

УДК 602.6:59; 602.6:612

Фаговые пептидные библиотеки как источник адресующих лигандов

А. А. Немудрая, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

*E-mail: kuligina@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.03.2015

Принята к печати 10.09.2015

РЕФЕРАТ Одно из ключевых направлений развития современной фармакологии – создание лекарственных средств, воздействующих непосредственно на очаг поражения и оказывающих минимальный токсический эффект на здоровые ткани и органы. Особенно остро эта проблема стоит в случае онкологических заболеваний. Короткие ткане- и органоспецифические пептиды, способные доставлять лекарственные средства к пораженному органу или ткани, считаются перспективными адресными агентами, которые могут использоваться как в диагностике, так и в терапии заболеваний, в том числе онкологических. В обзоре подробно рассмотрена технология фагового дисплея как метода получения специфических адресных пептидных агентов, приведены примеры их применения в диагностической и клинической практике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адресные пептиды, доставка лекарственных средств, фаговый дисплей, фаговые пептидные библиотеки.

ВВЕДЕНИЕ

Доставка лекарственных средств непосредственно к очагу поражения – одна из основных задач современной фармакологии. Особенно остро эта проблема стоит для онкологических заболеваний. Как правило, противоопухолевые препараты обладают значительной токсичностью, поражая наряду с малигнизированными здоровые клетки и ткани. Поэтому создание принципиально новых противоопухолевых средств, эффективность которых обеспечивается избирательным воздействием на опухоль, рассматривается как одно из ключевых направлений противоопухолевой терапии. Появление таких направленных на опухоль препаратов позволит снизить эффективную терапевтическую дозу и минимизировать побочные эффекты.

Известно, что раковые клетки обладают многими количественными и/или качественными признаками, отличающими их от нормальных клеток. Так, экспрессия рецепторов факторов роста, таких, как рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), рецепторы трансферрина и фолиевой кислоты, зачастую повышена на опухолевых клетках, что обеспечивает их неконтролируемую пролиферацию и способствует процессам метастазирования [1]. Известно также, что рост опухоли сопровождается активными процессами ангиогенеза, которые во взрослом организме активируются в основном при регенерации поврежденных тканей. Процессы ангиогенеза могут

активироваться, например, при повышении уровня экспрессии факторов роста сосудистого эндотелия (VEGF) [2]. Наконец, существуют физические отличия опухолевой ткани от нормальной: изменение температуры, низкая концентрация кислорода (гипоксия) и снижение pH [3].

Совокупность уникальных свойств раковых клеток позволяет находить специфические лиганды, взаимодействующие непосредственно с опухолью, и проводить направленную (таргетную) терапию злокачественных новообразований.

Технология фагового дисплея – один из перспективных подходов к поиску ткане- и/или органоспецифических молекул. Комбинаторные фаговые пептидные библиотеки позволяют получать высокоспецифические пептиды, в том числе к различным типам опухолей. Поиск опухолеспецифических пептидов с помощью комбинаторных фаговых пептидных библиотек можно осуществлять в системах *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время такие опухолеспецифические пептиды рассматриваются в качестве таргетных средств доставки терапевтических генов, цитокинов, агентов для визуализации, проапоптотических пептидов и цитотоксических препаратов.

В обзоре подробно рассмотрена технология фагового дисплея как метода получения адресующего агента, способного обеспечить специфичность взаимодействия лекарственного средства и органа или ткани-мишени. Приведены примеры использо-

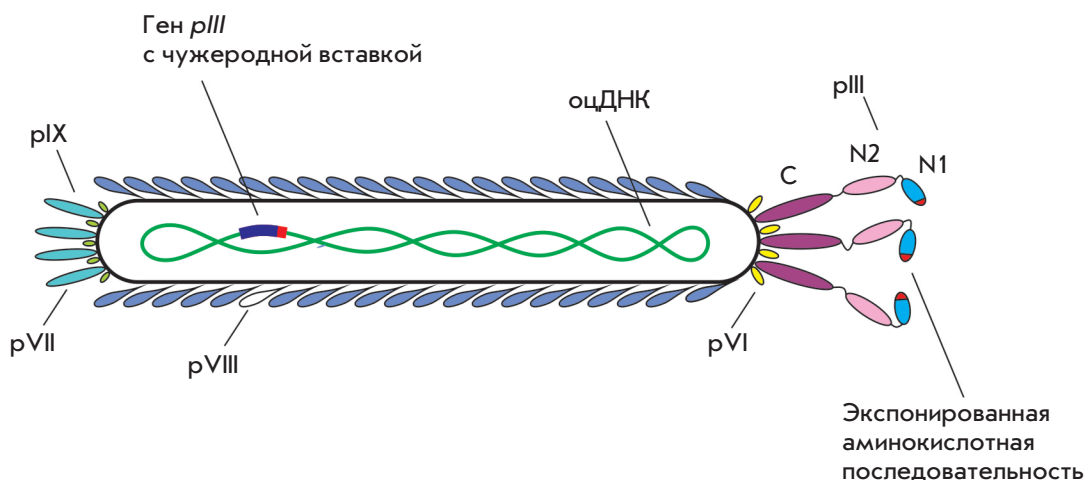


Рис. 1. Строение бактериофага с экспонированной чужеродной аминокислотной последовательностью в составе поверхностного белка pIII (отмечено красным цветом). N1, N2 и C – домены поверхностного белка pIII

вания органо- и тканеспецифических пептидов в биомедицине.

ТЕХНОЛОГИЯ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Технология фагового дисплея, впервые предложенная в 1985 г. G.P. Smith, сыграла важную роль в разработке принципиально новых молекулярно-биологических подходов и открыла новые возможности для развития фармацевтической индустрии. Концепция фагового дисплея заключается в клонировании последовательности чужеродной ДНК в специфический сайт гена поверхностного белка бактериофага так, чтобы эта последовательность находилась в одной рамке считывания с белком. В результате на поверхности бактериофага образуется (представляется) химерный белок, в состав которого включена чужеродная аминокислотная последовательность (рис. 1). При этом физиологические свойства и жизнеспособность вирусной частицы сохраняются [4, 5].

Технология фагового дисплея разработана для различных бактериофагов, например λ, T4, T7 [6–8]. Наиболее широкое применение при создании фагового дисплея получили нитчатые бактериофаги [9], вирионы которых похожи на длинную тонкую нить. Нитчатые фаги имеют небольшие размеры и просто устроенный геном [10]. Наиболее изученные нитчатые фаги – M13, f1 и fd – входят в род *Inovirus* семейства *Inoviridae* и объединяются в группу Ff, поскольку инфицируют *Escherichia coli*, несущие F-пили [11]. Штаммы фагов Ff содержат кольцевую одноцепочечную ДНК, идентичность которой у разных штаммов этой группы составляет 98.5% [10]. Геном Ff-фагов представлен 11 генами, продукты, которые можно сгруппировать по их функциональному назначению: белки капсида – pIII, pVI, pVII,

pVIII, pIX; белки, участвующие в репликации ДНК, – pII, pV, pX; и белки, отвечающие за сборку фаговой частицы, – pI, pIV, pXI (рис. 1) [12].

Как правило, нитчатые бактериофаги инфицируют грамотрицательные бактерии (*Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Thermus* и *Neisseria*). Бактериальная клетка, инфицированная фагом, высвобождает новые вирусные частицы, но сама при этом не лизируется.

В зависимости от того, в каком гене поверхностного белка клонирована чужеродная ДНК, различают несколько типов фагового дисплея (таблица).

Для представления чужеродной аминокислотной последовательности в технологии фагового дисплея

Типы фагового дисплея в зависимости от используемого поверхностного белка

Тип фагового дисплея	Используемый поверхностный белок (все ли копии белка представляют чужеродную последовательность)	Число и локализация копий гена поверхностного белка
3	pIII (все)	1 в геноме бактериофага
8	pVIII (все)	1 в геноме бактериофага
33	pIII (частично)	2 в геноме бактериофага
88	pVIII (частично)	2 в геноме бактериофага
3+3	pIII (частично)	2 в геноме бактериофага и фагмидном векторе
8+8	pVIII (частично)	2 в геноме бактериофага и фагмидном векторе

наиболее часто используют белки рIII и рVIII (406 и 50 аминокислотных остатков соответственно), которые также называют минорными и мажорными. Оба белка имеют N-концевые сигнальные последовательности, которые отщепляются сигнальной пептидазой в процессе созревания белка после переноса к внутренней части бактериальной мембраны. Зрелые белки встраиваются в оболочку бактериофага в ходе ее сборки. Таким образом, чтобы чужеродный пептид был представлен на поверхности фаговой частицы, кодирующая его нуклеотидная последовательность должна быть клонирована между последовательностью поверхностного белка и сигнальной последовательностью в единой рамке трансляции [13].

Бактериофаг содержит от трех до пяти копий белка рIII. Вместе с рVI они образуют дистальную крышку вириона и необходимы для его стабилизации, а также для терминации сборки фаговой частицы при выходе из бактериальной клетки. Кроме того, рIII играет важную роль при инфицировании, прикрепляясь к бактериальной клетке через F-пили [14]. рIII состоит из трех доменов: N1, N2 и С, разделенных глициновыми спейсерами (рис. 1). Домен С отвечает за сборку вириона, а N1 и N2 – за инфицирование бактериальной клетки [15]. Если встроить короткую нуклеотидную последовательность в ген рIII, то чужеродную вставку будет нести каждая молекула белка рIII. Фаговый дисплей такого вида называется дисплеем типа 3 (таблица).

Одна фаговая частица содержит около 2700 копий белка рVIII, который образует оболочку бактериофага и имеет спиралевидную структуру. На С-конце белка находятся четыре положительно заряженных остатка лизина, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами вирусной оцДНК внутри фага. N-Конец расположен на внешней стороне вирусной частицы [16, 17]. Максимальная длина чужеродной вставки, которая не приводит к значительным нарушениям сборки фаговой частицы и будет экспонирована в каждом белке рVIII, составляет 6–7 аминокислотных остатков (фаговый дисплей типа 8) [18, 19].

При экспозиции длинных чужеродных аминокислотных последовательностей происходит утрата функции химерного белка, что необходимо восполнить белком рIII или рVIII дикого типа. Существуют системы, в которых фаговый геном содержит ген рIII (рVIII) двух типов: рекомбинантный и дикий. В результате только часть белков рIII (рVIII) будет нести чужеродную последовательность, тогда как другая часть сохранит природные функции (тип 33 (88) фагового дисплея) [20]. Восполнение утраченной функции белка может происходить в системах с использованием фагмидных векторов и фагов-помощников

[21, 22]. Фагмидный вектор в таких случаях содержит ориджины репликации плазмиды и фага, последовательность, кодирующую ген устойчивости к антибиотикам, и последовательность, кодирующую химерный белок. Фаг-помощник кодирует белок дикого типа, он необходим для правильной сборки вирусных частиц. При инфицировании ген дикого типа попадает в клетку *E. coli* вместе с фагом-помощником, а рекомбинантный ген находится в плазмиде. В результате зрелые частицы высвобождаемого бактериофага будут устроены по мозаичному типу, т.е. будут содержать белки дикого и рекомбинантного типа (тип 3+3 или 8+8 фагового дисплея) [20].

Первые работы с использованием технологии фагового дисплея были направлены на получение пептидов и белков, способных специфически связываться с антителами. Smith G.P. в своей пилотной работе получил фаговый клон (fECO1), в белок рIII которого был встроены фрагмент рестриктазы EcoRI. Этот клон эффективно нейтрализовался антителами против рестриктазы [4]. В продолжение и развитие этих работ опубликовано множество других, в которых фаговые частицы с экспонированным антигеном служили иммуногенами, способными вызывать ответную реакцию иммунной системы [23–25].

Во второй части своей работы Smith исследовал возможность обогащения смешанной популяции бактериофагов специфическими фагами fECO1 путем аффинного связывания с антителами к EcoRI. К абсорбированным антителам против EcoRI добавляли смесь фагов fECO1 и значительный избыток фага M13mp8 дикого типа. Не связавшиеся фаги отмывали средой, а абсорбированные элюировали кислым буфером, нейтрализовали и титровали. В результате трех последовательных экспериментов получили популяцию, обогащенную фагом fECO1 в 1500–7200 раз по сравнению с фагом дикого типа [4]. На этом этапе возникла идея использовать антитела для отбора специфических клонов из популяции бактериофагов (комбинаторной фаговой библиотеки), где каждая отдельная фаговая частица экспонирует на своей поверхности случайную аминокислотную последовательность. С 1988 г. процедуру аффинного обогащения популяции фагов специфическим бактериофагом стали называть «биоэннингом» [26].

Типичный раунд биоэннинга включает в себя следующие стадии: 1) инкубация комбинаторной фаговой библиотеки с мишенью (белки, культура клеток, опухолевая ткань и т.д.); 2) отмывка не связавшихся фагов; 3) элюция связавшихся фагов; 4) амплификация элюированного фага для последующих раундов (рис. 2).

После нескольких раундов биоэннинга степень обогащения популяции бактериофагом определяют

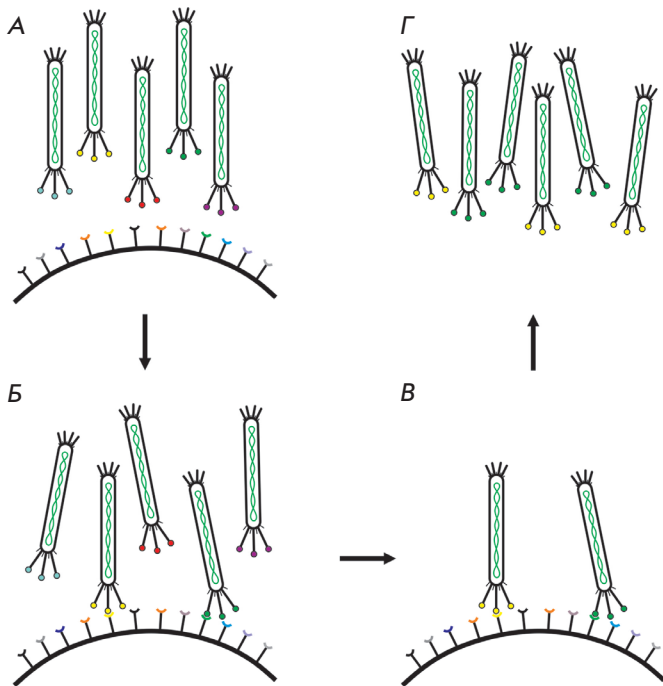


Рис. 2. Схема типичного раунда биоскрининга фаговой библиотеки. А, Б – инкубация комбинаторной фаговой библиотеки с мишенью; В – отмывка не связавшихся фагов; Г – элюция связавшихся фагов и их амплификация для следующих раундов

титрованием и/или иммуноферментными методами. Затем выделяют индивидуальные фаговые клоны и определяют последовательность чужеродной вставки. Важно отметить, что простая физическая связь между экспонированным пептидом и клонированной в геном фага последовательностью позволяет легко анализировать первичную структуру вставки. Благодаря небольшим размерам нитчатых бактериофагов (диаметр 5 нм, длина 1 мкм) концентрация фаговых частиц может достигать 10^{14} частиц/мл, что позволяет проводить скрининг огромного количества вариантов. Представительность пептидной фаговой библиотеки достигает 10^9 различных вариантов вставки [27].

Сегодня комбинаторные фаговые библиотеки получили широкое распространение в качестве инструмента, позволяющего решать различные задачи молекулярной биологии, биохимии и биомедицины. Библиотеки могут быть выполнены на основе случайных комбинаций олигопептидов, антител, ферментов, а также фрагментов геномной ДНК, кДНК, открытых рамок считывания или других функциональных районов генома [28–30]. Скрининг библиотек позволяет отбирать молекулы со специфическими свойствами,

изучать белок-белковые взаимодействия, искать субстраты различных ферментов, исследовать маркеры определенных тканей, органов и биохимических процессов, проводить поиск эпитопов антигенов и паратопоов антител и, наконец, получать высоко-специфические молекулы с адресными свойствами [31, 32].

ОТБОР СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ИЗ ФАГОВЫХ БИБЛИОТЕК

Конструирование пептидной библиотеки – один из ключевых моментов успешного скрининга, поскольку вероятность отбора лиганда, который специфически свяжется с определенной мишенью, во многом зависит от разнообразия библиотеки и длины вставки. Одна из наиболее распространенных стратегий конструирования комбинаторной библиотеки пептидов опирается на правила триплетности и вырожденности генетического кода. Эта стратегия заключается в генерировании различных комбинаций на основе кодона $(NNK)_n$, где N – эквимоллярное соотношение всех четырех нуклеотидов, а K – смесь только гуанина и тимина (1 : 1). Благодаря использованию кодона $(NNK)_n$ вместо $(NNN)_n$ число возможных стоп-кодонов сокращается с трех (TAA, TGA, TAG) до одного (TAG), а также выравнивается вероятность кодирования разных аминокислот. Таким образом, 32 возможных варианта кодона $(NNK)_n$ кодируют 20 канонических аминокислот и один стоп-кодон [13]. Число возможных вариантов аминокислотной последовательности длиной n будет равно 20^n . Однако на практике на представительность библиотеки влияют и другие факторы, такие, как наличие стоп-кодона в последовательности пептида и эффективность трансформации клеток *E. coli* фаговыми конструкциями. Обычно представительность коммерческой фаговой пептидной библиотеки составляет около 10^9 фаговых частиц [33]. При этом пептидная вставка может быть как линейной, так и кольцевой за счет образования дисульфидных мостиков между остатками цистеина, фланкирующими вставку.

Как уже сказано, чужеродная вставка может экспонироваться либо белком рIII, либо рVIII. Библиотеки на основе рIII, который представлен всего тремя-пятью копиями на одном из концов вирусной частицы, используют для получения высокоспецифичных лигандов, обладающих высоким сродством к мишени. С помощью таких библиотек получают лиганды с константами диссоциации в пределах 1–10 мкМ [34]. Наиболее часто столь специфические пептиды используют для доставки различных веществ к мишени или визуализации специфических структур и биохимических процессов.

Мажорный белок рVIII, покрывающий капсид, обеспечивает мультивалентное связывание и высокую avidность, что отрицательно отражается на аффинности взаимодействия пептида с мишенью. С помощью библиотек на основе белка рVIII отбирают лиганды с более низкой индивидуальной аффинностью, константы диссоциации таких лигандов находятся в пределах 10–100 мкМ [34]. Однако такие библиотеки также находят широкое применение, поскольку отобранные фаговые частицы обладают высоким сродством к мишени, стабильностью, их можно легко наработать в большом количестве. Например, Lang Q. и соавт. использовали иммуоферментный анализ для детекции простатспецифического антигена (PSA) с помощью отобранного из библиотеки рVIII фагового клона [35]. Показана возможность таргетной доставки миРНК GAPDH в раковые клетки с использованием способности фаговых белков к самосборке в присутствии какой-либо нуклеиновой кислоты [36]. Они использовали фаговую пептидную библиотеку на основе мажорного белка рVIII для отбора клонов, специфических к клеткам аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Рекомбинантные белки рVIII этого клона нарабатывали простой амплификацией фагового клона, отделяли от фаговой частицы и инкубировали с миРНК GAPDH с образованием так называемых нанофагов. Полученные частицы (нанофаги) защищали миРНК GAPDH от деградации нуклеазами плазмы крови, специфически доставляли их к клеткам MCF-7, обеспечивали их интернализацию внутрь клетки и при этом не влияли на функциональность миРНК GAPDH.

Скрининг фаговых пептидных библиотек можно проводить как в системе *in vitro*, так и *in vivo*. В системе *in vitro* скрининг проводят на самых различных объектах: инактивированных вирусах и бактериях, очищенных фракциях белков, ферментов, рецепторов, функциональных доменов и на культурах клеток [37, 38]. К скринингу *in vitro* также относят отбор на неорганических молекулах (например, металлы) и на синтетических материалах [39].

Наиболее простой и прямой метод отбора специфических пептидов *in vitro* – селекция на очищенной субстанции белка-мишени. Например, с помощью скрининга фаговой пептидной библиотеки, экспонирующей семизвенный пептид, с фактором роста фибробластов 8 (FGF8b) был получен пептид HSQAAVP (P12), специфически связывающийся с рецептором этого фактора. FGF8b является основной изоформой, которая продуцируется клетками рака предстательной железы. Отобранный пептид P12 ингибирует индуцируемую FGF8b пролиферацию клеток, приводит к остановке клеточного цикла в фазе G₀/G₁ путем супрессии циклина D1 и PCNA и блокирует

активацию каскадов Erk1/2 и Akt как в клетках рака предстательной железы, так и в клетках эндотелия сосудов. Таким образом, P12, действующий как антагонист FGF8b, может быть потенциальным терапевтическим средством при раке предстательной железы [40].

Недостаток или скорее ограничение такого способа отбора состоит в том, что пептиды, полученные после скрининга на очищенной субстанции белков, могут не обладать таргетностью к мишени *in vivo*. Одной из причин этого могут быть специфические посттрансляционные модификации белков, происходящие при различных процессах, в том числе при злокачественном перерождении клетки. Кроме того, получение растворимой субстанции очищенного белка с сохранением его природной структуры и функции не всегда представляет тривиальную задачу [41].

Скрининг *in vitro* на культурах клеток позволяет успешно отбирать пептиды к различным поверхностным структурам клетки, а также пептиды, способные интернализироваться внутрь клеток как рецептор-опосредованным, так и нерепторным путем, так называемые CPP-пептиды – пептиды с высокой проникающей способностью (от англ. cell penetrating peptides). К преимуществам селекции на культурах клеток относится возможность получения пептидов, специфичных к определенному типу клеток, без знания конкретной мишени, с которой эти пептиды свяжутся.

На основе уже полученных многочисленных данных конструируют фаговые пептидные библиотеки с дополнительными свойствами. Так, например, выделяют новый класс фаговых пептидных библиотек (iPhage libraries), в которых экспонированный пептид способен интернализировать фаговую частицу внутрь клетки и обеспечивать специфическое связывание с клеточными органеллами и функциональными доменами внутриклеточных белков. Пептиды, отобранные из такой библиотеки, позволяют изучать внутриклеточные сигнальные и метаболические пути [42].

Менее распространенным объектом для скрининга фаговой пептидной библиотеки являются различные биологические жидкости. Так, во внеклеточном матриксе опухоли обнаруживается большое количество фибрина, что обусловлено постоянным проникновением фибриногена в строму опухоли и его расщеплением. Pilch J. и соавт. провели биопэннинг со свернувшейся плазмой крови и отобрали два циклических декапептида (CLT1 и CLT2), способных специфически связываться с фибрин-фибронектиновыми комплексами. Внутривенное введение мышам с различными привитыми опухолями флуоресцентно меченных CLT1 и CLT2 приводило к их накоплению

во внеклеточном пространстве опухоли. Отобранные пептиды также специфически связывались с участками повреждений в тканях. Таким образом, такие пептиды могут быть полезны при создании адресных лекарственных средств для диагностики и терапии опухолей и поврежденных тканей [43].

Впервые возможность отбора специфических пептидов скринингом фаговой пептидной библиотеки *in vivo* показали Pasqualini и Ruoslahti в 1996 г. [44]. При скрининге *in vivo* существует несколько способов введения фаговой пептидной библиотеки экспериментальным животным. Наиболее распространено внутривенное введение, которое позволяет практически моментально «представить» библиотеку рецепторам кровеносных сосудов, органам и тканям. В процессе циркуляции фаговой пептидной библиотеки в кровяном русле часть популяции фагов связывается с белками плазмы и с другими нецелевыми органами и тканями. Эта часть библиотеки не попадает в дальнейшие раунды селекции, поскольку амплифицируется только та часть библиотеки, которая связалась с целевым органом.

Однако внутривенный способ введения затрудняет проведение отбора пептидов, специфичных к структурам головного мозга, поскольку проникновение фаговых частиц ограничено гематоэнцефалическим барьером. С этой целью разработан интраназальный способ введения фаговой пептидной библиотеки. Установлено, что при интраназальном введении большая часть вещества всасывается в кровь, меньшая – при помощи перинеурального транспорта по чувствительным нервам через нейроны обонятельного тракта попадает непосредственно в мозг и распространяется по структурам головного мозга при помощи механизмов, не связанных с кровотоком [45, 46]. Тем не менее внутривенный способ введения фаговой пептидной библиотеки позволяет отбирать пептиды, специфичные непосредственно к гематоэнцефалическому барьеру [47]. Такие пептиды потенциально могут транслоцироваться на внутреннюю сторону гематоэнцефалического барьера и обеспечивать доставку связанных с ними молекул к структурам мозга.

Альтернативой внутривенному и интраназальному способам является введение непосредственно в мишень (ортотопическое). Например, внутрибрюшинное введение фаговой пептидной библиотеки мышам с раком желудка позволило отобрать пептиды, специфически связывающиеся с метастазами рака желудка [48]. Ортоотопическое введение позволяет представлять мишени все возможные варианты библиотеки и уменьшает вероятность захвата фаговых частиц другими органами. С другой стороны, при внутривенном введении пептидов, отобранных

ортотопически, таргетность таких пептидов резко снижается.

Наконец, существует трансдермальный способ введения, позволяющий отбирать пептиды, способные проникать через интактную кожу [49, 50].

Основные ограничения скрининга *in vivo* – неспецифическое распределение фаговых частиц по органам и тканям и время полужизни введенного фага. Показано, что при циркуляции в организме фаг накапливается в значительном количестве в печени и селезенке. В крови мышей с интактной иммунной системой (линия CF-1) максимальная концентрация фага M13 дикого типа наблюдается через 5 мин с момента внутривенного введения и через 15 мин – в крови мышей с иммунодефицитом. Затем концентрация фаговых частиц в кровяном русле достаточно быстро снижается. Важно отметить, что концентрация фаговых частиц в селезенке мышей с иммунодефицитом гораздо ниже, чем у здоровых, что говорит об участии иммунной системы, в частности, ретикулоэндотелиальной системы, в захвате фагов [51]. Время полужизни фага M13 дикого типа в кровяном русле мышцы составляет около 4,5 ч, при этом различные модификации фаговых частиц (например, гликозилирование или сукцинирование) резко сокращают (до нескольких минут) время полужизни. Сокращение времени полужизни в кровяном русле и быстрая деградация модифицированных фагов связаны, по-видимому, с их взаимодействием с соответствующими рецепторами и интернализацией внутрь клетки [52]. Эти нюансы необходимо учитывать при построении и анализе экспериментов *in vivo*.

В 2002 г. опубликовали результаты первого скрининга фаговой пептидной библиотеки, проведенного *in vivo* на пациенте в коже [53]. После внутривенного введения такой библиотеки (один раунд скрининга) анализировали биопсийный материал нескольких органов. Показано, что распределение 47160 фаговых клонов между органами не случайно. Этот эксперимент стал первым шагом в создании «молекулярной карты» распределения рецепторов человека. Один из отобранных экспонированных пептидов обладал высокой тропностью к ткани предстательной железы и накапливался в ней в значительных количествах. Позже показали, что этот пептид является лигандом интерлейкина-11 [54].

В дальнейшем фаговые частицы, отобранные из биопсийного материала различных органов после первого раунда селекции, объединили в новую библиотеку. С помощью этой библиотеки провели еще два последовательных раунда селекции на двух больных раком предстательной железы. Биоинформатический анализ клонов, отобранных

из различных органов, выявил 15 пептидов, которые потенциально могут служить лигандами определенных рецепторов. С помощью биоинформатических методов (High-throughput analysis by similarity search, protein arrays) и аффинной хроматографии доказано, что четыре из этих 15 пептидов являются лигандами аннексинов А2 и А4, аполипопротеина Е3 и протеазы-3 лейкоцитов [55].

Таким образом, одно из главных преимуществ использования системы *in vivo* – то, что мишени, к которым отбирают специфические пептиды, представлены в естественном микроокружении живого организма.

ПРИМЕНЕНИЕ ОРГАНО- И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Развитие технологии получения органо- и тканеспецифических пептидов с помощью фаговых библиотек и обнаружение новых свойств таких пептидов позволило рассматривать их как перспективные диагностические и терапевтические средства.

Пептиды с противоопухолевой активностью

В большинстве случаев скрининг фаговых пептидных библиотек проводят с целью получения пептидов, которые специфически связываются с рецепторными структурами целевого органа или ткани и впоследствии могут служить адресным агентом для доставки различных веществ. С другой стороны, сами органо- и тканеспецифические пептиды обладают определенными биологическими свойствами. В частности, некоторые пептиды проявляют противоопухолевую активность.

Например, пептид LuP-1, специфически связывающийся с лимфатическими сосудами некоторых опухолей, при систематическом внутривенном введении ингибирует рост рака молочной железы MDA-MB-435 человека в модельных мышцах с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). Показано, что LuP-1 вызывает апоптотическую гибель только тех клеток, с которыми связывается [56].

Циклический пептид SIGB-300 блокирует фосфорилирование серин-треониновой протеинкиназы СК2, синтез которой значительно повышен при различных видах рака. Нарушение функции этого фермента приводит к торможению роста и индукции апоптоза раковых клеток в культуре. Показано также, что SIGB-300 обладает значительным противоопухолевым эффектом как при местном, так и при системном введении мышам с сингенными опухолями и с опухолями человека и может служить основой для создания противоопухолевого препарата [57].

Пептид SMSIASPYIALE (пептид РIII), специфичный к эндотелиальным клеткам GC9811-P рака же-

лудка, накапливающийся в метастазах этой опухоли, был отобран из фаговой пептидной библиотеки после четырех раундов селекции. Синтетический аналог РIII значительно ингибировал способность клеток GC9811-P к адгезии и инвазии, тормозил развитие метастазов и увеличивал продолжительность жизни мышей с привитой раковой опухолью желудка [58]. В дальнейшем получили пептид GMBP1, который специфически связывался с рецепторами клеток рака желудка, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, способствовал изменению фенотипа клеток и восстановлению чувствительности к лекарственным средствам [59].

Известно, что кислый фактор роста фибробластов (aFGF) продуцируется клетками рака молочной железы и, взаимодействуя с рецептором FGF (FGFR), способствует опухолевой прогрессии. Пептид AP8, полученный из фаговой пептидной библиотеки, способен специфически связывать aFGF и ингибировать пролиферацию клеток опухоли и новообразованных опухолевых сосудов, блокируя клеточный цикл [60]. Такие бифункциональные пептиды, специфичные к опухолевым клеткам и клеткам сосудов опухоли, могут быть как самостоятельными противоопухолевыми средствами, так и средствами доставки других лекарственных препаратов, усиливая их эффект собственным противоопухолевым действием.

Wang H. и соавт. разработали стратегию совместного использования апоптотического пептида AVPI и ДНК гена, кодирующего белок p53, для адъювантной терапии рака молочной железы. AVPI-пептид модифицировали, добавив к нему восемь остатков аргинина. Благодаря положительно заряженному «хвосту» из остатков аргинина AVPIR8 приобрел способность эффективно проникать в раковые клетки, а также служить вектором для доставки генов за счет образования нанокомплексов с нуклеиновой кислотой. Использование комбинации AVPIR8/ДНК p53 значительно увеличивало чувствительность раковых клеток к доксорубину в экспериментах *in vitro*, а также на мышинных моделях рака молочной железы с фенотипом множественной лекарственной устойчивости [61].

На основе опухоль-адресованных пептидов разработан ряд перспективных противоопухолевых лекарственных средств. Можно привести несколько примеров противоопухолевых пептидов, находящихся на различных стадиях клинических испытаний (www.clinicaltrials.gov). Так, например, циклический пептид [Arg-Gly-Asp-Dphe-(NMeVal)], содержащий мотив RGD, является основой противоопухолевого средства Циленгитид (Cilengitide). Циленгитид – высокоселективный ингибитор интегрина, подавляющий ангиогенез, рассматривают

как препарат против опухолей центральной нервной системы, в частности глиобластом, а также мелко-клеточного рака легкого, рака предстательной железы и метастазирующего и/или плоскоклеточного рака головы и шеи. В клинических испытаниях (фаза I/II) циленгитида в комбинации со стандартной радиотерапией и темозоломидом, проводимых на пациентах с впервые диагностированной глиобластомой, показано достижение первичной конечной точки (69% выживаемость без прогрессирования в течение 6 месяцев) [62, 63].

Клинические испытания противоопухолевого лекарственного средства NGR-hTNF, состоящего из аминокислотного мотива NGR, мишенью которого является аминопептидаза N (CD13), и человеческого фактора некроза опухолей (hTNF), начались после получения обнадеживающих результатов противоопухолевой терапии на животных моделях [64]. К настоящему времени проведены клинические испытания (II фаза) NGR-hTNF как препарата монотерапии при мезотелиоме плевры и раке печени. Клинические испытания (I/II фаза) комбинации NGR-hTNF с такими препаратами, как доксорубин, оксалиплатин, капецитабин, гемцитабин и т.д., при рецидиве рака яичников, колоректального рака и мелкоклеточного рака легкого находятся на разных стадиях завершения [5, 63]. По результатам клинических исследований NGR-hTNF наиболее эффективен в комбинации с традиционными химиопрепаратами.

В качестве средства от рака яичников и рецидивов глиобластомы проводятся клинические испытания (фаза II/III) онколитического аденовируса Ad5-Δ24-RGD, модифицированного RGD и способного реплицироваться в клетках, в которых отсутствует сигнальный путь Rb/p16 [5].

Обнадеживающие результаты уже завершённых и проводимых в настоящее время клинических исследований позволяют надеяться на то, что в ближайшее время появятся лекарственные средства на основе опухолеспецифических пептидов.

Использование пептидов в генной терапии

Опухолеспецифические пептиды активно используются в качестве адресующих составляющих при создании направленных генно-терапевтических препаратов. Например, встроенные в мембрану липосомы, «нагруженные» нуклеиновой кислотой пептиды обеспечивают дополнительную адресацию структур доставки. В работе Yang Z. и соавт. в состав липосом были включены два рецепторспецифических пептида: Angioper и tLyP-1. Angioper специфичен к рецептору липопротеинов низкой плотности, экспрессия которого повышена на структурах гематоэнцефа-

лического барьера. tLyP-1 специфичен к рецептору нейролипина-1, он эффективно проникает в паренхиму опухоли. Такие модифицированные липосомы, «нагруженные» миРНК, подавляющей экспрессию гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGF siРНК), эффективно трансфицировали клетки глиобластомы человека U87MG в системе *in vitro* и снижали экспрессию гена-мишени. В системе *in vivo* на глиобластоме U87MG в модели ксенографтов показана противоопухолевая активность созданных модифицированных липосом [65].

Вектор на основе адено-ассоциированного вируса (AAV), в капсид которого встроен пептид, отобранный из фаговой пептидной библиотеки и содержащий NGR-мотив, обладал способностью адресно доставлять генетическую информацию к CD13+ клеткам-мишеням. Рецептор CD13 экспрессируется на клетках эндотелия новообразованных сосудов и многих раковых клетках, таким образом, пептиды, содержащие NGR-мотив, могут использоваться как опухолеадресующие агенты [66].

В качестве средства направленной генной терапии также могут применяться генетически модифицированные бактериофаги, экспонирующие адресные пептиды в составе одного из своих поверхностных белков. К важным преимуществам бактериофагов относятся их безопасность для человека, высокая стабильность фаговых частиц и «пластичность» генома для конструирования [67, 68].

Одна из первых работ, доказавшая возможность направленной генной терапии с помощью модифицированных бактериофагов, выполнена на нитчатом бактериофаге, в состав минорного белка рIII которого был введен фактор роста фибробластов (FGF2). В качестве репортерного гена использовали ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) под ранним промотором цитомегаловируса (CMV). Модифицированные бактериофаги специфически проникали только в те клетки, на поверхности которых экспрессировался рецептор FGF2, и интернализировались внутрь клетки. При этом наблюдалась экспрессия репортерного гена и синтез GFP [69]. Таким образом, бактериофаг, несмотря на отсутствие тропизма к клеткам человека, может быть модифицирован таким образом, что приобретает специфичность к определенному типу клеток и способность доставлять чужеродный генетический материал.

Бактериофаг M13, экспрессирующий опухолеспецифический пептид RGD4C, использовали для доставки трансгенной кассеты, регулируемой промотором CMV и фланкированной инвертированными концевыми повторами AAV2. Для улучшения трансфекционных свойств фаговые частицы модифицировали катионными полимерами. Модифицированные

фаговые частицы обладали более высокой противоопухолевой активностью по сравнению с немодифицированными [70].

Наконец, опухолеспецифический пептид можно ковалентно присоединить к терапевтической нуклеиновой кислоте для ее доставки к мишени. Например, изучали возможность доставки миРНК VEGFR2, ковалентно связанной с адресным пептидом cRGD. cRGD специфически связывается с $\alpha\beta 3$ -рецепторами, которые экспрессируются с высокой плотностью на эндотелии опухолевых сосудов и самих клетках опухоли. Показано, что ковалентный комплекс cRGD-миРНК специфически проникает в $\alpha\beta 3$ -позитивные клетки HUVEC и вызывает «выключение» гена-мишени. В экспериментах *in vivo* на мышях с иммунодефицитом и привитой опухолью рака легкого A549 выявлен специфический противоопухолевый эффект рассмотренных конструкций [71].

Полученные положительные результаты позволяют рассматривать опухолеспецифические пептиды в качестве перспективной платформы для создания средств направленной генной терапии.

Адресные пептиды в диагностике заболеваний

Пептиды, специфически связывающиеся с определенными органами и тканями, клетками и сосудами опухолей, могут быть использованы для характеристики культур клеток, визуализации определенных структур (в том числе опухолей) *in vivo* и диагностики заболеваний [72].

Например, RGD-пептид, конъюгированный с FITC, используют в экспериментах *in vitro* для оценки уровня экспрессии интегринов $\alpha\beta 3$ на различных раковых клетках в культуре. Окрашивание биоптатов опухолей человека, заключенных в парафин, с помощью FITC-RGD позволяет оценить $\alpha\beta 3$ -профиль опухолевой ткани. Этот метод окрашивания гораздо проще и дешевле, чем окрашивание с помощью антител к $\alpha\beta 3$ -рецепторам [73].

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) – радионуклидный томографический метод диагностического исследования. В основе этого метода лежит детекция распределения в организме соединений (радиофармацевтиков), меченных позитронизлучающими радиоизотопами. В качестве белковых меток в ПЭТ применяют в основном природные пептиды (бомбезин, соматостатин) [74]. Опухолеспецифические пептиды также могут использоваться в качестве направляющих агентов для доставки радионуклидных меток при диагностике злокачественных новообразований. В настоящее время клинические испытания проходят новые радиофармацевтики, созданные на основе RGD-пептида [75].

Другой радиофармацевтик для ПЭТ создан на основе меченного ^{64}Cu NGR-содержащего пептида, специфичного к рецептору CD13. Этот препарат связывался с CD13⁺ клетками HT-1080 и не проявлял тропности к CD13⁻ клеткам MCF-7 в экспериментах *in vitro*. Результаты опытов *in vitro* подтверждены в системе *in vivo* с использованием ксенорафтов опухолей HT-1080 и MCF-7 [76].

Опухолеспецифические пептиды могут быть конъюгированы не только с радионуклидами, но и с другими диагностическими препаратами, например, с парамагнетиками для проведения МРТ (магнитно-резонансная томография) или ОФЭКТ (однофотонная эмиссионная компьютерная томография) или с флуоресцентными красителями в случае ФОТ (флуоресцентная оптическая томография) [74]. Такие конъюгаты избирательно накапливаются в опухоли в концентрациях, значительно превышающих их концентрацию в других органах, тем самым усиливая сигнал, детектируемый прибором.

Таким образом, опухолеспецифические пептиды обладают значительным потенциалом для усовершенствования уже существующих технологий диагностики и визуализации опухолевых структур.

Пептиды – адресные агенты для доставки лекарственных препаратов

Один из примеров использования опухолеспецифических пептидов для доставки проапоптотических белков – белок, объединяющий проапоптотический пептид KLAК и адресный пептид RGD. RGD-мотив в составе пептида узнает интегриновые рецепторы, которые в большом количестве экспрессируются на новообразованных сосудах и раковых клетках [77]. Полученный бифункциональный белок специфически связывается с клетками-мишенями (клетки эндотелия опухоли), проникает внутрь клеток и индуцирует в них апоптоз по митохондриальному пути [78].

В качестве адресного агента для доставки проапоптотического белка KLA был предложен также пептид M2per, который специфически связывается с опухоль-ассоциированными макрофагами и макрофагами M2 мыши [79]. Опухоль-ассоциированные макрофаги играют важную роль в развитии опухоли, стимулируя рост опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование, и способствуют развитию лекарственной устойчивости [80]. Полученный рекомбинантный белок M2perKLA тормозил развитие опухоли и сокращал популяцию опухоль-ассоциированных макрофагов [79].

При селекции пептидов с помощью пептидной фаговой библиотеки на основе фага T7 был отобран пептид CRGDKGPDC (iRGD), объединяющий свой-

ства двух мотивов – RGD (интегринсвязывающий) и R/KXXR/K (нейропилин (NRP)-связывающий) [81, 82]. RGD направляет пептид к опухоли, а R/KXXR/K увеличивает проницаемость сосудов опухоли и повышает эффективность доставки лекарственных агентов в паренхиму опухоли через сосудистый барьер. Кроме того, iRGD ингибирует спонтанное метастазирование у мышей. При этом антиметастатическая активность обеспечивается нейропилинсвязывающим RXXK, а не интегринсвязывающим RGD-мотивом [83]. Такие пептиды, обладающие адресующими свойствами и одновременно способные глубоко проникать в паренхиму опухоли, образуют отдельный класс пептидов – CPHP (cell penetrating homing peptides) [84].

Показано, что конъюгат iRGD с противоопухолевым препаратом абраксаном (стабилизированный альбумином паклитаксел) увеличивает эффективность действия абраксана и значительно снижает общую токсичность препарата [85, 82]. Кроме того, оказалось, что совместное введение iRGD-пептида с различными лекарственными препаратами (доксорубин, абраксан, липосомы с доксорубином, трастузумаб) увеличивает эффективность проникновения лекарственных средств в паренхиму опухоли и их терапевтический индекс [86].

Таким образом, короткие адресные пептиды, отобранные из фаговых библиотек, находят все большее применение как в диагностике, так и в клинической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скрининг фаговых пептидных библиотек – быстрый и удобный метод получения органо-, ткане- и опухолеспецифических пептидов. Безопасность бактериофагов для человека и простота манипуляций с ними позволили получить огромное количество разнообразных адресных пептидных лигандов. Некоторые из них проходят клинические испытания, причем

как в качестве самостоятельных терапевтических средств, так и в качестве агентов, доставляющих лекарственные препараты к органам и тканям-мишеням.

Большой интерес вызывает возможность применения опухоль-адресованных пептидов в диагностике и терапии злокачественных новообразований. Небольшие размеры адресных пептидов позволяют им глубоко проникать в паренхиму опухоли, что важно для таргетной терапии [87, 88]. Короткие пептиды практически неиммуногенны, что делает их безопасными для клинического применения [89]. Пептиды можно легко модифицировать, например, защитой N- и C-концов от протеолитической деградациии [87]. Химический синтез коротких пептидов гораздо дешевле производства моноклональных антител и рекомбинантных белков, а конечный продукт не требует дополнительной очистки от компонентов клеточной стенки бактерий или плазматической мембраны эукариот [90].

Опухолеспецифические пептиды являются «ключами» к огромному массиву информации об изменениях, происходящих в клетке при канцерогенезе, о механизмах, обеспечивающих выживаемость, пролиферацию и метастазирование раковых клеток. Идентификация мишеней таких пептидов представляет очень важную, но часто достаточно нетривиальную задачу. При этом опухолеспецифический лиганд может быть использован для адресной доставки диагностических и лекарственных средств даже при отсутствии информации о мишени. ●

Работа поддержана Минобрнауки России (ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 14.607.21.0063, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0063).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wicki A., Witzigmann D., Balasubramanian V., Huwyler J. // J. Control Release. 2015. V. 200. P. 138–157.
2. Ruoslahti E. // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. № 2. P. 83–90.
3. Arachchige M.C., Reshetnyak Y.K., Andreev O.A. // J. Biotechnol. 2015. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.009.
4. Smith G.P. // Science. 1985. V. 228. № 4705. P. 1315–1317.
5. Bábíčková J., Tóthová L., Boor P., Celec P. // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. № 8. P. 1247–1259.
6. Nicastro J., Sheldon K., Slavcev R.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 7. P. 2853–2866.
7. Gamkrelidze M., Dąbrowska K. // Arch. Microbiol. 2014. V. 196. № 7. P. 473–479.
8. Teesalu T., Sugahara K.N., Ruoslahti E. // Meth. Enzymol. 2012. V. 503. P. 35–56.
9. Ebrahimizadeh W., Rajabibazl M. // Curr. Microbiol. 2014. V. 69. № 2. P. 109–120.
10. Rakonjac J., Bennett N.J., Spagnuolo J., Gagic D., Russel M. // Curr. Issues Mol. Biol. 2011. V. 13. № 2. P. 51–76.
11. King A.M.Q., Adams M.J., Lefkowitz E.J. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2012.
12. Marvin D.A., Symmons M.F., Straus S.K. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2014. V. 114. № 2. P. 80–122.
13. Fagerlund A., Myrset A.H., Kulseth M.A. // Meth. Mol. Biol. 2014. V. 1088. P. 19–33.

14. Rakonjac J., Feng Jn., Model P. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 289. № 5. P. 1253–1265.
15. Hoffmann-Thoms S., Weininger U., Eckert B., Jakob R.P., Koch J.R., Balbach J., Schmid F.X. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 18. P. 12979–12991.
16. Zeri A.C., Mesleh M.F., Nevzorov A.A., Opella S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 11. P. 6458–6463.
17. Marvin D.A., Welsh L.C., Symmons M.F., Scott W.R., Straus S.K. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 355. № 2. P. 294–309.
18. Iannolo G., Minenkova O., Petruzzelli R., Cesareni G. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 248. № 4. P. 835–844.
19. Kay B.K., Kasanov J., Yamabhai M. // *Methods.* 2001. V. 24. № 3. P. 240–246.
20. Bratkovic T. // *Cell Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. № 5. P. 749–767.
21. Gupta A., Shrivastava N., Grover P., Singh A., Mathur K., Verma V., Kaur C., Chaudhary V.K. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. e75212.
22. Qi H., Lu H., Qiu H.J., Petrenko V., Liu A. // *J. Mol. Biol.* 2012. V. 417. № 3. P. 29–43.
23. Prisco A., De Berardinis P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. № 4. P. 5179–5194.
24. Sartorius R., Bettua C., D'Apice L., Caivano A., Trovato M., Russo D., Zanoni I., Granucci F., Mascolo D., Barba P., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2011. V. 41. № 9. P. 2573–2584.
25. Samoylova T.I., Norris M.D., Samoylov A.M., Cochran A.M., Wolfe K.G., Petrenko V.A., Cox N.R. // *J. Virol. Meth.* 2012. V. 183. № 1. P. 63–68.
26. Parmley S., Smith G. // *Gene.* 1988. V. 73. P. 305–318.
27. Hamzeh-Mivehroud M., Alizadeh A.A., Morris M.B., Church W.B., Dastmalchi S. // *Drug Discov. Today.* 2013. V. 18. № 23–24. P. 1144–1157.
28. Ayat H., Burrone O.R., Sadghizadeh M., Jahanzad E., Rastgou N., Moghadasi S., Arbabi M. // *Biologicals.* 2013. V. 41. № 6. P. 345–354.
29. Brunet E., Chauvin C., Choumet V., Jestin J.L. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 9. e40.
30. Sundell G.N., Ivarsson Y. // *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014:176172.
31. Azzazy H.M., Highsmith W.E. Jr. // *Clin. Biochem.* 2002. V. 35. № 6. P. 425–445.
32. Pande J., Szweczyk M.M., Grover A.K. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 6. P. 849–858.
33. Derda R., Tang S.K., Li S.C., Ng S., Matochko W., Jafari M.R. // *Molecules.* 2011. V. 16. № 2. P. 1776–1803.
34. Noren K.A., Noren C.J. // *Methods.* 2001. V. 23. № 2. P. 169–178.
35. Lang Q., Wang F., Yin L., Liu M., Petrenko V.A., Liu A. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 5. P. 2767–2774.
36. Bedi D., Gillespie J.W., Petrenko V.A. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2014. V. 27. № 7. P. 235–243.
37. Guo Z., Wang X., Li H., Gao Y. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. e76622.
38. Kuramoto K., Yamasaki R., Shimizu Y., Tatsukawa H., Hito-mi K. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2013. V. 537. № 1. P. 138–143.
39. Frascione N., Codina-Barrios A., Bassindale A.R., Taylor P.G. // *Dalton Trans.* 2013. V. 42. № 28. P. 10337–10346.
40. Wang W., Chen X., Li T., Li Y., Wang R., He D., Luo W., Li X., Wu X. // *Exp. Cell Res.* 2013. V. 319. № 8. P. 1156–1164.
41. Krumpel L.R., Mori T. // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2006. V. 12. № 1. P. 79–91.
42. Rangel R., Dobroff A.S., Guzman-Rojas L., Salmeron C.C., Gelovani J.G., Sidman R.L., Pasqualini R., Arap W. // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 10. P. 1916–1939.
43. Pilch J., Brown D.M., Komatsu M., Järvinen T.A., Yang M., Peters D., Hoffman R.M., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 8. P. 2800–2804.
44. Pasqualini R., Ruoslahti E. // *Nature.* 1996. V. 380. № 6572. P. 364–366.
45. Wan X.M., Chen Y.P., Xu W.R., Yang W.J., Wen L.P. // *Peptides.* 2009. V. 30. № 2. P. 343–350.
46. Chen H., Chen C.C., Acosta C., Wu S.Y., Sun T., Konofagou E.E. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 10. e108880.
47. Smith M.W., Al-Jayyousi G., Gumbleton M. // *Peptides.* 2012. V. 38. № 1. P. 172–180.
48. Akita N., Maruta F., Seymour L.W., Kerr D.J., Parker A.L., Asai T., Oku N., Nakayama J., Miyagawa S. // *Cancer Sci.* 2006. V. 97. № 10. P. 1075–1081.
49. Chen Y., Shen Y., Guo X., Zhang C., Yang W., Ma M., Liu S., Zhang M., Wen L.P. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 4. P. 455–460.
50. Lee N.K., Kim H.S., Kim K.H., Kim E.B., Cho C.S., Kang S.K., Choi Y.J. // *J. Drug Target.* 2011. V. 19. № 9. P. 805–813.
51. Zou J., Dickerson M.T., Owen N.K., Landon L.A., Deutscher S.L. // *Mol. Biol. Rep.* 2004. V. 31. № 2. P. 121–129.
52. Molenaar T.J., Michon I., de Haas S.A., van Berkel T.J., Kuiper J., Biessen E.A. // *Virology.* 2002. V. 293. № 1. P. 182–191.
53. Arap W., Kolonin M.G., Trepel M., Lahdenranta J., Cardó-Vila M., Giordano R.J., Mintz P.J., Ardelit P.U., Yao V.J., Vidal C.I., et al. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. № 2. P. 121–127.
54. Zurita A.J., Troncoso P., Cardó-Vila M., Logothetis C.J., Pasqualini R., Arap W. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 2. P. 435–439.
55. Staquicini F.I., Cardó-Vila M., Kolonin M.G., Trepel M., Edwards J.K., Nunes D.N., Sergeeva A., Efstathiou E., Sun J., Almeida N.F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 46. P. 18637–18642.
56. Laakkonen P., Porkka K., Hoffman J.A., Ruoslahti E.A. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. № 7. P. 751–755.
57. Perea S.E., Reyes O., Baladron I., Perera Y., Farina H., Gil J., Rodriguez A., Bacardi D., Marcelo J.L., Cosme K., et al. // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 316. № 1–2. P. 163–167.
58. Bai F., Liang J., Wang J., Shi Y., Zhang K., Liang S., Hong L., Zhai H., Lu Y., Han Y. // *J. Mol. Med. (Berl.)* 2007. V. 2. P. 169–180.
59. Kang J., Zhao G., Lin T., Tang S., Xu G., Hu S., Bi Q., Guo C., Sun L., Han S., et al. // *Cancer Lett.* 2013. V. 339. № 2. P. 247–259.
60. Dai X., Cai C., Xiao F., Xiong Y., Huang Y., Zhang Q., Xiang Q., Lou G., Lian M., Su Z., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 445. № 4. P. 795–801.
61. Wang H., Wang H., Liang J., Jiang Y., Guo Q., Peng H., Xu Q., Huang Y. // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. № 10. P. 3352–3360.
62. Stupp R., Weller M. // *Curr. Opin. Neurol.* 2010. V. 23. № 6. P. 553–555.
63. D'Onofrio N., Caraglia M., Grimaldi A., Marfella R., Servillo L., Paolisso G., Balestrieri M.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1846. № 1. P. 1–12.
64. Corti A., Ponzoni M. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1028. P. 104–112.
65. Yang Z., Xiang B., Dong D., Wang Z., Li J., Qi X. // *Curr. Gene Ther.* 2014. V. 14. № 4. P. 289–299.
66. Grifman M., Trepel M., Speece P., Gilbert L.B., Arap W., Pasqualini R., Weitzman M.D. // *Mol. Ther.* 2001. V. 3. № 6. P. 964–975.
67. Larocca D., Burg M.A., Jensen-Pergakes K., Ravey E.P., Gonzalez A.M., Baird A. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2002. V. 3. № 1. P. 45–57.
68. Shoaie-Hassani A., Keyhanvar P., Seifalian A.M., Mortazavi-Tabatabaei S.A., Ghaderi N., Issazadeh K., Amirmozafari N., Verdi J. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 11. e79907.
69. Larocca D., Kassner P.D., Witte A., Ladner R.C., Pierce G.F., Baird A. // *FASEB J.* 1999. V. 13. № 6. P. 727–734.

70. Yata T., Lee K.Y., Dharakul T., Songsivilai S., Bismarck A., Mintz P.J., Hajitou A. // *Mol. Ther. Nucl. Acids*. 2014. V. 3. e185.
71. Liu X., Wang W., Samarsky D., Liu L., Xu Q., Zhang W., Zhu G., Wu P., Zuo X., Deng H., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 42. № 18. P. 11805–11817.
72. Bakhshinejad B., Sadeghzadeh M. // *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2014. V. 11. № 10. P. 1561–1574.
73. Ji S., Zheng Y., Czerwinski A., Valenzuela F., Pennington M., Liu S. // *Bioconjug. Chem.* 2014. V. 25. № 11. P. 1925–1941.
74. Reubi J.C., Maecke H.R. // *J. Nucl. Med.* 2008. V. 49. № 11. P. 1735–1738.
75. Haubner R., Maschauer S., Prante O. // *Biomed. Res. Int.* 2014. 2014:871609.
76. Li G., Wang X., Zong S., Wang J., Conti P.S., Chen K. // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. P. 3938–3946.
77. Li Z.J., Cho C.H. // *J. Transl. Med.* 2012. V. 10. Suppl 1. S1.
78. Ellerby H.M., Arap W., Ellerby L.M., Kain R., Andrusiak R., Rio G.D., Krajewski S., Lombardo C.R., Rao R., Ruoslahti E., et al. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 9. P. 1032–1038.
79. Cieslewicz M., Tang J., Yu J.L., Cao H., Zavaljevski M., Motoyama K., Lieber A., Raines E.W., Pun S.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 10. № 40. P. 15919–15924.
80. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. // *Nature.* 2008. V. 454. № 7203. P. 436–444.
81. Teesalu T., Sugahara K.N., Kotamraju V.R., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 38. P. 16157–16162.
82. Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P. // *Cancer Cell.* 2009. V. 16. № 6. P. 510–520.
83. Sugahara K.N., Braun G.B., de Mendoza T.H., Kotamraju V.R., French R.P., Lowy A.M., Teesalu T., Ruoslahti E. // *Mol. Cancer Ther.* 2015. V. 14. № 1. P. 120–128.
84. Svensen N., Walton J.G., Bradley M. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2012. V. 33. № 4. P. 186–192.
85. Wang X., Li S., Shi Y., Chuan X., Li J., Zhong T., Zhang H., Dai W., He B., Zhang Q. // *J. Control. Release.* 2014. V. 193. P. 139–153.
86. Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P., Kotamraju V.R., Agemy L., Greenwald D.R., Ruoslahti E. // *Science.* 2010. V. 328. P. 1031–1035.
87. Aina O.H., Sroka T.C., Chen M.L., Lam K.S. // *Biopolymers.* 2002. V. 66. № 3. P. 184–199.
88. Gao H., Xiong Y., Zhang S., Yang Z., Cao S., Jiang X. // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. № 3. P. 1042–1052.
89. Brown K.C. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. № 9. P. 1040–1054.
90. Laakkonen P., Vuorinen K. // *Integr. Biol. (Camb).* 2010. V. 2. № 7–8. P. 326–337.