ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ ЛОКАЛЬНО ДЕЙСТВУЮЩИХ ЛЕКАРСТВ

А.С. Соболев, А.А. Розенкранц

Каф. биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; лаб. молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН

Проблема увеличения селективности в терапии онкологических заболеваний и возможные пути ее решения. Основной проблемой лекарственной терапии злокачественных новообразований при использовании химиотерапии, радиотерапии или же фотодинамической терапии и других подходов является наличие серьезных побочных эффектов, вызванных токсичностью применяемых средств для нормальных клеток. Эта токсичность обусловлена отсутствием или же недостаточностью селективности воздействия на раковые клетки, у которых есть множество общих свойств с исходными нормальными клетками. Практически все широко используемые в настоящее время противораковые лекарственные средства интенсивно воздействуют не только на опухолевые трансформированные клетки, но и на другие клетки с высокой скоростью пролиферации. Среди разработок, улучшающих избирательность терапевтического воздействия на опухолевые клетки, одно из ведущих мест занимает использование лигандов, специфичных для малигнизированных клеток (Allen, 2002). В качестве таких лигандов используют как моноклональные антитела (mAb), так и различные природные лиганды. Для реализации этого подхода действующее начало, наряду с соответствующим лигандом, опознающим клетку-мишень, включается в состав новой структуры за счет ковалентного присоединения, использования высокоаффинных нековалентных взаимодействий или же образования надмолекулярных комплексов. Однако опознавания опухолевой клетки (связывания с ее поверхностью) в большинстве случаев недостаточно для проявления действия доставляемых веществ – как минимум требуется также и транспорт внутрь клетки, где доставляемый терапевтический агент может оказать свое действие. При этом зачастую обеспечение опознавания клетки-мишени входит в противоречие с транспортом внутрь клетки, поскольку проявлению действия терапевтического вещества будет препятствовать включение его в состав доставляющей структуры (например, при доставке внутриклеточного токсина неинтернализуемым антителом к поверхности клеткимишени). Поэтому внимание исследователей, создающих системы селективной доставки лекарств, привлекают естественные системы специфического транспорта молекул и, в первую очередь макромолекул, внутрь клетки-мишени (Jones et al., 2003).

Фотосенсибилизаторы как объект направленной внутриклеточной доставки в опухолевые клетки-мишени. Понятно, что в первую очередь среди потенциальных терапевтических агентов в таком типе доставки нуждаются различные высокомолекулярные соединения: ДНК при генетической терапии рака или белки, например, бактериальные токсины или же их компоненты (ряд бактериальных токсинов используют подобную многокомпонентную систему доставки, но с собственной, присущей им специфичностью). Однако и эффективность многих низкомолекулярных противораковых средств, как химиотерапевтических, так и использующих физические средства для уничтожения злокачественных новообразований, может быть увеличена при специфической доставке в определенные компартменты клеток-мишеней. Кроме того, при разработке многокомпонентных систем доставки, а также при оптимизации их свойств наиболее удобны такие доставляемые терапевтические агенты, которые, с одной стороны, будут не слишком сильно влиять на транспорт, и, с другой стороны, не будут терять своей эффективности при включении их в состав доставляющей системы. К таким противораковым средствам можно отнести, например, фотосенсибилизаторы (ФС), применяемые при фотодинамической терапии (ФДТ), а также вещества, испускающие α-частицы – альфа-эмиттеры (АЭ), применяемые при радионуклидной терапии.

Для успешной реализации ФДТ (Dolmans et al., 2003) необходимо избирательное накопление ФС в клетках опухоли с последующим облучением опухоли светом в одном из максимумов поглощения ФС. При облучении ФС происходит локальное образование активных форм кислорода (АФК) – синглетного кислорода, ¹О₂, и свободных радикалов, таких как •OH, HO•2, •O2, а также перекиси водорода, - способных повреждать мембраны, ДНК и другие макромолекулы, находящиеся в непосредственной близости (не далее 40 нм) от мест генерации АФК. ФДТ является реальной альтернативой лечения раковых опухолей, устойчивых к химио- и радиотерапии (Canti et al., 1995; Lofgren et al., 1995; Teiten et al., 2001), однако имеет ряд собственных ограничений, сдерживающих применение метода. В частности, нормальные клетки также могут накапливать ФС, что приводит к длительной повышенной фоточувствительности кожи и другим побочным эффектам, ограничивающим применение ФДТ (Gomer and Ferrario, 1990; Mullooly et al., 1990; Musser and Fiel, 1991; Baas et al., 1994; Hebeda et al., 1995; Kostron et al., 1996; Hebeda et al., 1998; Hornung et al., 2000; Marks et al., 2000; Cahill et al., 2002). Причинами побочных эффектов при ФДТ являются недостаточная специфичность ФС и связанная с ней недостаточная эффективность фотодинамического воздействия на опухоль, что приводит к необходимости использования повышенных доз ФС.

Одним из широко используемых путей увеличения эффективности Φ С является присоединение его к различным веществам, способным изменить его распределение (использование «носителя»). Увеличение специфичности действия Φ С может быть достигнуто при помощи присоединения их к молекулам, имеющим повышенное сродство к клеткам опухоли, например к лигандам для рецепторов, сверхэкспрессированных на клетках опухоли, или к соответствующим моноклональным антителам, которые способны «доставить» Φ С к клеткам-мишеням (Reddi, 1997; Konan et al., 2002; Соболев и др., 2004b). Однако одного только присоединения Φ С к носителям, способным «узнавать» раковые клетки-мишени, недостаточно для обеспечения эффективности действия Φ С, поскольку плазматическая мембрана не является высокочувствительным к действию $A\Phi$ К объектом. Как минимум, необходима доставка Φ С внутрь клетки – различные внутриклеточные структуры намного более чувствительны к фотоповреждению, чем клеточная поверхность.

Клеточные компартменты различаются по своей чувствительности к фотодинамическому повреждению. ФС, добавленные к клеткам, могут накапливаться в различных клеточных структурах: в плазматических мембранах, митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме и других, где и оказывают свое фотодинамическое действие. Известно, что ФС, представляющие терапевтический интерес, не способны накапливаться в ядрах клеток (Oleinick and Evans, 1998). В то же время клеточное ядро является одной из наиболее чувствительных, если не самой чувствительной мишенью для активных форм кислорода (АФК) (Wiseman and Halliwell, 1996; Akhlynina et al., 1997; Akhlynina et al., 1999; Rosenkranz et al., 2000; Sobolev et al., 2000; Liang et al., 2000). Поэтому можно полагать, что в эффективности действия ФС существует значительный резерв, который может быть использован путем изменения внутриклеточной локализации ФС. Для использования этого резерва необходимо решение двоякой задачи: как обеспечение специфичности на уровне клетки, так и специфичность на субклеточном уровне. Перераспределение ФС в более чувствительные к повреждению компартменты клеток-мишеней способно уменьшить используемые дозы ФС за счет увеличения их эффективности и снижения побочных эффектов ФДТ. Таким образом, ФДТ представляется полем для использования многокомпонентных систем доставки в заданные компартменты раковых клеток-мишеней: эффективность действия ФС зависит от его локализации в клетке, увеличение специфичности по

отношению к клетке-мишени способно уменьшить побочные явления при ФДТ (Соболев и др., 2004а).

Радионуклиды в качестве объекта для направленной внутриклеточной доставки в опухолевые клетки-мишени. Еще одним быстроразвивающимся подходом для лечения рака является радионуклидная терапия. В настоящее время для лечения и диагностики новообразований используют ¹³¹I, ³²P, ⁸⁹Sr, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁶Re, ⁵⁹Fe (Chatal and Hoefnagel, 1999; Кешелава, 2003; Carlsson et al., 2003). При разработке методов радионуклидной терапии на первом плане стоит задача максимального снижения воздействия на окружающие опухоль нормальные ткани. Для решения этой задачи предпочтительно использование радионуклидов, обладающих мощным локальным поражающим эффектом. К таким радионуклидам с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) относятся АЭ, такие как, например. ²¹¹At или ²²⁵Ac. При распаде такого радионуклида происходит испускание α-частицы и образование ядра отдачи, являющихся высокоэнергетическими частицами. При этом, по сравнению с другими продуктами радиационного распада, такими как γ-кванты и β-частицы, α-частицы обладают наименьшим пробегом в биологических тканях. Так, например, пробег а-частиц астата-211 в тканях не превышает 70-80 микрон. Понятно, что это снижает цитотоксический эффект излучателя α-частиц на окружающие здоровые ткани (Pauwels et al., 1998; McDevitt et al., 1998; McCready, 2000; McDevitt et al., 2001).

Самым уязвимым местом для воздействия ионизирующего излучения, в особенности для частиц с высоким значением ЛПЭ, является клеточное ядро (Raju et al., 1993; Walicka et al., 1998; Zalutsky and Vaidyanathan, 2000; Hartman et al., 2000). Достаточно всего нескольких (от 2 до 6) попаданий α -частиц в клеточное ядро, для того чтобы вызвать гибель клетки (Raju et al., 1991). Поэтому не всякая α -частица, испущенная с поверхности клетки-мишени (например, в результате доставки с помощью специфических антител), будет столь же эффективна, как α -частица, испущенная радионуклидами в ядре клетки. Кроме того, в случае внутриядерной доставки α -излучателей, может быть использовано цитотоксическое действие ядер отдачи, у которых пробег намного короче, чем у α частиц (меньше 100 нм), а ЛПЭ значительно выше (Zidenberg-Cherr et al., 1987).

Такм образом, как Φ С, так и радионуклиды, излучающие α -частицы, могли бы оказывать значительно большее действие, если бы существовали способы их селективной доставки в клетки-мишени и направленной внутриклеточной доставки в ядро этих клеток. В своих разработках мы решили опираться как на существующие практически в каждой клетке

процессы селективного эндоцитоза, так и специфического транспорта в ядро.

Транспорт макромолекул в клетки осуществляется главным образом при помощи различных видов эндоцитоза в составе замкнутых мембранных образований, и дальнейшая судьба эндоцитированной молекулы в значительной мере зависит от системы везикулярного транспорта клетки и наличия соответствующих сигнальных последовательностей на доставляющей структуре или же на тех молекулах клетки, с которыми она взаимодействует. Понимание этого приводит к мысли, что опознавания клетки-мишени и транспорта терапевтического начала внутрь клетки в общем случае недостаточно для его попадания в те компартменты клетки, где может эффективно осуществляться его действие, т. е. необходимы также и некие дополнительные компоненты, несущие сигналы внутриклеточного транспорта. В одних случаях, при сигналах, задействующих везикулярный транспорт между эндосомами и такими органеллами, как эндоплазматический ретикулюм (ЭР), или же при транспорте из эндосом в гиалоплазму, может оказаться достаточным одного такого компонента, в других, например при транспорте в ядро клетки или же в митохондрии, одного добавочного компонента в доставляющей структуре может оказаться недостаточно. Таким образом, система транспорта в необходимые компартменты клеток-мишеней должна включать в себя несколько компонентов с различными транспортными сигналами. Макромолекулы могут поступать в клетку различными путями (рис. 1). Помимо эндоцитоза через покрытые клатриновые ямки и везикулы существует еще несколько в большей или меньшей степени изученных путей интернализации макромолекул (Johannes and Lamaze, 2002; Nichols, 2003; Maxfield and McGraw, 2004). К ним относятся эндоцитоз через кавеолы (Nichols, 2003), эндоцитоз, в процессе которого не участвуют ни клатрин, ни кавеолин (Lamaze et al., 2001), фагоцитоз (May and Machesky, 2001), макропиноцитоз (Cardelli, 2001), а также трубчатые мембранные структуры, связанные с поверхностью ряда типов клеток (Myers et al., 1993; Krolenko et al., 1997).

Во многих типах клеток неклатриновые пути могут обеспечивать до половины поглощения мембранной поверхности и жидкости в клетки (Maxfield and McGraw, 2004). Определенные участки плазматической мембраны, обогащенные холестерином и гликосфинголипидами, такие, например, как кавеолы и липидные рафты, также принимают участие в специфическом транспорте макромолекул внутрь клетки. Замыкание складок плазматической мембраны ведет к образованию больших замкнутых эндоцитозных компартментов различного размера макроприносом. Специфическую роль этот процесс играет, например, в антигенпредставляющих дендритных клетках. Макропиноцитоз регулируется через полимеризацию актина и по своим свойствам близок к фагоцитозу, который наиболее развит в макрофагах, однако способность к такому типу поглощения в некоторой степени сохраняют почти все типы клеток.



Рис. 1. Пути поглощения макромолекул клетками млекопитающих и предельные размеры поглощающих структур: 1 – рецептор-опосредуемый эндоцитоз через покрытые клатриновые везикулы, 2 – транспорт через кавеолы, 3 – транспорт через образование везикул, в состав которых не входит ни клатрин, ни кавеолин, например, транспорт, связанный с липидными доменами (lipid rafts), 4–5 – различные типы фагоцитоза, 6 – замыкание складок мембран, которое ведет к образованию замкнутых везикул размером до 2 мкм

Весь транспорт в ядро, как пассивный, так и активный, происходит через комплекс ядерной поры. Он состоит из большого количества субъединиц, образующих цилиндрическую структуру, пронизывающую ядерную мембрану и образующую канал для пассивного транспорта, молекулярное сито, через которое путем свободной диффузии проходят белки меньше 40-45 кД. Для белков свыше 45 кД требуется специальный адресный сигнал (аминокислотная последовательность), например, для импорта белков необходим сигнал ядерной локализации (СЯЛ – (Lanford and Butel, 1984; Hall et al., 1984; Kalderon et al., 1984a; Kalderon et al., 1984b). СЯЛ представляет собой короткую последовательность аминокислотных остатков, необходимую и достаточную для транспорта белка, содержащего эту последовательность, в ядро клетки. Роль СЯЛ в импорте белков в ядро напоминает роль лиганда в лиганд-рецепторном взаимодействии: СЯЛ «узнается», т.е. специфически связывается с особыми белками импортинами (Cowie et al., 1986; Lyons et al., 1987; Kleinschmidt and Seiter, 1988; Hall et al., 1990). Процесс СЯЛ-зависимого транспорта в ядро (рис. 2) состоит из двух основных этапов (Newmeyer and Forbes, 1988; Richardson et al., 1988): первый включает в себя не зависящее от энергии узнавание сигнала локализации и накопление перед комплексом ядерной поры транспортируемого субстрата, тогда как второй этап требует энергии и заключается в транспортировке через комплекс ядерной поры и в ядро. Первый этап осуществляется посредством «СЯЛ-рецептора» - гетеродимерного белкового комплекса, состоящего из специфически связывающегося с СЯЛ α-импортина и связывающегося с нуклеопоринами βимпортина (Radu et al., 1995; Gorlich et al., 1995), который также необходим и для высокоаффинного связывания СЯЛ с α-импортином (Rexach and Blobel, 1995). Нередко этот рецептор представляет собой только один β-импортин (например, β2-импортин, или транспортин 1 (Chook and Blobel, 1999)). Оба импортина, а и β, имеют большое число гомологов. В α-импортине есть СЯЛ-связывающий домен с десятью т. наз. Armadilloповторами, в которых мотив Trp-XXX-Asn (где XXX – любые аминокислоты) участвует в связывании СЯЛ (Fontes et al., 2000), и автоингибирующий N-концевой IBB (Importin Beta Binding)-домен, который связывается либо с доменом Armadillo (автоингибирование), либо с β-импортином, за счет чего сродство α-импортина к СЯЛ резко возрастает. Имеющиеся в βимпортине т. наз. НЕАТ-повторы способны связываться с FG-повторами Nup-белков, находящихся в ядерной поре, а также с СЯЛ тех белков, транспорт которых осуществляется без участия адаптерного α-импортина.

Следующий этап - энергозависимая транслокация комплекса импортин(ы)-СЯЛ-содержащий белок через комплекс ядерной поры в сторону нуклеоплазмы – требует белка Ran в ГДФ-связанной форме (Moore and Blobel, 1993) и таких белков, как NTF2 (Nuclear Transport Factor 2), RanBP1/2 (Ran-Binding Protein 1 или 2), и RanGAP1 (Ran GTPase-Activating Protein 1) (Bischoff and Ponstingl, 1991; Coutavas et al., 1993; Moore and Blobel, 1994; Paschal and Gerace, 1995; Bischoff et al., 1995) (рис. 2). Как только комплекс достигает нуклеоплазмы (транслокация примерно на 100-120 нм), Ran-ГТФ, находящийся в высокой концентрации в ядре, посредством белка RCC1, вызывает диссоциацию комплекса. Таким образом, СЯЛ-содержащий белок и α-импортин высвобождаются в нуклеоплазму, тогда как В-импортин остается связанным с комплексом ядерной поры (Gorlich et al., 1995). Направленность транспорта обеспечивается благодаря компартментализации RanGAP1 и RCC1, локализующихся в основном в цитоплазме и в ядре соответственно, что гарантирует поллержание белка Ran в цитоплазме в основном в ГДФ-связанной форме. а в ядре – в ГТФ-связанной (Bischoff and Ponstingl, 1991).

Одним из способов регуляции СЯЛ-зависимого импорта белков служит фосфорилирование определенных аминокислотных остатков вблизи СЯЛ, приводящее как к активации, так и ингибированию транспорта (Jans and Hubner, 1996; Jans et al., 1998). Примером наиболее хорошо изученного СЯЛ, фосфорилирование которого приводит к изменению СЯЛ- зависмого импорта, является последовательность в составе большого Тантигена вируса SV40 (T-аг). Фосфорилирование серинов, находящихся в 111 и 112 положениях T-аг, протеинкиназой СК2 увеличивает скорость импорта T-аг примерно в 50 раз (Jans et al., 1991; Rihs et al., 1991; Jans, 1995). Напротив, фосфорилирование циклин-зависимой киназой (cdk) *cdc2* соседнего с СЯЛ треонина-124 ингибирует импорт T-аг, что выражается в снижении максимального уровня накопления белка в ядре (Jans et al., 1991). Таким образом, T-аг содержит особый тип СЯЛ, который включает в себя сайты фосфорилирования как усиливающие, так и ингибирующие импорт белка. Замена сайтов фосфорилирования, входящих в состав регулируемого СЯЛ, позволяет создавать новые СЯЛ, ядерный импорт которых может осуществляться в ответ на различные клеточные сигналы.



Рис. 2. Схема транспорта белков, несущих СЯЛ, через ядерную пору (пояснения в тексте)

Модульные конструкции для внутриклеточной доставки ФС и АЭ

В основу разрабатываемого подхода был положен принцип модульного транспортера, т.е. такой химерной макромолекулы, которая несла бы в качестве заменяемых и/или перемещаемых компонентов – модулей, такие домены, которые обеспечивали бы всю последовательность «узнавания» и последующего направленного транспорта, начиная со связывания с интернализуемым сверхэкспрессируемым рецептором на поверхности клетки-мишени, вплоть до домена с СЯЛ, обеспечивающего транспорт в ядро этой клетки.

Транспортеры с присоединенными модулями. Для специфического направленного транспорта ФС хлорина е₆ в ядра опухолевых клеток нами (Akhlynina et al., 1997; Akhlynina et al., 1999) была создана серия адресных систем доставки, содержащих инсулин в качестве модельного интернализуемого лиганда и модифицированный СЯЛ Т-аг. В качестве носителей, к которым ковалентно присоединялись все остальные модули, были использованы БСА, бактериальная β-галактозидаза или химерный рекомбинантный полипептид (Р10), состоящий из последовательностей Вгалактозидазы и СЯЛ Т-аг. Фотодинамическая активность конструкций, содержащих и не содержащих пептидную последовательность СЯЛ Т-аг, была исследована на клетках гепатомы человека линии PLC/PRF/5 и клетках глиомы крысы линии C6, имеющих рецепторы к инсулину (Akhlynina et al., 1997; Akhlynina et al., 1999). Эта последовательность помимо собственно СЯЛ (аминокислоты 126-132) включала в себя участок полипептидной цепи, который принимает участие в регуляции ядерного транспорта вирусного белка (аминокислоты 111-125). Основой модифицированного сигнала ядерного транспорта (P101Lys) служил участок вирусного Тантигена со 111 по 132 аминокислоту, который включал в себя сайт фосфорилирования протеин-киназой СК2, но не содержал сайта действия киназы cdc2. Результаты исследования фотодинамической активности конструкций на клетках гепатомы PLC/PRF/5 и глиомы C6 приведены в таблице.

Среди конструкций на основе β -галактозидазы максимальную фотодинамическую активность проявил конъюгат P10-(хлорин e_6)-инсулин, содержащий последовательность аминокислот T-антигена 111-135, в которой треонин в сайте действия циклин-зависимой киназы (положение 124) был заменен на нефосфорилируемый остаток аланина. Концентрация полумаксимального действия EC₅₀ этой конструкции на клетках PLC/PRF/5 составила 0,13 нМ, EC₅₀ свободного хлорина e_6 была примерно в 2300 раз выше (см. таблицу).

Конструкция ^а	Сигнальная последовательность ^b	$EC_{50} \pm SD (HM)^{c}$,	
		Гепатома	Глиома С6
		PLC/PRF/5	
Хлорин е ₆	-	320 ± 2	>1000
Р10-(хлорин <i>e</i> ₆)-	Включает аминокислоты Т-аг 111-	0.13 ± 0.06	ndd
инсулин(1:3:8)	135: Ser-Ser ¹¹² -Asp-Asp-Glu-Ala-Thr-		iiu
	Ala-Asp-Ala-Gln-His-Ala-Ala ¹²⁴ -Pro-		
	Pro-Lys-Lys ¹²⁸ -Lys-Arg-Lys-Val-Glu-		
	Asp-Pro ¹³⁵		
β-галактозидаза-		2.0 ± 0.4	nd ^c
(хлорин <i>e</i> ₆)-	отсутствует		nu
инсулин(1:2:8)			
БCA-P101Lys-	P101Lys: NH ₂ -Cys-Gly-Pro-Gly-Ser ¹¹² -	50 ± 8	28 ± 3
(хлорин <i>e</i> ₆)-ин-	Asp-Asp-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Ala-		
сулин(1:1:11:2)	Gln-His-Ala-Ala ¹²⁴ -Pro- <u>Pro-Lys-Lys¹²⁸-</u>		
	Lys-Arg-Lys-Val ¹³² -Gly-Tyr-COOH		
БCA-P101Thr-	P101Thr: NH ₂ -Cys-Gly-Pro-Gly-Ser ¹¹² -	104 ± 21	74 ± 29
(хлорин <i>e</i> ₆)-	Asp-Asp-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Ala-		
инсулин(1:1:8:2)	Gln-His-Ala-Ala ¹²⁴ -Pro-Pro-Lys-Thr ¹²⁸ -		
/	Lys-Arg-Lys-Val ¹³² -Gly-Tyr-COOH		

Фотодинамическая активность конструкций, содержащих СЯЛ и хлорин е₆

^а В скобках приводятся соотношения компонентов конструкции.

^b Номера показывают положения аминокислот в последовательности Т-аг, СЯЛ (аминкислоты 126-132) подчеркнут; **Ser**¹¹² (выделен жирным) –сайт, фосфорилирование которого СК2 усиливает импорт Т-аг в ядро, Thr¹²⁴ (замененный на **Ala** во всех случаях) – сайт, фосфорилирование которого *cdc2* ингибирует импорт Т-аг в ядро. Замена **Lys**¹²⁸ (выделено жирным) на **Thr** полностью подавляет активность СЯЛ.

^с Определено по тесту колониеобразования.

^d nd, не определяли.

Похожие результаты были получены и в случае конструкций с БСА, где максимальный повреждающий эффект был получен при использовании конъюгата с пептидом P101Lys. Эти данные были впоследствии подтверждены другими авторами (Bisland et al., 1999). В экспериментах с использованием видео-интенсификационной и конфокальной лазерной микроскопии было показано, что конъюгат БСА-P101Lys-(хлорин e_6)-инсулин накапливался в ядре и около него, тогда как БСА-P101Thr-(хлорин e_6)-инсулин преимущественно распределялся по цитоплазме. Различие во внутриклеточном распределении этих двух конструкций, по-видимому, является причиной различий в их фотодинамической активности. Картина распределения конъюгатов P10-(хлорин e_6)-инсулин и β -галактозидаза-(хлорин e_6)-инсулин внутри клеток PLC/PRF/5 качественно не отличалась от таковой в случае конъюгатов БСА-P101Lys-(хлорин e_6)-инсулин и БСА-

Р101Thr-(хлорин *e*₆)-инсулин соответственно. Неконъюгированный хлорин *e*₆ накапливался в цитоплазме.

Известно, что в обычных условиях лишь небольшая доля эндоцитированного инсулина способна транспортироваться в ядро (Smith and Jarett, 1990; Rosenkranz et al., 1992; Harada et al., 1999). Возможно, это обусловлено тем, что часть молекул инсулина не выходит из эндосом. Однако существуют природные механизмы транспорта из эндосом в цитоплазму. Так, человеческий аденовирус повреждает эндосомную мембрану во время рецептор-опосредованного эндоцитоза, тем самым обеспечивая себе выход в гиалоплазму и доставку собственной ДНК в ядро клетки-хозяина (FitzGerald et al., 1983). Это свойство аденовирусов неоднократно использовалось в целях повышения эффективности внутриклеточной доставки различных белков (FitzGerald et al., 1983; Seth, 1994); включение аденовирусных частиц в состав ген-переносящих конструкций также увеличивало эффективность доставки генетического материала (Sobolev et al., 1998). Адресная система внутриклеточной доставки, состоящая из наиболее перспективной СЯЛ-содержащей конструкции Р10-(хлорин е₆)-инсулин и ослабленного штамма dl312 аденовируса Ad5 (без канцерогенного участка Е1А), значительно более эффективно накапливалась в ядре, что приводило к возрастанию ее фотодинамической активности (Akhlynina et al., 1999).

Приведенные данные свидетельствуют о том, доставка ΦC в ядра клеток-мишеней повышает их цитотоксическую активность, что подтверждает гипотезу о гиперчувствительности клеточного ядра к фотодинамическому повреждению (Wiseman and Halliwell, 1996; Akhlynina et al., 1997; Rosenkranz et al., 2000; Sobolev et al., 2000). Точный механизм гибели клеток, индуцированной фотоповреждениями ядра при такой доставке ΦC , остается пока неизвестным.

Аналогичный подход был нами использован (Розенкранц и др., 2004) для направленной внутриядерной доставки АЭ²¹¹At, получаемого на циклотроне НИИЯФ им Д.В. Скобельцына МГУ. С целью присоединения ²¹¹At к СЯЛ-содержащей конструкции Р10-инсулин получали *p*-астатбензойную кислоту, которую присоединяли к белковой молекуле при помощи карбодиимида.

Присоединение ²¹¹At к созданному нами транспортеру привело к значительному усилению его цитотоксического действия на клетках гепатомы: при использовании ²¹¹At-P10-инсулин 37 % выживаемость (D_0) достигалась при активности 240 кБк/мл, а для свободного ²¹¹At D_0 составляла 2000 кБк/мл. Зависимости выживаемости клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 от удельной активности свободного ²¹¹At или в составе транспортера представлены на рис. 3.

Активность, кБк/мл



Рис. 3. Выживаемость клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 в зависимости от радиоактивности ^{211}At (в кБк/мл), добавленного к клеткам: 1 – свободный ^{211}At , 2 – ^{211}At -P10-инсулин

Полученные результаты дают основание для разработки высокоэффективных молекулярных конструкций, состоящих из нескольких функциональных модулей, которые бы обеспечивали специфическое связывание с клетками, интернализацию, выход из внутриклеточных везикул и доставку всей конструкции в ядро. В описанных выше экспериментах в качестве модельного лиганда, отвечающего за специфическое связывание с клеткой-мишенью и последующую рецептор-опосредованную интернализацию ФС-переносящей конструкции, был использован инсулин, однако данный подход может быть применен к широкому спектру лигандов и типов опухолевых клеток.

В настоящее время известно немало интернализуемых пептидных лигандов, количество рецепторов к которым на опухолевых клетках значительно превышает таковое на окружающих нормальных клетках, среди них α-меланоцитстимулирующий гормон (Morandini et al., 1994; Jiang et al., 1996), семейство рецепторов эпидермального фактора роста (Huang et al., 1997), соматостатин (de Jong et al., 1998a; de Jong et al., 1998b) и др. Удачной альтернативой подобным лигандам могут служить интернализуемые антитела, специфические к опухолевым антигенам. Перспективным также является использование интернализуемых лигандов, первичные последовательности которых содержат функциональные СЯЛ, то есть подобные лиганды могут обеспечивать и специфичность проникновения адресной конструкции в клетку-мишень, и её последующий транспорт в ядро. Примерами таких лигандов могут служить кислый и щелочной факторы роста фибробластов, тромбоцитарный фактор роста и интерлейкины 1,2,5 (Jans, 1994; Johnson et al., 2004).

Есть возможность дальнейшего совершенствования внутриклеточной доставки, в частности, за счет использования в качестве модуля, опосредующего выход содержимого из эндосом, амфипатических олигопептидов, таких как транслокационный домен дифтерийного токсина (Uherek et al., 1998; Barati et al., 2002) или кислый синтетический пептид GALA (Plank et al., 1994; Nir and Nieva, 2000).

Рекомбинантные транспортеры. Нами были разработаны модульные рекомбинантные транспортеры (МРТ), содержащие: 1) α-меланоцитстимулирующий гормон (МСГ) в качестве лигандного модуля, интернализуемого клетками-мишенями (меланома), 2) оптимизированный СЯЛ Т-аг, 3) гемоглобиноподобный белок НМР *E. coli* в качестве модуля-носителя и 4) модуль с эндосомолитическим полипептидом – транслокационным доменом (DTox) дифтерийного токсина (Rosenkranz et al., 2003; Розенкранц и др., 2003).

Принцип модульности был применен и к дизайну генных конструкций. Так, каждый генный модуль, кодирующий соответствующий полипептидный модуль, был сконструирован в соответствии со следующей общей схемой: сайт *Bam*HI – модуль – сайт *Bg*/II – стоп-кодон – сайт *Hind*III. Эта схема позволяет ставить каждый генный модуль в любое место химерного гена, т.к. он фланкирован рестриктными сайтами *Bam*HI и *Bg*/II, имеющими одинаковые липкие концы; все конструкты были собраны последовательным клонированием (Rosenkranz et al., 2003; Розенкранц и др., 2003).

Как уже отмечалось, в качестве лигандного модуля был избран МСГ, связывающийся со сверхэкспрессированными меланокортиновыми рецепторами на меланомных клетках-мишенях и затем эндоцитируемый ими (Jiang et al., 1996; Funasaka et al., 1999). Особенностью МСГ, требующей помещения его на С-конце МРТ, служит то, что лишь модификация Nконца МСГ не приводит к существенной потере как способности связываться с рецептором, так и его активности в целом (Sahm et al., 1994). В качестве модуля, несущего СЯЛ, был использован оптимизированный СЯЛ Т-аг вируса SV40, идентичный описанному выше: Ser-Ser¹¹²-Asp-Asp-Glu-Ala-Thr-Ala-Asp-Ala-Gln-His-Ala-Ala¹²⁴-Pro-Pro-Lys-Lys¹²⁸-Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Asp-Pro¹³⁵. В качестве эндосомолитического модуля были использованы 1) последовательность GALA-пептида, способность которого образовывать поры в мембранах при кислых рН была продемонстрирована в нескольких лабораториях (Plank et al., 1994), и 2) транслокационный домен дифтерийного токсина (DTox), также обладающий свойством при кислых pH проникать через эндоцитозные мембраны, даже находясь в составе надмолекулярных комплексов из химерных полипептидов и ДНК (Uherek et al., 1998; Barati et al., 2002). Ген DTox был взят с прилегающим к нему природным спейсером, разделяющим домены нативного дифтерийного токсина. В результате были получены плазмиды, кодирующие ряд МРТ, в том числе следующие:

рR522: НМР-СЯЛ-МСГ,

рR523: GALA-НМР-СЯЛ-МСГ,

рR676: DTox-HMP-СЯЛ-МСГ.

Уровень экспрессии МРТ в *E. coli* варьировал от 5–8% для pR523 до 20–30% для pR522 и pR676 (от общего белка *E. coli*). Растворимость МРТ, кодируемых pR522, pR523и pR676, была 60–70%. Одноступенчатая очистка на колонке с Blue Sepharose CL-6B обеспечивала 90–95% чистоту получаемых МРТ.



Рис. 4. Проверка функционирования модулей МРТ. А рецептор-опосредованная инлукция меланогенеза в клетках В16-F1 меланомы мыши: ◆ свободный МСГ, ▲ - НМР-СЯЛ-МСГ,● DTox-HMP-_ СЯЛ-МСГ. ■ – DTox-HMP: Б – повреждение мембран липосом под действием MPT: • -**DTox-HMP-СЯЛ-МСГ**, Λ – GALA-НМР-СЯЛ-МСГ. _ НМР-СЯЛ-МСГ, □ – НМР. Липосомы из фосфатидилхолина яичного желтка были нафлуоресцирующим гружены красителем кальцеином в концентрациях. приводящих к тушению флуоресценции, выход красителя из липосом в результате нарушения целостности липосом приводил к многократному увеличению интенсивности флуоресценции; В – связывание (В) гетеродимера α/β-импортинов с МРТ: • – DTох-НМР-СЯЛ-МСГ, ▲ – НМР-СЯЛ-МСГ. \blacksquare – DTox-HMP. B_{max} , максимальное связывание.

Далее авторы исследовали, проявляют ли отдельные модули, находясь в составе МРТ, свою функциональную активность, которую предполагали в них заложить при конструировании МРТ.

Проведенные эксперименты по индукции меланогенеза в клетках мышиной меланомы B16-F1 показали, что MPT способны взаимодействовать с меланокортиновыми рецепторами этих клеток и вызывать в них биологический ответ. Концентрации полумаксимального эффекта (EC₅₀) для обоих MPT были близки: 13,5±0.5 нМ для HMP-CЯЛ-MCГ и 17±2 нМ для DTox-HMP-CЯЛ-MCГ; EC₅₀ для немодифицированного MCГ была 0,36±0,05 нМ (рис. 4A). Рекомбинантные пептиды, аналогичные по дизайну вышеупомянутым, но не содержащие в своем составе последовательности MCГ, не вызывали индукции меланогенеза в клетках B16-F1 (рис. 4A).

Как показало исследование взаимодействия МРТ с комплексом α/β импортинов, опосредующих цитоплазменно-ядерный транспорт, СЯЛ в их составе сохранил способность связываться с импортинами (рис. 4Б): константа диссоциации (К_{дисс}) для комплекса α/β -импортинов с НМР-СЯЛ-МСГ была 1,9 ± 0,4 нМ, а с DTox-HMP-СЯЛ-МСГ – 2,5 ± 0,7 нМ, что характерно для белков, содержащих СЯЛ большого T-антигена вируса SV-40: К_{дисс} около 2 нМ (Hubner et al., 1997).

МРТ, попадающие в клетки-мишени путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза, оказываются в эндосомах – замкнутых мембранных структурах со слабокислым рН, - из которых им нужно выйти в гиалоплазму для эффективного взаимодействия с импортинами. Для оценки способности эндосомолитического модуля МРТ в кислой среде образовывать поры в мембранах был исследован выход флуоресцентного красителя кальцеина из нагруженных им липосом при различных рН; было показано, что полумаксимальный эффект GALA-HMP-СЯЛ-МСГ наблюдался около рН 4.5 (рис. 4В), более кислом, чем в эндосомах (Maxfield and McGraw, 2004). Выход кальцеина под влиянием DTox-HMP-СЯЛ-МСГ (рис. 4В) отмечен в 2-х диапазонах pH: от 3.5 до 4.5, что, по-видимому, обусловлено наличием НМР в составе полипептида (рис. 4В), и от 4.5 до 6.5. Последний максимум, предположительно связанный с наличием модуля DTox, вызывает образование пор при pH, близких к эндосомным (Maxfield and McGraw, 2004). Эти результаты, наряду с относительно низким выходом GALA-НМР-СЯЛ-МСГ (см. выше), заставили авторов остановить свой выбор на DTох-HMP-СЯЛ-МСГ как наиболее предпочтительном MPT токсина (Розенкранц и др., 2003).

Исследование локализации и мест внутриклеточного фотодинамического действия DTox-HMP-СЯЛ-МСГ и HMP-СЯЛ-МСГ в клетках меланомы показало, что MPT накапливаются в клетках и характер этого накопления зависит от наличия функционального эндосомолитического модуля в составе МРТ: НМР-СЯЛ-МСГ выявлялся в ядрах лишь 12,2% клеток, тогда как DTox-HMP-СЯЛ-МСГ обнаруживался в ядрах 87,5% клеток (p < 0.05) (рис. 5).



Рис. 5. Флуоресцентная визуализация мест генерации активных форм кислорода в клетках МЗ меланомы мыши. А и Б – клетки МЗ, инкубированные с конъюгатами (бактериохлорин p_6)-DTox-HMP-СЯЛ-МСГ или (бактериохлорин p_6)-HMP-СЯЛ-МСГ соответственно

Исследование фотоцитотоксического действия на клетках мышиной меланомы B16-F1 показало, что включение ФС в состав MPT многократно увеличивает их эффективность (рис. 6А). Концентрация полумаксимального действия DTox-HMP-СЯЛ-МСГ-(бактериохлорин *p*₆) на этих клетках была в 230 раз ниже, чем для свободного бактериохлорина р₆. В то же время нормальные фибробласты мыши линий C3H/10T1/2 (рис. 6А) и **DTox-HMP-СЯЛ-МСГ-**NIH/3T3 повреждались конъюгатом не (бактериохлорин p_6) в тех концентрациях, в каких он был эффективным на клетках меланомы, что доказывает клеточную специфичность использованного МРТ. Свободный бактериохлорин p₆ оказывал фотоцитотоксическое действие на фибробласты примерно в том же диапазоне концентраций, что и на клетках меланомы B16-F1 (рис. 6А и Б); НМР-СЯЛ-МСГ оказался в 5,3 раза менее фотоцитотоксичным на клетках B16-F1, чем DTох-НМР-СЯЛ-МСГ, содержащий эндосомолитический модуль (рис. 6Б); МРТ с еще меньшим набором модулей оказались соответственно менее эффективными (рис. 6Б) (Rosenkranz et al., 2003).

Эти результаты доказывают возможность конструирования модульных гибридных генов, кодирующих МРТ, и получения МРТ с 90–95% чистотой после простой процедуры очистки. Модули МРТ – лиганд, носитель, эндосомолитик и СЯЛ – могут быть помещены почти в любое место в составе МРТ, и основным ограничением может оказаться изменение активности модуля, зависящее от его положения внутри целого МРТ (например, МСГ). Модули химерных МРТ сохраняют свои функциональные активности, которыми они обладали, будучи индивидуальными молекулами (МСГ) или находясь в составе нативных белков (транслокационный домен дифтерийного токсина, СЯЛ Т-аг вируса SV40): т.о. МРТ оказались способными взаимодействовать с соответствующими интернализуемыми рецепторами, сверхэкспрессируемыми на клетках-мишенях (меланома мышей), выходить из кислых эндоцитозных компартментов (эндосом) после интернализации, транспортироваться в клеточное ядро и быть также носителями для ΦC (рис. 7). ΦC , присоединенные к MPT оказались существенно более цитотоксичными, чем свободные, немодифицированные ΦC : усиление эффекта более чем на 2 порядка (оценка по EC₅₀).



Рис. 6. Усиление фотоцитотоксической активности ФС бактериохлорина р₆ в результате его специфической внутриклеточной доставки в ядра клеток-мишеней. А цитотоксическое действие бактериохлорина р6, доставленного в ядра клеток B16-F1 в виде конъюгата (бактериохлорин *p*₆)-DTox-HMP-СЯЛ-МСГ (•) по сравнению со свободным бактериохлорином p_6 (\circ); также показано цитотоксическое действие бактериохлорина p_6 в составе конъюгата (бактериохлорин

 p_6)-DTox-HMP-СЯЛ-МСГ (♥) и свободного ФС (\heartsuit) на клетки нормальных фибробластов мыши линии СЗН/10Т1/2. Б – влияние конъюгатов (бактериохлорин p_6)-MPT, лишенных различных функциональных модулей, на выживаемость клеток

В16-F1: \blacktriangle – (бактериохлорин p_6)-НМР-СЯЛ-МСГ, \diamond – (бактериохлорин p_6)-НМР- МСГ, \blacktriangle – (бактериохлорин p_6)-DTox- МСГ, • – DTox-HMP-СЯЛ-МСГ, не конъюгированный с ФС.

Эти данные указывают на перспективность применения рекомбинантных химерных мультикомпонентных транспортеров и для других локально действующих лекарственных агентов, таких, например, как радионуклиды, испускающие альфа-частицы (применяемые для лучевой терапии рака): доза радиоактивности астата-211, доставляемого в ядра клеток гепатомы человека PLC/PRF5 такими транспортерами, необходимая для гибели 63% этих клеток (D₀), оказалась почти в 10 раз меньше дозы свободного ²¹¹ At⁻ (см. выше).



Модули:

Рис. 7. Схема модульного рекомбинантного транспортера ΦC и стадии его проникновения в клетку-мишень.

Описанные здесь МРТ, способные транспортироваться в заданные компартменты клеток-мишеней и тем самым усиливать действие переносимых ими лекарств, представляют собой, по нашему мнению, новое поколение фармакологических агентов широкого назначения. Модули МРТ могут быть заменены/перемещены, что позволяет «перекраивать» МРТ для самых различных применений. Например, могут быть использованы иные лигандные модули, нежели МСГ: так МРТ, содержащий в качестве лиганда эпидермальный фактор роста и конъюгированный с бактериохлорином p_6 , продемонстрировал на клетках эпидермоидной карциномы человека A-431 фотоцитотоксичность в 960 раз большую, чем у свободного бактериохлорина p_6 (Д.Г. Гилязова, А.А. Розенкранц, В.Г. Лунин, О.В. Сергиенко, П.В. Гулак, М.А. Грин, А.Ф, Миронов, А.Б. Рубин, А.С. Соболев, неопубликованные данные). Носитель – НМР – также может быть заменен при необходимости доставлять др. типы молекул: например, ДНК-связывающим доменом в случае доставки ДНК (Chan and Jans, 2001). Описанный здесь модульный и комбинаторный подход к специфической направленной доставке лекарств представляет, по нашему мнению, первый шаг на пути разработки нового поколения фармакологических агентов.

Литература

- 1. Кешелава В.В. Новые лечебно-диагностические средства в онкологии // Международный медицинский журнал. 2003. С. 457-459.
- Розенкранц А.А., Лунин В.Г., Сергиенко О.В., Гилязова Д.Г., Воронина О.Л., Янс Д.Э., Кофнер А.А., Шумянцева М.А., Миронов А.Ф., апd Соболев А.С. Направленная внутриклеточная доставка локально действующих лекарств: специфическая доставка фотосенсибилизаторов в ядра клеток меланомы // Генетика 2003. Т. 39. С. 259-268.
- Розенкранц А.А., Набатников П.А., Алиев Р.А., Янс Д.Э., and Соболев А.С. Усиление цитотоксического действия при направленной доставке α-эмиттера астата-211 в ядра клеток гератомы человека. // Мол. медицина - 2004. - Т. 2. - С. 47-55.
- Соболев А.С., Розенкранц А.А., and Гилязова Д.Г. Подходы к направленной внутриклеточной доставке фотосенсибилизаторов для увеличения их эффективности и придания клеточной специфичности // Биофизика - 2004а. - Т. 49. - С. 351-379.
- 5. Соболев А.С., Розенкранц А.А., and Ахлынина Т.В. Направленный внутриклеточный транспорт фотосенсибилизаторов // Росс. хим. журнал 2004b. Т. 42. С. 84-88.
- Akhlynina T.V., Jans D.A., Rosenkranz A.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., and Sobolev A.S. Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity // J. Biol. Chem. - 1997. -V. 272. - P. 20328-20331.
- Akhlynina T.V., Jans D.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rosenkranz A.A., Naroditsky B.S., and Sobolev A.S. Adenoviruses synergize with nuclear localization signals to enhance nuclear delivery and photodynamic action of internalizable conjugates containing chlorin e6 // Int. J. Cancer - 1999. - V. 81. - P. 734-740.
- 8. Allen T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy // Nat. Rev. Cancer 2002. V. 2. P. 750-763.

- Baas P., Oppelaar H., van der Valk M.A., van Zandwijk N., and Stewart F.A. Partial protection of photodynamic-induced skin reactions in mice by n-acetylcysteine: a preclinical study // Photochem. Photobiol. - 1994. -V. 59. - P. 448-454.
- Barati S., Chegini F., Hurtado P., and Rush R.A. Hybrid tetanus toxin C fragment-diphtheria toxin translocation domain allows specific gene transfer into PC12 cells // Exp. Neurol. - 2002. - V. 177. - P. 75-87.
- Bischoff F.R., Krebber H., Kempf T., Hermes I., and Ponstingl H. Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1995. - V. 92. - P. 1749-1753.
- Bischoff F.R. and Ponstingl H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1 // Nature - 1991. - V. 354. - P. 80-82.
- Bisland S.K., Singh D., and Gariepy J. Potentiation of chlorin e6 photodynamic activity in vitro with peptide-based intracellular vehicles // Bioconjug. Chem. - 1999. - V. 10. - P. 982-992.
- Cahill M.T., Smith B.T., and Fekrat S. Adverse reaction characterized by chest pain, shortness of breath, and syncope associated with verteporfin (visudyne) // Am. J. Ophthalmol. - 2002. - V. 134. - P. 281-282.
- Canti G., Lattuada D., Morelli S., Nicolin A., Cubeddu R., Taroni P., and Valentini G. Efficacy of photodynamic therapy against doxorubicinresistant murine tumors // Cancer Lett. - 1995. - V. 93. - P. 255-259.
- Cardelli J. Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct // Traffic - 2001. - V. 2. - P. 311-320.
- Carlsson J., Forssell A.E., Hietala S.O., Stigbrand T., and Tennvall J. Tumour therapy with radionuclides: assessment of progress and problems // Radiother. Oncol. - 2003. - V. 66. - P. 107-117.
- Chan C.K. and Jans D.A. Enhancement of MSH receptor- and GAL4mediated gene transfer by switching the nuclear import pathway // Gene Ther. - 2001. - V. 8. - P. 166-171.
- Chatal J.F. and Hoefnagel C.A. Radionuclide therapy // Lancet 1999. -V. 354. - P. 931-935.
- Chook Y.M. and Blobel G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp // Nature - 1999. - V. 399. - P. 230-237.
- Coutavas E., Ren M., Oppenheim J.D., D'Eustachio P., and Rush M.G. Characterization of proteins that interact with the cell-cycle regulatory protein Ran/TC4 // Nature - 1993. - V. 366. - P. 585-587.

- 22. Cowie A., de Villiers J., and Kamen R. Immortalization of rat embryo fibroblasts by mutant polyomavirus large T antigens deficient in DNA binding // Mol. Cell Biol. 1986. V. 6. P. 4344-4352.
- 23. de Jong M., Bakker W.H., Breeman W.A., Bernard B.F., Hofland L.J., Visser T.J., Srinivasan A., Schmidt M., Behe M., Macke H.R., and Krenning E.P. Pre-clinical comparison of [DTPA0] octreotide, [DTPA0,Tyr3] octreotide and [DOTA0,Tyr3] octreotide as carriers for somatostatin receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy // Int. J. Cancer -1998a. - V. 75. - P. 406-411.
- 24. de Jong M., Breeman W.A., Bakker W.H., Kooij P.P., Bernard B.F., Hofland L.J., Visser T.J., Srinivasan A., Schmidt M.A., Erion J.L., Bugaj J.E., Macke H.R., and Krenning E.P. Comparison of (111)In-labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy // Cancer Res. - 1998b. - V. 58. - P. 437-441.
- 25. Dolmans D.E., Fukumura D., and Jain R.K. TIMELINE: Photodynamic therapy for cancer // Nat. Rev. Cancer 2003. V. 3. P. 380-387.
- 26. FitzGerald D.J., Padmanabhan R., Pastan I., and Willingham M.C. Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis // Cell - 1983. - V. 32. - P. 607-617.
- Fontes M.R., Teh T., and Kobe B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha // J. Mol. Biol. - 2000. - V. 297. - P. 1183-1194.
- Funasaka Y., Sato H., Chakraborty A.K., Ohashi A., Chrousos G.P., and Ichihashi M. Expression of proopiomelanocortin, corticotropin-releasing hormone (CRH), and CRH receptor in melanoma cells, nevus cells, and normal human melanocytes // J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. - 1999. -V. 4. - P. 105-109.
- 29. Gomer C.J. and Ferrario A. Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-1- aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 3985-3990.
- Gorlich D., Vogel F., Mills A.D., Hartmann E., and Laskey R.A. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import // Nature - 1995. - V. 377. - P. 246-248.
- Hall M.N., Craik C., and Hiraoka Y. Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1990. - V. 87. - P. 6954-6958.
- Hall M.N., Hereford L., and Herskowitz I. Targeting of E. coli betagalactosidase to the nucleus in yeast // Cell - 1984. - V. 36. - P. 1057-1065.

- Harada S., Smith R.M., and Jarett L. Mechanisms of nuclear translocation of insulin // Cell Biochem. Biophys. - 1999. - V. 31. - P. 307-319.
- Hartman T., Lundqvist H., Westlin J.E., and Carlsson J. Radiation doses to the cell nucleus in single cells and cells in micrometastases in targeted therapy with (131)I labeled ligands or antibodies // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. - 2000. - V. 46. - P. 1025-1036.
- 35. Hebeda K.M., Huizing M.T., Brouwer P.A., van der Meulen F.W., Hulsebosch H.J., Reiss P., Oosting J., Veenhof C.H., and Bakker P.J. Photodynamic therapy in aids-related cutaneous kaposi's sarcoma // J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. - 1995. - V. 10. - P. 61-70.
- 36. Hebeda K.M., Kamphorst W., Sterenborg H.J., and Wolbers J.G. Damage to tumour and brain by interstitial photodynamic therapy in the 9L rat tumour model comparing intravenous and intratumoral administration of the photosensitiser // Acta Neurochir. (Wien). - 1998. - V. 140. - P. 495-501.
- 37. Hornung R., Fehr M.K., Walt H., Wyss P., Berns M.W., and Tadir Y. PEG-m-THPC-mediated photodynamic effects on normal rat tissues // Photochem. Photobiol. - 2000. - V. 72. - P. 696-700.
- 38. Huang H.S., Nagane M., Klingbeil C.K., Lin H., Nishikawa R., Ji X.D., Huang C.M., Gill G.N., Wiley H.S., and Cavenee W.K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling // J. Biol. Chem. -1997. - V. 272. - P. 2927-2935.
- Hubner S., Xiao C.Y., and Jans D.A. The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear localization sequence by importin // J. Biol. Chem. - 1997. - V. 272. - P. 17191-17195.
- 40. Jans D.A. Nuclear signaling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors? // FASEB J. 1994. V. 8. P. 841-847.
- 41. Jans D.A. The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation // Biochem. J. 1995. V. 311 (Pt 3). P. 705-716.
- 42. Jans D.A., Ackermann M.J., Bischoff J.R., Beach D.H., and Peters R. p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins // J. Cell Biol. 1991. V. 115. P. 1203-1212.
- Jans D.A., Chan C.K., and Huebner S. Signals mediating nuclear targeting and their regulation: application in drug delivery // Med. Res. Rev. -1998. - V. 18. - P. 189-223.
- 44. Jans D.A. and Hubner S. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation // Physiol Rev. 1996. V. 76. P. 651-685.

- 45. Jiang J., Sharma S.D., Fink J.L., Hadley M.E., and Hruby V.J. Melanotropic peptide receptors: membrane markers of human melanoma cells // Exp. Dermatol. - 1996. - V. 5. - P. 325-333.
- 46. Johannes L. and Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? // Traffic. 2002. V. 3. P. 443-451.
- Johnson H.M., Subramaniam P.S., Olsnes S., and Jans D.A. Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors // Bioessays - 2004. - V. 26. - P. 993-1004.
- Jones A.T., Gumbleton M., and Duncan R. Understanding endocytic pathways and intracellular trafficking: a prerequisite for effective design of advanced drug delivery systems // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2003. - V. 55. - P. 1353-1357.
- Kalderon D., Richardson W.D., Markham A.F., and Smith A.E. Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen // Nature - 1984a. - V. 311. - P. 33-38.
- Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., and Smith A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location // Cell - 1984b. - V. 39. - P. 499-509.
- 51. Kleinschmidt J.A. and Seiter A. Identification of domains involved in nuclear uptake and histone binding of protein N1 of Xenopus laevis // EMBO J. 1988. V. 7. P. 1605-1614.
- Konan Y.N., Gurny R., and Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy // J. Photochem. Photobiol. B -2002. - V. 66. - P. 89-106.
- Kostron H., Obwegeser A., and Jakober R. Photodynamic therapy in neurosurgery: a review // J. Photochem. Photobiol. B 1996. V. 36. P. 157-168.
- Krolenko S.A., Adamian S.I., and Lucy J.A. [Functional role of vacuolization of the T-system of skeletal muscle fibers] // Tsitologiia - 1997. - V. 39. - P. 878-888.
- 55. Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo C.G., Benmerah A., and Dautry-Varsat A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway // Mol. Cell -2001. - V. 7. - P. 661-671.
- Lanford R.E. and Butel J.S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen // Cell - 1984. - V. 37. -P. 801-813.
- 57. Liang H., Shin D.S., Lee Y.E., Nguyen D.C., Kasravi S., Aurasteh P., and Berns M.W. Subcellular phototoxicity of photofrin-II and lutetium

texaphyrin in cells in vitro. // Lasers Med. Sci. - 2000. - V. 15. - P. 109-122.

- Lofgren L.A., Hallgren S., Nilsson E., Westerborn A., Nilsson C., and Reizenstein J. Photodynamic therapy for recurrent nasopharyngeal cancer // Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg. - 1995. - V. 121. - P. 997-1002.
- Lyons R.H., Ferguson B.Q., and Rosenberg M. Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a // Mol. Cell Biol. - 1987. - V. 7. - P. 2451-2456.
- Marks P.V., Belchetz P.E., Saxena A., Igbaseimokumo U., Thomson S., Nelson M., Stringer M.R., Holroyd J.A., and Brown S.B. Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II trial--an early report // Br. J. Neurosurg. - 2000. - V. 14. - P. 317-325.
- 61. Maxfield F.R. and McGraw T.E. Endocytic recycling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. V. 5. P. 121-132.
- 62. May R.C. and Machesky L.M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton // J Cell Sci 2001. V. 114. P. 1061-1077.
- 63. McCready V.R. Milestones in nuclear medicine // Eur. J. Nucl. Med. 2000. V. 27. P. S49-S79.
- McDevitt M.R., Ma D., Lai L.T., Simon J., Borchardt P., Frank R.K., Wu K., Pellegrini V., Curcio M.J., Miederer M., Bander N.H., and Scheinberg D.A. Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators // Science 2001. V. 294. P. 1537-1540.
- McDevitt M.R., Sgouros G., Finn R.D., Humm J.L., Jurcic J.G., Larson S.M., and Scheinberg D.A. Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides // Eur. J. Nucl. Med. - 1998. - V. 25. - P. 1341-1351.
- Moore M.S. and Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus // Nature - 1993. - V. 365. - P. 661-663.
- Moore M.S. and Blobel G. Purification of a Ran-interacting protein that is required for protein import into the nucleus // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1994. - V. 91. - P. 10212-10216.
- Morandini R., Suli-Vargha H., Libert A., Loir B., Botyanszki J., Medzihradszky K., and Ghanem G. Receptor-mediated cytotoxicity of alpha-MSH fragments containing melphalan in a human melanoma cell line // Int. J. Cancer - 1994. - V. 56. - P. 129-133.
- 69. Mullooly V.M., Abramson A.L., and Shikowitz M.J. Dihematoporphyrin ether-induced photosensitivity in laryngeal papilloma patients // Lasers. Surg. Med. 1990. V. 10. P. 349-356.

- Musser D.A. and Fiel R.J. Cutaneous photosensitizing and immunosuppressive effects of a series of tumor localizing porphyrins // Photochem. Photobiol. - 1991. - V. 53. - P. 119-123.
- Myers J.N., Tabas I., Jones N.L., and Maxfield F.R. Beta-very low density lipoprotein is sequestered in surface-connected tubules in mouse peritoneal macrophages // J Cell Biol. - 1993. - V. 123. - P. 1389-1402.
- Newmeyer D.D. and Forbes D.J. Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation // Cell -1988. - V. 52. - P. 641-653.
- 73. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 4707-4714.
- Nir S. and Nieva J.L. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion // Prog. Lipid Res. - 2000. - V. 39. - P. 181-206.
- Oleinick N.L. and Evans H.H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms // Radiat. Res. - 1998. - V. 150. - P. S146-56.
- 76. Paschal B.M. and Gerace L. Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62 // J. Cell Biol. - 1995. - V. 129. - P. 925-937.
- 77. Pauwels E.K., McCready V.R., Stoot J.H., and van Deurzen D.F. The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals // Eur. J. Nucl. Med. - 1998. - V. 25. - P. 277-305.
- Plank C., Oberhauser B., Mechtler K., Koch C., and Wagner E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 12918-12924.
- Radu A., Blobel G., and Moore M.S. Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A - 1995. -V. 92. - P. 1769-1773.
- Raju M.R., Eisen Y., Carpenter S., and Inkret W.C. Radiobiology of alpha particles. III. Cell inactivation by alpha-particle traversals of the cell nucleus // Radiat. Res. - 1991. - V. 128. - P. 204-209.
- Raju M.R., Eisen Y., Carpenter S., Jarrett K., and Harvey W.F. Radiobiology of alpha particles. IV. Cell inactivation by alpha particles of energies 0.4-3.5 MeV // Radiat. Res. 1993. V. 133. P. 289-296.
- Reddi E. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours // J. Photochem. Photobiol. B - 1997. - V. 37. -P. 189-195.

- Rexach M. and Blobel G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins // Cell - 1995. - V. 83. - P. 683-692.
- 84. Richardson W.D., Mills A.D., Dilworth S.M., Laskey R.A., and Dingwall C. Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores // Cell - 1988. - V. 52. - P. 655-664.
- 85. Rihs H.P., Jans D.A., Fan H., and Peters R. The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen // EMBO J. -1991. - V. 10. - P. 633-639.
- Rosenkranz A.A., Jans D.A., and Sobolev A.S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency // Immunol. Cell Biol. - 2000. - V. 78. - P. 452-464.
- Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., Jans D.A., and Sobolev A.S. Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity // FASEB J. - 2003. -
- Rosenkranz A.A., Yachmenev S.V., Jans D.A., Serebryakova N.V., Murav'ev V.I., Peters R., and Sobolev A.S. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of a transfecting DNA construct // Exp. Cell Res. 1992. V. 199. P. 323-329.
- Sahm U.G., Olivier G.W., Branch S.K., Moss S.H., and Pouton C.W. Influence of alpha-MSH terminal amino acids on binding affinity and biological activity in melanoma cells // Peptides - 1994. - V. 15. - P. 441-446.
- 90. Seth P. Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein // J. Virol. 1994. V. 68. P. 1204-1206.
- Smith R.M. and Jarett L. Partial characterization of mechanism of insulin accumulation in H35 hepatoma cell nuclei // Diabetes - 1990. - V. 39. - P. 683-689.
- Sobolev A.S., Jans D.A., and Rosenkranz A.A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers // Prog. Biophys. Mol. Biol. - 2000. - V. 73. - P. 51-90.
- 93. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., and Ernst L.K. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo // J. Biol. Chem. - 1998. - V. 273. - P. 7928-7933.

- 94. Teiten M.H., Bezdetnaya L., Merlin J.L., Bour-Dill C., Pauly M.E., Dicato M., and Guillemin F. Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrugresistant human breast cancer cells // J. Photochem. Photobiol. B - 2001. -V. 62. - P. 146-152.
- 95. Uherek C., Fominaya J., and Wels W. A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 8835-8841.
- 96. Walicka M.A., Vaidyanathan G., Zalutsky M.R., Adelstein S.J., and Kassis A.I. Survival and DNA damage in Chinese hamster V79 cells exposed to alpha particles emitted by DNA-incorporated astatine-211 // Radiat. Res. 1998. V. 150. P. 263-268.
- 97. Wiseman H. and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer // Biochem. J. - 1996. - V. 313 (Pt 1). - P. 17-29.
- Zalutsky M.R. and Vaidyanathan G. Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy // Curr. Pharm. Des - 2000. - V. 6. - P. 1433-1455.
- 99. Zidenberg-Cherr S., Parks N.J., and Keen C.L. Tissue and subcellular distribution of bismuth radiotracer in the rat: considerations of cytotoxicity and microdosimetry for bismuth radiopharmaceuticals // Radiat. Res. -1987. - V. 111. - P. 119-129.