanoparticles; a specific peptide with an NGR motif; hepta arginine; photo-induced activity

Funding. This work was supported by the Fundamental Scientific Research Program for 2013-2020 of the State Academies of Sciences for 2013-2020.

Received: 21.10.2019, revised: 27.10.2019, accepted: 30.10.2019.