

УДК 576.5, 577.27

Сфероиды HER2-положительной аденокарциномы молочной железы человека как модель для тестирования противоопухолевых иммунотоксинов

И. В. Балалаева^{1,2*}, Е. А. Соколова^{1,2}, А. Д. Пужихина¹, А. А. Брилкина¹, С. М. Деев^{1,2,3}¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30

*E-mail: irin-b@mail.ru

Поступила в редакцию 22.08.2016

Принята к печати 18.11.2016

РЕФЕРАТ Ответ опухоли на терапевтическое воздействие во многом определяется ее гетерогенностью и межклеточными контактами, которые затрудняют проникновение крупных молекул в глубь трехмерной структуры. В связи с этим все большее распространение получают трехмерные модели опухолей *in vitro*, такие, как сфероиды опухолевых клеток. Нами получены сфероиды аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3, сверхэкспрессирующей онкомаркер HER2. Показано, что токсичность HER2-специфичного противоопухолевого иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении сфероидов на несколько порядков ниже, чем для монослойной культуры той же линии клеток. Существенную разницу в выраженности действия иммунотоксина можно объяснить его неэффективным проникновением в глубь сфероида и воздействием только на клетки внешних слоев. Полученная модель опухолевого сфероида может быть использована как при разработке препаратов для таргетной терапии, так и при исследовании путей повышения эффективности противоопухолевых агентов за счет направленного воздействия на межклеточные контакты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунотоксин 4D5scFv-PE40, онкомаркер HER2/neu, сфероиды, проникновение терапевтического агента в опухоль, таргетная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2); scFv – одноцепочечный переменный фрагмент антитела (single-chain variable fragment); PE40 – 40 кДа фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (*Pseudomonas* exotoxin A); ДМСО – диметилсульфоксид; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; ПААГ – полиакриламидный гель.

ВВЕДЕНИЕ

Сложная структура солидных опухолей *in vivo* создает объективные трудности в исследовании опухолевого процесса и оценке терапевтического потенциала противоопухолевых препаратов *in vitro*. Использование с этой целью монослойной культуры опухолевых клеток, несмотря на ее широчайшее распространение, не отражает ряда особенностей реальной опухоли, прежде всего, ее трехмерной организации. Трехмерное строение опухоли предполагает существование многочисленных межклеточных контактов, а также значительных градиентов концентрации газов, питательных веществ и катаболитов

по всему объему образования, способствуя формированию специфического микроокружения клеток различных слоев. В свою очередь, это приводит к гетерогенности клеточных популяций в опухоли, выражающейся в варьировании профилей экспрессии генов и метаболизма. Гетерогенность опухоли во многом определяет ответ новообразования на терапевтическое воздействие. Кроме того, наличие межклеточных контактов затрудняет проникновение крупных молекул внутрь опухоли, в результате чего на эффективность лекарственных препаратов влияет их способность к диффузии через опухолевую массу [1]. В связи с этим все большее распространение по-

лучают трехмерные модели опухоли *in vitro*, такие, как сфероиды опухолевых клеток. Многоклеточные опухолевые сфероиды представляют собой плотные конгломераты опухолевых клеток и воспроизводят аваскулярную стадию развития опухолевого узла, т.е. небольшую первичную опухоль, ранний метастаз или зону опухоли, расположенную далеко от сосуда. Структурная близость сфероида к реальной опухоли обуславливает большую релевантность данной модели, позволяя с ее помощью более корректно оценивать противоопухолевый эффект исследуемых агентов в условиях *in vitro* [2, 3]. Учитывая стремительное развитие таргетной (направленной) терапии [4], актуально получение и использование сфероидов клеток, экспрессирующих молекулярные мишени, определяющие специфичность исследуемого таргетного агента.

Нами получены сфероиды аденокарциномы молочной железы человека, сверхэкспрессирующей рецептор-мишень HER2, и показана информативность использования данной модели для оценки глубины проникновения HER2-специфичного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 и его противоопухолевого эффекта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение сфероидов аденокарциномы молочной железы человека

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3 (номер по каталогу ATCC – HTB-30), характеризующиеся сверхэкспрессией рецептора HER2 [5]. Клетки культивировали в среде McCoy's 5A, содержащей 1.5 mM глутамин (HyClone, США), с добавлением 10% (v/v) эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США), при 37°C и 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена («ПанЭко», Россия).

Сфероиды получали тремя способами. В первом варианте использовали 96-луночный культуральный планшет со стандартной адгезией поверхности (Corning, США), предварительно покрытый 1% раствором агарозы (AppliChem, Германия), приготовленным на дистиллированной воде (50 мкл на лунку). Во втором и третьем вариантах использовали 96-луночные планшеты из пластика со сверхнизкой адсорбцией Ultra Low Attachment Microplate с плоским и круглым дном соответственно (Corning, США). Во всех вариантах суспензию клеток SKBR-3 вносили в лунки соответствующих планшетов в количестве 200 клеток на лунку.

Изображения сфероидов получали методом фазового контраста на инвертированном микроскопе Axiovert 200 с использованием объектива EC Plan-Neofluar 10 × /0.3 (Carl Zeiss, Германия). Объем фор-

мировавшихся сфероидов (V, мкм³) рассчитывали по формуле: $V = a \times b^2 / 2$, где *a* – больший диаметр (мкм), *b* – меньший диаметр (мкм).

Получение иммунотоксина 4D5scFv-PE40

Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 [6] нарабатывали в клетках *Escherichia coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой pSD-4D5scFv-PE40, содержащей ген соответствующего белка под контролем *lac*-промотора. Очистку белка проводили последовательно методами металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap FF 1 ml (GE Healthcare, США) и анионообменной хроматографии на колонке QSepharose FF 1 ml (GE Healthcare, США) согласно инструкциям производителя. Фракции, содержащие белок, анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу.

Анализ цитотоксичности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении монослоя и сфероидов SKBR-3

Для исследования цитотоксичности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении монослойной культуры SKBR-3 суспензию клеток высевали на 96-луночный культуральный планшет (Corning, США) по 2000 клеток на лунку и культивировали в течение ночи. После этого ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую 4D5scFv-PE40 в различных концентрациях (10⁻⁵–10² нМ), и инкубировали в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ-теста [7]. Для этого заменяли среду в лунках на свежую, содержащую 0.5 мг/мл МТТ (Alfa Aesar, Великобритания), и инкубировали в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО («ПанЭко», Россия), затем измеряли оптическую плотность в лунках при 570 нм с использованием планшетного спектрофотометра Synergy MX (BioTek, США). Сфероиды получали по описанной выше методике с использованием 96-луночных круглодонных планшетов из пластика со сверхнизкой адсорбцией и культивировали в течение ночи. Цитотоксичность иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении сфероидов изучали таким же образом, но увеличивали время инкубации в его присутствии до 168 ч.

Относительную жизнеспособность клеток представляли в виде процентного отношения усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными клетками. Оценку цитотоксичности иммунотоксина в отношении сфероидов оценивали также по данным объема сфероидов на последний день инкубации в присутствии

иммунотоксина: в этом случае относительную жизнеспособность клеток рассчитывали как процентное отношение усредненных объемов обработанных и необработанных сфероидов. Обработку полученных данных проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Расчет IC_{50} проводили методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели доза–эффект.

Оценка проникновения иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в сфероиды

Для визуализации проникновения иммунотоксина в сфероид 4D5scFv-PE40 конъюгировали с низкомолекулярным флуоресцентным красителем DyLight650. Для проведения реакции конъюгации белок переводили в боратный буфер (400 мМ H_3BO_3 , 70 мМ $Na_2B_4O_7$, pH 8.0) методом гель-фильтрации на колонке PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare, США). Для конъюгации использовали N-гидроксисукцинимидное производное DyLight650 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific, США), обеспечивающее конъюгацию красителя по первичным аминокетильным группам белка. Инкубировали белок с 7-кратным молярным избытком DyLight650 NHS Ester, разведенного в ДМСО, в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте в соответствии с рекомендациями производителя. Несвязавшийся краситель удаляли методом гель-фильтрации на колонке PD SpinTrap G-25, уравновешенной фосфатно-солевым буфером (PBS), pH 7.4 («ПанЭко», Россия).

Для получения сфероидов суспензию клеток SKBR-3 вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета из пластика со сверхнизкой адсорбцией по 1000 клеток на лунку и культивировали в течение ночи. Сфероиды инкубировали в среде, содержащей флуоресцентные конъюгаты 4D5scFv-PE40, в течение 2 ч при 37°C. После этого сфероиды дважды промывали PBS и фиксировали 10% формалином, приготовленным на PBS, в течение 15 мин в темноте. Изображения сфероидов получали с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) с объективом EC Plan-Neofluar 20×/0.50. Для возбуждения флуоресценции DyLight650 использовали гелий-неоновый лазер 633 нм. Сигнал регистрировали в диапазоне 643–735 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что раковые клетки, в том числе ряд линий рака молочной железы человека, как правило, характеризуются высокой склонностью к образованию сфероидов в культуре [8–12]. Однако в ряде работ обнаружены сложности получения хорошо оформленных сфероидов клеток линии SKBR-3 в широком

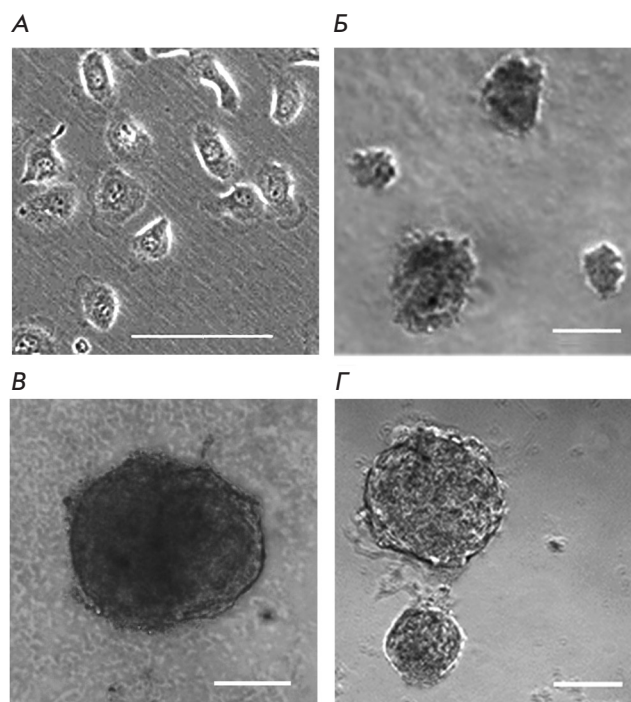


Рис. 1. Морфология клеток SKBR-3 в монослойной культуре (А) и при культивировании в течение 8-ми дней в условиях, препятствующих адгезии клеток к подложке: на агарозной подложке (Б) и на планшетах из пластика со сверхнизкой адсорбцией с круглым (В) и плоским (Г) дном. Бар на А – 50 мкм, на Б, В, Г – 100 мкм

диапазоне условий культивирования, в том числе при включении в ростовую среду компонентов внеклеточного матрикса (Matrigel) или повышении ее вязкости за счет добавления метилцеллюлозы [9, 10].

Культивирование клеток SKBR-3 в различных условиях, препятствующих формированию монослойной культуры (рис. 1А), показало их существенное влияние на способность данной культуры клеток формировать сфероиды. При выращивании на агарозной подложке клетки формировали рыхлые агрегаты неправильной формы, сильно варьирующие по размеру, с неровными краями. Диаметр наиболее крупных агрегатов на 2-е сут после посадки клеток составлял 30–100 мкм и достигал 60–140 мкм в течение 8 дней культивирования (рис. 1Б).

Более успешным оказалось использование низкоадгезивного пластика. Уже через сутки культивирования в лунках круглодонного планшета формировалось по одному сфероиду, представляющему собой плотный округлый конгломерат клеток диаметром около 160–200 мкм с четко очерченной границей.

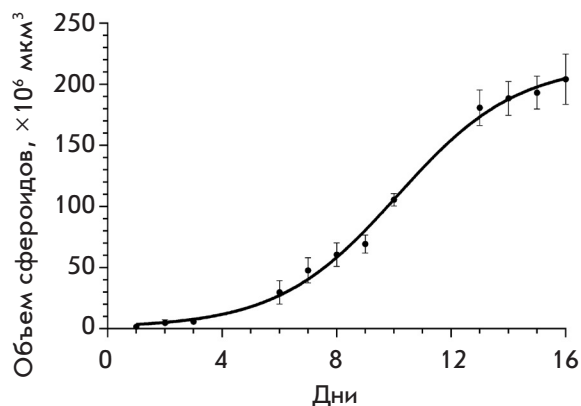


Рис. 2. Кривая роста сфероидов SKBR-3, полученных с использованием круглодонного планшета из пластика со сверхнизкой адсорбцией. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 5$. День «0» – посадка клеток на планшет

К 8-му дню культивирования сфероиды достигали 250–560 мкм в диаметре (рис. 1B). На плоскодонных планшетах формировалось 20–30 сфероидов округлой формы, в большинстве с четкой ровной границей, размером 30–60 и 130–360 мкм на 2-й и 8-й дни культивирования соответственно (рис. 1Г).

С учетом особенностей формирования трехмерных структур SKBR-3 в различных условиях культивирования оптимальным признано использование круглодонного планшета из пластика со сверхнизкой адсорбцией, который применяли в дальнейшем.

Показано, что динамика роста сфероидов, полученных с помощью этого подхода, имеет сложный характер: начальная экспоненциальная фаза, в нашем эксперименте длившаяся около 10 дней, сменяется фазой замедления роста (рис. 2). Аналогичная зависимость, описываемая функцией Гомпертца, характеризует рост опухолей *in vivo* [13]. Замедление роста сфероида может быть связано с изменением соотношения различных популяций клеток по мере увеличения его размеров и все более затрудненного поступления кислорода и нутриентов в глубь сфероида: увеличением доли неделящихся (покоящихся) клеток и/или гибелью покоящихся клеток, сопровождающейся разрастанием некротического ядра [3, 14].

Одна из важных особенностей линии SKBR-3, использованной нами для получения сфероидов, – сверхэкспрессия рецептора HER2. Этот рецептор относится к семейству рецептора эпидермального фактора роста человека и является важным участником сети сигнальной трансдукции, контролирующей процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза клеток [15]. Высокий уровень экспрессии HER2, характерный для многих типов рака, и его роль в патогенезе опухолей делают данный рецептор перспективной мишенью для создания таргетных противоопухолевых препаратов [16, 17]. Многообещающими агентами для таргетной терапии считаются рекомбинантные иммунотоксины – белки слияния, содержащие функционально независимые направляющий и токсический модули. Направляющим модулем, обеспечивающим нацеленную доставку таких кон-

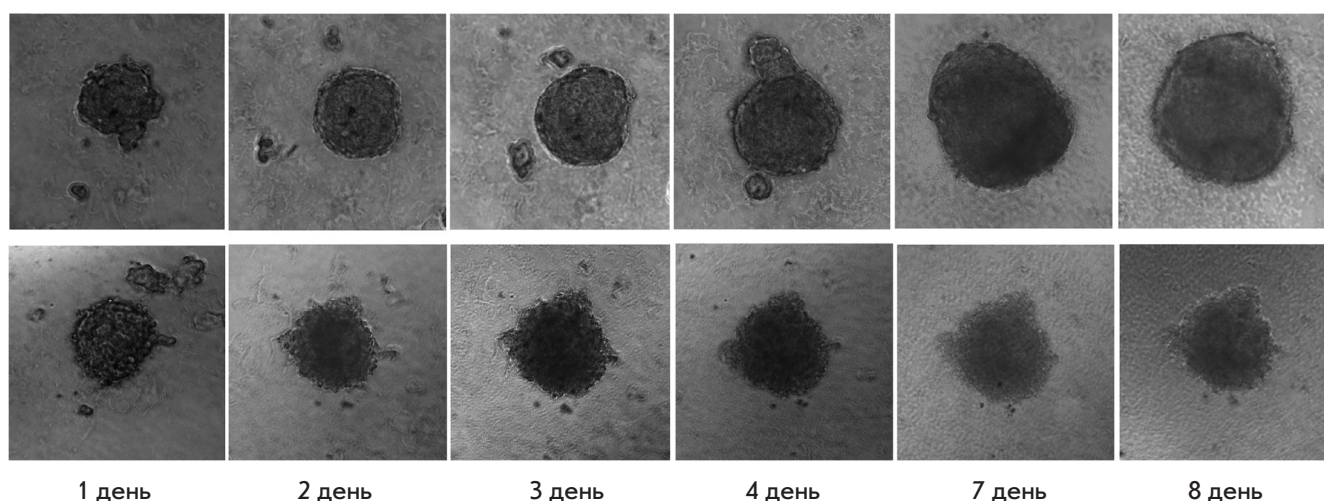


Рис. 3. Морфология сфероидов SKBR-3 на разные дни роста в контроле (верхний ряд) и в присутствии в среде 100 нМ 4D5scFv-PE40 (нижний ряд). Размер изображений 400 × 400 мкм

струкций к опухолевым клеткам, служат фрагменты антитела или узнающие полипептиды неиммуноглобулиновой природы, а токсическое действие обусловлено модифицированными природными белковыми токсинами различного происхождения [18]. Нами проанализировано влияние на рост полученных сфероидов созданного ранее рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40, содержащего HER2-специфичное антитело 4D5scFv в качестве направляющего модуля и 40 кДа фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (PE40) в качестве токсического модуля [6].

В присутствии 4D5scFv-PE40 в ростовой среде рост сфероидов значительно замедлялся (рис. 3). Эффект иммунотоксина на размер сфероидов имел дозозависимый характер (рис. 4). Полное ингибирование роста сфероидов было достигнуто при концентрациях иммунотоксина более 1 нМ (рис. 3, нижний ряд). При этом иммунотоксин влиял также на морфологию сфероидов: в отличие от контроля, уже на 2-е сут инкубации с иммунотоксином сфероиды разрыхлялись и теряли характерные очертания (рис. 3, нижний ряд). Известно, что плотная упаковка клеток в структуре сфероида обеспечивается повышением экспрессии и накоплением на поверхности клеток белков межклеточных контактов, в частности кадгеринов [19, 20]. Поскольку токсический эффект псевдомонадного экзотоксина А проявляется блокадой биосинтеза белка в клетках-мишенях [21], обнаруженный эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на морфологию сфероидов может быть обусловлен снижением количества белков клеточной адгезии в клетках.

Сравнительный анализ цитотоксичности 4D5scFv-PE40 в отношении клеток SKBR-3 в монослое и в сфероидах методом МТТ показал значительную резистентность сфероидов к данному агенту. Так, эффект 4D5scFv-PE40 в отношении монослойной

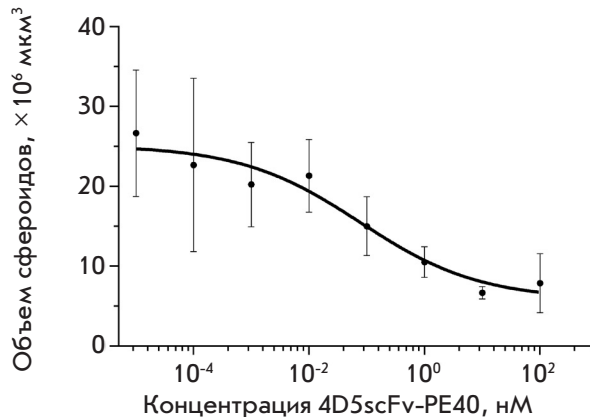


Рис. 4. Размер сфероидов SKBR-3 на 7-й день инкубации в среде с 4D5scFv-PE40 в зависимости от концентрации иммунотоксина. Показаны средние значения ± SEM, n = 6 для каждой точки

культуры проявлялся в диапазоне концентраций от 0.1 пМ до 0.1 нМ с IC₅₀ около 0.8 пМ в результате 72-часовой инкубации (рис. 5, слева). Это хорошо согласуется с результатами, полученными ранее для другой HER2-сверхэкспрессирующей линии клеток, SKOV-3 [22]. В то же время жизнеспособность клеток в сфероидах практически не снижалась в аналогичных условиях. При увеличении длительности инкубации до 168 ч токсическое действие иммунотоксина 4D5scFv-PE40 наблюдали только при увеличении его концентрации до 1 нМ, а значение IC₅₀ составило более 100 нМ (рис. 5, справа).

Явление большей резистентности опухолей *in vivo* к терапевтическим агентам по сравнению с соответствующими опухолевыми клетками в культуре хорошо известно [23, 24]. Ранее нами был показан токсический эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40, взятого в пикомолярных концентрациях, на HER2-

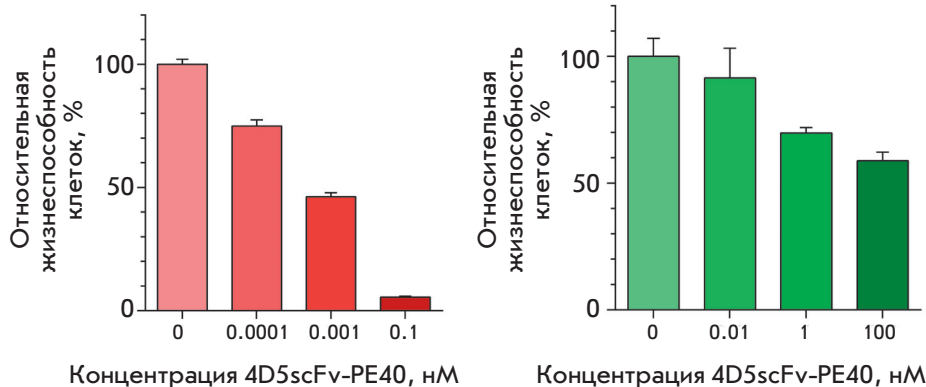


Рис. 5. Влияние 4D5scFv-PE40 на рост культур SKBR-3. Слева: относительная жизнеспособность монослойной культуры клеток после 72 ч инкубации в среде с иммунотоксином. Справа: относительная жизнеспособность клеток сфероидов, определенная через 168 ч после внесения в среду 4D5scFv-PE40. Показаны средние значения ± SEM, n = 6 для каждой точки

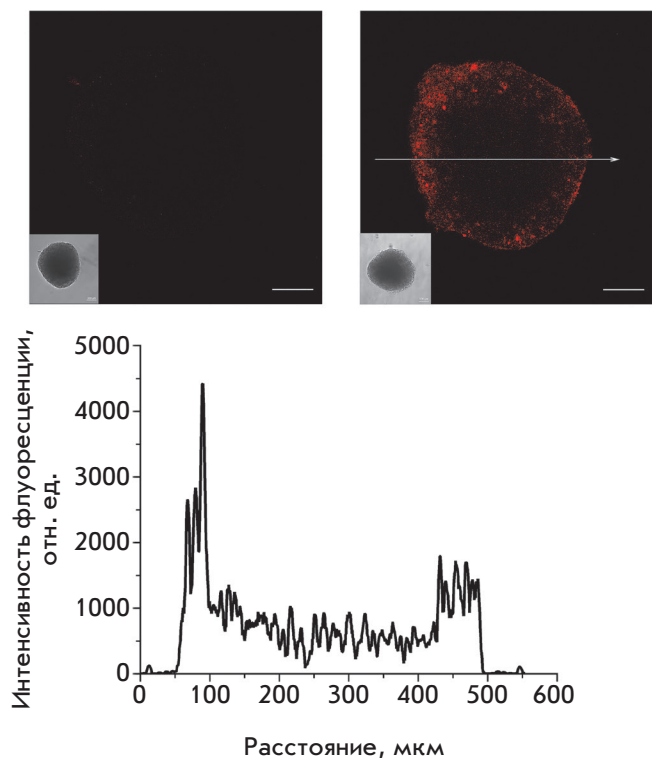


Рис. 6. Неокрашенный сфероид SKBR-3 (слева) и сфероид SKBR-3, окрашенный в течение 2 ч конъюгатом 4D5scFv-PE40 с флуоресцентным красителем DyLight650 (справа). Бар 100 мкм. На врезке показаны изображения соответствующих сфероидов, полученные методом просветной микроскопии. Снизу приведен профиль флуоресцентного сигнала вдоль линии, указанной на правом изображении

сверхэкспрессирующие клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-kat в культуре, в то время как его активность *in vivo* в отношении ксенографтной опухоли SKOV-kat проявлялась при введении в наномолярной концентрации [25]. Очевидно, что использование монослойной культуры опухолевых клеток не позволяет предсказать диапазон эффективных концентраций тестируемого агента в условиях организма.

Резистентность, как правило, определяется совокупностью факторов различной природы, отражающих как свойства самой опухоли, так и фармакокинетику препарата. Один из таких факторов – недостаточное накопление препарата в опухоли в результате его плохого проникновения в опухолевую массу, что, в свою очередь, может быть вызвано высоким давлением интерстициальной жидкости, неравномерным расположением сосудов в опухоли, многочисленными межклеточными

контактами и/или присутствием элементов внеклеточного матрикса. Это имеет особенное значение в случае белковых препаратов, в частности, рекомбинантных иммунотоксинов, размер молекул которых (50–70 кДа) обуславливает, с одной стороны, небольшое время циркуляции в кровотоке (20–30 мин), а с другой – медленную диффузию в ткани [26–28].

Для оценки глубины проникновения иммунотоксина в толщу сфероиды мы получили конъюгаты 4D5scFv-PE40 с флуоресцентным красителем DyLight650. Показано, что в результате 2-часовой инкубации 4D5scFv-PE40, меченный флуоресцентным красителем, проникает на глубину около 80–100 мкм (при диаметре сфероиды 400–500 мкм), что соответствует нескольким поверхностным слоям клеток (рис. 6). Эти результаты согласуются с данными о проникновении Fab-фрагментов антител, размер которых лежит в том же диапазоне (около 50 кДа), в сфероиды рака толстой кишки человека [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, существенная разница в выраженности токсического действия иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на сфероиды и монослой клеток SKBR-3 может во многом объясняться его неэффективным проникновением в глубь сфероиды и воздействием только на клетки внешних слоев. В этом случае использование сфероидов, состоящих только из опухолевых клеток, позволяет оценить влияние непосредственно межклеточных контактов на эффективность тестируемого препарата. В связи с этим мы полагаем, что полученная нами модель опухолевого сфероиды может быть успешно использована при поиске путей повышения эффективности накопления противоопухолевых агентов в опухоли за счет одновременного воздействия на межклеточные контакты. Это представляет особый интерес для разработки и исследования HER2-специфичных агентов, поскольку рецептор HER2, как правило, скрыт белками клеточной адгезии и может быть недоступен для связывания с таргетным препаратом [30, 31]. Такое воздействие, в частности, возможно при использовании белков, действие которых направлено на плотные межклеточные контакты [32]. Указанный подход, предложенный несколько лет назад, показал свою эффективность при использовании полноразмерных терапевтических антител и, по-видимому, представляет интерес для развития таргетной противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 14.578.21.0051, уникальный идентификатор RFMEFI57814X0051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minchinton A.I., Tannock I.F. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 8. P. 583–592.
2. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. № 3. P. 5517–5527.
3. Weiswald L.B., Bellet D., Dangles-Marie V. // *Neoplasia*. 2015. V. 17. № 1. P. 1–15.
4. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev*. 2015. V. 84. P. 1–26.
5. Hynes N.E., Gerber H.A., Saurer S., Groner B. // *J. Cell Biochem*. 1989. V. 39. № 2. P. 167–173.
6. Sokolova E.A., Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2014. V. 79. № 12. P. 1376–1381.
7. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth*. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
8. Glinisky V.V., Huflejt M.E., Glinisky G.V., Deutscher S.L., Quinn T.P. // *Cancer Res*. 2000. V. 60. № 10. P. 2584–2588.
9. Ivascu A., Kubbies M. // *Int. J. Oncol*. 2007. V. 31. № 6. P. 1403–1413.
10. Froehlich K., Haeger J.D., Heger J., Pastuschek J., Photini S.M., Yan Y., Lupp A., Pfarrer C., Mrowka R., Schleussner E., Markert U.R., Schmidt A. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2016. doi: 10.1007/s10911-016-9359-2.
11. Akasov R., Haq S., Haxho F., Samuel V., Burov S.V., Markvicheva E., Neufeld R.J., Szewczuk M.R. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 40. P. 66119–66134. doi: 10.18632/oncotarget.11868.
12. Debnath J., Brugge J.S. // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. V. 5. № 9. P. 675–688.
13. Hjelstuen M.H., Rasch-Halvorsen K., Brekken C., Bruland O., de L.D.C. // *Acta Oncol*. 1996. V. 35. № 3. P. 273–279.
14. Lin R.Z., Chang H.Y. // *Biotechnol. J*. 2008. V. 3. № 9–10. P. 1172–1184.
15. Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Biochemistry*. 2012. V. 77. № 3. P. 227–245.
16. Harari D., Yarden Y. // *Oncogene*. 2000. V. 19. № 53. P. 6102–6114.
17. Yan M., Parker B.A., Schwab R., Kurzrock R. // *Cancer Treat Rev*. 2014. V. 40. № 6. P. 770–780.
18. Kreitman R.J. // *Aaps J*. 2006. V. 8. № 3. P. E532–551.
19. Mueller S., Cadenas E., Schonthal A.H. // *Cancer Res*. 2000. V. 60. № 1. P. 156–163.
20. Xiang X., Phung Y., Feng M., Nagashima K., Zhang J., Broaddus V.C., Hassan R., Fitzgerald D., Ho M. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. P. e14640.
21. Weldon J.E., Pastan I. // *FEBS J*. 2011. V. 278. № 23. P. 4683–4700.
22. Sokolova E.A., Stremovskiy O.A., Zdobnova T.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 4. P. 93–96.
23. Niero E.L., Rocha-Sales B., Lauand C., Cortez B.A., de Souza M.M., Rezende-Teixeira P., Urabayashi M.S., Martens A.A., Neves J.H., Machado-Santelli G.M. // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2014. V. 33. P. 37.
24. Fong E.L., Harrington D.A., Farach-Carson M.C., Yu H. // *Biomaterials*. 2016. V. 108. P. 197–213.
25. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 31. P. 30919–30928.
26. Weldon J.E., Xiang L., Zhang J., Beers R., Walker D.A., Onda M., Hassan R., Pastan I. // *Mol. Cancer Ther*. 2013. V. 12. № 1. P. 48–57.
27. Zielinski R., Lyakhov I., Hassan M., Kuban M., Shafer-Weaver K., Gandjbakhche A., Capala J. // *Clin. Cancer Res*. 2011. V. 17. № 15. P. 5071–5081.
28. Cao Y., Marks J.W., Liu Z., Cheung L.H., Hittelman W.N., Rosenblum M.G. // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 4. P. 429–439.
29. Sutherland R., Buchegger F., Schreyer M., Vacca A., Mach J.P. // *Cancer Res*. 1987. V. 47. № 6. P. 1627–1633.
30. Choi I.K., Strauss R., Richter M., Yun C.O., Lieber A. // *Front. Oncol*. 2013. V. 3. P. 193.
31. Beyer I., van Rensburg R., Lieber A. // *Tissue Barriers*. 2013. V. 1. № 1. P. e23647.
32. Beyer I., van Rensburg R., Strauss R., Li Z., Wang H., Persson J., Yumul R., Feng Q., Song H., Bartek J., Fender P., Lieber A. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 22. P. 7080–7090.