

## БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКТИВНОГО НАКОПЛЕНИЯ И ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ ТКАНИ

### Обзор

© 2022 В.И. Иванова-Радкевич

*Российский университет дружбы народов (РУДН),  
117198 Москва, Россия; электронная почта: ivanova-radkevich-vi@rudn.ru*

Поступила в редакцию 01.06.2022

После доработки 17.08.2022

Принята к публикации 06.09.2022

Одним из ключевых параметров фотодинамической терапии злокачественных новообразований является селективность накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани. Недостаточная избирательность фотосенсибилизаторов по отношению к патологически измененным тканям и генерализованное распространение по организму приводит к развитию тяжелых токсических эффектов, в том числе кожной фототоксичности. Механизмы селективности фотосенсибилизаторов в отношении опухолевой ткани включают избирательное связывание с белками и липопротеинами крови, количество рецепторов к которым увеличено на мембранах опухолевых клеток, поглощение макрофагами в опухоли, лучшую растворимость при низком рН, характерном для опухолевых клеток, и другие механизмы. В настоящее время повышение эффективности фотодинамической терапии во многом связывают с дополнительным нацеливанием фотосенсибилизаторов на ткани опухоли. Стратегии таргетной доставки основываются на различиях в метаболизме и профилях экспрессии опухолевых и здоровых клеток. В этих клетках могут по-разному экспрессироваться рецепторы, протеазы или трансмембранные переносчики. В частности, ускоренный метаболизм у многих типов опухолей приводит к гиперэкспрессии рецепторов эпидермального фактора роста, фолиевой кислоты, трансферрина и ряда других соединений. В настоящем обзоре рассмотрены биохимические основы избирательного накопления в опухолях фотосенсибилизаторов разных классов (хлорины, фталоцианины, производные 5-аминолевулиновой кислоты и др.) и обсуждаются различные стратегии таргетной доставки с акцентом на конъюгацию фотосенсибилизаторов с лигандами рецепторов, гиперэкспрессируемых в опухолевых клетках.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, таргетная доставка, селективность, хлорин, аминолевулиновая кислота.

**DOI:** 10.31857/S032097252211001X, **EDN:** LUVMUG

### ВВЕДЕНИЕ

В обзоре рассмотрены основные таргетные молекулы (векторы), используемые для нацеленной доставки фотосенсибилизаторов в ткани опухоли. Первыми приведены векторы, показывающие в исследованиях наибольшую

эффективность, с подтвержденной многочисленными исследованиями высокой фототоксичностью в отношении разных типов опухолей. Далее рассмотрены векторы, которые исследуются только недавно, эффективность которых показана в ограниченном количестве работ, и, наконец, векторы, применение которых имеет

Принятые сокращения: 5-АЛК – 5-аминолевулиновая кислота; АТ – антитела; Вир – виросома; Гц – гиперицин; ДМЭ-Хл – диметиловый эфир хлорина еб; Кур – куркумин; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛпС – липосома; М – манноза; НЧ – наночастица; П – пептид; Пиро-Фео – пиррофеофорбид А; ПпIX – протопорфилин IX; ПЭГ – полиэтиленгликоль; Тмф – тамоксифен; Тф – трансферрин; Тф(п) – пептид, связывающийся с рецепторами к трансферрину; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФеоА – феофорбид А; ФК – фолиевая кислота; Хл – хлорин еб; Э2 – эстрадиол; АlPc – фталоцианин алюминия; АlPcS4 – тетрасульфированный фталоцианин алюминия; BPD-MA – производное бензопорфирина; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор к эпидермальному фактору роста; G – глюкоза; IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования; Pс – фталоцианин; SiPc – фталоцианин кремния, ZnPc – фталоцианин цинка.

серьезные технические или иные ограничения. При оценке перспективности и эффективности векторов автор данного обзора в первую очередь ориентировался на сравнительные данные исследователей по фототоксичности нацеленного фотосенсибилизатора в сравнении с фотосенсибилизатором, не связанным с таргетной молекулой. В данном обзоре рассмотрены в основном те исследования, в которых имеются указанные сравнительные данные. Показателем, оцениваемым в большинстве рассмотренных в обзоре работ, является  $IC_{50}$  – полумаксимальная ингибирующая концентрация фотосенсибилизатора, вызывающая гибель 50% клеток. Сравнивая разницу в значениях этого показателя для нацеленных и ненацеленных фотосенсибилизаторов, можно наиболее достоверно оценить эффективность разных векторов доставки. В качестве дополнительного критерия для сравнительной оценки использован показатель увеличения уровня накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках при использовании вектора доставки. Однако, как отмечает Schneider et al. [1], оценка внутриклеточного накопления фотосенсибилизатора не всегда корректна, поскольку уровень накопления фотосенсибилизатора в опухоли не всегда коррелирует с уровнем его фототоксичности. Например, накопление фотосенсибилизатора в клетках внутри эндосом и лизосом может быть менее эффективным, чем у соответствующего неконъюгированного фотосенсибилизатора, накапливающегося в цитоплазме, несмотря на повышенное внутриклеточное поглощение.

В наиболее важных обзорах по данной тематике, опубликованных за последние несколько лет [1–4], оценка эффективности разных векторов проведена с учетом сравнения между собой эффективности разных конъюгатов с векторными молекулами. Такой подход не является оптимальным, так как в нем не учитывается разница в эффективности исходных фотосенсибилизаторов и разные условия проведения экспериментов. Новизна данного обзора связана с тем, что оценка рассмотренных векторов доставки произведена по наиболее объективному критерию – величине изменения показателя  $IC_{50}$  нацеленного фотосенсибилизатора в сравнении с аналогичным показателем ненацеленного фотосенсибилизатора в одинаковых условиях.

## ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

В основе метода фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований

лежит селективное накопление в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, который при облучении светом с длиной волны, соответствующей максимуму его поглощения, вызывает образование синглетного кислорода и других цитотоксических соединений, вызывающих повреждение структурных элементов опухолевой ткани.

При облучении соответствующей длиной волны фотосенсибилизатор поглощает один фотон и переходит из основного состояния ( $S_0$ ) в первое синглетное возбужденное состояние ( $S_1$ ) или в более высокие синглетные возбужденные состояния ( $S_n$ ). Состояния  $S_n$  быстро переходят в  $S_1$  путем внутренней конверсии. Фотосенсибилизатор в возбужденном состоянии  $S_1$  нестабилен, время его жизни составляет несколько наносекунд, и он быстро переходит в основное состояние  $S_0$ , что сопровождается флуоресценцией или рассеиванием энергии в виде тепла (рис. 1). Из состояния  $S_1$  может произойти переход в возбужденное состояние  $T_1$  путем интеркомбинационной конверсии. Фотосенсибилизатор в возбужденном состоянии  $T_1$  обычно характеризуется более длительным временем жизни (от мкс до с) и может вступать в различные фотофизические и фотохимические процессы, такие как фосфоресценция и образование синглетного кислорода  $^1O_2$  с последующей генерацией других активных форм кислорода [2, 3].

К химическим соединениям, применяемым в качестве фотосенсибилизаторов для ФДТ, предъявляют определенные требования, среди которых стабильность химического состава, максимум поглощения, лежащий в области так называемого «терапевтического окна», где поглощение собственных тканей минимально, высокий квантовый выход генерации синглетного кислорода, а также, в качестве одного из основных требований, высокая селективность накопления в опухоли. Последнее обеспечивает высокую фотодинамическую активность, возможность использования низких терапевтических доз, минимальное воздействие на окружающие здоровые ткани при облучении и низкую кожную фототоксичность [5–7].

В большинстве стран первыми фотосенсибилизаторами, разрешенными для применения в клинической практике, были производные гематопорфирина – фотофрин и его аналоги. Наиболее длинноволновая полоса поглощения порфиринов лежит в области 620–640 нм. Вследствие этого ФДТ с данными фотосенсибилизаторами вызывает в опухолях ограниченные по глубине фотоиндуцированные некрозы. Также эти препараты характеризуются низкой

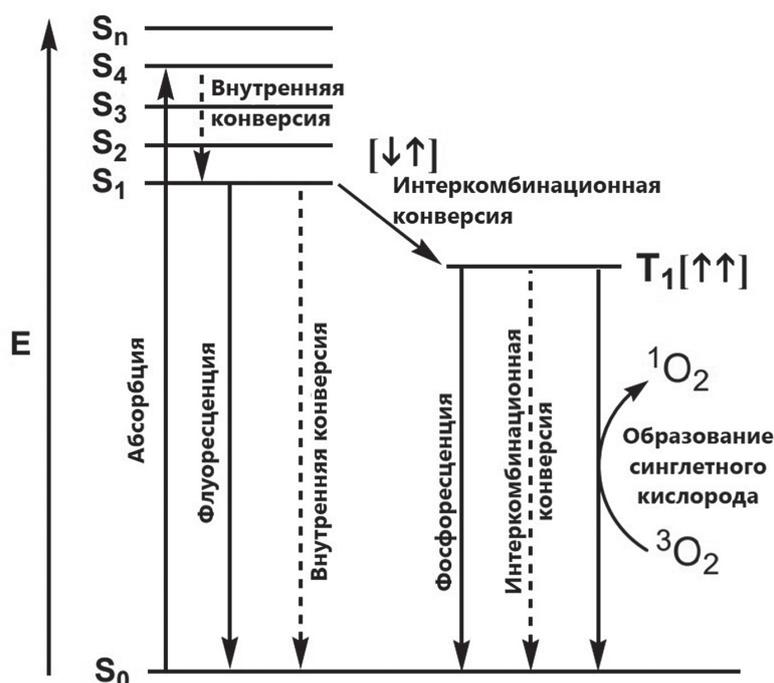


Рис. 1. Модифицированная диаграмма Яблонского. Фотофизические процессы фотодинамической терапии

селективностью накопления в опухолевой ткани по сравнению с окружающими здоровыми тканями и кожей, что является причиной высокой кожной фототоксичности, ограничивающей их клиническое применение [5–8].

При разработке фотосенсибилизаторов последующих поколений основными критериями для их успешного внедрения в клиническую практику стали смещение максимумов поглощения в более длинноволновую область спектра (650–670 нм и более), что позволило обеспечить большую глубину поражения опухолевой ткани, а также повышение селективности по отношению к опухолевой ткани по сравнению с препаратами первого поколения. К этим препаратам относятся фотосенсибилизаторы на основе фталоцианинов (Pc), хлоринов, бактериохлорина и их производных (фотосенс, темпорфин, пурлитин, фоскан, фотодитазин, радахлорин, фотохлорин, фотолон, бактериосенс и др.) [5, 6, 8, 9].

### СЕЛЕКТИВНОСТЬ НАКОПЛЕНИЯ НЕНАЦЕЛЕННЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛИ

Селективность накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани – один из основных параметров ФДТ [5, 10]. Низкая тропность фотосенсибилизаторов к опухолевой ткани приводит к необходимости повышения

их эффективных концентраций и накоплению фотосенсибилизаторов в здоровых органах и тканях, в том числе в коже, что вызывает ее фотосенсибилизацию и развитие тяжелой кожной фототоксичности.

Для фотосенсибилизаторов разной химической природы существуют разные теории, объясняющие избирательность их накопления в опухоли.

Хорошо известно, что при введении в кровоток все липофильные фотосенсибилизаторы связываются с белками сыворотки, включая в первую очередь липопротеины низкой плотности (ЛПНП), а также липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и альбумин, и только небольшая их часть оказывается в свободном состоянии. Молекулы фотосенсибилизаторов связываются с белками за счет электростатических, ван-дер-ваальсовых, гидрофобных и водородных взаимодействий. Включение гидрофобных фотосенсибилизаторов (в первую очередь производных гематопорфирина) в ЛПНП обусловлено в основном гидрофобными взаимодействиями, тогда как более гидрофильные фотосенсибилизаторы связываются с альбумином [3, 10–12]. Доказано, что фталоцианин цинка (ZnPc) и этиопурпурин олова могут транспортироваться в составе ЛПВП. Некоторые хлорины и тетрафенилпорфины (N-аспартилхлорин е6, мезо-тетра-гидроксибензилхлорин, тетрафенилпорфины) переносятся в основном альбумином, а хлорин е6 (Хл) и суль-

фированный фталоцианин алюминия (AlPcS) примерно в равной степени связываются с альбумином и ЛПВП; значительная роль в переносе производного бензопорфирина, AlPcS и ZnPc также отводится ЛПНП. Следует отметить, что липопротеины не фагоцитируются клетками крови и длительно циркулируют в кровеносном русле [10, 13–16].

Из других механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов в опухоли некоторые авторы отмечают повышенную продукцию в опухолевых клетках коллагена, связывающего порфирины, что также может способствовать селективному накоплению фотосенсибилизаторов с порфириновой структурой в опухолевой ткани [17]. Вместе с тем, как отмечается в некоторых работах, высокое содержание коллагена во внеклеточном матриксе опухолевых тканей приводит к плохому проникновению и удержанию фотосенсибилизатора (например, хлоринов) и значительно ограничивает эффективность ФДТ [18].

На избирательность накопления фотосенсибилизаторов в опухоли значительное влияние оказывают низкие значения pH опухоли по сравнению с нормальными тканями за счет избыточного производства лактата при активном гликолизе в опухолевых клетках. В кислой среде анионные фотосенсибилизаторы лучше растворяются в водных растворах и вследствие этого лучше накапливаются в клетках [19, 20].

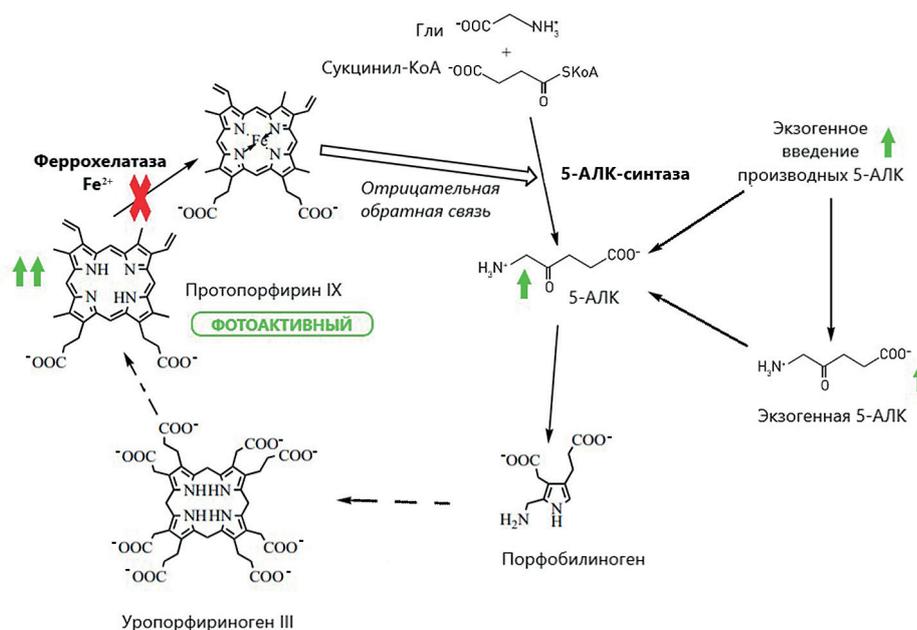
Согласно еще одной теории, повышенное содержание фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани связано с увеличением в ней количества макрофагов. Макрофаги в большей степени, чем сами опухолевые клетки, накапливают фотосенсибилизаторы за счет поглощения их агрегированных комплексов путем фагоцитоза. За рубежом проведено сравнительное изучение накопления в макрофагах и опухолевых клетках протопорфирина IX (ПпIX), индуцированного приемом 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Отмечено, что накопление в макрофагах было значительно выше, чем в опухолевых клетках [21].

По еще одной версии, фотосенсибилизаторы с одинаковой скоростью накапливаются в опухолевой и неизменной тканях, однако в опухолевой ткани они задерживаются на более длительное время. Объясняют это тем, что молекулы фотосенсибилизатора, связанные с белками или агрегированные между собой, из-за своего размера могут элиминировать из опухолевой ткани только с оттоком лимфы, а в опухолях лимфатическая система развита слабо [4, 19, 22]. Так, в исследованиях показано, что для эфира дигематопорфирина (актив-

ного компонента производного гематопорфирина) характерна высокая агрегация в водных растворах даже при наличии альбуминов в концентрации, подобной той, которая имеется в сыворотке крови [23].

К отдельной группе фотосенсибилизаторов, так называемых профотосенсибилизаторов, относятся лекарственные препараты на основе 5-АЛК. 5-АЛК является промежуточным метаболитом биосинтеза гема (рис. 2). В биосинтезе гема лимитирующим скорость этапом является образование 5-АЛК из сукцинил-КоА и глицина. Системное экзогенное введение 5-АЛК увеличивает скорость продукции фотоактивного ПпIX во всех клетках организма, в которых происходит процесс биосинтеза гема. В присутствии ионов  $Fe^{2+}$  фермент феррохелатаза (ЕС 4.99.1.1) катализирует превращение ПпIX в фотонеактивный гем. В неизменных клетках этот процесс происходит довольно быстро (2–4 часа). В опухолевых клетках в связи с большей активностью ферментов начального этапа синтеза гема (в частности, порфобилиногендеаминазы (ЕС 2.5.1.61)), а также со снижением активности в них (из-за ограниченной доступности  $Fe^{2+}$ ) феррохелатазы происходит накопление фотоактивного ПпIX (рис. 2). Увеличение концентрации ПпIX в опухоли происходит в течение нескольких часов, а высокий уровень его удерживается до 24 часов, в то время как в нормальных клетках ПпIX быстро превращается в фотонеактивный гем под действием феррохелатазы. Таким образом, в интервале приблизительно от 2 до 24 часов наблюдается значительная разница (до 10–15 раз) между концентрацией фотоактивного ПпIX в опухолевых и здоровых тканях. Это позволяет выполнять процедуру ФДТ с минимальным воздействием на здоровые ткани, а также с высокой эффективностью проводить флуоресцентную диагностику для выявления опухолей и уточнения их границ [24, 25].

При местном введении поступление 5-АЛК в опухолевые ткани и клетки связано с определенными проблемами. При физиологических значениях 5-АЛК представляет собой гидрофильный цвиттерион. Подобные соединения имеют ограниченную способность преодолевать биологические барьеры, такие как клеточные мембраны или роговой слой кожи [26]. Хотя в экспериментах *in vitro* было показано, что при местном применении 5-АЛК проникает в подкожную клетчатку, небольшая глубина ее проникновения во всю кожу является одним из основных ограничений использования 5-АЛК для локальной ФДТ [27–29]. Для увеличения проникающей способности 5-АЛК



**Рис. 2.** Механизм накопления фотоактивного протопорфина IX в опухолевых клетках при экзогенном введении 5-АЛК и ее производных

были предприняты попытки разработки модифицированных составов 5-АЛК: добавление ДМСО, ЭДТА или использование липосом (ЛпС) [30, 31]. Другой способ заключается в этерификации 5-АЛК с получением более липофильного соединения. Peng et al. [32] и Kloek и Henegouwen [26, 33] были первыми, кто разработал концепцию использования этерифицированных производных 5-АЛК для повышения эффективности ФДТ, и продемонстрировали, что местное применение различных эфиров 5-АЛК (метильный, этиловый и пропиловый эфиры) на коже здоровых мышей приводило к более высокой интенсивности флуоресценции ПпIX, чем при применении неэтерифицированной 5-АЛК. Позже эти данные были подтверждены в многочисленных клинических исследованиях.

Наши исследования эффективности гексилового эфира 5-АЛК для флуоресцентной диагностики опухолей мочевого пузыря показали, что данный фотосенсибилизатор демонстрирует не только более глубокое проникновение в опухолевые ткани, но и более высокую селективность в отношении опухоли, чем свободная 5-АЛК [27, 28, 34–36]. Так, в сравнительном исследовании эффективности препаратов 5-АЛК и гексилового эфира 5-АЛК [28] было показано, что интенсивность флуоресценции нормальной слизистой мочевого пузыря кролика после инстилляций 0,0001%-го раствора гексилового эфира 5-АЛК была сопоставима с аналогичным показателем при инстиляции в мочевой пузырь 0,3%-го раствора 5-АЛК.

А в проспективном многоцентровом клиническом исследовании препарата «Гексвикс» на основе гексилового эфира 5-АЛК [34] проведение флуоресцентной диагностики опухолей мочевого пузыря с этим препаратом у 124 пациентов позволило дополнительно выявить у 34 (27,4%) пациентов 65 флуоресцирующих очагов, не определяемых в белом свете, в которых при морфологическом исследовании был подтвержден опухолевый процесс. При этом флуоресцентная контрастность опухолевой ткани относительно окружающей неизмененной слизистой в среднем достигала 4,3–7,6, что в 1,5 раза выше, чем при использовании 5-АЛК.

### ПОВЫШЕНИЕ СЕЛЕКТИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ

При ФДТ общее распространение фотосенсибилизатора по всему телу приводит к генерализованной фотосенсибилизации, кожной фототоксичности и плохой переносимости лечения пациентами. Поиск путей повышения селективности накопления фотосенсибилизаторов в опухолевых тканях идет по двум направлениям: разработка новых фотосенсибилизаторов, обладающих большей тропностью по отношению к опухолевым тканям, и использование транспортных систем для направ-

ленной доставки фотосенсибилизатора к тканям-мишеням. Во втором случае повышение селективности фотосенсибилизатора достигается путем его модификации специальными лигандами (векторами), которые будут нацелены на определенные рецепторы или ферменты. Выбор стратегии нацеливания фотосенсибилизатора на опухоль основывается на различиях в активности метаболических путей и профилях экспрессии генов в опухолевых и здоровых клетках. Так, отдельные опухолевые линии могут характеризоваться повышенной или пониженной экспрессией генов определенных ферментов, рецепторов или трансмембранных переносчиков. Фотосенсибилизаторы могут быть функционализированы белками, пептидами, а также небелковыми лигандами, такими как металлоорганические соединения. В качестве альтернативы фотосенсибилизаторы могут быть инкапсулированы в наночастицы (НЧ), несущие нацеливающие агенты, что снижает концентрацию свободно циркулирующего фотосенсибилизатора [3, 10].

На рис. 3 схематически изображены возможные формы транспортных систем для направленной доставки фотосенсибилизаторов в опухоли. В разделах, посвященных конкретным таргетным молекулам/системам, подробно рассмотрен состав каждой системы.

Далее рассмотрены основные векторы, используемые для нацеленной доставки фотосенсибилизаторов в ткани опухоли.

### КОНЬЮГАЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С ТРАНСФЕРРИНОМ

Все быстро делящиеся клетки нуждаются в постоянном притоке железа. Свободное железо не встречается в биологических системах, оно транспортируется и хранится в виде хелатных соединений с белками. Трансферрин (Тф, молекулярная масса 80 кДа) является основным циркулирующим транспортным белком ионов железа. Он содержится в крови на уровне около 3 г/л, и каждая молекула Тф может связывать два иона железа. Некоторые типы опухолевых клеток демонстрируют повышенную экспрессию рецептора Тф, и, следовательно, Тф может являться перспективным агентом для таргетной доставки фотосенсибилизаторов в опухолевые клетки [3, 37].

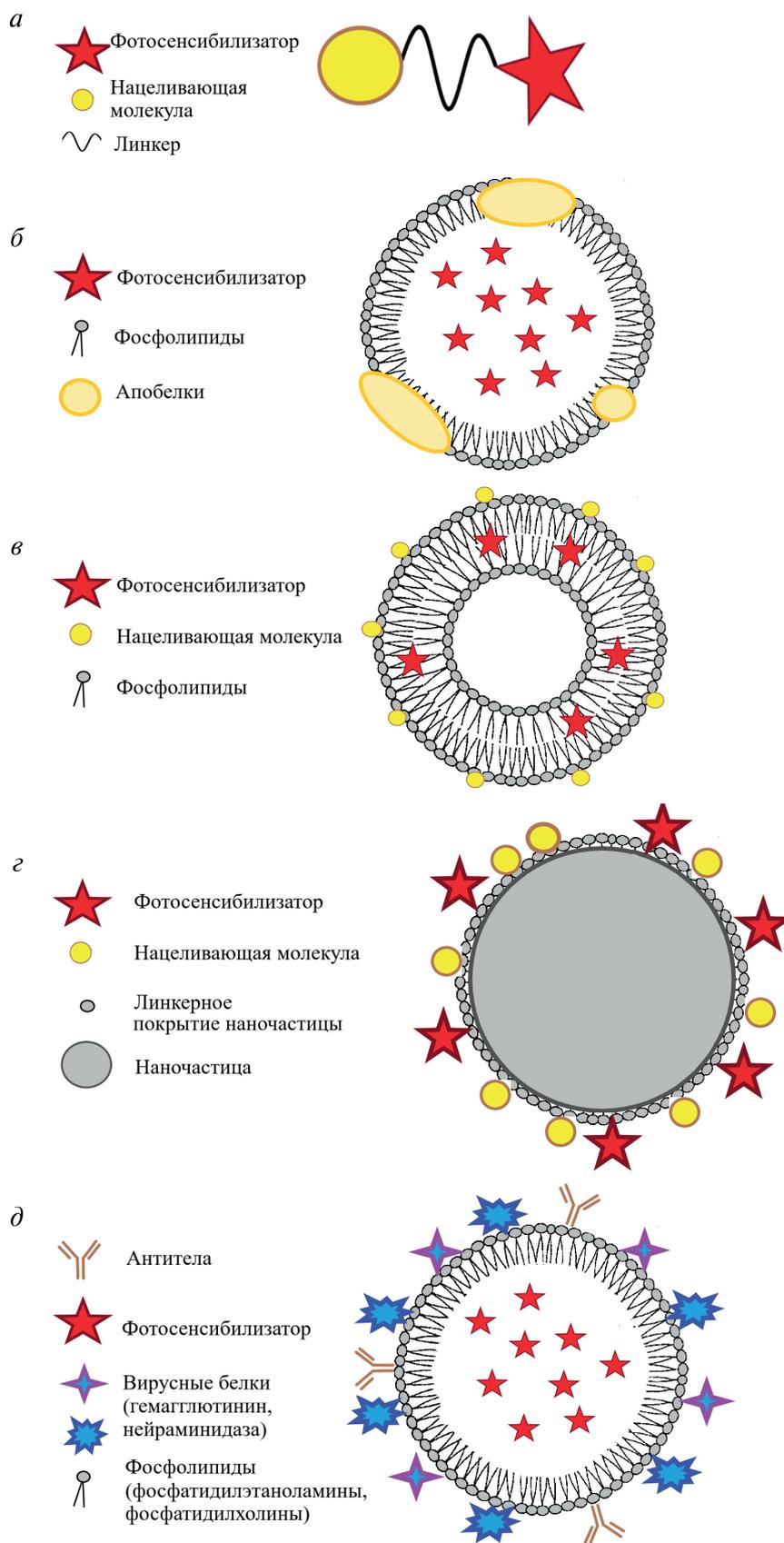
Тф может быть напрямую соединен с фотосенсибилизатором через линкер (рис. 3, а), например, через аминоэтил-сефадекс [38]. Для линкеров, соединяющих фотосенсибилизатор

с вектором, важными свойствами являются гидрофильность (для повышения водорастворимости конъюгата и, следовательно, эффективности таргетной доставки) и легкое расщепление связи между линкером и фотосенсибилизатором после доставки лекарства в клетку-мишень. Тф также может быть включен в состав более сложных транспортных систем. Так, в работах Gijssens et al. [39] и Derycke et al. [40] AlPcS был загружен в ЛпС, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ-ЛпС), конъюгированные с Тф через линкер дистеарилфосфатидилэтаноламин (липосомальный липид), соединенный с ПЭГ, несущим на дистальном конце малеимидную группу (рис. 3, в). В другом исследовании [41] производное бензопорфирина (BPD-MA) было связано с поверхностью НЧ сополимера молочной и гликолевой кислот с ПЭГ, соединенных тиол-малеимидной связью с пептидом, связывающим рецепторы Тф (рис. 3, г).

Эффективность использования Тф в качестве нацеливающей молекулы доказана многими экспериментальными исследованиями. Hamblin и Newman [42] изучали комплексы гематопорфирина, ковалентно связанного с Тф. Авторы показали, что поглощение конъюгата фибробластами мыши NIH 3T3 и клетками рака толстой кишки человека HT29 опосредовано рецептором Тф. При этом авторы отмечают, что транспортной активности рецептора Тф может быть недостаточно для доставки фототоксичной дозы комплекса фотосенсибилизатора с Тф к опухолевым клеткам *in vivo*.

В других исследованиях оценивали эффективность конъюгата Тф с Хл [38]. Результаты эксперимента со светозависимым окислением тетраметилбензида показали, что квантовый выход синглетного кислорода конъюгата составляет примерно 70% эффективности нативного Хл. Однако высокое поглощение конъюгата обеспечивает увеличение его эффективности при одинаковых концентрациях. Конъюгат оказался в 10–40 раз более фототоксичен в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и крысы MTLn3, чем свободный Хл:  $IC_{50}$  для Хл – 4 мкг/мл, для конъюгата с Тф (Хл–Тф) – 0,1–0,4 мкг/мл (в пересчете на Хл).

Исследования фотодинамической активности конъюгата гиперидина с трансферрином (Гц–Тф) [43] показали снижение  $IC_{50}$  для конъюгата в 2–2,5 раза по сравнению с неконъюгированным фотосенсибилизатором. На культуре клеток SW480 при одних и тех же параметрах облучения  $IC_{50}$  для Гц составила 5 мкМ, для Гц–Тф – 2,5 мкМ; на клетках HCT116 и Caco2  $IC_{50}$  для Гц – 2,5 мкМ, для Гц–Тф – 1 мкМ.



**Рис. 3.** Возможные стратегии соединения фотосенсибилизаторов с нацеливающими молекулами. *а* – Фотосенсибилизатор соединяется с нацеливающей молекулой через линкер. *б* – Фотосенсибилизатор включен в состав липопротеина, связанного с нацеливающими молекулами. *в* – Нагруженная фотосенсибилизатором липосома связана с нацеливающими молекулами. *г* – Нагруженная фотосенсибилизатором наночастица связана с нацеливающими молекулами. *д* – Нагруженная фотосенсибилизатором виросома связана с нацеливающими молекулами (антителами)

Gijssens et al. [39] использовали Тф в качестве вектора направленной доставки для содержащих тетрасульфированный фталоцианин алюминия (AlPcS<sub>4</sub>) ЛпС, покрытых ПЭГ. После 24-часовой инкубации клеток HeLa с фотосенсибилизатором и его конъюгатом в одинаковой концентрации (10 мкМ по AlPcS<sub>4</sub>) внутриклеточная концентрация фотосенсибилизатора составляла 37,3 мкМ для свободного AlPcS<sub>4</sub>, 4,9 мкМ – для фотосенсибилизатора в составе ЛпС (ЛпС–AlPcS<sub>4</sub>) и 136,5 мкМ – для фотосенсибилизатора в составе ЛпС, конъюгированных с Тф (ЛпС–AlPcS<sub>4</sub>–Тф). Из приведенных данных видно, что включение фотосенсибилизатора в состав ЛпС снижало его накопление в опухоли, однако функционализация ЛпС Тф повышала накопление даже выше уровня исходного свободного фотосенсибилизатора. Исследования показали, что конъюгаты ЛпС–AlPcS<sub>4</sub>–Тф были в 10 раз более фототоксичны в отношении клеток HeLa, чем свободный AlPcS<sub>4</sub>, при этом ПЭГ–ЛпС без фотосенсибилизатора не проявляли фототоксичности. Было показано, что эта высокая фототоксичность индуцируется внутриклеточным накоплением AlPcS<sub>4</sub>, которое резко снижается в присутствии свободного Тф. Это объясняется конкуренцией за рецептор Тф между свободным и связанным с ЛпС Тф. При одних и тех же параметрах облучения IC<sub>50</sub> для AlPcS<sub>4</sub> составила 6,3 мкМ, для ЛпС–AlPcS<sub>4</sub>–Тф – 0,63 мкМ, для ЛпС–AlPcS<sub>4</sub> IC<sub>50</sub> не была достигнута.

Те же авторы продолжили исследования разработанного конъюгата на культуре клеток АУ-27 [40]. После 24-часовой инкубации клеток АУ-27 с фотосенсибилизатором и его конъюгатом в одинаковой концентрации (10 мкМ по AlPcS<sub>4</sub>) внутриклеточная концентрация фотосенсибилизатора составляла 3,7 мкМ для свободного AlPcS<sub>4</sub>, 52,7 мкМ – для ЛпС–AlPcS<sub>4</sub> и 384,1 мкМ – для ЛпС–AlPcS<sub>4</sub>–Тф. Исследования этой системы *in vivo* также показали ее высокую специфичность в отношении трансплантированных крысам опухолей мочевого пузыря по сравнению с нормальными тканями.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Использование фолиевой кислоты (ФК) для нацеливания на опухолевые клетки – одно из самых перспективных и активно развивающихся в последние годы направлений таргетной доставки фотосенсибилизатора в опухоль. К не-

сомненным преимуществам использования ФК относятся ее доступность, низкая стоимость, биосовместимость, возможность применения с разными таргетными системами (прямая сшивка с фотосенсибилизатором через линкер, конъюгация с ЛпС или НЧ), гиперэкспрессия рецептора ФК на поверхности многих опухолевых клеток, включая опухоли головного мозга, легких, яичников, молочной железы, толстой кишки, предстательной железы, носа, горла, гемопоэтические злокачественные новообразования миелоидного происхождения, включая хронические и острые миелогенные лейкозы. При этом высоко недифференцированные метастатические опухоли экспрессируют значительно больше рецепторов ФК, чем их локализованные аналоги с низкой степенью злокачественности [44–51]. Гиперэкспрессия рецептора ФК не обнаруживается в клетках нормальных тканей, за исключением активированных макрофагов при некоторых воспалительных заболеваниях. Все это позволяет использовать ФК как вектор для направленной доставки фотосенсибилизатора к опухоли [3, 52, 53].

В более ранних исследованиях [44–45] использовали конъюгаты фотосенсибилизаторов, связанных с ФК через линкеры различной химической природы (рис. 3, а). В качестве линкера для присоединения ФК может быть использован глутамат [54], также описано успешное применение 1,6-диаминогексана и 2,20-(этилендиокси)-бис-(этиламина) [44–45]. В исследованиях последних лет применяют более сложные транспортные конструкции. Так, в работе Nwaha et al. [46] использовали нагруженные фотосенсибилизатором ЛпС, связанные с ФК (рис. 3, в). В ряде исследований в качестве транспортной системы применяют модифицированные НЧ, связанные с фотосенсибилизатором и ФК (рис. 3, г). В работах Liang et al. [47], Akbarzadeh et al. [48] и Pan et al. [55] были изучены НЧ оксида титана и висмута, модифицированные линкерами с аминогруппами (например, АРТЕС (3-аминопропил-триэтоксисилан)), в работе Hwang et al. [49] – НЧ оксида железа, покрытые ПЭГ, а в работе Son et al. [50] – полимерные НЧ, покрытые фосфолипидами, модифицированными ПЭГ.

В последние несколько лет данное направление таргетной доставки активно развивается. Показана перспективность использования ФК как вектора таргетной доставки в опухоль для многих фотосенсибилизаторов, в том числе для тетрафенилпорфинов [44], ZnPc [46] и AlPc [47, 55], 5-АЛК [48], ФеоА [49, 50], производных хлорина [45, 51, 56].

В экспериментах на клетках носоглотки человека KB при прямом конъюгировании с ФК клеточное поглощение и фотодинамическая активность конъюгата тетрафенилпорфирина и аналога мета-тетра(гидроксифенил)хлорина значительно увеличивались по сравнению со свободным фотосенсибилизатором [44, 45]. В работе Schneider et al. [44] накопление конъюгированного с ФК тетрафенилпорфирина в опухолевых клетках KB (оцененное по интенсивности флуоресценции) в экспериментах *in vitro* было выше в 10–15 раз, чем для свободного фотосенсибилизатора. В другом исследовании [45] в экспериментах *in vivo* на опухолевой модели KB у мышей было показано, что и селективность накопления в опухоли по сравнению с здоровыми окружающими тканями тоже увеличивается после конъюгации: селективность накопления конъюгата аналога мета-тетра(гидроксифенил)хлорина составила 5,0, а при использовании свободного фотосенсибилизатора – 2,1. В работе Schneider et al. [44] 24-часовая инкубация клеток KB с тетрафенилпорфирином, конъюгированным с бычьим альбумином, в достаточно низкой концентрации (10 мкМ) с последующим облучением не приводила к гибели клеток, а при проведении облучения после инкубации клеток с конъюгатами фотосенсибилизатора с ФК с той же концентрацией фотосенсибилизатора доля погибших клеток достигала 30–70% от контроля в зависимости от использованного линкера и параметров облучения. Данные по  $IC_{50}$  авторами не представлены (показатели не были достигнуты в изучаемом диапазоне концентраций (до 30 мкМ)).

Nwahara et al. [46] изучали фотодинамическую активность ZnPc с использованием в качестве транспортной системы ЛпС, связанных с ФК. Авторы показали в экспериментах *in vitro* с использованием флуоресцентной визуализации увеличение специфичности фотосенсибилизатора в отношении клеток HeLa и MCF-7 со сверхэкспрессией рецептора ФК с использованием флуоресцентной визуализации. На клетках HeLa интенсивность флуоресценции фотосенсибилизатора в составе ЛпС, связанных с ФК, была почти в 3 раза выше, чем при использовании ЛпС с фотосенсибилизатором без ФК. По результатам исследования авторами сделан вывод, что подобная транспортная система обладает превосходной противоопухолевой эффективностью в условиях гипоксии и располагает потенциалом для снижения побочных эффектов, связанных с нецелевой терапией. Последнее особенно актуально для фотосенсибилизаторов на основе Pc, основным побочным эффектом которых является длительная кожная фототоксичность.

Транспортные системы на основе НЧ, связанных с ФК, также демонстрируют повышение уровня накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках и его фотодинамической активности. Так, в работе Liang et al. [47] при одной и той же концентрации фталоцианина алюминия (10 мкг/мл) и условиях облучения выживаемость клеток HeLa при использовании фталоцианина алюминия AlPc в свободном виде составила 92%, а для комплекса НЧ оксида титана, нагруженного фотосенсибилизатором и модифицированных ФК (НЧ–AlPc–ФК) – менее 35%. Akbarzadeh et al. [48] сообщили, что интенсивность флуоресценции ПпIX на клетках KB для конъюгата НЧ оксида висмута с 5-АЛК и ФК (НЧ–5-АЛК–ФК) была в 2–3 раза (в зависимости от времени инкубации) выше, чем для свободной 5-АЛК, и в 1,5–2,3 раза выше, чем для НЧ с 5-АЛК, но без ФК (НЧ–5-АЛК). Согласно данным, представленным авторами, выживаемость клеток KB после инкубации с 5-АЛК, НЧ–5-АЛК и НЧ–5-АЛК–ФК (концентрация 5-АЛК во всех случаях – 20 мкг/мл) и проведения облучения составила 85%, 65% и 50%.  $IC_{50}$  для 5-АЛК, НЧ–5-АЛК и НЧ–5-АЛК–ФК составила 170, 110 и 90 мкг/мл. Hwang et al. [49] в аналогичном исследовании НЧ оксида железа, покрытых ПЭГ, связанных с FeoA и ФК (НЧ–FeoA–ФК), на клетках KB получили разницу в интенсивности флуоресценции для НЧ–FeoA–ФК по сравнению с НЧ–FeoA и FeoA в 3 и 4 раза соответственно. Выживаемость клеток KB после инкубации с FeoA, НЧ–FeoA и НЧ–FeoA–ФК (концентрация FeoA во всех случаях – 200 мкМ) и проведения облучения составила 95%, 65% и 10%. Значения  $IC_{50}$  для НЧ–FeoA–ФК были достигнуты при концентрации 50 мкг/мл (в пересчете на FeoA), а для свободного FeoA и НЧ–FeoA значения  $IC_{50}$  не были достигнуты при 200 мкг/мл (то есть разница в показателях  $IC_{50}$  составляет более, чем 4 раза). По данным Bharathiraja et al. [51], выживаемость клеток MDA-MB-231 после инкубации с НЧ кремния, связанными с Хл и ФК (НЧ–Хл–ФК), и облучения составила 20%, а после инкубации со свободным Хл в той же концентрации (5 мкМ) и облучения – 80%.

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ EGF ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

Некоторые опухолевые клетки экспрессируют повышенное количество рецепторов эпидермального фактора роста (EGF) [57].

EGF представляет собой небольшой полипептид (молекулярная масса 6 кДа). Рецептор EGF (EGFR) является трансмембранным белком с тирозинкиназной активностью. При связывании с поверхностным рецептором производные EGF поглощаются клетками путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, что обеспечивает их внутриклеточное накопление [58].

Для связывания фотосенсибилизаторов с EGF используются как простые модели – через линкер (рис. 3, а), причем в качестве линкера могут выступать декстраны, поливиниловый спирт, сывороточный альбумин [2, 59, 60], так и более сложные конструкции, например, НЧ золота, связанные с фотосенсибилизатором и EGF (рис. 3, з) [61].

Lutsenko et al. [59] в экспериментах на клетках карциномы молочной железы человека MCF-7 продемонстрировали 7-кратное увеличение фотодинамической активности AlPcS2, связанного с EGF (AlPcS2–EGF), по сравнению со свободным фталоцианином (AlPcS2):  $IC_{50}$  составила 1,6 мкМ для AlPcS2–EGF и 11 мкМ – для AlPcS2. В экспериментах на клетках В16 разница была не столь значительная:  $IC_{50}$  составила 2,5 мкМ для AlPcS2–EGF против 6,1 мкМ – для AlPcS2 (разница в 2,4 раза). В других исследованиях [60] фотодинамическая активность конъюгата производного хлорина е6 с EGF в отношении клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-468 была значительно сильнее, чем у свободного фотосенсибилизатора. Еще в одном исследовании Castilho et al. [61] показали высокую фотодинамическую активность НЧ золота, связанных с Хл и EGF, в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-468. В исследовании Tsai et al. [62] использование EGF для таргетной доставки НЧ хитозана, нагруженных фотосенсибилизатором куркумином (Кур), в опухолевые клетки, вызвало почти 4-кратное снижение  $IC_{50}$  по сравнению с использованием ненацеленных НЧ. На клетках MKN45  $IC_{50}$  для комплекса НЧ с фотосенсибилизатором и EGF (НЧ–Кур–EGF) составила 3,4 мкМ, для ненацеленных НЧ (НЧ–Кур) – 11,9 мкМ. На клетках GES результаты были хуже и почти не различались для нацеленных и ненацеленных НЧ:  $IC_{50}$  для НЧ–Кур–EGF составила 12,8 мкМ, для НЧ–Кур – 13,1 мкМ.

### КОНЬЮГАЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С ПЕПТИДНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Пептиды, как и белки, представляют собой полимеры аминокислот, соединенных вместе

пептидными связями, но их размер и молекулярная масса существенно меньше, чем у белков. Обычно считается, что пептиды состоят менее чем из пятидесяти аминокислот. Это приводит к нечетко определенной третичной структуре и высокому сродству к связыванию с рецепторами. Пептиды могут быть легко синтезированы. По сравнению с белками они обычно обладают улучшенным проникновением в ткани, а также повышенной чувствительностью к пептидазам и быстрым клиренсом.

В 2006 г. Schneider et al. [1] опубликовали обзор конъюгатов фотосенсибилизаторов с различными пептидами. Авторы отмечают, что, несмотря на идентификацию в последние годы значительного количества тропных к опухолевым клеткам пептидов, только небольшое количество конъюгатов пептидов с фотосенсибилизаторами были протестированы *in vivo* с оценкой их фотодинамической активности. Одной из причин сложности изучения этих конъюгатов является присущая немодифицированным пептидам ферментативная нестабильность. В свою очередь, пептиды обычно менее токсичны, более растворимы, и их легче идентифицировать и синтезировать, чем небольшие органические молекулы-мишени. Чтобы пептиды можно было использовать в качестве эффективных систем для транспортной доставки, их необходимо химически модифицировать. Наиболее распространенными стратегиями повышения стабильности пептидов являются использование D-аминокислот, псевдоаминокислот и циклизация пептидов [2].

Пептиды могут соединяться с фотосенсибилизатором напрямую, через линкер (рис. 3, а) [63] или входить в состав более сложных транспортных систем, связываясь, например с НЧ (рис. 3, д) [41, 64].

Конъюгация с пептидами используется для повышения селективности доставки в опухолевые ткани фотосенсибилизаторов на основе Хл [65, 66], Рс [63], ФеоА [67], 5-АЛК [64] и других химических групп.

Во многих работах показано, что конъюгация с пептидами повышает и селективность доставки, и фотодинамическую активность фотосенсибилизаторов. Так, Yan et al. [67] использовали для повышения селективности доставки фотосенсибилизатора пиррофеофорбида А (Пиро-Фео) к раковым стволовым клеткам колоректального рака конъюгацию фотосенсибилизатора с пептидом, нацеленным на CD133, который высоко экспрессируется на этих клетках и коррелирует с плохим прогнозом пациентов с колоректальным раком. Синтезированный конъюгат продемонстрировал

способность к адресной доставке и высокую фотодинамическую активность на культуре раковых стволовых клеток колоректального рака, полученных из клеточных линий HT29 и SW620, и на опухолевой модели у мышей с ксенотрансплантатом.

В исследовании Liu et al. [63] изучали фототоксичность конъюгатов фталоцианина кремния с пептидом, нацеленным на  $\alpha_v\beta_3$ -интегриновый рецептор, который широко экспрессируется в кровеносных сосудах опухоли. Были изучены как прямые конъюгаты (без линкеров), так и конъюгаты с одним или несколькими соединенными ПЭГ-линкерами. Наибольшую активность продемонстрировал конъюгат, в котором фотосенсибилизатор был соединен с пептидом двумя ПЭГ-линкерами и глутаматом.  $IC_{50}$  этого конъюгата (SiPc–П) и свободного SiPc различались в 1,8–2,4 раза и на культуре клеток глиобластомы человека U87-MG составили 17,3 и 39,9 нМ; на культуре клеток рака предстательной железы человека 22RV1 – 16,7 и 30,7 нМ; на культуре клеток рака предстательной железы человека PC3 – 15,5 и 37,1 нМ соответственно.

В другой работе также использовали пептид, нацеленный на  $\alpha_v\beta_3$ -интегриновый рецептор, в качестве вектора доставки 5-АЛК, связанной с НЧ золота. Wu et al. [64] сообщили о высокой фотодинамической активности полученного конъюгата. На культуре клеток A549 после 4-часовой инкубации поглощение клетками НЧ с фотосенсибилизатором и пептидом (НЧ–5-АЛК–П) было выше в 3,7 раза, чем для НЧ–5-АЛК.  $IC_{50}$  для конъюгата НЧ–5-АЛК–П составила 12 мкг/мл, для НЧ–5-АЛК – 20 мкг/мл. Выживаемость клеток снижалась в ряду 5-АЛК > НЧ–5-АЛК > НЧ–5-АЛК–П в диапазоне исследованных доз 10–50 мкг/мл (по 5-АЛК). Так, для дозы 20 мкг/мл выживаемость составила 100%, 50% и 20%.

Jadia et al. [41] в качестве вектора таргетной доставки использовали пептид-агонист рецептора Тф. Они оценивали интенсивность флуоресценции и фотодинамическую активность BPD-MA в виде полимерных НЧ, конъюгированных с пептидом, связывающимся с рецептором Тф (НЧ–BPD-MA–Тф(п)). Флуоресцентная визуализация подтвердила, что НЧ, нагруженные BPD-MA, демонстрировали флуоресценцию с большей интенсивностью в клетках трижды негативного рака молочной железы по сравнению со свободным BPD-MA. Исследования также подтвердили специфичность НЧ, связанных с пептидом-агонистом рецептора Тф, для клеток трижды негативного рака молочной железы. Результаты противо-

опухолевой ФДТ соответствовали результатам флуоресцентной визуализации: связанные с векторным пептидом НЧ проявляли самую высокую фототоксичность в отношении клеток трижды негативного рака молочной железы. Выживаемость клеток линии MDA-MB-231 после инкубации со свободным BPD-MA, НЧ–BPD-MA и НЧ–BPD-MA–Тф(п) и проведения облучения составила 29,4%, 23,1% и 19,9% соответственно.

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭСТРОГЕНОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

Еще одной перспективной мишенью для доставки фотосенсибилизаторов к эстроген-зависимым опухолям являются рецепторы к эстрогенам. В этом случае вектором для направленной доставки является либо сам эстрадиол, эндогенный стероидный гормон, связывающийся с рецептором для эстрогенов, либо тамоксифен (Тмф), являющийся антагонистом данного рецептора, но также селективно связывающийся с ним. В ряде исследований на эстроген-зависимых опухолевых клетках человека была изучена фотодинамическая активность фотосенсибилизаторов на основе порфиринов, ФеоА и Рс, конъюгированных с этими агентами. Связывание фотосенсибилизатора с вектором доставки обеспечивали линкеры различной длины и химической природы (рис. 3, а), в частности, кислородсодержащие углеводородные линкеры, состоящие из оксоэтиленовых или оксопропиленовых фрагментов [68], и углеводородные линкеры, содержащие алкильные группы [69] и различные алифатические и/или ароматические фрагменты [70].

Как правило, конъюгаты сохраняли хорошее сродство к рецепторам эстрогена и обеспечивали высокую селективность фотосенсибилизатора в отношении опухолевых тканей [68–71].

Swamy et al. [69] в экспериментах на клеточной линии MCF-7 показали, что выживаемость клеток после инкубации с конъюгатом диметилового эфира Хл с эстрадиолом (ДМЭ-Хл–Э2) и проведения облучения составила 50%, а инкубация со свободным диметиловым эфиром хлорина е6 (ДМЭ-Хл) и последующим облучением не вызывала цитотоксических эффектов – выживаемость клеток составила 100%.  $IC_{50}$  для ДМЭ-Хл–Э2 составила 0,18 мкМ, а для свободного ДМЭ-Хл – не была достигнута в

экспериментах с концентрациями фотосенсибилизатора до 1 мкМ. Таким образом, конъюгация с эстрадиолом более чем в 5 раз повысила цитотоксичность ДМЭ-Хл. Интенсивность флуоресценции Хл после инкубации клеток MCF-7 с ДМЭ-Хл–Э2 была в 3 раза сильнее, чем после инкубации со свободным ДМЭ-Хл в той же концентрации.

Использование Тмф в качестве вектора доставки также показало высокую эффективность. В исследованиях Fernandez-Gacio et al. [71] выживаемость клеток MCF-7 после инкубации с конъюгатом Пиро-Фео с Тмф (Пиро-Фео–Тмф) и облучения составляла 10–15%, в то время как облучение клеток, инкубированных со свободным Пиро-Фео, не приводило к гибели клеток (выживаемость составила 100%).

Несмотря на эффективность применения Тмф в качестве вектора направленной доставки для фотосенсибилизаторов, использование его ограничено побочными эффектами. В частности, известно, что Тмф значительно повышает риск развития поражений эндометрия, включая гиперплазию, полипы, карциномы, саркомы, а также рак матки и тромбоемболию [72, 73]. Ведется разработка производных Тмф с антиэстрогенными свойствами, но не обладающих агонистическим действием на ткани матки. Díaz et al. [74] сообщили об успешных испытаниях комплекса FLTX2. В состав FLTX2 входят ковалентно связанные Тмф, 7-нитробензофуразан (в качестве флуоресцентного красителя) и бенгальский розовый (в качестве фотосенсибилизатора). Авторы продемонстрировали, что FLTX2 обладает такой же антиэстрогенной активностью, как Тмф, и эффективно вызывает апоптоз клеток карциномы молочной железы человека MCF-7 при проведении ФДТ.

#### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ГИДРОФОБНЫХ ФОТОСЕНСИБИ- ЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

Как было отмечено ранее, считается, что селективность накопления в опухолевых тканях ряда фотосенсибилизаторов, в том числе производных гематопорфирина, обусловлена их связыванием с ЛПНП, рецепторы к которым гиперэкспрессированы на мембранах многих опухолевых клеток [10]. ЛПНП являются основными переносчиками холестерина в крови. Экспрессия рецепторов ЛПНП регулируется потребностью клеток в холестерине

и обычно выше в быстрорастущих клетках. Различные исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что лейкемические и некоторые солидные опухоли (например, толстой кишки, почек, легких и головного мозга) характеризуются повышенной экспрессией рецепторов ЛПНП по сравнению с соответствующими нетрансформированными клетками [75, 76].

В настоящее время известно, что связанные с липопротеинами порфирины активнее захватываются и дольше удерживаются опухолевыми клетками, чем порфирины в водных растворах. Кроме того, для порфиринов, связанных с липопротеинами, и их свободной формы различаются мишени фотодинамического воздействия: цитоплазматическая мембрана, как более доступная, поражается водным раствором порфирина, а порфирины, связанные с липопротеинами, вызывают более глубокие внутриклеточные поражения митохондрий, лизосом и цитоплазмы [3, 77].

ЛПНП характеризуются высокой грузочной емкостью для гидрофобных препаратов и являются эндогенными переносчиками, биосовместимыми, биodeградируемыми и неиммунными. Все перечисленные особенности делают ЛПНП привлекательными для использования в качестве транспортных систем в таргетной доставке фотосенсибилизаторов [3].

Исследования ЛПНП, как транспортных систем для доставки фотосенсибилизаторов в опухоль, продолжают несколько десятилетий. Гидрофобные фотосенсибилизаторы могут быть включены в ядро ЛПНП (рис. 3, б) и в таком виде доставлены к опухолевым клеткам, многие из которых характеризуются повышенной экспрессией рецепторов к ЛПНП. Еще в 1988 г. Zhou et al. [78] в экспериментах на мышах с перевитой фибросаркомой MS-2 продемонстрировали селективное накопление в опухолевых клетках гематопорфирина, введенного мышам в составе ЛПНП. С помощью электронной микроскопии авторами было показано, что введение мышам комплекса гематопорфирина с ЛПНП индуцирует прямую гибель клеток, в то время как свободный гематопорфирин вызывает регрессию опухоли через повреждение сосудов. В 1994 г. Hamblin и Newman [79] показали специфичность гематопорфирина, включенного в ЛПНП, в отношении рецепторов апоВ ЛПНП клеток фибробластов NIH 3T3 и клеток рака толстой кишки HT29. Фототоксичность в отношении клеток 3T3 для гематопорфирина в составе ЛПНП была выше, чем для чистого гематопорфирина (выживаемость клеток составила приблизительно 0,5% и 2% соответственно).

Вместе с тем для клеток HT29 фототоксичность была выше для неконъюгированного фотосенсибилизатора.

За последние годы ряд исследований подтвердил высокую эффективность ЛПНП как транспортных систем для таргетной доставки фотосенсибилизаторов в опухоль. В исследовании Polo et al. [80] была показана роль рецепторов ЛПНП в накоплении комплексов фотосенсибилизатор–ЛПНП трансформированными фибробластами человека и крысы. Авторы показали, что ЛПНП связывают как амфифильный гематопорфирин IX, так и гидрофобный фталоцианин цинка. Связывание фталоцианина с ЛПНП происходит в молярных соотношениях: 5–6/1 (для амфифильного гематопорфирина IX) и 10–12/1 (для гидрофобного фталоцианина цинка). Исследования показали, что комплекс гематопорфирин–ЛПНП проникает в фибробласты человека HT1080 в основном с участием высокоаффинных рецепторов ЛПНП, в то время как комплекс Рс–ЛПНП поглощается фибробластами посредством неспецифического эндоцитоза. В клетках HT1080, стимулированных для максимальной экспрессии рецепторов ЛПНП, поглощение доставленного липопротеинами гематопорфирина увеличивалось примерно в 4 раза по сравнению с нестимулированными клетками. Для ZnРс изменения поглощения фотосенсибилизатора при стимуляции клеток не происходило. Авторы связывают это наблюдение с изменениями структуры апоВ–ЛПНП, индуцированными ассоциацией с Рс, что подтверждается данными спектроскопических исследований. В исследованиях Song et al. [81] было показано 8-кратное увеличение уровня накопления производного нафталоцианина, включенного в ЛПНП, в перевиваемых опухолях HepG2 у мышей по сравнению с окружающей мышечной тканью.

В исследованиях Wang et al. [82] новый фотосенсибилизатор ТРА–DPPy на основе пиридиновой соли был включен в гидрофобное ядро ЛПНП для таргетной доставки к опухолевым клеткам, характеризующимся гиперэкспрессией рецепторов ЛПНП. На культуре клеток карциномы легкого человека A549 было показано высокое внутримитохондриальное накопление и флуоресценция с высокой интенсивностью ТРА–DPPy–ЛПНП. Дополнительным преимуществом использования ЛПНП в качестве транспортной системы является ограниченный контакт фотосенсибилизатора в составе ЛПНП с растворенным кислородом в водной среде. В результате в процессе транспорта к клеткам-мишеням фотосенсибилизатора в составе ЛПНП в крови не происходит генера-

ции активных форм кислорода, в отличие от использования свободного фотосенсибилизатора.

ЛПВП также рассматриваются в качестве потенциальных транспортных систем для таргетной доставки, поскольку было показано, что их рецепторы (в частности, рецептор SR-B1) сверхэкспрессируются в опухолевых клетках. Так, в исследовании Cao et al. [83] аналог бактериохлорофилла еб, этерифицированный олеиновой кислотой для увеличения липофильности, был включен в гидрофобное ядро ЛПВП. Полученный комплекс фотосенсибилизатора с ЛПВП был использован для визуализации опухолей. В проведенных экспериментах клетки назофарингиальной карциномы человека, экспрессирующие рецептор ЛПВП, активно поглощали ЛПВП, нагруженные фотосенсибилизатором. При этом 25-кратный избыток нативных ЛПВП тормозил поступление фотосенсибилизатора в опухолевые клетки за счет конкуренции свободных и связанных с фотосенсибилизатором ЛПВП за связывание с рецепторами. Дополнительные исследования *in vivo* показали хорошую флуоресценцию опухолей у мышей с ксенотрансплантированными опухолями назофарингиальной карциномы человека после введения им ЛПВП, нагруженных фотосенсибилизатором.

### КОНЬЮГАЦИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Одним из эффективных способов таргетной доставки является конъюгация фотосенсибилизаторов с моноклональными антителами (АТ), специфичными к антигенам на поверхности опухолевых клеток или стенок сосудов опухоли. Это обеспечивает возможность доставки фотосенсибилизатора непосредственно в опухолевую ткань. В литературе можно найти много сообщений об успешном использовании для таргетной доставки фотосенсибилизаторов цельных моноклональных АТ с молекулярной массой около 150 кДа, либо меньших фрагментов моноклональных АТ в диапазоне 25–100 кДа [3]. Антитела могут быть связаны с фотосенсибилизатором напрямую или через линкер (рис. 3, а), фотосенсибилизатор также может присоединяться к АТ через так называемый множитель, чаще всего полимерной структуры [4]. С точки зрения синтеза, проще реализуется прямое присоединение фотосенсибилизатора к АТ. Однако в данном случае могут изменяться свойства АТ, и это будет снижать эффективность таргетной доставки.

Создание модульной транспортной системы на основе умножителя, связанного с АТ, является гораздо более трудоемким процессом. Данный подход дает возможность максимально сохранить свойства используемого АТ. Кроме того, использование модульной транспортной системы позволяет изменять количество и виды связываемых фотосенсибилизаторов [4, 17, 22, 84]. Так, в исследовании Savellano и Hasan [85] BPD-MA был связан с АТ к EGFR через разветвленный («two-branched») ПЭГ. Благодаря такому строению линкера молярное соотношение BPD-MA/АТ в структуре конъюгата можно было изменять. Авторы подобрали режимы фотодинамического воздействия, позволяющие достичь снижения выживаемости клеток до 8% от контроля (концентрация фотосенсибилизатора составляла 0,14–0,28 мкМ). Однако сравнение выживаемости клеток А-431 при проведении ФДТ со свободным фотосенсибилизатором (BPD-MA) и конъюгатом с АТ (BPD-MA-АТ) показало, что свободный BPD-MA позволяет достичь той же эффективности, что и BPD-MA-АТ, при дозе меньшей в 5 раз (доза BPD-MA-АТ – 0,14 мкМ, доза BPD-MA – 0,028 мкМ). При увеличении времени инкубации фотосенсибилизатора с клетками фототоксичность BPD-MA-АТ возрастала, но в пределах 40 часов не достигала показателей фотоактивности чистого BPD-MA. Авторы связывают такие наблюдения с постепенным высвобождением фотосенсибилизатора из конъюгата и указывают на необходимость увеличения соотношения BPD-MA/АТ для повышения фототоксичности конъюгата. Однако технические сложности не позволяют увеличить соотношение более, чем в 11 раз, в связи со снижением аффинности и чистоты связывания полученного конъюгата. Один из путей решения этой проблемы Savellano и Hasan [85] видят в реализации стратегии множественного нацеливания (использование АТ нескольких типов). По мнению автора данного обзора, предложенный путь представляется излишне технически сложным, особенно учитывая сомнительную эффективность разрабатываемых конъюгатов и наличие других, более технически простых и эффективных путей нацеливания.

Большую эффективность показывают более сложные транспортные системы, в том числе на основе нагруженных фотосенсибилизаторами полимерных мицелл, НЧ, вирусом (Вир) или ЛпС, связанных с АТ [1]. Подобная конструкция реализована, например, в работе Low et al. [86], которые изучали фотодинамическую активность Вир, связанных с Хл

и АТ к EGFR (Вир-Хл-АТ) (рис. 3, д). Исследования показали, что специфичность в отношении клеток плоскоклеточной карциномы полости рта OSCC (которые характеризуются гиперэкспрессией рецептора к EGF) была выше для Вир, связанных с АТ. IC<sub>50</sub> для конъюгата Вир-Хл-АТ на клетках OSCC составила 10 мкМ. Для свободного фотосенсибилизатора (Хл) и конъюгата Вир-Хл в той же концентрации выживаемость составила 70%. IC<sub>50</sub> для Хл и Вир-Хл в проведенных экспериментах не была достигнута (максимальная исследованная концентрация 10 мкМ).

Основное преимущество моноклональных АТ состоит в том, что они обладают высокой степенью специфичности. При этом они являются дорогостоящими молекулами, их производство требует много времени, и они могут вызывать иммунные реакции. Конъюгация фотосенсибилизатора с АТ должна происходить строго контролируемо в участках, которые не будут влиять на распознавание антигена. Кроме того, фотосенсибилизаторы с явно выраженными гидрофобными свойствами могут изменять растворимость АТ. Эффективность применения АТ, как векторов таргетной доставки, также может быть ограничена возможностью присоединения к носителю только определенного количества молекул. Использование АТ для таргетной доставки в ряде случаев повышает фототоксичность фотосенсибилизаторов, но их эффективность сопоставима с эффективностью других рассмотренных транспортных систем, многие из которых гораздо более простые в техническом исполнении, более доступные и более дешевые.

### **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

В опухолевых клетках изменяется активность многих метаболических путей, в том числе связанных с превращениями углеводов, вероятно, в результате ускоренного метаболизма и потребности в энергии активно метаболизирующих опухолевых клеток. Эффект Варбурга и высокая экспрессия GLUT1 в опухолевых клетках определяют высокую скорость использования глюкозы, что может применяться для направленной доставки [3]. Ряд исследований показывает, что накопление фотосенсибилизаторов в опухолевых клетках увеличивается после конъюгации с углеводами. Так, напри-

мер, было показано, что конъюгированный с глюкозой Хл (G–Хл) обладает высокой селективностью к опухолевым клеткам, быстрее выводится из организма и обладает большей фотодинамической активностью, чем свободный Хл [87, 88]. В работе Nishie et al. [87] показано повышение эффективности G–Хл по сравнению со свободным таллапорфином натрия (моно-L-аспартил хлорин еб). Сравнение этих двух фотосенсибилизаторов можно принять условно, поскольку контрольный фотосенсибилизатор отличается по химической структуре от фотосенсибилизатора, конъюгированного с глюкозой. Согласно результатам, представленным авторами,  $IC_{50}$  для конъюгата на клетках OE21, KYSE30, MKN45 и HT29 была выше, чем у таллапорфина в 12–52 тысяч раз. Также показано в 70–190 раз большее накопление G–Хл в клетках MKN45 и HT29 по сравнению с таллапорфином. Следует отметить, что подобные результаты (со снижением  $IC_{50}$  в десятки тысяч раз) не встречались в других исследованиях и не были повторены позже самими авторами.

В исследованиях тех же авторов [88] на клетках SNP было продемонстрировано снижение  $IC_{50}$  для G–Хл с последующим облучением всего в 2,3–18 раз в сравнении со свободным таллапорфином натрия с облучением в том же режиме. Значения  $IC_{50}$  для таллапорфина в отношении клеток SNP, подвергнутых облучению световыми дозами 1, 5 и 15 Дж/см<sup>2</sup>, составили 75,2, 30,4 и 30,6 мкг/мл соответственно. Для G–Хл значения  $IC_{50}$  в отношении клеток SNP, подвергшихся облучению в тех же световых дозах, составили 33,4, 10,4 и 1,7 мкг/мл соответственно.

Имеются данные, что после конъюгации с углеводами накопление происходит преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, а длина олигосахарида является важным фактором, определяющим скорость проникновения через мембрану [89, 90].

Soyama et al. [91] использовали таргетную доставку Хл к M2-подобным опухолеассоциированным макрофагам (M2-TAM). Хл конъюгировали с маннозой (M–Хл), рецепторы к которой гиперэкспрессированы на поверхности M2-TAM. Авторы сравнивали фотодинамическую активность M–Хл и G–Хл с таллапорфином натрия. Накопление M–Хл в опухолевой ткани было выше, чем в нормальной ткани кожи сингенных мышей, причем селективность конъюгированных форм Хл к опухолевой ткани (1,4 – для G–Хл и 1,7 – для M–Хл) была выше, чем у таллапорфина натрия (1,2). ФДТ с конъюгированным хлорином значительно снижала объем и массу опухо-

левой ткани. Сравнительные данные по эффективности ФДТ с неконъюгированным Хл в тех же условиях авторами не представлены. Цитопроточный анализ подтвердил, что ФДТ с M–Хл вызывала избирательное повреждение M2-TAM.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время активно развивается таргетная доставка фотосенсибилизаторов в опухолевые ткани. Об этом свидетельствует большое количество экспериментальных и клинических работ в этой области.

Одним из наиболее эффективных методов нацеливания фотосенсибилизаторов на опухолевые ткани представляется их конъюгация со специфическими лигандами к рецепторам, гиперэкспрессируемым на мембранах опухолевых клеток. Основная проблема использования таких лигандов связана с тем, что опухолевая клетка чаще всего способна использовать их для повышения скорости метаболических процессов, что может опосредованно привести к прогрессированию злокачественного процесса. Такие данные имеются, например, для транспортных систем с использованием в качестве лигандов эстрогенов и EGF. Развитие этого направления таргетной доставки происходит по пути использования в качестве векторов доставки молекул-антагонистов.

Наиболее перспективными мишенями для нацеливания фотосенсибилизаторов на опухоль являются рецепторы Тф, ФК и EGF, которые гиперэкспрессируются на большинстве опухолевых клеток. Традиционно для нацеливания на данные рецепторы используются их нативные лиганды – Тф, ФК и EGF. Использование указанных векторов показывает значительное повышение уровня накопления фотосенсибилизатора и увеличение эффективности фотодинамической терапии. Так, при связывании ФК с самим фотосенсибилизатором или его транспортной формой уровень накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках увеличивается в 1,5–15 раз, селективность накопления в опухолевых клетках возрастает в 2,5 раза, наблюдается почти 6-кратное увеличение противоопухолевой эффективности, а показатели  $IC_{50}$  снижаются в 2–4 раза [44–49, 51]. При использовании в качестве вектора доставки Тф уровень накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках повышается до 4–28 раз, а показатели  $IC_{50}$  снижаются до 2–40 раз [38–40, 42, 43]. Использование EGF позволяет снизить показатели  $IC_{50}$  до

2,4–7 раз [59, 62]. Из указанных соединений наиболее доступным, дешевым и простым в конъюгации является ФК. В многочисленных исследованиях показана эффективность ФК как вектора направленной доставки в опухоль 5-АЛК, Хл, Рс, ФеоА, порфиринов и других групп фотосенсибилизаторов [44–49, 51]. Скорее всего, сочетание эффективности с доступностью и простотой конъюгации обуславливает такой интерес к ФК, хотя она несколько проигрывает Тф и EGF в эффективности.

Еще одно перспективное, активно развивающееся направление таргетной доставки – использование в качестве векторов доставки пептидов, чаще всего нацеленных на рецепторы, гиперэкспрессированные на поверхности опухолевых клеток, например, EGFR, рецептор Тф,  $\alpha_v\beta_3$ -интегриновый рецептор и другие. Сами пептиды доступны и могут быть легко синтезированы, однако они чувствительны к действию пептидаз и требуют химической модификации для повышения устойчивости. Эффективность пептидов показана в ряде исследований, их использование позволяет увеличить накопление фотосенсибилизатора в опухолевой ткани (по имеющимся данным, до 4 раз) и снизить IC<sub>50</sub> (в 2–3 раза). По общему уровню эффективности пептиды уступают вышеописанным векторам, однако представляются перспективной группой для дальнейшего изучения [36, 41, 63, 64].

Использование в качестве векторов доставки лигандов к рецепторам эстрогенов ограничено эстроген-чувствительными опухолями, гиперэкспрессирующими на своей поверхности рецепторы эстрогена. Также существенным минусом является способность эстрогенов оказывать стимулирующее действие на таргетные опухолевые клетки, активируя их пролиферацию. Антагонист эстрогеновых рецепторов, Тмф, хотя и показывает хорошие результаты как векторная молекула (повышение эффективности до 10 раз), также обладает пролиферирующим действием на ткани матки, что ограничивает возможность его применения [69, 71–73].

Исследования липопротеинов, как транспортных форм для доставки фотосенсибилизаторов, насчитывают несколько десятилетий, однако в последние годы активные исследования в данной области не ведутся. Это связано с ограниченными возможностями применения данной транспортной системы. Использование липопротеинов оправдано только для гидрофобных фотосенсибилизаторов. Кроме того, не все опухолевые клетки характеризуются

повышенной экспрессией рецепторов к липопротеинам. Несмотря на то что многие исследования показывают хорошую эффективность подобных транспортных систем, полноценных сравнительных исследований эффективности свободных фотосенсибилизаторов и включенных в состав липопротеинов практически нет [2, 78–80, 82, 83].

Использование АТ в качестве векторов направленной доставки фотосенсибилизаторов представляется излишне дорогостоящим и технически сложным. АТ могут вызывать иммунные реакции, и их эффективность не превышает эффективность других, гораздо более простых и дешевых векторов [1, 2, 85, 86].

Последняя группа рассмотренных в обзоре нацеливающих молекул – углеводы. Для данной группы векторов имеется очень мало исследований, в которых было бы проведено полноценное сравнение фототоксичности конъюгированной с углеводом и свободной формы фотосенсибилизатора. Те редкие исследования, в которых такое сравнение выполнено, показывают очень высокую эффективность конъюгированных форм (увеличение эффективности в десятки тысяч раз) [87]. Однако последующие исследования не подтверждают полученные результаты [88].

Таким образом, анализ сравнительных исследований эффективности фотосенсибилизаторов и их конъюгатов с различными векторами направленной доставки показывает наибольшую эффективность и перспективность таких нацеливающих молекул, как ФК, Тф и EGF. Данные векторы в настоящее время наиболее активно исследуются и признаны научным сообществом как эффективные способы таргетной доставки [1–4].

За счет селективного накопления фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани реализуется его фотодинамическая активность, сохранность окружающих тканей при проведении облучения и низкая кожная фототоксичность. Изучение механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов в опухоли и поиск новых транспортных систем, обеспечивающих еще более высокую избирательность попадания фотосенсибилизатора в опухоль, необходимы для дальнейшего развития метода ФДТ.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schneider, R., Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thomas, N., et al. (2006) Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy, *Curr. Med. Chem. Anti Cancer Agents*, **6**, 469-488, doi: 10.2174/187152006778226503.
- Ulfo, L., Costantini, P. E., Di Giosia, M., Danielli, A., and Calvaresi, M. (2022) EGFR-targeted photodynamic therapy, *Pharmaceutics*, **14**, 241, doi:10.3390/pharmaceutics14020241.
- Schmitt, F., and Juillerat-Jeanneret, L. (2012) Drug targeting strategies for photodynamic therapy, *Anticancer Agents Med Chem.*, **12**, 500-525, doi: 10.2174/187152012800617830.
- Sharma, S., Jajoo, A., and Dube, A. (2007) 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin-IX accumulation and associated phototoxicity in macrophages and oral cancer cell lines, *J. Photochem. Photobiol. B*, **88**, 156-162, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.07.005.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., and Hamblin, M. R. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization, *Photodiag. Photodynam. Ther.*, **1**, 279-293, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
- Chilakamarthi, U., and Giribabu, L. (2017) Photodynamic therapy: past, present and future, *Chem Rec.*, **17**, 775-802, doi: 10.1002/tcr.201600121.
- Филоненко Е. В., Серова Л. Г. (2016) Фотодинамическая терапия в клинической практике, *Biomed. Photonics*, **5**, 26-37.
- Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., et al. (2018) Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.*, **106**, 1098-1107, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- Juzeniene, A., and Moan, J. (2007) The history of PDT in Norway/Part one: identification of basic mechanisms of general PDT, *Photodiag. Photodynam. Ther.*, **4**, 3-11, doi: 10.1016/j.pdpdt.2006.11.002.
- Мачинская Е. А., Иванова-Радкевич В. И. (2013) Обзор механизмов селективного накопления фотосенсибилизаторов различной химической структуры в опухолевой ткани, *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*, **2**, 28-32.
- Maziere, J. C., Morliere, P., and Santus, R. (1991) The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **8**, 351-360, doi: 10.1016/1011-1344(91)80111-t.
- Niamien Konan, Y., Gurny, R., and Allemann, E. (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **66**, 89-106, doi: 10.1016/s1011-1344(01)00267-6.
- Jones, H. J., Vernon, D. I., and Brown, S. B. (2003) Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) *in vivo*: correlation with pharmacokinetics, *Br. J. Cancer*, **89**, 398-404, doi: 10.1038/sj.bjc.6601101.
- Moan, J., and Berg, K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, **53**, 549-553, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x.
- Lukyanets, E. A. (1999) Phthalocyanines as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **3**, 424-432, doi: 10.1002/(SICI)1099-1409(199908/10)3:6/7<424::AID-JPP151>3.0.CO;2-K.
- Zheng, G., Li, H., Zhang, M., Lund-Katz, S., Chance, B., et al. (2002) Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide cholesteryl oleate as target specific photosensitizer, *Bioconj. Chem.*, **13**, 392-396, doi: 10.1021/bc025516h.
- Nowis, D., Makowski, M., Stokłosa, T., Legat, M., Issat, T., et al. (2005) Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy, *Acta Biochim. Pol.*, **52**, 339-352.
- Tang, Y., Liu, Y., Wang, S., Tian, Y., Li, Y., et al. (2019) Depletion of collagen by losartan to improve tumor accumulation and therapeutic efficacy of photodynamic nanoplateforms, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **9**, 615-624, doi: 10.1007/s13346-018-00610-1.
- Moan, J., and Peng, Q. (2003) An outline of the history of PDT, in *Photodynamic Therapy. Comprehensive series in Photochem. Photobiol. Sci. Ed. T. Patrice*, The Royal Society of Chemistry, London, pp. 3-17.
- Pottier, R., and Kennedy, J. C. (1990) The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **8**, 1-16, doi: 10.1016/1011-1344(90)85183-w.
- Solban, N., Rizvi, I., and Hasan, T. (2006) Targeted photodynamic therapy, *Lasers Surg. Med.*, **38**, 522-531, doi: 10.1002/lsm.20345.
- Wiedmann, M. W., and Caca, K. (2004) General principles of photodynamic therapy (PDT) and gastrointestinal applications, *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.*, **5**, 397-408, doi: 10.2174/1389201043376805.
- Dougherty, T. J., Potter, W. R., and Weishaupt, K. R. (1984) *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors* (Liss, A. R. ed) pp. 301-314.
- Filonenko, E. V., Kaprin, A. D., Alekseev, B. Ya., Apolikhin, O. I., Slovokhodov, E. K., et al. (2016) 5-aminolevulinic acid in intraoperative photodynamic therapy of bladder cancer (results of multicenter trial), *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **16**, 106-109, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.09.009.
- Filonenko, E., Kaprin, A., Urlova, A., Grigorievikh, N., and Ivanova-Radkevich, V. (2020) Topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for basal cell carcinoma, *Photo-*

- diagnosis Photodyn. Ther.*, **30**, 101644, doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.101644.
26. Kloek, J., Akkermans, W., and Beijersbergen van Henegouwen, G. M. (1998) Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin, *Photochem. Photobiol.*, **67**, 150-154, doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb05178.x.
  27. Каприн А. Д., Трушин А. А., Головащенко М. П., Иванова-Радкевич В. И., Чиссов В. И., и др. (2019) Повышение эффективности диагностики рака мочевого пузыря при использовании цистоскопии с гексилловым эфиром 5-АЛК, *Biomedical Photonics*, **8**, 29-37, doi: 10.24931/2413-9432-2019-8-1-29-37.
  28. Якубовская Р. И., Панкратов А. А., Филоненко Е. В., Лукьянец Е. А., Иванова-Радкевич В. И., и др. (2018) Сравнительное экспериментальное исследование специфической активности 5-АЛК и гексиллового эфира 5-АЛК, *Biomedical Photonics*, **7**, 43-46, doi: 10.24931/2413-9432-2018-7-3-43-46.
  29. Lopez, R. F., Lange, N., Guy, R., and Bentley, M. V. (2004) Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **56**, 77-94, doi: 10.1016/j.addr.2003.09.002.
  30. Malik, Z., Kostenich, G., Roitman, L., Ehrenberg, B., and Orenstein, A. (1995) Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **28**, 213-218, doi: 10.1016/1011-1344(95)07117-k.
  31. Fukuda, H., Paredes, S., and Batlle, A. M. (1992) Tumour-localizing properties of porphyrins. *In vivo* studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **102**, 433-436, doi: 10.1016/0305-0491(92)90147-j.
  32. Peng, Q., Warloe, T., Moan, J., Heyerdahl, H., Steen, H. B., et al. (1995) Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma, *Photochem. Photobiol.*, **62**, 906-913, doi: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb09154.x.
  33. Kloek, J., and Beijersbergen van Henegouwen, G. M. (1996) Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **64**, 994-1000, doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb01868.x.
  34. Филоненко Е. В., Каприн А. Д., Алексеев Б. Я., Иванова-Радкевич В. И., Словоходов Е. К., и др. (2017) Флуоресцентная диагностика рака мочевого пузыря с препаратом гексасенс – результаты многоцентрового клинического исследования, *Biomedical Photonics*, **6**, 20-27, doi: 10.24931/2413-9432-2017-6-1-20-27.
  35. Slovokhodov, E. K., Ivanova-Radkevich, V. I., and Brodsky, I. B. (2017) Fluorescent diagnosis of bladder cancer by hexasens as a drug, *J. Biol. Today's World*, **6**, 123-128, doi: 10.15412/J.JBTW.01060701.
  36. Ivanova-Radkevich, V. I., Smirnova, I. P., Kuznetsova, O. M., Lobaeva, T. A., Gushchina, Yu. Sh., et al. (2016) Organization of clinical trials of photosensitizer based on 5-aminolevulinic acid hexyl ester, *Ind. J. Sci. Technol.*, **9**, 1-7, doi: 10.17485/ijst/2016/v9i18/93759.
  37. Shen, Y., Li, X., Dong, D., Zhang, B., Xue, Y., and Shang, P. (2018) Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy, *Am. J. Cancer Res.*, **8**, 916-931.
  38. Cavanaugh, P. G. (2002) Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent *in vitro* breast cancer cell killing ability, *Breast Cancer Res. Treat.*, **72**, 117-130, doi: 10.1023/a:1014811915564.
  39. Gijssens, A., Derycke, A. S., Missiaen, L., De Vos, D., Huwyler, J., et al. (2002) Targeting of the photocytotoxic compound AlPcS4 to Hela cells by transferrin conjugated PEG-liposomes, *Int. J. Cancer*, **101**, 78-85, doi: 10.1002/ijc.10548.
  40. Derycke, A. S., Kamuhabwa, A., Gijssens, A., Roskams, T., De Vos, D., et al. (2004) Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AlPcS4 to rat bladder carcinoma cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 1620-1630, doi: 10.1093/jnci/djh314.
  41. Jadia, R., Kydd, J., and Rai, P. (2018) Remotely phototriggered, transferrin-targeted polymeric nanoparticles for the treatment of breast cancer, *Photochem. Photobiol.*, **94**, 765-774, doi: 10.1111/php.12903.
  42. Hamblin, M. R., and Newman, E. L. (1994) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **26**, 45-56, doi: 10.1016/1011-1344(94)85035-6.
  43. Sardoiwala, M. N., Kushwaha, A. C., Dev, A., Shrimali, N., Guchhait, P., et al. (2020) Hypericin-loaded transferrin nanoparticles induce PP2A-regulated BMI1 degradation in colorectal cancer-specific chemo-photodynamic therapy, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **6**, 3139-3153, doi: 10.1021/acsbiomaterials.9b01844.
  44. Schneider, R., Schmitt, F., Frochot, C., Fort, Y., Lourette, N., et al. (2005) Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2799-2808, doi: 10.1016/j.bmc.2005.02.025.
  45. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F., et al. (2008) Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. Synthesis and *in vivo* delivery studies, *J. Med. Chem.*, **51**, 3867-3877, doi: 10.1021/jm800125a.
  46. Nwahara, N., Abrahams, G., Prinsloo, E., and Nyokong, T. (2021) Folic acid-modified phthalocyanine-nanozyme loaded liposomes for targeted photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **36**, 102527, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102527.

47. Liang, X., Xie, Y., Wu, J., Wang, J., Petković, M., et al. (2021) Functional titanium dioxide nanoparticle conjugated with phthalocyanine and folic acid as a promising photosensitizer for targeted photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **215**, 112122, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.112122.
48. Akbarzadeh, F., Khoshgard, K., Arkan, E., Hosseinzadeh, L., and Hemati Azandaryani, A. (2018) Evaluating the photodynamic therapy efficacy using 5-aminolevulinic acid and folic acid-conjugated bismuth oxide nanoparticles on human nasopharyngeal carcinoma cell line, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **46**, 514–523, doi: 10.1080/21691401.2018.1501376.
49. Hwang, J. W., Jung, S. J., Cheong, T. C., Kim, Y., Shin, E. P., et al. (2019) Smart hybrid nanocomposite for photodynamic inactivation of cancer cells with selectivity, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 6776–6783, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b04301.
50. Son, J., Yang, S. M., Yi, G., Roh, Y. J., Park, H., et al. (2018) Folate-modified PLGA nanoparticles for tumor-targeted delivery of pheophorbide a *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **498**, 523–528, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.013.
51. Bharathiraja, S., Moorthy, M. S., Manivasagan, P., Seo, H., Lee, K. D., et al. (2017) Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **19**, 212–220, doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.001.
52. Hilgenbrink, A. R., and Low, P. S. (2005) Folate receptor-mediated drug targeting: from therapeutics to diagnostics, *J. Pharm. Sci.*, **94**, 2135–2146, doi: 10.1002/jps.20457.
53. Scaranti, M., Cojocaru, E., Banerjee, S., and Banerji, U. (2020) Exploiting the folate receptor  $\alpha$  in oncology, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **17**, 349–359, doi: 10.1038/s41571-020-0339-5.
54. Juillerat-Jeanneret, L., and Schmitt, F. (2007) Chemical modification of therapeutic drugs or drug vector systems to achieve targeted therapy: looking for the Grail, *Med. Res. Rev.*, **27**, 574–590, doi: 10.1002/med.20086.
55. Pan, X., Xie, J., Li, Z., Chen, M., Wang, M., et al. (2015) Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **130**, 292–298, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.028.
56. Yang, S. W., Jeong, Y. I., Kook, M. S., and Kim, B. H. (2022) Reactive oxygen species and folate receptor-targeted nanophotosensitizers composed of folic acid-conjugated and poly(ethylene glycol)-chlorin e6 tetramer having diselenide linkages for targeted photodynamic treatment of cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3117, doi: 10.3390/ijms23063117.
57. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **19**, 183–232, doi: 10.1016/1040-8428(94)00144-i.
58. Vieira, A. V., Lamaze, C., and Schmid, S. L. (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis, *Science*, **274**, 2086–2089, doi: 10.1126/science.274.5295.2086.
59. Lutsenko, S. V., Feldman, N. B., Finakova, G. V., Posypanova, G. A., Severin, S. E., et al. (1999) Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates, *Tumor Biol.*, **20**, 218–224, doi: 10.1159/000030066.
60. Gijssens, A., Missiaen, L., Merlevede, W., and De Witte, P. (2000) Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e<sub>6</sub> selectively potentiates its photodynamic activity, *Cancer Res.*, **60**, 2197–2202.
61. Castilho, M. L., Jesus, V. P. S., Vieira, P. F. A., Hewitt, K. C., and Raniero, L. (2021) Chlorin e<sub>6</sub>–EGF conjugated gold nanoparticles as a nanomedicine based therapeutic agent for triple negative breast cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **33**, 102186, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102186.
62. Tsai, W.-H., Yu, K.-H., Huang, Y.-C., and Lee, C.-I. (2018) EGFR-targeted photodynamic therapy by curcumin-encapsulated chitosan/TPP nanoparticles, *Int. J. Nanomed.*, **13**, 903–916, doi: 10.2147/IJN.S148305.
63. Liu, Q., Pang, M., Tan, S., Wang, J., Chen, Q., et al. (2018) Potent peptide-conjugated silicon phthalocyanines for tumor photodynamic therapy, *J. Cancer*, **9**, 310–320, doi: 10.7150/jca.22362.
64. Wu, J., Lin, Y., Li, H., Jin, Q., and Ji, J. (2017) Zwitterionic stealth peptide-capped 5-aminolevulinic acid prodrug nanoparticles for targeted photodynamic therapy, *J. Colloid Interf. Sci.*, **485**, 251–259, doi: 10.1016/j.jcis.2016.09.012.
65. Kamarulzaman, E. E., Gazzali, A. M., Acherar, S., Frochot, C., Barberi-Heyob, M., et al. (2015) New peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 for anti-vascular targeted photodynamic therapy, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 24059–24080, doi: 10.3390/ijms161024059.
66. Thomas, N., Bechet, D., Becuwe, P., Tirand, L., Vanderesse, R., et al. (2009) Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B*, **96**, 101–108, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2009.04.008.
67. Yan, S., Tang, D., Hong, Z., Wang, J., Yao, H., et al. (2021) CD133 peptide-conjugated pyropheophorbide-a as a novel photosensitizer for targeted photodynamic therapy in colorectal cancer stem cells, *Biomater. Sci.*, **9**, 2020–2031, doi: 10.1039/d0bm01874k.
68. El-Akra, N., Noirot, A., Faye, J. C., and Souchard, J. P. (2006) Synthesis of estradiol–pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells,

- Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 996-999, doi: 10.1039/b606117f.
69. Swamy, N., Purohit, A., Fernandez-Gacio, A., Jones, G. B., and Ray, R. (2006) Nuclear estrogen receptor targeted photodynamic therapy: selective uptake and killing of MCF-7 breast cancer cells by a C17 $\alpha$ -alkynylestradiol-porphyrin conjugate, *J. Cell. Biochem.*, **99**, 966-977, doi: 10.1002/jcb.20955.
  70. Khan, E. H., Ali, H., Tian, H., Rousseau, J., Tessier, G., et al. (2003) Synthesis and biological activities of phthalocyanine-estradiol conjugates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1287-1290, doi: 10.1016/s0960-894x(03)00120-3.
  71. Fernandez-Gacio, A., Fernandez-Marcos, C., Swamy, N., Dunn, D., and Ray, R. (2006) Photodynamic cell-kill analysis of breast tumor cells with a tamoxifen-pyropheophorbide conjugate, *J. Cell. Biochem.*, **99**, 665-670, doi: 10.1002/jcb.20932.
  72. Iqbal, J., Ginsburg, O. M., Wijeratne, T. D., Howell, A., Evans, G., et al. (2012) Endometrial cancer and venous thromboembolism in women under age 50 who take tamoxifen for prevention of breast cancer: a systematic review, *Cancer Treat. Rev.*, **38**, 318-328, doi: 10.1016/j.ctrv.2011.06.009.
  73. Dong, C., and Chen, L. (2014) Second malignancies after breast cancer: the impact of adjuvant therapy, *Mol. Clin. Oncol.*, **2**, 331-336, doi: 10.3892/mco.2014.250.
  74. Díaz, M., Lobo, F., Hernández, D., Amesty, Á., Valdés-Baizabal, C., et al. (2021) FLT3L: a novel tamoxifen derivative endowed with antiestrogenic, fluorescent, and photosensitizer properties, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5339, doi: 10.3390/ijms22105339.
  75. Pawar, S., Koneru, T., McCord, E., Tatiparti, K., Sau, S., et al. (2021) LDL receptors and their role in targeted therapy for glioma: a review, *Drug Discov. Today*, **26**, 1212-1225, doi: 10.1016/j.drudis.2021.02.008.
  76. Floeth, M., Elges, S., Gerss, J., Schwöppe, C., Kessler, T., et al. (2021) Low-density lipoprotein receptor (LDLR) is an independent adverse prognostic factor in acute myeloid leukaemia, *Br. J. Haematol.*, **192**, 494-503, doi: 10.1111/bjh.16853.
  77. Jori, G., and Reddi, E. (1993) The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers, *Int. J. Biochem.*, **25**, 1369-1375, doi: 10.1016/0020-711x(93)90684-7.
  78. Zhou, C., Milanesi, C., and Jori, G. (1988) An ultrastructural comparative evaluation of tumors photosensitized by porphyrins administered in aqueous solution, bound to liposomes or to lipoproteins, *Photochem. Photobiol.*, **48**, 487-492, doi: 10.1111/j.1751-1097.1988.tb02850.x.
  79. Hamblin, M. R., and Newman, E. L. (1994) Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins, *J. Photochem. Photobiol.*, **26**, 147-157, doi: 10.1016/1011-1344(94)07036-9.
  80. Polo, L., Valduga, G., Jori, G., and Reddi, E. (2002) Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34**, 10-23, doi: 10.1016/s1357-2725(01)00092-9.
  81. Song, L., Li, H., Sunar, U., Chen, J., Corbin, I., et al. (2007) Naphthalocyanine-reconstituted LDL nanoparticles for *in vivo* cancer imaging and treatment, *Int. J. Nanomedicine*, **2**, 767-774.
  82. Wang, C., Zhao, X., Jiang, H., Wang, J., Zhong, W., et al. (2021) Transporting mitochondrion-targeting photosensitizers into cancer cells by low-density lipoproteins for fluorescence-feedback photodynamic therapy, *Nanoscale*, **13**, 1195-1205, doi: 10.1039/d0nr07342c.
  83. Cao, W., Ng, K. K., Corbin, I., Zhang, Z., Ding, L., et al. (2009) Synthesis and evaluation of a stable bacteriochlorophyll-analog and its incorporation into high-density lipoprotein nanoparticles for tumor imaging, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 2023-2031, doi: 10.1021/bc900404y.
  84. Fujita, M., Lee, B.-S., Khazenzon, N. M., Penichet, M. L., Wawrowsky, K. A., et al. (2007) Brain tumor tandem targeting using a combination of monoclonal antibodies attached to biopoly( $\beta$ -L-malic acid), *J. Control Release*, **122**, 356-363, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.032.
  85. Savellano, P., and Hasan, T. (2005) Photochemical targeting of epidermal growth factor receptor: a mechanistic study, *Clin. Can. Res.*, **11**, 1658-1668, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1902.
  86. Low, K. P., Bhuvaneswari, R., Thong, P. S., Bunte, R. M., and Soo, K. C. (2016) Novel delivery of Chlorin e6 using anti-EGFR antibody tagged virosomes for fluorescence diagnosis of oral cancer in a hamster cheek pouch model, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **83**, 143-154, doi: 10.1016/j.ejps.2015.12.023.
  87. Nishie, H., Kataoka, H., Yano, S., Yamaguchi, H., Nomoto, A., et al. (2018) Excellent anti-tumor effects for gastrointestinal cancers using photodynamic therapy with a novel glucose conjugated chlorin e6, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 1204-1209, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.171.
  88. Osaki, T., Hibino, S., Yokoe, I., Yamaguchi, H., Nomoto, A., et al. (2019) A basic study of photodynamic therapy with glucose-conjugated chlorin e6 using mammary carcinoma xenografts, *Cancers (Basel)*, **11**, 636, doi: 10.3390/cancers11050636.
  89. Desroches, M. C., Kasselouri, A., Meyniel, M., Fontaine, P., Goldmann, M., et al. (2004) Incorporation of glycoconjugated porphyrin derivatives into phospholipid monolayers: a screening method for the evaluation of their interaction with a cell membrane, *Langmuir*, **20**, 11698-11705, doi: 10.1021/la0482610.
  90. Bautista-Sanchez, A., Kasselouri, A., Desroches, M. C., Blais, J., Maillard, P., et al. (2005) Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins, *J. Photochem.*

*Photobiol. B Biol.*, **81**, 154-162, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.05.013.

91. Soyama, T., Sakuragi, A., Oishi, D., Kimura, Y., Aoki, H., et al. (2021) Photodynamic therapy

exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages, *Transl. Oncol.*, **14**, 101005, doi: 10.1016/j.tranon.2020.101005.

## BIOCHEMICAL BASIS OF SELECTIVE ACCUMULATION AND TARGETED DELIVERY OF PHOTOSENSITIZERS INTO TUMOR TISSUES

### Review

V. I. Ivanova-Radkevich

*Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),  
117198 Moscow, Russia; e-mail: ivanova-radkevich-vi@rudn.ru*

The basis of the method of photodynamic therapy of malignant neoplasms is the selectivity of the accumulation of photosensitizers in the tumor tissue. Insufficient selectivity of photosensitizers in relation to pathologically altered tissues and generalized distribution throughout the body leads to the development of severe toxic effects, including skin phototoxicity. The mechanisms of selectivity of photosensitizers for tumor tissue include selective binding to blood proteins and lipoproteins, the number of receptors for which is increased on tumor cell membranes, uptake by macrophages, better solubility at low pH, characteristic of tumor cells, and other mechanisms. At present, the increase in the efficiency of photodynamic therapy is largely associated with the additional targeting of photosensitizers to tumor tissues. Targeted delivery strategies are based on differences in metabolism and expression profiles of tumor and healthy cells. In these cells, receptors, proteases, or transmembrane transporters may be expressed differently. In particular, accelerated metabolism in many types of tumors leads to overexpression of receptors for epidermal growth factor, folic acid, transferrin, and a number of other compounds. This review considers the biochemical basis for the selective accumulation of various classes of photosensitizers in tumors (chlorins, phthalocyanines, 5-aminolevulinic acid derivatives, etc.) and discusses various targeted delivery strategies with an emphasis on conjugation of photosensitizers with receptor ligands overexpressed in tumor cells.

*Keywords:* photodynamic therapy, photosensitizer, targeted delivery, selectivity, chlorine, aminolevulinic acid