

РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ТЕРАНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНЕЗЕМА С ИММОБИЛИЗИРОВАННЫМИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ И НАПРАВЛЯЮЩИМ ЛИГАНДОМ VEGF

Чебуркин Ю. В.¹, Шульмейстер Г. А.¹, Бондаренко А. Б.^{1,4},
Чистякова А. В.², Королёв Д. В.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Чебуркин Юрий Владимирович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Долгоозерная, д. 43, лит. А, Санкт-Петербург, Россия, 197349.
E-mail: cheburkin_yuv@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 28.06.2023
и принята к печати 18.10.2023.

Резюме

Актуальность. Введение некоторых лекарств вызывает нежелательные явления, связанные с системным воздействием действующего вещества на организм. Селективное нацеливание лекарственного средства на пораженную ткань способно избирательно повысить концентрацию вещества именно в зоне интереса, тем самым снизив системное влияние и усилив локальный терапевтический эффект. **Цель.** Создание средства направленной доставки тераностических агентов с использованием рекомбинантного фактора роста эндотелия сосудов типа А человека (rhVEGF-A121) в качестве направляющего лиганда. **Материалы и методы.** Для создания тераностического комплекса были использованы коммерчески доступные реактивы: рекомбинантный белок rhVEGF-A121 и пирогенный кремнезем Аэросил. Тозильный спейсер, соединяющий оба компонента, был синтезирован в условиях лаборатории. Конъюгация белка с флуорофорами также проводилась собственными силами. Для иммобилизации взяты индоцианин зеленый и Родамин Б. **Результаты.** В ходе работы проведена функционализация наночастиц кремнезема (НЧК) Аэросил тозильным спейсером, синтезированы конъюгаты НЧК с rhVEGF-A121, получены тераностические конструкции на основе НЧК, включающие rhVEGF-A121, в качестве направляющего

лиганда, и ИЦЗ/Родамин Б, в качестве визуализирующей метки. **Заключение.** В представленном исследовании разработан прототип средства направленной доставки тераностического агента в ткани с активно протекающим процессом ангиогенеза, например, в опухолевые и ишемизированные ткани. Для решения задачи проведена иммобилизация на поверхности наночастицы кремнезема (НЧК) направляющего лиганда, в качестве которого использован рекомбинантный белок фактора роста эндотелия сосудов человека (rhVEGF). Подобная синтетическая конструкция позволит доставлять диагностические и/или лекарственные вещества, заключенные в НЧК, непосредственно к клеткам, усиленно экспрессирующим экстрацеллюлярные специфические рецепторы для данного фактора роста, а именно протеин-тирозинкиназы семейства VEGFR. В последующих экспериментах *in vivo* оценка эффективности доставки будет оцениваться по накоплению в тканях флуорофоров ИЦЗ и Родамина Б, которые были конъюгированы с белком направляющего лиганда.

Ключевые слова: наночастицы кремнезема, направленная доставка, направляющий лиганд, тераностические агенты, функционализация наночастиц кремнезема, VEGF-A.

Для цитирования: Чебуркин Ю.В., Шулмейстер Г.А., Бондаренко А.Б. и др. Разработка прототипа тераностической системы на основе наночастиц кремнезема с иммобилизованными флуоресцентными красителями и направляющим лигандом VEGF. *Трансляционная медицина*. 2023;10(6):522-534. DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-522-534. EDN: JVUYKD

DEVELOPMENT OF A PROTOTYPE OF A THERANOSTIC SYSTEM BASED ON SILICA NANOPARTICLES WITH IMMOBILIZED FLUORESCENT DYES AND VEGF TARGETING LIGAND

Yuri V. Cheburkin¹, Galina A. Shulmeister¹, Andrey B. Bondarenko^{1,4}, Anastasia V. Chistyakova², Dmitry V. Korolev^{1,3}

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

³ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Yuri V. Cheburkin,
Almazov National Medical Research Centre,
Dolgoozernaya str., 43, Saint Petersburg,
Russia, 197349.

E-mail: cheburkin_yuv@almazovcentre.ru

Received 28 June 2023; accepted 18 October 2023.

Abstract

Background. Administration of certain drugs causes undesirable effects associated with the systemic effect of the active substance on the entire body. Selective targeting of the drug to the affected tissue promotes a selective increase in the concentration of the substance in the area of interest, thereby reducing the systemic effect and enhancing the local therapeutic effect. **Objective.** Development of a targeted delivery system for theranostic agents using recombinant human vascular endothelial growth factor type A (rhVEGF-A121) as a targeting ligand. **Design and method.** To create the theranostic complex, commercially available reagents were used: the recombinant protein rhVEGF-A121 (cat.#: PSG140-10, LLC CyStorLab, Skolkovo, Russia) and fumed silica Aerosil (A-200, Degussa AG, Germany). The tosyl spacer that interconnects both components was synthesized in the laboratory. Protein conjugation with fluorophores was also carried out in-house. Indocyanine green (ICG;

Sigma-Aldrich, USA) and rhodamine B (JSC Lenreaktiv, St. Petersburg, Russia) were taken for immobilization. **Results.** In the course of the work, functionalization of silica nanoparticles (SiNPs) with a tosyl spacer was carried out, conjugates of SiNPs with rhVEGF-A121 were synthesized, and theranostic constructs based on SiNPs were obtained, including rhVEGF-A121 as a targeting ligand, and ICG/Rhodamine B as a visualizing label. **Conclusion.** In the presented study, a prototype of a complex for targeted delivery of a theranostic agent to tissues with an active angiogenesis process, for example, to tumor and ischemic tissues, was developed. To solve the problem, we immobilized on the surface of SiNP a recombinant protein of human vascular endothelial growth factor (rhVEGF) to use as a guide ligand. Such a synthetic construct will help to deliver diagnostic and/or medicinal substances packed in SiNP directly to cells that overexpress extracellular specific receptors of the VEGFR family. In subsequent in vivo experiments, delivery efficiency will be assessed by tissue accumulation of the fluorophores ICG and rhodamine B, which have been conjugated to the targeting ligand protein. The physicochemical characteristics of the obtained samples were studied by the methods of spectrophotometry and dynamic light scattering.

Key words: functionalization of silica nanoparticles, silica nanoparticles, targeted delivery, targeting ligand, theranostic agents, VEGF-A.

For citation: Cheburkin YV, Shulmeister GA, Bondarenko AB, et al. Development of a prototype of a theranostic system based on silica nanoparticles with immobilized fluorescent dyes and VEGF targeting ligand. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2023;10(6):522-534 (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2023-10-6-522-534. EDN: JVUYKD

Список сокращений: ИЦЗ (ICG) — индоцианин зеленый, НЧК (SiNP) — наночастицы кремнезема, rhVEGF-A121 — рекомбинантный фактор роста эндотелия сосудов тип А, изоформа 121 человека, VEGF — фактор роста эндотелия сосудов, VEGFR — рецептор факторов роста эндотелия сосудов.

Введение

Семейство факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) объединяет в себе белки, регулирующие васкулогенез и ангиогенез в физиологических условиях, а также и при патологических состояниях, например, при опухолевом росте или иных процессах, связанных с неоваскуляризацией. Фактор роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A) представляет собой гомодимерный гликопротеин, специфичный для эндотелиальных клеток, существующий в различных изоформах, часть из которых утратила способность связываться с гепарином [1]. Кроме него в семейство VEGF входят белки VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста. Биологические эффекты VEGF опосредованы связыванием этих лигандов с тремя рецепторными тирозинкиназами (VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR) и VEGFR3 (Flt-4)) и некоторыми несигнальными корецепторами, например, нейропилинами (NRP), модулирующими передачу сигналов с помощью VEGF [2, 3]. VEGF-A секретируется многими типами

нормальных клеток (например, эндотелиальными), а также опухолевыми клетками. Первоначально была показана роль VEGF-A в повышении проницаемости микрососудов [4], позже была установлена его функциональная способность стимулировать деление эндотелиоцитов [5, 6]. Биологическая активность VEGF-A в основном связана с проведением митогенного сигнала через VEGFR1 и VEGFR2 [7].

Наиболее распространенные изоформы VEGF-A, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, включают VEGF-A121, VEGF-A165, VEGF-A189 и VEGF-A206, где числовой индекс указывает на длину аминокислотной последовательности каждого белка: 121, 165, 189 и 206 аминокислотных остатков соответственно. Каждая изоформа имеет уникальные молекулярные характеристики; при этом VEGF-A165 является наиболее распространенной изоформой и обладает наилучшей биодоступностью и биоактивностью [8, 9]. Со стороны клетки-мишени важнейшую роль в процессе регуляции васкуло- и ангиогенеза играют рецепторы семейства VEGFR, имеющие структурные различия, которые определяют степень их избирательности и сродства к различным изоформам и типам VEGF [10].

Поскольку VEGF-A является ключевым регулятором ангиогенеза при росте солидных опухолей, снижение уровня VEGF-A стало инновационным терапевтическим подходом в онкологии и привело

к разработке первого антиангиогенного препарата Авастин (бевацизумаб), представляющего собой гуманизированное моноклональное антитело против VEGF-A, которое было одобрено FDA в качестве препарата первой линии для лечения метастатического колоректального рака [11, 12].

Тонкая настройка процесса ангиогенеза напрямую зависит от комбинаторики связывания различных изоформ (сплайс-вариантов) VEGF-A(ххх) и типов рецептора-мишени VEGFR(*n*). В работе S. B. Mamer и соавторов определены кинетика и аффинность связывания различных сплайс-вариантов лиганда с двумя типами рецептора. Кинетические константы были получены для каждой пары лиганд-рецептор. Было установлено сродство между VEGF-A121 и VEGFR1 с аффинностью $K_D = 3,7$ nM, а также сродство VEGF-A121:VEGFR2 как $K_D = 0,66$ nM. Для пары VEGF-A165:VEGFR1 и VEGF-A165:VEGFR2 аффинность по константе диссоциации составила 1,0 pM и 9,8 pM соответственно. Константы сродства (K_D) рассчитывали как отношение скоростей ассоциации и диссоциации [13].

В нашем исследовании лиганд VEGF-A был использован для фиксации на наномерном носителе в качестве специфического молекулярного «проводника» к тканям с активным ангиогенезом, а значит, активно экспрессирующим на поверхности клеток рецепторы семейства VEGFR. В качестве пилотного эксперимента при разработке прототипа направляющего лиганда для тераностического препарата была использована изоформа-A121 рекомбинантного человеческого VEGF-A (rhVEGF-A121), обладающая достаточно высоким сродством к рецепторам 1 и 2 типа, активно участвующим в формировании капиллярной сосудистой сети. Нами сделано предположение, что использование НЧК с зафиксированным на поверхности направляющим лигандом (rhVEGF-A121) позволит обеспечивать таргетную доставку необходимых лекарственных средств, заключенных внутри наночастиц кремнезема (НЧК), к тканям, усиленно экспрессирующим VEGFR. Потенциальными мишенями для разрабатываемого тераностического агента могут являться как клетки эндотелия сосудов быстрорастущих солидных опухолей, так и ишемизированные ткани (например, при хронической ишемической болезни сердца, хронической артериальной недостаточности нижних конечностей, хронической ишемии головного мозга, кишечника и т. д.).

Наночастицы кремнезема состоят из диоксида кремния, самого распространенного соединения на Земле, и широко используются во многих областях, например, в пищевой промышленности, меди-

цинской диагностике, доставке лекарств, визуализации топологий [14]. НЧК обладают множеством преимуществ, таких как контролируемый размер частиц, большая удельная площадь поверхности и отличная биосовместимость. Методы синтеза НЧК являются технологичными. В многочисленных исследованиях показано биомедицинское применение НЧК, включая поверхностную и структурную модификацию для борьбы с различными видами патологий и диагностики заболеваний [15].

Направляющий лиганд и НЧК соединяли посредством синтетического тозильного спейсера, который обладает рядом преимуществ. Во-первых, для Аэросила, ввиду его химической инертности, возможна модификация различными методами, которые иногда неприменимы для магнитных или органических наночастиц. Помимо всего прочего, существуют работы, в которых этот носитель уже был использован для доставки лекарств [16–19]. Также нанопорошки Аэросила допущены для применения в качестве энтеросорбентов и абсолютно безопасны для организма [20, 21]. Для обозначения процесса фиксации лиганда на поверхности носителя в данной работе использовался термин «иммобилизация» [22].

Для иммобилизации действующего вещества на поверхности носителя используется, как правило, молекула-вставка, называемая спейсером. Такой молекулярный спейсер в химическом смысле — это подвижная часть молекулы, осуществляющая связь между двумя другими частями молекулы.

Иммобилизация действующего вещества посредством спейсера осуществляется при помощи функциональной группы, которой спейсер должен заканчиваться и которая определяет его химические свойства. Для органических соединений старшая функциональная группа соединения является критерием его отнесения к тому или иному классу и определяет его название по системе IUPAC.

Функциональная группа может обеспечивать различную природу химической связи спейсера с действующим веществом. По этому показателю классифицируют типы иммобилизации: адсорбционная, координационно-ионная и ковалентная. Есть типы связей, не попадающие в эту классификацию, например, дисульфидная. Тип иммобилизации крайне важен, так как влияет на скорость высвобождения действующего вещества и подбирается индивидуально.

Для изучения функциональной активности тераностического агента, основанного на лигандопосредованной доставке через систему рецепторов семейства VEGFR, можно применить модель хронического инфаркта миокарда у крыс. Для этого необходима достоверная визуализация внутритканевого

трафика тераностического агента. Реализация этой задачи проходит через функционализацию лиганда флуоресцентным красителем. На роль такого красителя хорошо подходит ИЦЗ (также известный как кардиогрин), поскольку он имеет полосы поглощения и испускания в ближней инфракрасной области спектра (700–900 нм), которая является прозрачной для биологических тканей. Кроме того, дополнительно можно иммобилизовать второй флуоресцентный краситель, имеющий какие-либо кислотные группы, на оставшиеся, не занятые аминогруппы белка. Конъюгация направляющего лиганда одновременно с двумя флуорофорами, отличающимися по длинам волн возбуждения и эмиссии, позволяет более точно определить захват молекулярного комплекса лиганд-флуорофор(ы)-НЧК тканями и детально проследить его дальнейшую судьбу. Кроме того, такой подход позволит использовать детектирующую аппаратуру с различными техническими характеристиками.

Создание конструкции rhVEGF-A121-НЧК — это лишь одна из ступеней развития технологии, использующей принцип доставки активного вещества с помощью наноносителя, функционализированного направляющим лигандом, в роли которого

могут выступать не только ростовые факторы, но и иные молекулы белковой и небелковой природы. Лекарственные и диагностические препараты, основанные на принципах активной лиганд-опосредованной доставки, внедряются в практический арсенал методов персонализированной терапии патологических состояний, при развитии которых в пораженной ткани обнаруживается специфически повышенная дифференциальная экспрессия отдельных поверхностных клеточных рецепторов. Включение синтетических лигандов к этим рецепторам в состав тераностического комплекса, на соответствующем уровне развития технологии, превращается в чисто техническую задачу.

Такого рода биотехнологические подходы к внедрению в клетку-мишень открывают широкие перспективы в лечении и диагностике целого ряда заболеваний, спектр которых не ограничен областями кардиологии или онкологии, но также распространяется и на другие разделы медицины. При этом очевидно, что широта применения подобных методов должна сочетаться с избирательностью воздействия на патологические процессы. Решению этих задач и посвящена представленная работа.

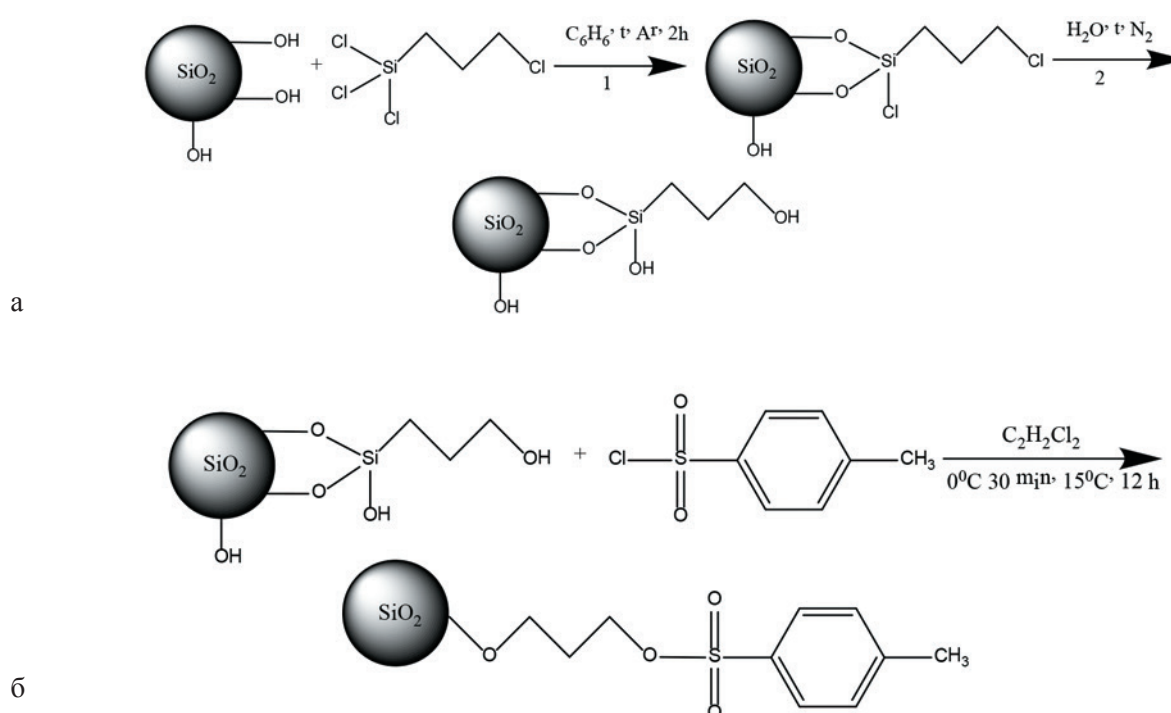


Рис. 1. Схема синтеза тозилowego спейсера: *а* — реакция с (3-хлорпропил)трихлорсиланом и гидроксילирование; *б* — реакция с пара-толуолсульфонилхлоридом

Figure 1. Scheme for the synthesis of a tosyl spacer: *a* — reaction with (3-chloropropyl)trichlorosilane and hydroxylation; *b* — reaction with para-toluenesulfonyl chloride

Материалы и методы**Используемые носитель и спейсер**

В работе в качестве носителя действующего вещества использованы наночастицы кремнезема (НЧК), а именно пирогенный кремнезем Аэросил (А-200, Degussa AG, Германия). Для иммобилизации белка на поверхности НЧК формировался тозилый спейсер. Исходя из минимизации стадий синтеза, была выбрана схема синтеза тозилыого спейсера в три стадии (рис. 1):

- реакция гидроксильных групп НЧК с (3-хлорпропил)трихлорсиланом, проводилась: а) в бензоле, б) токе аргона при кипячении в течение 2 часов;
- гидролиз хлоридной группы в псевдокипящем слое в токе азота и патов воды;
- реакция гидроксильной группы с пара-толуолсульфонилхлоридом в дихлорэтано при температуре 15 °С в течение 12 часов.

В последующем продукт отмывали сначала циклогексаном, затем троекратно этанолом и лиофилизировали на лиофильной сушке VaCo-2 (ZirBus, Germany).

Соединение лиганда с носителем осуществили посредством тозилыого спейсера, синтезированного на НЧК в условиях лаборатории. Такой спейсер обеспечивает ковалентную иммобилизацию и максимально длительное время высвобождения действующего вещества, причем присоединение должно проходить по терминальной группе, не вызывая изменения конформации белка. Схема иммобилизации белка на такой спейсер на примере аминокислоты лизина приведена на рисунке 2.

Рекомбинантный белок rhVEGF-A121

Для экспериментов был использован лиофильно высушенный рекомбинантный белок

rhVEGF-A121 (кат. №: PSG140-10, производитель ООО «СайСторЛаб», Сколково, РФ).

Иммобилизация белка

10 мкг лиофильно высушенного белка rhVEGF-A121 разводили в 5 мл воды для инъекций. Из них 1 мл оставляли для контроля и разбавляли 1 мл воды для инъекций. Оставшиеся 4 мл использовали для иммобилизации белка. Для этого брали 10 мг Аэросила и заливали 4 мл водного раствора белка. Полученную суспензию перемешивали на орбитальном шейкере LS-220 (ЛОИП, РФ) в течение 1 часа при частоте 300 мин⁻¹. Продукт промывали пятикратно дистиллированной водой при центрифугировании в течение 2 мин. при скорости 3000 мин⁻¹. Каждый смыв сохраняли для исследования в нем количества белка. Затем образец вновь редиспергировали в 4 мл воды для инъекций.

Изучение физико-химических характеристик образцов

Спектры поглощения образцов исследовались на двухлучевом спектрофотометре Unico 2802S (Unico Sys, США).

Размеры нанообъектов определялись методом динамического рассеяния света (DLS) на приборе Zeta Sizer Ultra (Malvern, США).

Определение количества белка

В исходном растворе белка, каждом смыве и в конечном продукте количество белка определяли с помощью нингидриновой реакции, для чего Нингидрин растворяли в ацетоне в концентрации 0,2 % масс. Затем к 1 мл каждого образца добавляли 1 мл раствора Нингидрина. Полученную смесь кипятили на водяной бане в течение 10 мин. После естественного охлаждения смеси до комнатной

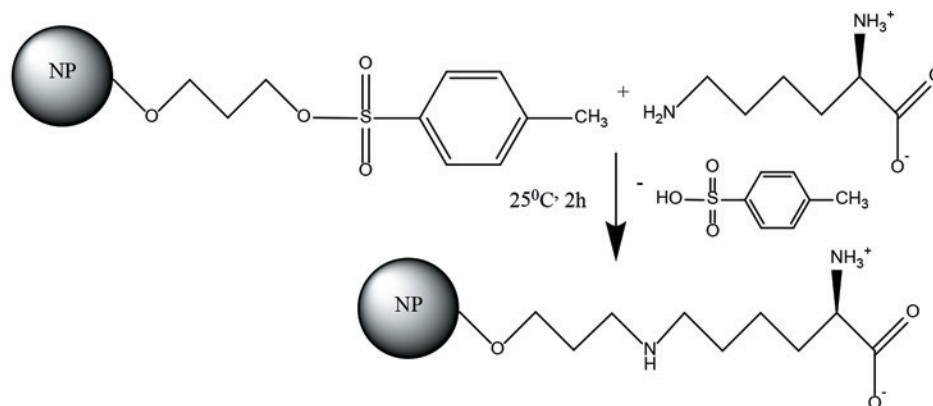


Рис. 2. Схема иммобилизации белка на тозилый спейсер на примере аминокислоты лизина

Figure 2. Scheme of protein immobilization on a tosyl spacer using the example of the amino acid lysine

температуры образцы анализировали на спектрофотометре Unico 2802s (Unico Sys., США) на длине волны 339 нм, что соответствует длине поглощения пролина.

Иммобилизация флуорофоров

Иммобилизация флуорофоров, ИЦЗ и Родамина Б проводилась по одинаковой схеме. В 15 мл пробирку, содержащую суспензию образца А-200-тозил-rhVEGFA121, добавляли 2 мл водного раствора флуорофора (1 мг/мл). Образец перемешивали на орбитальном шейкере при скорости 300 мин.⁻¹ в течение 1 часа. Затем образец промывался до визуальной прозрачной надосадочной жидкости с центрифугированием в течение 10 мин. на скорости 3000 мин.⁻¹. В результате получали образец А-200-тозил- rhVEGFA121-ИЦЗ или А-200-тозил-rhVEGF A121-ИЦЗ-Родамин Б соответственно.

Результаты

Средний размер молекул белка составил 170 нм (рис. 3), средний размер исходных наночастиц Аэросила составил 230 нм. При синтезе спейсера на поверхности наночастиц их размер увеличился до 270 нм, а при иммобилизации белка — до 900 нм. Также в конечном образце наблюдалось некоторое количество «неотмытого» свободного белка. Этим объясняется дву模альное распределение нанообъектов по размерам.

Количество иммобилизованного и свободного белка определялось спектрофотометрически на длине волны 339 нм, что соответствует длине волны пролина, и эта полоса наиболее выражена на спектрах поглощения (рис. 4).

Содержание чистого белка в контрольном (исходном) образце составило 2 мкг/мл (табл. 1). В смывах от 1 по 5 концентрация белка сначала растет, а затем уменьшается. Концентрация связанного на поверхности наночастиц белка составила 0,503 мкг/мл. Сумма количества белка в смывах и связанного белка примерно равна исходному количеству белка, соотношение связанного и несвязанного белка составляет 1:3.

ИЦЗ был иммобилизован сульфогруппами на аминокислотные группы в боковых цепях аминокислот белка, как показано на рисунке 5. Родамин Б был иммобилизован на оставшиеся свободные аминокислотные группы в боковых цепях белка карбоксильными группами.

Количество связанного с белком ИЦЗ определяли спектрофотометрически на длине волны 700 нм. Сравнение спектров поглощения чистого ИЦЗ с концентрацией 40 мкг/мл и образца А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ показаны на рисунке 6. Отчетливо видно, что в инфракрасной области спектра наблюдаются лишь полосы поглощения ИЦЗ, в то время как полосы поглощения Аэросила и белка лежат в ультрафиолетовой области

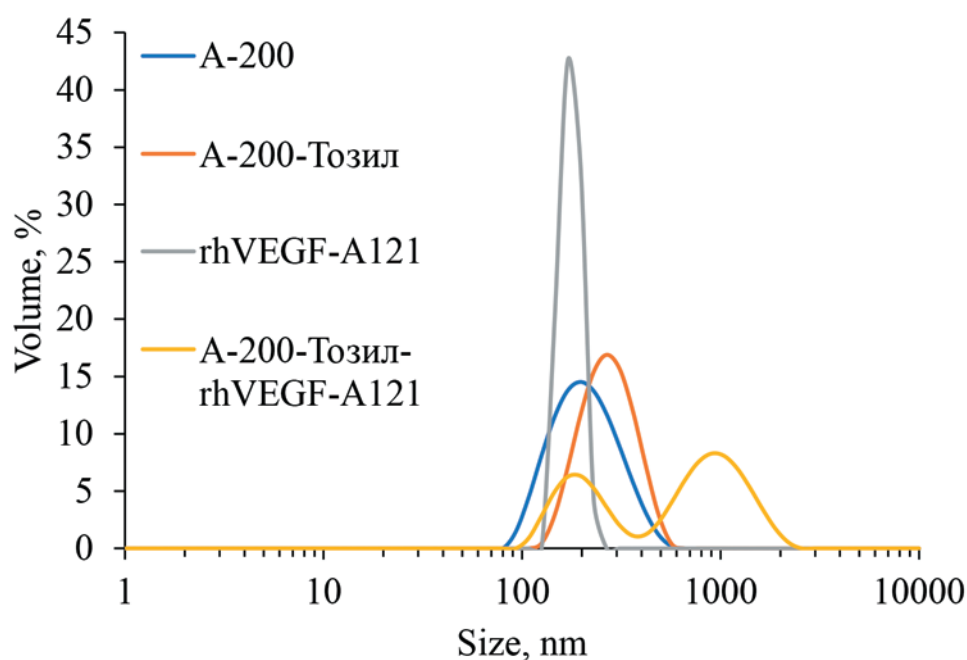


Рис. 3. Результаты исследования размеров нанообъектов методом DLS

Figure 3. Results of studying the sizes of nanoobjects using the DLS method

спектра, что облегчает определение количества флуорофора.

Содержание ИЦЗ в образце rhVEGF-A121-ИЦЗ составило 2,0 мг или 2,6 мкмоль на 1 грамм носителя, что вполне применимо для исследований на флуоресцентном томографе.

Также на рисунке 5 показано, что наиболее интенсивно с образцом А-200-тозил-rhVEGF-A121 связывается флуоресцентный краситель Родамин Б, поскольку его полоса поглощения 555 нм имеет наибольшую интенсивность в образце А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ-Родамин Б. Замечено, что Родамин Б постепенно гидролизуются и переходит в раствор, ввиду чего такие образцы долго не хранятся, что воспрепятствовало определению точной концентрации этого флуорофора в полученном нанобъекте.

Обсуждение

Оптимизация активных систем для адресной доставки инкапсулированных лекарств является нерешенной задачей. Один из путей повышения эффективности носителей лекарственных средств — использование их специфических взаимодействий с мембранными рецепторами [23]. Выбор факторов роста (или их коротких белковых мотивов) в качестве векторов для нацеливания тераностического агента в патологический очаг

очень привлекателен с точки зрения повышения такой эффективности, а также снижения системного воздействия на организм лекарственных средств и уменьшения нежелательных явлений, что значительно расширяет возможности терапии многих заболеваний. Кроме того, целенаправленная доставка лекарства внутрь клетки-мишени позволяет снизить эффективную дозу, повышая тем самым доступность многих дорогостоящих лекарственных препаратов. Решающим фактором в выборе пары лиганд/рецептор служит повышенный уровень экспрессии рецепторов в интересующих патологических тканях по сравнению с нормальной тканью, что для генов семейства VEGFR было показано, например, в исследовании профилей экспрессии рака почки [24]. Достаточная изученность функции рецепторов и кристаллической структуры аффинно-связанных пар лиганд/рецептор делает их пригодными для молекулярного моделирования, описывающего массивные конформационные и структурные изменения, происходящие в момент образования пары. Например, перспективными кандидатами для разработки систем лиганд/рецептор-опосредованной доставки можно считать пары VEGF/VEGFR [25], EGF/EGFR [26, 27] и FGF/FGFR [28, 29].

На рынке уже имеется десяток систем, в основном на основе наноносителей (липосом, полимер-

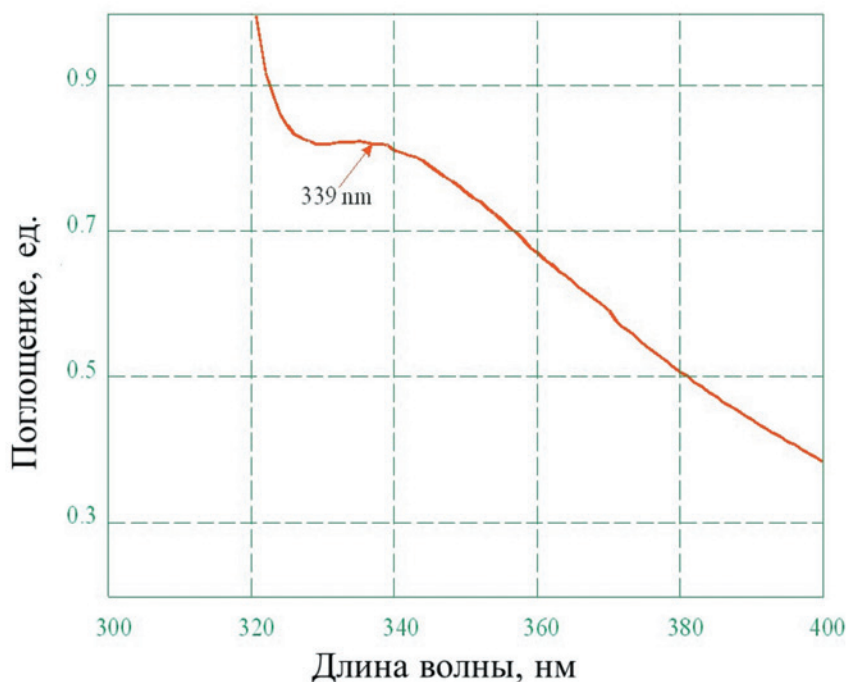


Рис. 4. Спектр поглощения образца А-200-тозил-rhVEGF-A121

Figure 4. Absorption spectrum of sample A-200-tosyl-rhVEGF-A121

Таблица 1. Концентрация белка в образцах

Образец	Концентрация белка, мкг/мл
Белок чистый	2,000
Смыв 1	0,241
Смыв 2	0,332
Смыв 3	0,532
Смыв 4	0,221
Смыв 5	0,280
Связанный белок	0,503
Всего смывов и связанного белка	2,109

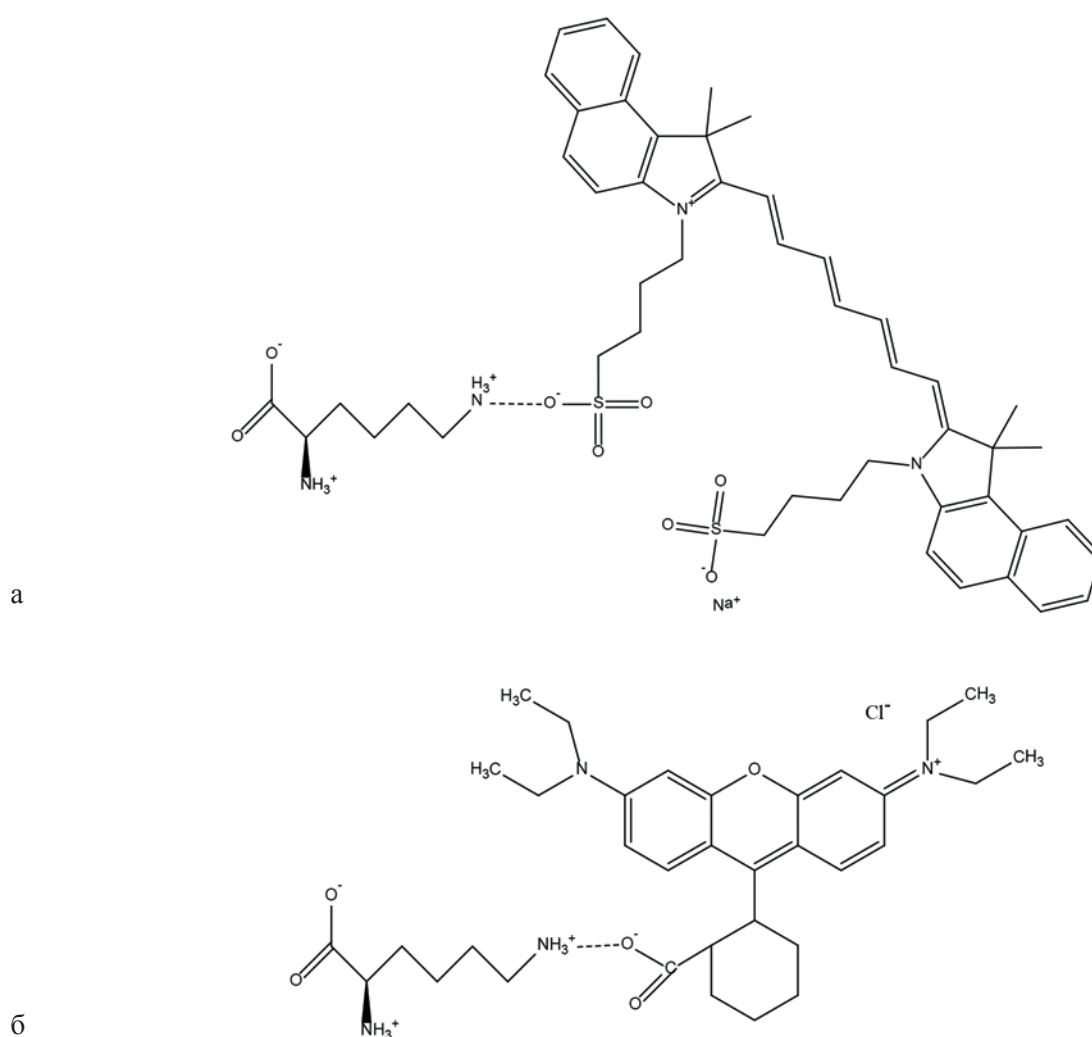


Рис. 5. Возможные пути хемосорбции флуорофоров: а — координационно-ионная иммобилизация индоцианина зеленого на аминогруппу лизина; б — структурная формула Родамина Б, поясняющая центры иммобилизации

Figure 5. Possible pathways for chemisorption of fluorophores: а — coordination-ionic immobilization of indocyanine green on the amino group of lysine; б — structural formula of rhodamine B, explaining the immobilization centers

ных мицелл и др.), которые могут транспортировать тераностический агент к очагу заболевания за счет взаимодействия между конъюгированными лигандами и поверхностными рецепторами, в большом количестве представленными на мембране клеток-мишеней. Системы активного таргетинга могут быть также основаны на конъюгатах, причем под этим понимается прямая конъюгация лиганда и молекулы лекарственного средства с линкером или без него, хорошо освещенная в литературе [30].

Связывание направляющего лиганда с наночастицами придает тераностическому комплексу новые свойства, позволяющие повысить степень его задержки в целевой области, а также улучшить показатели фармакокинетики и фармакодинамики потенциального лекарственного средства. При этом прочная ковалентная связь лиганда с наночастицей лекарственного средства позволит избежать нежелательной диссоциации направляющей молекулы и средства доставки. Определенные сомнения может вызывать способность иммобилизованного лиганда к взаимодействию с целевым рецептором. Полагаем, что тщательный подбор связывающего линкера определенной длины

и пространственной гибкости позволит разрешить сомнения в пользу предложенного разработчиками продукта. Также негативное влияние на эффективность лиганда может оказывать гетерогенность его сайт-специфической конъюгации с НЧ или лекарственным веществом. Для повышения гомогенности типов связей можно использовать включение неканонических аминокислот с ортогонально-реактивной функциональной группой, такой как альдегидная, кетонная, азидо- или алкинильная. Такой подход позволит использовать новые биоортогональные химические реакции, в которых используются реактивные фрагменты, отличные от тиола или амина. Это расширяет разнообразие линкеров, которые можно использовать, что приведет к повышению характеристик будущих систем доставки [31]. Также для улучшения их дизайна можно применить методы молекулярно-динамического моделирования, которые позволят напрямую визуализировать биологические реакции узнавания и связывания между участниками процесса активного нацеливания [32].

Включенный в состав препарата направляющий лиганд, являясь по сути сигнальной молекулой, может быть также использован в виде активного

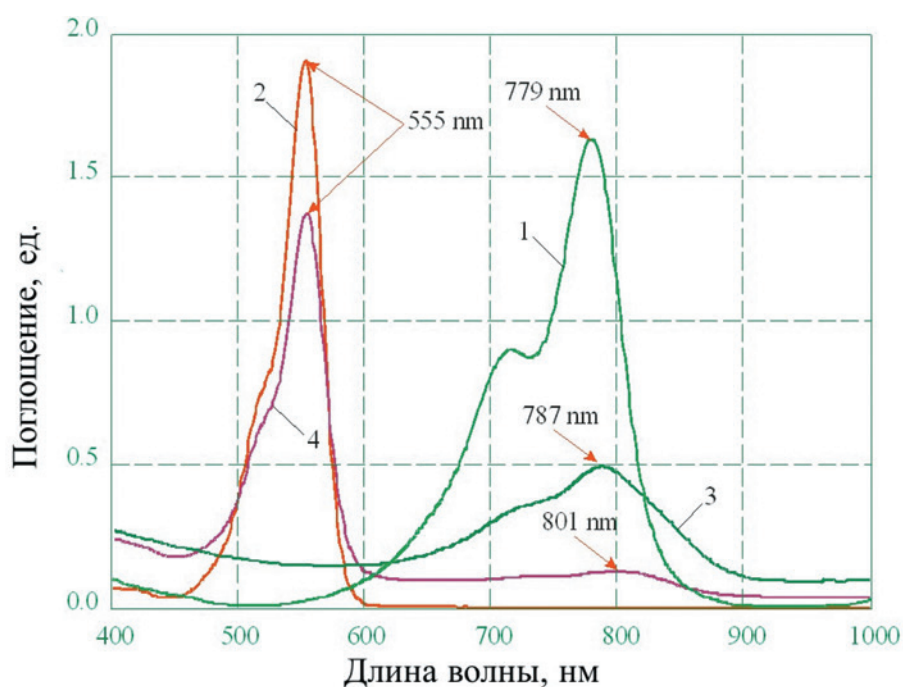


Рис. 6. Спектры поглощения: 1 — ИЦЗ с концентрацией 40 мкг/мл; 2 — Родамин Б с концентрацией 10 мкг/мл; 3 — образец А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ; 4 — образец А-200-тозил-rhVEGF-A121-ИЦЗ-Родамин Б

Figure 6. Absorption spectra: 1 — ICG with a concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2 — Rhodamine B with a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 3 — sample A-200-tosyl-rhVEGF-A121-ICZ; 4 — sample A-200-tosyl-rhVEGF-A121-ICZ-Rhodamine B

или доминант-негативного миметика эндогенного сосудистого фактора роста, как, впрочем, и в качестве блокатора его рецептора. Дополняя воздействие на патологическую ткань доставляемого диагностического вещества или потенцируя эффект включенного в состав комплекса лекарственного агента, экзогенный лиганд VEGF придает системе дополнительные тераностические качества, полезные как для онкологии, так и для кардиологии. При этом необходимо обратить особое внимание на два аспекта, требующие дальнейшей интеллектуальной и экспериментальной проработки.

Первый заключается в возникновении возможной конкуренции с эндогенным VEGF, чья экспрессия может повышаться в процессе роста опухолевой ткани в связи с необходимостью поддержания митогенного сигнала в трансформированных клетках и стимуляции процесса неоангиогенеза. Однако в этом случае эндогенный VEGF является локальным участником и его воздействие может расцениваться в качестве паракринного. При системном введении экзогенный лиганд-содержащий препарат, скорее всего, получит явное количественное преобладание, что обеспечит ему конкурентное преимущество, в том числе и из-за реципрокного снижения эндогенной экспрессии на фоне возросшей конкуренции за рецептор.

Второй аспект связан с тем, что некоторые этапы механизмов стимуляции так называемого биологического шунтирования и опухолевого неоангиогенеза, связанные с эффектом VEGF, совпадают. Поэтому нельзя исключить, что в случае использования полученной в ходе нашей работы конструкции для доставки препарата в ишемизированную ткань сердца у пациентов с сопутствующим онкологическим заболеванием, биологически активный rhVEGF может также вызывать нежелательную стимуляцию эпителия кровеносных сосудов опухоли. В этом случае для нейтрализации его собственной биологической функции интересным видится ряд генно-инженерных модификаций rhVEGF, которые позволят придать этому белку или его пептидному мотиву способность блокировать передачу сигнала внутрь клетки через VEGFR (выключение митогенного потенциала экзогенного рекомбинантного лиганда), а также увеличат его сродство с рецептором (настройка 3-мерной конфигурации) для повышения конкурентоспособности против эндогенно-экспрессирующегося нативного VEGF. Последнее качество — повышение сродства к рецептору — также полезно и в случае с ишемизированной тканью, хотя в этой ситуации потребуются изменения противоположного характера,

а именно усиливающие активность лиганда как ростового фактора.

Оба перечисленных выше аспекта могут быть оценены только после серии дополнительных экспериментов на моделях *in vitro* и *in vivo*. Наиболее актуальным является поиск решения задачи разделения эффектов рекомбинантного лиганда в системе, где одновременно требуется стимуляция терапевтического ангиогенеза и подавление неоангиогенеза. Результаты дополнительных исследований покажут путь, по которому следует двигаться для достижения основной цели — создания эффективного тераностического агента, поддающегося настройке и пригодного для использования в различных разделах медицины и, в первую очередь, в кардиологии и онкологии.

Заключение

В ходе выполнения работы нами был решен ряд исследовательских задач, а именно:

1. Проведена функционализация НЧК то- зильным спейсером;
2. Синтезированы конъюгаты НЧК с rhVEGF-A121;
3. Получены тераностические конструкции на основе НЧК, включающие rhVEGF-A121 в качестве направляющего лиганда (и одновременно действующего вещества при ишемии) и ИЦЗ/Родамин Б в качестве визуализирующей метки.

Модификация препарата сразу двумя флуоресцентными красителями позволяет наиболее надежно проследить путь его распространения *in vivo* и приближает нас к созданию контролируемых систем тераностики.

Апробация созданного тераностического агента в дальнейшем будет проведена на моделях *in vitro* и *in vivo*. Результаты планируемого эксперимента, в случае успеха, могут стать еще одним шагом к созданию платформенного решения для диагностики препаратов с иными ростовыми факторами в качестве направляющего лиганда, основанного на использовании схожих принципов активной лиганд-опосредованной доставки. Мы надеемся, что получение подобного мощного инструмента специфического и избирательного воздействия на патологическую ткань сможет найти свое применение в научных исследованиях и доклинических испытаниях, а позднее — и в терапии широкого круга патологий.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально- го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-15-00151). / This study was supported by the Russian Science Foundation (Project 23-15-00151).

Список литературы / References

1. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669–676. DOI: 10.1038/nm0603-669.
2. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:251–75. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925.
3. Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(4):1264. DOI: 10.3390/ijms19041264.
4. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219(4587):983–5. DOI: 10.1126/science.6823562.
5. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al., Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science.* 1989;246:1306–1309. DOI: 10.1126/science.2479986.
6. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851–8. DOI: 10.1016/0006-291x(89)92678-8.
7. Claesson-Welsh L, Welsh M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med.* 2013;273(2):114–27. DOI: 10.1111/joim.12019.
8. Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991;5(12):1806–14. DOI: 10.1210/mend-5-12-1806.
9. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11947–54.
10. Sa-Nguanraksa D, O-Charoenrat P. The role of vascular endothelial growth factor a polymorphisms in breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14845–64. DOI: 10.3390/ijms131114845.
11. Ferrara N, Adamis AP. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):385–403. DOI: 10.1038/nrd.2015.17.
12. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 333(2):328–35. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.05.132.
13. Mamer SB, Wittenkeller A, Imoukhuede PI. VEGF-A splice variants bind VEGFRs with differential affinities. *Sci Rep.* 2020;10(1):14413. DOI: 10.1038/s41598-020-71484-y.
14. Huang Y, Li P, Zhao R, et al. Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jul;151:113053. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113053. Epub 2022 May 17. PMID: 35594717.
15. Kirla H, Henry DJ, Jansen S, et al. Use of Silica Nanoparticles for Drug Delivery in Cardiovascular Disease. *Clin Ther.* 2023 Nov;45(11):1060–1068. DOI: 10.1016/j.clinthera.2023.08.017. Epub 2023 Oct 1. PMID: 37783646.
16. Galagudza M, Korolev D, Postnov V, et al. Passive targeting of ischemic-reperfused myocardium with adenosine-loaded silica nanoparticles. *Int J of Nanomed.* 2012; 7:1–8.
17. Galagudza MM, Korolev DV, Syrensky AV, et al. Method of cardioprotection. Patent RU 2456024, 26.04.2010. In Russian [Галагудза М.М., Королёв Д.В., Сыренский А.В. и др. Способ кардиопротекции. Патент на изобретение RU 2456024 от 26.04.2010 г.].
18. Galagudza MM, Korolev DV, Sonin DL, et al. Targeted drug delivery — results of recent years and prospects. *Nanotechnology Ecology Production.* 2010;1:132–138. In Russian [Галагудза М.М., Королёв Д.В., Сонин Д.Л. и др. Направленная доставка лекарственных препаратов — итоги последних лет и перспективы. Нанотехнологии. Экология. Производство. 2010;1:132–138].
19. Galagudza MM, Korolev DV, Sonin DL, et al. Passive targeted drug delivery to the ischemic myocardium using silica nanoparticles. *Russian nanotechnologies.* 2010;5:(11–12):92–97. In Russian [Галагудза М.М., Королёв Д.В., Сонин Д.Л. и др. Пассивная направленная доставка лекарственных препаратов в ишемизированный миокард с использованием наночастиц кремнезема. Российские нанотехнологии. 2010;5:(11–12):92–97].
20. Smirnova N. The effectiveness of enterosorbent “Polysorb MP” in patients with infectious diseases. *Doctor.* 2007;3:80–82. In Russian [Смирнова Н. Эффективность энтеросорбента «Полисорб МП» у больных инфекционными заболеваниями. *Врач.* 2007;3:80–82].
21. Ratnikova L, Permitina M, Popilov A. Polysorb in toxic hepatitis. *Doctor.* 2007;2:64–66. In Russian [Ратникова Л., Пермитина М., Попилов А. Полисорб при токсическом гепатите. *Врач.* 2007;2:64–66].
22. Lisichkin GV. Chemistry of grafted surface compounds. M.: FIZMATLIT, 2003. P. 592. In Russian [Лисичкин Г.В. Химия привитых поверхностных соединений. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. С. 592].
23. Mehra NK, Mishra V, Jain NK. Receptor-based targeting of therapeutics. *Ther Deliv.* 2013;4(3):369–94. DOI: 10.4155/tde.13.6.
24. Cheburkin YuV, Knyazeva TG, Peter S, et al. Molecular Portrait of Human Kidney Carcinomas: The

cDNA Microarray Profiling of Kinases and Phosphatases Involved in the Cell Signaling Control. *Molecular Biology*. 2002;36(3):376–384. In Russian [Чебуркин Ю.В., Князева Т.Г., Петер Ш. и др. Молекулярный портрет карцином почки человека, полученный на основе экспрессии протеин-тирозин-киназ и тирозин-фосфатаз, контролирующих передачу регуляторных сигналов в клетках. *Молекулярная биология*. 2002;36(3):480–490]. DOI: 10.1023/A:1016059313254.

25. Michigami M, Takahashi K, Yamashita H, et al. A “ligand-targeting” peptide-drug conjugate: Targeted intracellular drug delivery by VEGF-binding helix-loop-helix peptides via receptor-mediated endocytosis. *PLoS One*. 2021;16(2):e0247045. DOI: 10.1371/journal.pone.0247045.5.

26. Master AM, Sen Gupta A. EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. *Nanomedicine (Lond)*. 2012;7(12):1895–906. DOI: 10.2217/nnm.12.160.

27. Habban Akhter M, Sateesh Madhav N, Ahmad J. Epidermal growth factor receptor based active targeting: a paradigm shift towards advance tumor therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup2):1188–1198. DOI: 10.1080/21691401.2018.1481863.

28. Terada T, Mizobata M, Kawakami S, et al. Basic fibroblast growth factor-binding peptide as a novel targeting ligand of drug carrier to tumor cells. *J Drug Target*. 2006;14(8):536–545. DOI: 10.1080/10611860600849498.

29. Wu Y, Lu C-T, Li W-F, et al. Preparation and antitumor activity of bFGF-mediated active targeting doxorubicin microbubbles. *Drug Dev Ind Pharm*. 2013;39(11):1712–1719. DOI: 10.3109/03639045.2012.730527.

30. Wang X, Li S, Shi Y, et al. The development of site-specific drug delivery nanocarriers based on receptor mediation. *J Control Release*. 2014;193:139–153. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.028.

31. Jain N, Smith SW, Ghone S, et al. Current ADC Linker Chemistry. *Pharm Res*. 2015;32(11):3526–40. DOI: 10.1007/s11095-015-1657-7.

32. Gocheva G, Ivanova A. A Look at Receptor–Ligand Pairs for Active-Targeting Drug Delivery from Crystallographic and Molecular Dynamics Perspectives. *Mol Pharm*. 2019;16(8):3293–3321. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00250.

33. Knyazev YuP, Cheburkin YuV, Spikermann K, et al. The cDNA Microarray Profiling of Protein Kinases and Phosphatases: Molecular Portrait of Human Prostate Carcinomas. *Molecular Biology*. 2003;37(1):89–101. In Russian [Князев Ю.П., Чебуркин Ю.В., Спикерманн К. и др. Профили экспрессии протеинкиназ и фосфатаз, полученные с помощью упорядоченных наборов кДНК (cDNA Arrays): молекулярный портрет рака предстательной железы. *Молекулярная биология*. 2003;37(1): 97–111]. DOI: 10.1023/A:1022341015018.

Информация об авторах:

Чебуркин Юрий Владимирович, к.м.н., заведующий НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, научный сотрудник НИЛ нейрогенеза и нейродегенеративных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шульмейстер Галина Анатольевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Бондаренко Андрей Борисович, младший научный сотрудник НИЛ инфекционных патогенов и биомолекулярных наноструктур, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; старший преподаватель кафедры медицинской биологии ФГБОУ ВО «СПбГПМУ» Минздрава России;

Чистякова Анастасия Вячеславовна, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Королев Дмитрий Владимирович, д.х.н., заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; научный сотрудник ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И. П. Павлова» Минздрава России.

Authors information:

Yuri V. Cheburkin, MD, PhD, head of Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, research scientist, Research Laboratory of Neurogenesis and Neurodegenerative Diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Galina A. Shulmeister, junior research assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Andrey B. Bondarenko, junior research scientist, Research Laboratory of Infectious Pathogens and Biomolecular Nanostructures, Almazov National Medical Research Centre; senior lecturer of Department of Medical Biology, Saint Petersburg State Pediatric Medical University;

Anastasia V. Chistyakova, student of Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”;

Dmitry V. Korolev, PhD, head of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre; research scientist of Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.