



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК,
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А. Н. БАХА

Н. П. Акентьева, А. Ф. Топунов

РОЛЬ ПЕПТИДОВ В ТЕРАНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Москва
2021

УДК 576, 576.3, 577, 577.1, 61, 615.
ББК 28, 52.8
А38

Акентьева Н. П., Топунов А. Ф.

А38 Роль пептидов в тераностике онкологических заболеваний: монография /
Н. П. Акентьева, А. Ф. Топунов. – М.: РАН, 2021. – 172 с.

В монографии рассматриваются вопросы, связанные с ролью пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний. Значительное внимание уделено исследованию RНАММ-таргет-пептидов, их влиянию на жизнеспособность, пролиферацию, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток молочной и предстательной желез и рака яичников. Книга рассчитана на врачей различного профиля, научных сотрудников, преподавателей и студентов вузов медицинских и биологических специальностей.

ISBN 978-5-907366-48-0

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение.....	7
Глава 1. Роль пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний.....	9
1.1. Опухоль-таргетные пептиды.....	15
1.2. Антимикробные пептиды.....	22
1.3. Клеточно-проникающие пептиды.....	27
1.4. Клеточно-проникающие пептиды и доставка противоопухолевых препаратов.....	28
Глава 2. Общая характеристика системы RHAMM/ГК.....	33
2.1. Гиалуроновая кислота: структура, свойства и роль в онкогенезе.....	33
2.2. RHAMM: свойства, структура, область связывания с ГК и тубулином.....	38
2.3. ГК и RHAMM – мишени для терапии онкологических заболеваний.....	44
Глава 3. Таргетинг RHAMM для лечения раковых заболеваний.....	48
3.1. RHAMM-пептиды, используемые в качестве вакцин.....	48
3.2. Рекombинантные пептиды, RHAMM-миметики.....	51
3.3. Пептиды, ГК-миметики, связывающиеся с RHAMM.....	51
Глава 4. Идентификация, дизайн и синтез пептидов, специфично связывающихся с RHAMM/HMMR.....	52
4.1. BLAST-поиск и сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков.....	52
4.2. Синтез пептидов.....	55
4.3. Получение и очистка рекombинантного RHAMM-СТ-белка.....	58
4.4. Анализ специфичности связывания пептидов с RHAMM-СТ.....	60
4.4.1. Анализ связывания пептидов-лигандов с RHAMM-СТ с помощью поверхностного плазмонного резонанса.....	60
4.4.2. Анализ связывания FITC-пептидов с RHAMM-СТ.....	64
4.4.3. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности пептидов.....	64
4.4.4. Анализ конкурентного связывания FITC-пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ.....	65
4.4.5. Анализ связывания гликозаминогликанов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ.....	66
4.4.6. Анализ связывания пептидов с CD44 и RHAMM-СТ.....	67
4.5. Анализ стабильности пептидов.....	68
Глава 5. Взаимодействие FITC-пептидов с клетками.....	70
5.1. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака молочной железы.....	70
5.2. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака предстательной железы.....	72
5.3. Исследование интернализации RHAMM-таргет-пептидов с RHAMM ^(-/-) -фибробластами и RHAMM ^(+/+) -фибробластами.....	74

Глава 6. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на клетки рака молочной железы.....	76
6.1. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на выживаемость клеток рака молочной железы	76
6.2. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной железы	77
6.3. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на активность каспаз 3/7	80
Глава 7. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на инвазивность клеток рака молочной железы	82
7.1. Анализ инвазивности опухолевых клеток MDA-MB-231 во времени	82
7.2. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток рака	
молочной железы.....	84
7.3. Анализ гетерогенности популяции клеток MDA-MB-231	
в процессе развития инвазивности	85
7.4. Морфологические изменения актина в клетках РМЖ	
при обработке RHAMM-таргет-пептидами	87
Глава 8. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на жизнеспособность клеток рака предстательной железы	90
8.1. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы	91
8.2. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов	
на активность каспаз 3/7 в клетках рака предстательной железы	92
8.3. Изучение связывания пептидов (FITC-GE GEEGEE	
и FITC-DFGEEAEE) с клетками рака предстательной железы	93
8.4. Сравнительный анализ инвазивности клеток рака предстательной	
железы, мышинных эмбриональных фибробластов и клеток меланомы кожи	96
8.5. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток РПЖ.....	98
Глава 9. Визуализация клеток рака яичников	
с помощью пептида VEGEGEEEGEEY	100
9.1. Связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников.....	100
9.2. Связывание VEGEGEEEGEEY-пептида с RHAMM	
на поверхности клеток рака яичников.....	102
Глава 10. Исследование влияния пептида RYQLHPYR	
на жизнеспособность клеток рака предстательной железы	105
10.1. Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток рака	
предстательной железы.....	106
10.2. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз 3/7	107
10.3. Исследование влияния пептида RYQLHPYR	
на инвазивность клеток РПЖ.....	108
10.4. Влияние RHAMM-таргет-пептидов на рост опухоли	
у ксенографтов (мышинная опухолевая модель).....	110
Заключение.....	112
Выводы.....	129
Рекомендации по использованию научных выводов	
и перспективы научных исследований.....	131
Список научных публикаций авторов	132
Список литературы	135

Список сокращений

BCA	– бычий сывороточный альбумин.
PBS	– фосфатно-солевой буфер (от англ. phosphate sodium buffer).
pNA	– фенил-нитроанилид (от англ. phenyl-nitroanilide).
DAPI	– 4,6-диамидино-2-фенилиндо́л (от англ. 4,6-diamidino-2-phenyl-indole).
FITC	– флуоресцеина изотиоцианат (от англ. Fluorescein isothiocyanate).
Cy5.5	– флуоресцентный краситель, цианин 5 (от англ. Cyanine 5).
FBS	– эмбриональная телячья сыворотка (от англ. Fetal Bovine Serum).
PMЖ	– рак молочной железы.
ППЖ	– рак предстательной железы.
DMEM	– модифицированная по способу Дульбекко ростовая среда (от англ. Dulbecco's modified Eagle's medium).
ELISA	– иммуноферментный анализ (от англ. Enzyme-linked immunosorbent assay).
TMB	– 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (от англ. 3,3',5,5'-tetramethylbynzidine).
RHAMM/ HMMR	– рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности (от англ. Receptor for hyaluronan mediated motility/Hyaluronan-mediated motility receptor).
ГК	– гиалуроновая кислота (от англ. hyaluronic acid).
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография.
SPR	– поверхностный плазмонный резонанс (от англ. Surface plasmon resonance).
ESI-MS	– электроспрей-ионизационная масс-спектрометрия (от англ. Electrospray ionization mass spectrometry).
ECM	– внеклеточный матрикс (от англ. Extra cellular matix).
FcR	– иммуноглобулин-подобный рецептор (от англ. Fragment crystallizable region).
Fmoc	– твердофазный пептидный синтез (от англ. Fmoc deprotection and amino acid coupling Cycles).
AMP	– антимикробные пептиды (от англ. Antimicrobial peptides).
CPP	– клеточно-проникающие пептиды (от англ. Cell-penetrating peptides).
TTP	– опухоль-таргетные пептиды (от англ. Tumor-targeting peptides).
Dox	– доксорубицин.
ПЭГ	– полиэтиленгликоль.
AlamarBlue	– реагент резазурин (от англ. Resazurin).

MAP	– белки, ассоциированные с микротрубочками (от англ. Microtubules associated proteins).
MAPK	– киназа, связанная с микротрубочками (от англ. Microtubule associated protein kinase).
АФК	– активные формы кислорода.
FDA	– Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (от англ. U.S. Food and Drug Administration).
HEPES-буфер	(от англ. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid).
EDAC	– 1-этил-3-диметиламинопропилкарбодиимид (от англ. 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide, Hydrochloride).
сульфо-NHS	– N-Гидроксисукцинимид (от англ. N-hydroxysulfosuccinimide).
4-MU	– 4-метилумбеллиферон (от англ. 4-methylumbelliferone).
IPTG	– изопропилтио-β-D-галактопиранозид (от англ. Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside).
HYAL1, HYAL2	– гиалуронидазы 1, 2 (от англ. Hyaluronidase).
HAS1, HAS2, HAS3	– гиалурон-синтазы 1, 2, 3 (от англ. Hyaluronan synthases).
MEF	– мышинные эмбриональные фибробласты (от англ. Mouse Embryonic Fibroblasts).
SEREX	– серологический скрининг библиотек экспрессии кДНК (от англ. Serological analysis of expression cDNA libraries).
ПЭТ	– позитронно-эмиссионная томография (от англ. Positron emission tomography).
MPT	– магнитно-резонансная томография (от англ. Magnetic resonance tomography).
BrdU	– бромдезоксипуридин (от англ. Bromodeoxyuridine).
TNF	– фактор некроза опухоли (от англ. Tumor necrosis factor, cachexin).
SST	– соматостатин (от англ. Somatostatin).
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов (от англ. Vascular endothelial growth factor).
TAT	– пептид, получен из трансаактиватора транскрипции вируса иммунодефицита человека (от англ. transactivator of transcription).
HNP1, HNP2, HNP3	– альфа-дефензины (от англ. Alpha defensins).
ZIP	– лейциновая застежка-молния (от англ. leucine zipper).
bZIP	– основная область лейциновой застежки-молнии (от англ. Basic-region leucine zipper).
UDP	– уридин дифосфат (от англ. Uridine diphosphate).
ТФК	– трифторуксусная кислота.

Введение

Частота возникновения онкологических заболеваний в мире растет в геометрической прогрессии. Согласно статистике, смертность от раковых заболеваний составила 40% от общего количества смертей к 2020 году [1]. Кроме того, лечение онкологических заболеваний является крайне дорогостоящим. Несмотря на определенные успехи в лечении раковых заболеваний, основной проблемой в онкологии является отсутствие селективности противоопухолевых препаратов. Поэтому разработка способов для таргетной терапии раковых заболеваний является самой актуальной и активно развивающейся областью биомедицины.

Таргетная, адресная химиотерапия позволяет избирательно и эффективно локализовать препарат на молекулярных мишенях в клетке (например, на рецепторах), в то же время ограничить его доступ к нормальной клетке и, таким образом, получить максимальный терапевтический эффект и снизить токсичность препарата. На протяжении последних лет использование пептидов как перспективных терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний стремительно растет. Терапевтические пептиды завоевывают все большую популярность для применения в медицине в различных аспектах, в том числе в виде противоопухолевых вакцин, антимикробной терапии, лечении рака или доставки нуклеиновых кислот [2–9]. Недавно установлено, что антимикробный пептид низин обладает противоопухолевой активностью, низин индуцирует апоптоз и подавляет пролиферацию клеток астероцитомы человека (SW1088) [10]. В ходе исследований было выявлено, что пептиды имеют разную физиологическую активность и различный эффект действия на опухолевые клетки. Многие природные и синтетические «проапоптотические» пептиды индуцируют ферменты апоптоза и вызывают гибель клеток. Например, катионный антимикробный пептид, выделенный из бразильского тарангула, обладает не только бактериостатическими свойствами, но также проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* [11]. Так называемые «клеточно-проникающие пептиды» усиливают эффект химиотерапевтических препаратов, в то же время «мембранно-литические», катионные антимикробные пептиды, разрушают мембраны раковых клеток [12–16]. Недавно показано, что пептиды, выделенные из австралийской лягушки, ингибируют деление клеток рака молочной железы [17]. Химерные пептиды проявляют противоопухолевую активность и понижают множественную лекарственную устойчивость опухолей [18]. Известно, что клеточно-проникающий пептид dNP2 может ускорять накопление противоопухолевых препаратов в клетке и тем самым повышать эффективность лечения рака [19].

Известно, что под воздействием различных неблагоприятных факторов нормальная клетка может перерождаться в раковую клетку, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии рецепторов, белков или ферментов, являющихся молекулярными мишенями опухолевой клетки. Существует категория противоопухолевых пептидов (пептиды-антагонисты), которые преимущественно связываются с известным рецептором и модулируют его

активность, активируют или блокируют его функции и тем самым влияют на процессы развития и прогрессии рака [20–26]. В качестве примера можно привести белок 2 (Grb²), связанный с рецептором фактора роста. Этот белок 2 (Grb²) представляет собой белок-адаптер, который в значительной степени вовлечен в опухолевые новообразования, и блокирование этого белка пептидами приводит к подавлению роста опухоли [27]. В последнее время эфрин-рецепторы киназной системы также привлекают все большее внимание как основной класс потенциальных мишеней для лекарств [28]. Были идентифицированы пептиды, которые специфично связываются с эфрин-рецепторами с высоким сродством [29]. Эти пептиды, как правило, являются антагонистами, которые ингибируют связывание эфрина и передачу сигналов на эфрин-рецептор, но некоторые являются агонистами, имитирующими активацию эфрин-рецептора [30]. Помимо модуляции функции эфрин-рецептора такие пептиды могут служить в качестве диагностических и терапевтических средств, а также для доставки различных наночастиц в опухоли и другие пораженные ткани, представляющие мишени эфрин-рецепторов [31, 32]. Пептиды-антагонисты имеют большие перспективы, потому что основной механизм их действия нацелен на конкретную молекулярную мишень опухолевых клеток, что приводит к их гибели. Поэтому идентификация таких пептидов, изучение молекулярных механизмов их взаимодействия с рецепторами в опухолевых клетках является на сегодня актуальной задачей.

RHAMM/HMMR-онкорепцептор (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности) является такой молекулярной мишенью для диагностических, прогностических и терапевтических целей в области лечения онкологических заболеваний. В настоящее время установлено, что RHAMM-рецептор синтезируется в избытке в метастатических агрессивных опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. В ряде работ было показано, что повышенное содержание RHAMM-рецептора наблюдается в клетках рака молочной и предстательной желез, толстой кишки, в солидных опухолях и в клетках рака крови, при миелоидном лейкозе, множественной миеломе и что обычно повышенный синтез RHAMM-рецептора коррелирует с плохим прогнозом [33–36]. Поиск RHAMM-таргет-пептидов, селективно блокирующих RHAMM-рецептор и его сигнальные пути, является одним из перспективных подходов для лечения онкологических заболеваний. Пептиды-антагонисты, способные блокировать центр связывания гиалуроновой кислоты (ГК) на RHAMM-рецепторе, представляют собой новую стратегию противоопухолевой терапии, направленную на индукцию процессов апоптоза, некроза и ингибирование жизнеспособности, инвазивности опухолевых клеток.

Предлагаемая читателю монография посвящена обобщению результатов многолетних исследований, направленных на идентификацию и дизайн пептидов-антагонистов, способных модулировать активность RHAMM-онкорепцептора и тем самым понижать выживаемость опухолевых клеток и блокировать развитие опухоли на самой ранней стадии. Исследования, которым посвящена монография, вносят вклад в развитие представлений о роли RHAMM-рецептора и RHAMM-таргет-пептидов в регуляции таких процессов, как выживаемость, пролиферация, рост, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток.

Глава 1. Роль пептидов в диагностике и терапии онкологических заболеваний

Онкологические заболевания занимают второе место в мире по вызываемой ими смертности после сердечно-сосудистых заболеваний. Злокачественные новообразования все еще являются серьезной проблемой для научного и медицинского сообщества.

Рак – это не отдельное заболевание, а группа заболеваний, характеризующихся нерегулируемым ростом аномальных клеток. Движущей силой этого неконтролируемого роста является ряд мутаций, которые вызывают aberrантную экспрессию генных продуктов, необходимых для регуляции пролиферации, выживания и роста клеток. Следовательно, рак возникает из-за дефектов самых основных биологических функций клеток: способности реагировать на сигналы роста, задействовать программы гибели клеток для устранения ненужных, избыточных или поврежденных клеток, а также образование новых кровеносных сосудов и способности проникать в ткани. Задача, стоящая перед клиницистами и исследователями, которые ищут эффективные терапевтические подходы для лечения онкологических заболеваний, заключается в устранении раковых клеток при сохранении нормальной, здоровой ткани.

В настоящее время рак предстательной железы – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований у мужчин. В России заболеваемость раком простаты занимает 7–8-е место (составляя около 6% от общего количества онкологических заболеваний). Особенностью рака простаты в России и других странах СНГ является поздняя диагностика, когда опухоль диагностируют на III–IV стадии [37]. Рак молочной железы – это наиболее частая форма рака среди женщин в России и в мире, с показателями заболеваемости 99,4 на 100 000 женщин в возрасте от 13 до 90 лет [38]. Рак яичников считается одним из наиболее агрессивных видов злокачественных опухолей у женщин. В соответствии со статистикой, каждый год в мире регистрируется более 225 тысяч новых случаев карциномы яичника, из которых около 140 тысяч заканчиваются летально [39]. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике карциномы яичника, около 75% ее выявляется на поздних стадиях. Поэтому актуальность разработки таргетных противоопухолевых препаратов определяется высокой частотой онкологических заболеваний во всем мире, низкой выживаемостью онкологических больных и дорогостоящим лечением раковых заболеваний.

Хотя в последние годы был достигнут значительный прогресс в лечении онкологических заболеваний, большинство современных методов лечения рака включает хирургическое вмешательство или химио-, радиационную и гормональную терапию, которые мало изменились за последнее десятилетие и имеют ряд ограничений. Так, хирургическое вмешательство и радиотерапия применяются часто уже на последних стадиях развития рака, эти методы не являются специфичными и не подавляют образование метастазов. Химиотерапевтические методы также имеют ряд недостат-

ков. Используемые в настоящее время химиотерапевтические препараты основаны на быстром делении опухолевых клеток и не учитывают другие специфические свойства раковых клеток. Например, обычные химиотерапевтические препараты (то есть ДНК-алкилирующие агенты), которые нацелены на пролиферирующие раковые клетки, также повреждают здоровые растущие клетки, но могут не устранить элиминационные или непролиферирующие раковые клетки [40, 41]. Кроме того, зачастую при химиотерапии наблюдается развитие лекарственной устойчивости опухоли, которое может быть связано с нарушениями в доставке лекарств или детоксифицирующими ферментами, которые влияют на взаимодействие между лекарством и его мишенью. Дефекты в механизмах репарации ДНК и путей апоптоза или гибели клеток также могут приводить к развитию устойчивости к противоопухолевым лекарственным средствам. Даже если первоначальные методы лечения были успешны, риск рецидива рака остается проблемой для пациентов. Кроме того, многие противоопухолевые препараты обладают высокой токсичностью, проявляют побочные эффекты, отличаются плохой растворимостью, слабой проницаемостью в клетку и плохой биосовместимостью. Стремление найти новые лекарства от рака стимулировало исследования по эволюции малых молекул как лекарств, но проблемы с непредвиденными нецелевыми последствиями создали потребность в альтернативных подходах. В связи с этим появился новый класс противоопухолевых реагентов, который основан на пептидах. Эти молекулы с малой молекулярной массой могут быть смоделированы из эндогенных белков, синтез пептидов является дешевым и экономически эффективным, они легко поддаются модификации. Пептиды находят применение как в диагностике, так и в лечении рака, обеспечивая специфичность для опухолевых тканей, снижают вероятность развития лекарственной устойчивости и имеют низкую токсичность.

Каждая опухоль обладает своими специфичными признаками (иногда специфичными и для пациента, так называемыми молекулярными подписями – signature), которые экспрессируются в опухоли в больших количествах и (или) располагаются в другом месте по сравнению с нормальной тканью. Эта опухоль-специфичная подпись дает возможность развивать адресные, таргетные агенты для раннего выявления, диагностики и терапии онкологических заболеваний. Синтетические полипептиды являются отличными кандидатами для диагностики раковых заболеваний. В частности, пептидные лиганды имеют преимущества из-за их небольшого размера, легкого и доступного производства, высокой специфичности и замечательной гибкости в отношении их последовательности и возможностей конъюгации. В сочетании с визуализирующими агентами, химиотерапевтическими препаратами или наноносителями они хорошо себя зарекомендовали для таргетной доставки, обеспечивая лучшее контурирование опухолевой массы при визуализации и повышая эффективность химиотерапии за счет снижения побочных эффектов.

В новую эру персонализированной, точной медицины целью терапевтического лечения является применение опухоль- и пациент-специфичных генетических и молекулярных особенностей для выбора специфичной на-

правленной терапии для каждого пациента [42–44]. Последнее десятилетие ознаменовалось появлением многочисленных целенаправленных реагентов, обеспечивающих таргетную доставку противоопухолевых препаратов. Например, были разработаны антитела, направленные на рак, которые показали отличные характеристики в качестве транспортных средств для доставки радионуклидов с целью визуализации рака, а также для доставки цитотоксических средств при химиотерапии. Однако, несмотря на то, что антитела были одобрены FDA и прошли клинические испытания, они имели ряд ограничений. Например, некоторая область антител (fragment crystallizable) имела тенденцию неспецифически связываться с ретикуло-эндотелиальной системой, вызывая заметную токсичность в отношении таких тканей, как печень, селезенка и костный мозг [46, 47]. Кроме того, вследствие их высокой молекулярной массы (до 160 кДа) они плохо диффундировали в опухоли или вообще не достигали мозга в случае опухолей центральной нервной системы [48, 49]. Кроме того, несмотря на то, что терапевтические антитела являются очень специфичными и эффективными, их производство является довольно трудоемким и весьма дорогостоящим. В свете этих недостатков таргетные пептиды можно рассматривать как альтернативное средство для доставки диагностических агентов и (или) противоопухолевых препаратов. По сравнению с антителами таргетные пептиды имеют ряд преимуществ. В частности, они не являются иммуногенными, быстро выводятся из крови, лучше диффундируют внутрь опухоли из-за их более низкой молекулярной массы и исключительно хорошо переносятся пациентами.

Следует отметить, что короткий период полураспада пептидов, который может уменьшить их накопление в опухоли, часто считается одним из их ограничений. Однако более длительный период полураспада пептидов может быть получен путем предотвращения их деградации в крови протеазами несколькими способами, а именно: через наличие цикла, образования, например, дисульфидными связями между двумя цистеинами; блокированием С- и N-концов; заменой эукариотических аминокислот их D-аналогами или использованием неприродных аминокислот, несовместимых с эндогенными протеазами. Кроме того, длительный период полураспада в случае квантовых дотов, покрытых пептидами, достигается за счет ПЭГ, который исключает на 95% неспецифическое поглощение печенью и селезенкой [50]. Кроме того, пептиды, как правило, легко и относительно недорого синтезировать и они имеют множество возможностей для конъюгирования с визуализирующими агентами, лекарственными препаратами и наночастицами для адресной доставки. Таким образом, пептиды обеспечивают дополнительные перспективные способы лечения для современной персонализированной, адресной медицины.

Свойства пептидов

В настоящее время было выделено множество природных пептидов и разработаны искусственные пептиды и пептидомиметики.

Пептиды, которые возможно использовать для лечения рака, можно разделить на три основные группы, как показано на рисунке 1.

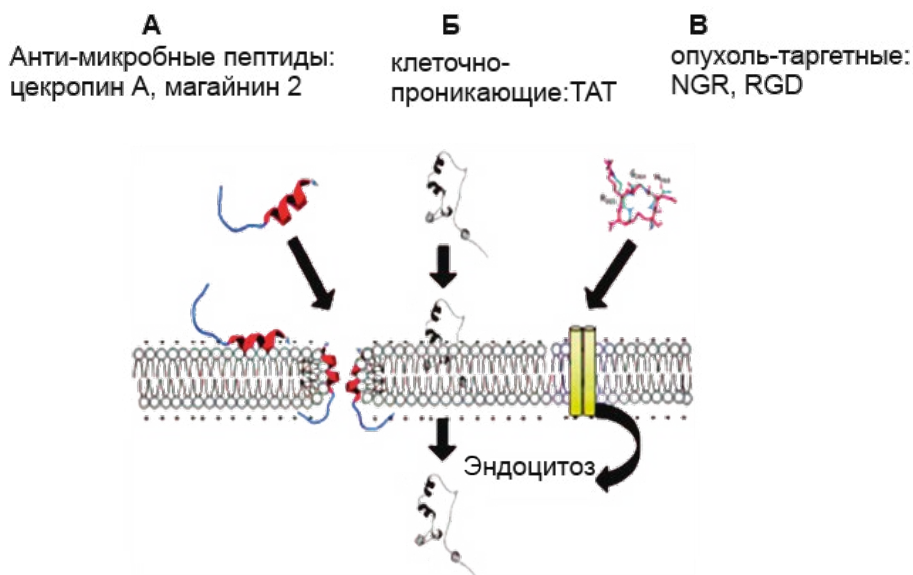


Рис. 1. Классы терапевтических пептидов: А) антимикробные пептиды (то есть магайнины или цекропины); Б) клеточно-проникающие пептиды (например, пептид ТАТ); В) опухоль-таргетные пептиды (пептиды RGD или NGR). *Адаптировано из: Boohaker R.J. и Lee M.W., 2012 [51].*

В первую группу входят те пептиды, которые обычно существуют в природе или получены из известного белка. Эти пептиды способны связываться с мембраной, могут образовывать поры или разрушать мембраны, и на этом основано их цитотоксическое действие (рисунок 1А). Помимо антимикробных пептидов (АМР), таких как цекропины и магайнины, к первой группе относятся также «порообразующие» пептиды, полученные из семейства Bcl-2 – посредников апоптоза. Во вторую группу входят клеточно-проникающие пептиды (СРР), такие как трансаактиватор транскрипции (ТАТ), полученный из вируса иммунодефицита человека, который функционирует как «троянский конь» и внедряет в клетку связанное с ним лекарство (рисунок 1Б). Проблемы, связанные с использованием СРР, таких как ТАТ, обусловлены отсутствием у них специфичности к опухолевым клеткам, они требуют модификации или слияния с опухоль-специфичным лигандом для оптимального противоопухолевого эффекта. Третья группа состоит из таргетных, целенаправленных на опухоль пептидов (ТТР), которые специфичны для опухолевых поверхностных маркеров, таких как мембранные рецепторы, и могут быть использованы для доставки цитотоксических соединений (например, лекарств или цитотоксических пептидов) конкретно в опухолевую ткань или кровеносную систему опухоли (рисунок 1В). Примерами таких пептидов являются пептиды с аминокислотной последовательностью RGD (аргинин/глицин/аспарагиновая кислота) или NGR (аспарагин/глицин/аргинин), которые связываются с интегринами или молекулами, расположенными на клеточной поверхности, или рецепторами, которые часто сверхэкспрессируются в опухолевых клетках или в кровеносных сосудах

опухоли. СРР могут напрямую проникать через мембраны или, как ТТР, использовать биологически активный механизм, такой как эндоцитоз, для интернализации соединений в клетку. Для создания идеального терапевтического пептида необходимо интегрировать основные характеристики пептидов из каждой группы: нацеливание на опухоль, проникновение в клеточную мембрану и индукция гибели клетки. Многие пептиды, которые обладают цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам (т.е. те, что в группе 1, рисунок 1А), имеют катионную, амфифильную структуру, которая позволяет им нацеливаться на отрицательно заряженные мембраны раковых клеток (и бактерий), а не на нормальные клетки млекопитающих, и они также обладают порообразующей активностью. Эти пептиды имеют сродство к анионным фосфолипидным группам цитоплазматической мембраны, и они проявляют свои цитотоксические эффекты путем стыковки с мишенью мембраны, вызывая ее деполяризацию [52, 53].

Механизм действия, лежащий в основе деполяризации, в свою очередь, связан со способностью катионных мембранно-активных пептидов образовывать тороидальные поры [52, 53]. В тороидальной поре, по сравнению с порами «бочкообразного ствола», пептиды и липиды собираются в тип организованной, надмолекулярной структуры, вызывая искривление мембраны для формирования поры, через которую могут проходить ионы или небольшие молекулы (рисунок 2).

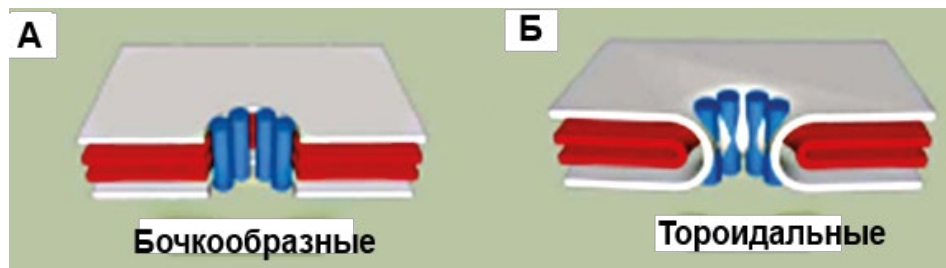


Рис. 2. Модели типов пор: А) бочкообразные и Б) тороидальные поры, которые могут быть сформированы антимикробными или порообразующими пептидами. Слои представляют собой наружную и внутреннюю мембраны, пронизанные цилиндрами, состоящими из пептидов. *Адаптировано из: Boohaker R. J. и Lee M. W., 2012 [51].*

Альтернативным способом объяснения разрушения мембран пептидами является модель «ковер»: пептиды накапливаются параллельно поверхности мембраны и дестабилизируют мембрану, вызывая повышение ее проницаемости. Другие структурные особенности могут также способствовать цитотоксичности пептида. Например, положение остатка триптофана, входящего в состав катионной области короткого амфипатического пептида, стимулирует электростатические взаимодействия, способствует встраиванию и последующей цитотоксической активности пептида [54].

Такие амфипатические биоактивные пептиды могут также использоваться для «самосборки» с образованием пептидных структур более высокого порядка, которые могут быть направлены непосредственно на мембрану или проникать через мембрану для атаки внутриклеточных мишеней [55].

Свойства опухолей

Мембраны раковых клеток

Чтобы быть полезными в качестве противоопухолевых препаратов, цитотоксические пептиды, такие как AMP (рисунок 1А), должны быть нацелены на повреждение мембран опухолевых клеток, не разрушая нормальные, нераковые клетки. Важным в этом отношении является тот факт, что клеточные мембраны опухолевых клеток значительно отличаются от мембран нормальных клеток, и это способствует направленному, таргетному действию таких цитотоксических пептидов. Известно, что в нормальных клетках общий заряд мембраны является нейтральным по сравнению с зарядом мембран раковых клеток из-за присутствия цвиттер-ионных фосфолипидов, таких как фосфатидилхолин (PC), сфингомиелин, фосфатидилсерин (PS) и фосфатидилэтаноламин (PE), расположенных на внутренней поверхности плазматической мембраны [56]. Опухолевые клетки, напротив, утрачивают эту мембранную симметрию и выставляют анионный фосфатидилсерин (PS) на наружную часть плазматической мембраны, увеличивая общий отрицательный заряд [57]. Расположение PS связано с метастатическим фенотипом и было показано для многих типов опухолевых тканей [58, 59]. Другим источником повышенного отрицательного заряда на мембране опухолевых клеток являются остатки сиаловой кислоты, связанные с гликолипидами и гликопротеинами, такими как муцин. Муцин-1 (Muc1) сверхэкспрессируется в клетках рака молочной железы, а также в раковых клетках яичников, поджелудочной железы и легких [60]. Протеогликаны с высокоотрицательно заряженными боковыми цепями – гепаринсульфат и хондроитинсульфат – также могут вносить вклад в изменение заряда на поверхности мембран опухолевых клеток [61, 62]. Помимо увеличения отрицательных зарядов на клеточных мембранах раковых клеток наблюдались также изменения в текучести мембран при некоторых видах рака, и это могло быть связано с более высоким уровнем холестерина [63–66]. Другим отличием является увеличение площади поверхности опухолевых клеток из-за большего количества микроворсинок (филаментов) на раковых клетках по сравнению с нормальными клетками [66]. В целом это указывает на то, что существуют значительные различия между клеточными мембранами раковых и нормальных клеток, которые могут способствовать специфичности цитотоксичных пептидов при терапии онкологических заболеваний.

Сосудистая сеть опухоли

Солитные опухоли представляют собой особую проблему в лечении онкологических заболеваний, поскольку лекарственные средства, вводимые через кровеносные сосуды, могут проникать в опухолевые ткани только на глубину нескольких клеток [67]. Причины могут включать плохой кровоток через опухолевые сосуды и высокое внутриклеточное давление в опухолях, которые могут возникать из-за aberrантного лимфатического потока [68, 69]. Тем не менее, проблемы с доставкой терапевтических средств в опухоли могут быть преодолены «течкой» опухоли, вызванной быстро растущей и ненормальной опухолевой сосудистой сетью. Это изменение в гидродинамике опухолей вызывает накопление клеточных метаболитов в опу-

холях при более высоких концентрациях, чем в нормальной ткани [70]. Эти эффекты, называемые усиленной проницаемостью и удерживанием, могут различаться в зависимости от опухоли, что вызывает значительную изменчивость в эффективности лечения. Помимо неравномерности и протечек опухолевые кровеносные сосуды экспрессируют белки поверхностного и внеклеточного матрикса, которые отличаются от нормальных кровеносных сосудов.

Таким образом, альтернативный подход к лечению для улучшения доставки противоопухолевых лекарств к опухолям заключается в непосредственном лечении кровеносных сосудов с использованием нацеленных на опухоль пептидов (рисунок 1В), которые локализуются в сосудистой сети опухоли. Экспрессия некоторых из этих белков связана с ангиогенезом, примером является сверхэкспрессия некоторых типов $\alpha\beta$ -интегринов [71]. Поскольку эти интегрины сверхэкспрессируются, они могут служить центрами для таргетных пептидов, которые будут накапливаться в сосудистой сети опухоли. Внутриклеточный матрикс также имеет маркеры, которые могут помочь направлять пептиды в опухоли, такие как экспрессия альтернативной формы фибронектина, которая связана с опухолевыми сосудами [72]. Пептиды также могут быть использованы для нацеливания на фибрин-фибронектиновые комплексы в стенках или стромах опухолевых кровеносных сосудов [73, 74]. Экспрессия коллагена является еще одной потенциальной мишенью для опухоль-специфичных пептидов. Однако ангиогенез обычно происходит в контексте воспаления, а также в регенерации тканей. Следовательно, нацеливание ангиогенных маркеров на сосудистую сеть опухоли может также привести к побочному повреждению тканей, подвергающихся восстановлению или отвечающих на инфекции. Таким образом, необходимость в опухоль-таргетных пептидах с более сфокусированным распознаванием молекул, специфичных для сосудистой системы опухоли, является очевидной.

1.1. Опухоль-таргетные пептиды

Противоопухолевая эффективность лекарственного средства или соединения ограничена его проницаемостью через мембраны, адресной доставкой и локализацией в опухолях. Способность нацеливаться на раковые ткани и концентрировать желаемый терапевтический препарат в этих тканях может быть достигнута с помощью опухоль-специфичных маркеров, особенно тех, которые обнаружены на опухоли или в сосудистой сети опухоли. В настоящее время в молекулярной биологии наблюдается открытие сотен опухолевых маркеров-мишеней. Идентификация и характеристика опухолевых маркеров являются основой знаний, с помощью которых разрабатываются опухоль-таргетные пептиды (ТТР), также известные как хоминг-пептиды. Посредством метода скрининга фаговых пептидных библиотек и скрининга на основе антител был успешно идентифицирован ряд ТТР, функционирующих *in vivo* и связывающихся с молекулами, которые доступны и экспрессируются в сосудистой сети опухоли. Большинство ТТР, которые обеспечивают доставку терапевтических препаратов к опухолям, можно разделить на две основные группы.

К первой группе относятся ТТР, связанные с клеточно-проникающими пептидами (СРР), которые осуществляют транспорт лекарства через клеточную мембрану. Сами по себе эти СРР не являются специфичными; специфичность может быть получена только за счет их связывания с ТТР. Ко второй группе относятся таргетные пептиды, которые могут связываться непосредственно с опухолевым маркером, и, как следствие, интернализировать лекарство (cargo) внутрь клетки. Одним из первых открытых СРР был пептид ТАТ, полученный из вируса иммунодефицита человека [75, 76]. Присоединение последовательности ТАТ (GRKKRRQRRPPQ) позволило интернализировать лекарство из окружающей среды в многочисленные линии опухолевых клеток [77]. К таргетным пептидам второй группы относятся пептиды с последовательностями RGD (аргинин/глицин/аспарагиновая кислота) или NGR (аспарагин/глицин/аргинин), а также пептиды, взаимодействующие специфично с рецепторами опухолей [78]. Эффективное использование ТАТ-подобных и RGD-подобных аминокислотных последовательностей для доставки лекарств в опухоли привело к разработке многочисленных гибридных противоопухолевых соединений, в которых ТТР были связаны с лекарственными средствами или цитотоксическими пептидами.

Многочисленные исследования продемонстрировали полезность слияний ТАТ для проникновения в клетки белков, пептидов или олигонуклеотидов [79]. Одним из примеров было конъюгирование ТАТ с пептидом, который активирует р53. Этот конъюгат использовали для лечения мышей с имплантированной раковой тканью человека, и он дал положительные результаты [80]. Совсем недавно пептид (с Met-докинг-последовательностью), который блокирует взаимодействие между фактором роста гепатоцитов (HGF) и его рецептором Met, был получен с использованием ТАТ. При концентрациях 10–25 мкМ пептид ТАТ-Met ингибировал HGF-опосредованный рост клеток, а более высокие дозы этого пептида повышали его цитотоксичность [81]. Генерирование гибридного соединения, в котором ТАТ был связан с хитозаном и доксорубицином, показало значительное ингибирование роста аденокарциномы СТ26 (значение IC_{50} было в наномолярном диапазоне), что было в два раза ниже, чем для хитозана и доксорубина без пептида [82]. Эти исследования продемонстрировали противоопухолевый терапевтический потенциал ТАТ и других СРР, а также необходимость модификаций, позволяющих им нацеливаться на опухоли и концентрировать цитотоксичные соединения. Один из подходов заключается в том, чтобы скрыть катионный СРР во время доставки к опухолевой ткани, а затем выявить мембрано-проникающую активность СРР в центре опухоли. Примерами этого являются рН-чувствительные ТАТ-модифицированные ПЭГ-липосомы, или так называемые «умные» соединения [83]. Стерическое препятствие, обеспечиваемое ПЭГ, экранирует пептид ТАТ до тех пор, пока кислотная опухолевая среда не приведет к расщеплению линкера, к которому был присоединен ПЭГ [84]. Эффективность этой системы была показана в липосомальной композиции, включающей доксорубин, которая продемонстрировала цитотоксичность в клетках MCF-7 при LC_{50} 2 мкг/мл, по сравнению с 38 мкг/мл для одного доксорубина [85].

Пептиды, содержащие RGD и NGR

Исходя из предположения, что эндотелиальные клетки в кровеносных сосудах опухоли имеют отчетливые белковые маркеры, которых нет в нормальных кровеносных сосудах, была использована библиотека фаговых пептидов, чтобы идентифицировать пептиды, которые «жили бы» в сосудистой сети опухоли [86]. Были обнаружены два пептида с последовательностями, нацеленными на опухоль, один из которых содержал аминокислотные остатки RGD (ArgGlyAsp), а другой имел аминокислотные остатки NGR (AsnGlyArg). Биохимические исследования показали, что RGD обнаруживается в интегрин-центре взаимодействия многих белков экстраклеточного матрикса. Следовательно, RGD распознаёт класс интегринов, ассоциированных с опухолями, в частности, интегрины $\alpha\text{v}\beta^3$ и $\alpha\text{v}\beta^5$, которые сверхэкспрессируются в ангиогенных кровеносных сосудах [71, 87, 88]. Пептиды NGR распознают и связываются с аминопептидазой N (также известной как CD13), которая сверхэкспрессируется эндотелиальными клетками многих опухолей, и это может способствовать селективности воздействия на опухоль [86, 89]. Совсем недавно было обнаружено, что NGR-содержащие пептиды превращаются в isoDGR путем деамидирования аспарагина, что приводит к образованию интегриновых лигандов $\alpha\text{v}\beta^3$, которые могут влиять на функции эндотелиальных клеток и рост опухоли [90]. Оба пептида RGD и NGR были использованы для адресной доставки противоопухолевых препаратов и прошли разные фазы клинических испытаний на человеке (таблица 1).

Например, пептид RGD (GSSSGRGDSPA), связанный с ПЭГ, встраивали в мицеллы хитозана, увеличивая тем самым эффективность его поглощения опухолями, которые сверхэкспрессируют интегрины. Это позволило целенаправленно доставлять доксорубин в опухолевые клетки [91]. Используя c(RGDyK), циклический пептид RGD, была достигнута адресная доставка и интернализация мицеллярных наночастиц с лекарствами в раковые клетки, которые также сверхэкспрессировали интегрины [92]. NGR-содержащие пептиды связывали с доксорубицином, и это вызывало подавление роста опухоли ксенографтов мышей [86]. Совсем недавно NGR был соединен с платиновыми противоопухолевыми препаратами для усиления их адресной доставки и включения в опухоли [93]. Эта NGR-последовательность специфически локализовалась в солидных опухолях и в эндотелии ангиогенных кровеносных сосудов и также доставляла липосомальный доксорубин для лечения ортотопической нейробластомы ксенографтов мышей [94, 95].

Таблица 1

Доклинические и клинические испытания терапевтических пептидов.

Адаптировано из: Boohaker R.J. и Lee M. W., 2012 [51].

Название пептида	Терапевтическое применение	Фаза клинических испытаний
Пептиды группы 1		
Цекропин А и В	Рак: Лейкемия	Доклинические
	Мочевой пузырь	Доклинические
Плейроцидин	Рак: грудь	Доклинические

Название пептида	Терапевтическое применение	Фаза клинических испытаний
Магайнин 2	Рак: Мочевой пузырь Антимикробные: диабетические язвы стопы	Доклинические Фаза III
β-дефензин	Антимикробные: Биомаркер воспаления	Фаза IV
α5–α6 Вах-пептид	Рак: апоптоз	Доклинические
ВНЗ-домен	Рак: апоптоз	Доклинические
KLAKLAK	Рак: глиобластома	Доклинические
Пептиды группы 2		
Tat	Рак HIV: вакцина	Доклинические Фаза I, II
Пептиды группы 3		
RGD (Cilengitide, Delta 24-RGD, Delta 24-RGD 4C, RGD-K5)	Рак: Мозг Яичники Голова и шея Предстательная железа Легкие Меланома	Фаза I Фаза I Фаза I, II Фаза II Фаза I, II Фаза II
NGR (NGR-hTNF)	Рак: Яичники Легкие Саркома	Фаза II Фаза II Фаза II

Пептид NGR, слитый с активным фрагментом 15 кДа, индуцировал апоптоз *in vitro* путем интеграции в цитоскелет [96]. Пептиды NGR и (или) STR-R4, прикрепленные к дистальным концам ПЭГ на липосомах, усиливали поглощение липосом в CD13-позитивных клетках [97]. В соответствии с такими результатами была получена соль циклизованного пентапептида (циленгитид) на основе RGD (EMD 121974, Merck). Цилентгитид прошел тестирование I, II и III фазы клинических испытаний для немелкоклеточного рака легких, глиомы, рака головы и шеи, рака простаты и многих других. Применение цилентгитида для пациентов с глиобластомой в исследованиях II фазы приводило к тому, что выживаемость составила 12–15% без прогрессирования в течение шести месяцев [98, 99].

Другим многообещающим подходом является доставка в клетки фактора некроза опухоли (TNF) через пептиды RGD или NGR. В отношении NGR-hTNF проводится ряд клинических испытаний II–III фазы для рака яичников, легких, толстой кишки и других видов рака (таблица 1). При использовании NGR-hTNF в группе пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой токсичность была минимальной или отсутствовала и была достигнута средняя выживаемость 8,9 месяцев (в среднем 6 месяцев) [100].

Следующее поколение RGD-пептидов разрабатывалось для улучшения проникновения противоопухолевых препаратов в опухоли. Проникновение лекарств в опухолевую ткань является проблемой, учитывая, что кровоток через опухолевые сосуды может быть ненормальным, а опухоли могут иметь высокое внутреннее давление [67, 68]. Новые RGD-пептиды были связаны с ткань-проникающим мотивом, R/KXXR/K, который должен подвергаться действию так называемого правила С-конца (CendR). Был разработан пептид RGD, содержащий мотив CendR, iRGD, который связывался с интегринами, а затем при протеолитическом расщеплении продуцировал мотив CendR, который позволял связываться с нейропилином-1 (NRP-1), вызывая проникновение в ткани [101, 102]. Потенциальное применение iRGD – это увеличение количества лекарств, проникающих в опухоли. Комбинирование iRGD с такими препаратами, как паклитаксел (таксол) или доксорубицин, позволило увеличить накопление препаратов в опухолевых тканях, что указывает на его возможное использование в комбинированной терапии [102].

Природные пептиды-лиганды

Природные пептиды-лиганды играют ключевую роль в функционировании клеток и в межклеточных взаимодействиях, при этом они состоят из совокупности аминокислот, связанных амидными связями, и содержат обычно менее ста мономеров. Их низкий молекулярный вес позволяет им быстро выводиться из крови, а их высокая специфичность связывания приводит к тому, что их активная концентрация в опухоли достигается при наномолярных количествах. Интересно, что пептиды-лиганды являются очень гибкими относительно их химического состава. Показано, что легко могут быть разработаны такие модификации пептидов, как циклизация, использование неприродных D-аминокислот или их комбинации, связанные с химическими линкерами. Применение пептидов-лигандов обычно определяется избыточной экспрессией опухоли-специфичных рецепторов. Накопление пептида-лиганда в опухоли коррелирует с экспрессией рецептора, позволяя отличить опухолевую ткань от нормальной. Поэтому пептиды, конъюгированные с такими разнообразными соединениями, как флуоресцентные красители, радионуклиды или частицы оксида железа, используются для оптической, позитронной эмиссионной томографии или для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, а также для магнитно-резонансной томографии.

Идеальный таргетный пептид-лиганд должен накапливаться в мишени, а не в нормальных тканях, и в случае применения для визуализации рака он должен быстро удаляться из обращения, чтобы минимизировать фон и усилить специфичный сигнал по отношению к шуму [103].

В случае доставки лекарств накопление конъюгата «пептид-лекарство» в мишени будет увеличить эффективность препарата и уменьшать побочные эффекты.

Следует отметить, что недавно появились новые тераностические средства, подходящие для использования как в визуализации, так и в терапии рака [104]. Такие природные пептиды-лиганды применяются для визуализа-

ции периферических раковых заболеваний, таких как рак молочной железы, предстательной железы и меланомы.

Аминокислотные последовательности таргетных пептидов-лигандов можно определять с помощью различных методов. Эти методы включают разработку производных последовательностей природных белков, таких как, например, ростовой фактор эндотелиальных сосудов (VEGF) и соматостатин (SST) или скрининг библиотек пептидов, состоящих из миллиардов коротких случайных аминокислотных последовательностей, расположенных на вирусных частицах [105–108].

Производные соматостатина

Многие солидные опухоли часто связаны с сверхэкспрессией G-белок-связанных рецепторов (GPCR) и рецепторов соматостатина (SSTR), которые активируются пептидами-лигандами. Семейство SSTR включает пять рецепторов (от SSTR1 до SSTR5), которые широко распространены в центральной нервной системе, гипофизной железе и многих периферических органах. Установлено, что связывание природного пептида-лиганда соматостатина (SST) к рецепторам приводит к ингибированию пролиферации и (или) индукции апоптоза в раковых клетках [106]. Рецепторы соматостатина SSTR2 и SSTR5 значительно сверхэкспрессируются при раке молочной железы, что позволяет использовать их в качестве противоопухолевых мишеней. Соматостатин проявляет высокое сродство к рецепторам, но имеет удивительно короткий период полураспада, он существует в плазме крови только от 1 до 3 минут [106]. Чтобы преодолеть эту проблему, был разработан SST-аналог, циклический SSTR-агонист октапептид, называемый октреотидом (SMS 201–995; DFCFDWKTCT), который содержит D-аминокислоты в SST-цепи и избирательно связывает SSTR2 и SSTR5. По сравнению с SST октреотид значительно увеличивал период полураспада в плазме – до 113 мин [109]. Другим примером модификаций природного пептида-лиганда является встраивание молекул жирных кислот в процессе липофилизации, что позволяет увеличить стабильность и биологическую активность пептида, не вызывая конформационных изменений. Например, добавление 12, 14 или 16 атомов углерода к другому SST-аналогу RC-160 (DFCYDWKVCW) с коротким периодом полураспада в сыворотке приводило к повышению стабильности и 10-кратному увеличению эффективности действия по сравнению с самим RC-160 [110]. Рецепторы соматостатина SSTR2 и SSTR5 также использовались для визуализации первичных опухолей простаты и метастазирования костей в ПЭТ/КТ у 20 пациентов. Однако экспрессия SSTR2 и SSTR5 в опухолевой ткани большинства исследуемых пациентов были слишком низкой для рецептор-опосредованной доставки лекарств [111].

Пептидные производные гастрин-высвобождающего пептида (GRP)

Недавно опубликованы результаты исследований, которые сообщают, что рецептор гастрин-высвобождающего пептида (GRPR) связан с прогрессированием рака предстательной железы, а также сверхэкспрессируется в 62–96% случаев в первичных опухолях молочной железы [112].

Природный гастрин-высвобождающий пептид (GRP) обладает высоким сродством к рецептору GRPR. Бомбезин (YQRLGNQ-WAVGHLM) и его производные, являющиеся аналогами гастрин-высвобождающего пептида (GRP), были изучены наиболее подробно на многих линиях опухолевых клеток человека и на опухоли ксенографтов, включая рак молочной железы [113–115].

Эти исследования показали, что аналоги бомбезина могут быть полезны для обнаружения опухолей молочной железы человека, экспрессирующих GRPR, методом ПЭТ. Подобно системе SSSTR, эти пептиды, состоящие из С-концевой модификации бомбезина, были успешно использованы для визуализации опухоли предстательной железы с помощью ПЭТ и КТ у мышей и человека [116–120].

Было также высказано предположение, что сам бомбезин может быть использован в качестве таргетного пептида для диагностики рака предстательной железы и пораженных лимфатических узлов у пациентов [120]. Однако последующее исследование опровергло это предложение из-за очень низкой метаболической стабильности бомбезина [121]. Удивительно, но бомбезин показал неожиданно быструю деградацию у пациентов *in vivo*, даже несмотря на то, что в сыворотке человека наблюдался длительный период полураспада *in vitro* [122].

Другим примером пептидов-лигандов является природный лиганд α -меланоцитстимулирующий гормон (α -MSH), который специфично связывается с рецептором меланокортина-1 (MC1R). Рецептор меланокортина-1 экспрессируется меланоцитами в нормальной ткани и играет ключевую роль в синтезе эпидермальных меланиновых пигментов и в фотозащитном ответе через активацию путей репарации ДНК и антиоксидантной защиты. Так как MC1R сильно сверхэкспрессируется в первичных меланомах и их метастазах, были разработаны методы визуализации с использованием нескольких пептидных фрагментов, полученных из α -меланоцитстимулирующего гормона (α -MSH) [123]. В течение последнего десятилетия миметики MC1R-лиганда, радиофлуорированные металлопептиды, были разработаны для ПЭТ-визуализации опухолей. Для СPECT-визуализации были разработаны лактам-циклические аналоги α -MSH, которые могут также использоваться в ПЭТ, когда этот циклический α -MSH связан с остатками DOTA [124]. Все синтетические пептиды показали лучшее накопление в опухоли по сравнению с радиоактивно мечеными эндогенными лигандами в доклинических исследованиях. Совсем недавно сериновая протеаза (гранзим В), которая является молекулярной мишенью иммунной системы, была использована для визуализации меланомы [125, 126]. Доклинические исследования показали, что гранзим В, который играет главную роль при гибели раковых клеток и высвобождается Т-клетками, может использоваться как биомаркер раннего ответа опухоли на иммунотерапию [127]. Был разработан пептид (GZP), который необратимо связывался с гранзимом В. Затем этот GZP-пептид конъюгировали с $[^{68}\text{Ga}]\text{-DOTA}$ и применяли для ПЭТ/КТ-визуализации опухоли. Было показано, что мыши, имеющие меланому, получали иммунопрепараты и GZP, и это позволило различать обработанные иммунными препаратами чувствительные опухоли от резистентных на основе уровня гранзима В в опухолях [127].

1.2. Антимикробные пептиды

Антимикробные пептиды (или так называемые защитные пептиды хозяина, или катионные антимикробные пептиды) (АМР) являются низкомолекулярными веществами (10–40 аминокислот) с катионной амфипатической структурой, которая позволяет им взаимодействовать с анионными мембранными липидами. Природные АМР являются частью внутреннего защитного иммунного ответа к различным микробам, и они обнаруживаются в животных, амфибиях и насекомых. Из-за того, что АМР нацелены на мембраны, АМР могут использоваться как альтернативные противоопухолевые препараты. В настоящее время в дата-базах находится более чем 100 АМР, которые обладают потенциальной противоопухолевой активностью [128]. АМР имеют ряд преимуществ перед другими пептидами. Поскольку липиды мембран являются главной мишенью большинства АМР, развитие лекарственной устойчивости является менее вероятным, так как через минуты после введения пептида происходит разрушение мембраны [129]. АМР могут индуцировать гибель опухолевых клеток через два главных механизма: апоптоз или некроз. Некротический путь гибели является результатом АМР-таргетинга отрицательно заряженных молекул на клеточной мембране раковых клеток, приводя к лизису клетки, в то время как апоптоз является следствием разрушения митохондриальной мембраны. АМР-опосредованное растворение мембраны (пермеабилзация) может происходить через различные механизмы, такие как образование «бочкообразных пор» (barrel stave), «ковровая» модель нарушения мембраны, образование организованных каналов или «тороидальных» пор (рисунок 2). АМР также проявляют немембранную активность, такую как активация иммунных механизмов, что приводит к гибели опухолевых клеток [130].

Магайнины

Магайнины, полученные из кожи африканской когтистой лягушки (*Xenopus laevis*), были одними из первых АМР, протестированных на противоопухолевую активность [131]. Ранние работы показали, что магайнин 2 имел амфифильную α -спиральную структуру, которая образовывала поры в мембранах [132]. Локальная обработка магайнином 2 опухолей мышей (ксенографты) приводила к исчезновению опухолей [133]. Многочисленные данные подтвердили цитотоксическое действие магайнина 2 при меланоме, раке молочной железы и легких. Установлено, что магайнин 2 эффективно ингибировал пролиферацию опухолевых клеток мочевого пузыря при IC_{50} в диапазоне от 31 до 135 мкМ [134]. Кроме того, было показано, что противоопухолевые эффекты магайнинов являются специфичными. Было обнаружено, что низкие концентрации магайнинов являются токсичными по отношению к раковым клеткам, но не к лимфоцитам или фибробластам. Также было установлено, что магайнины являются устойчивыми к протеолизу в сыворотке [133, 135]. Показано, что конъюгирование магайнина 2 с опухоль-таргетным пептидом бомбезином усиливало противоопухолевую активность конъюгатного пептида (MG2B) [136]. Следует отметить, что бомбезин сам по себе не является цитотоксичным, однако при конъюгации с MG2B он проявлял токсичность по отношению к раковым клеткам молоч-

ной железы и меланомы (IC_{50} 10–15 мкМ). Эта величина IC_{50} была примерно в 10 раз ниже, чем для неконъюгированного магайнина 2, и в 6–10 ниже, чем IC_{50} для нормальных клеток, фибробластов [136]. Применение магайнина 2 в качестве противоопухолевого средства является перспективным, потому что механизм его действия препятствует развитию лекарственной устойчивости [137].

Цекропины

Цекропины А и В относятся к семейству цекропинов AMP, выделенных из гемолимфы гигантской шелковой бабочки (*Hyalophora cecropia*), позднее они были обнаружены также у млекопитающих. Структура обоих цекропинов, А и В, состоит из двух α -спиралей, несущих амфипатический N-конец и гидрофобный C-конец с цитотоксической противоопухолевой активностью, связанной с особенностями N-конца [138, 139]. Оба цекропина А и В могут лизировать раковые клетки в концентрациях ниже, чем концентрации, которые повреждают нормальные клетки [140, 141]. Цекропин В и его аналоги демонстрировали значения IC_{50} в диапазоне от 3 до 17 мкМ для различных линий опухолевых клеток, таких как HL-60, K-562 или Jurkat-клетки, тогда как значения IC_{50} для фибробластов 3Т3 составляли > 50 мкМ [140]. Цекропин В также проявлял *in vitro* противоопухолевую активность против раковых клеток молочной железы и яичников человека и оказывал противоопухолевое действие *in vivo* на аденокарциному толстой кишки [142]. Антимикробные пептиды из семейства цекропинов обладают селективной и цитотоксической эффективностью, воздействуя на неполярные липиды клеточных мембран и формируя ион-проницаемые каналы, как было показано при инвазивном раке мочевого пузыря [143]. В случае опухолевых клеток мочевого пузыря средние значения IC_{50} для жизнеспособности клеток находились в диапазоне от 185 до 251 мкг/мл, причем эти дозы были намного ниже, чем для фибробластов [143]. Синергический летальный эффект наблюдался при сочетании цекропина А с 5-фторурацилом при лечении лейкемии человека [141].

Дефензины

Дефензины относятся к одной из подгрупп AMP с вариациями структуры β -листа [144, 145]. Дефензины – это небольшие (3,5–4 кДа), богатые цистеином пептиды, которые обнаруживаются у млекопитающих, насекомых, растений и грибов [145]. В организме человека также вырабатываются α - и β -дефензины как часть врожденного иммунного ответа на патогены. Альфа-дефензины (HNP1, HNP2, HNP3) были обнаружены в гранулах нейтрофилов и эпителиальных клеток кишечника (HD5, HD6), тогда как бета-дефензины были найдены в слизистой среде [146]. Альфа-дефензины способны проникать через клеточные мембраны за счет образования каналов в липидных бислоях [146]. В результате исследований дефензины были обнаружены в жидкостях и клетках, связанных со злокачественными новообразованиями [147]. При колоректальном раке уровни HNP 1–3 были повышены в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями [148]. Такие исследования предполагали, что дефензины могут быть использо-

ваны в качестве биомаркеров для раннего выявления рака. В качестве терапевтического средства сообщалось о цитотоксической активности HNP1–3 для опухолевых клеток человека, в частности, HNP1 (100 мкг/мл) демонстрировал значительную цитотоксичность в отношении плоскоклеточного рака полости рта [149]. Другие противоопухолевые эффекты, документированные для HNP, включают способность вызывать повреждение ДНК и препятствовать неоваскуляризации опухолей [150, 151]. Однако существует одна проблема при использовании дефензинов, которая заключается в том, что HNP-опосредованная цитотоксичность не является специфичной. Дефензины способны вызывать не только лизис опухолевых клеток, но также и лизис нормальных лейкоцитов или эпителиальных клеток, и, кроме того, они ингибируются сывороткой [152, 153]. Для решения этой проблемы были разработаны новые варианты дефензинов. Коприсин является дефензин-подобным пептидом насекомых, из которого был синтезирован синтетический пептид (катионный 9-мерный димер), называемый СорА3 [154]. СорА3 проявлял антимикробную активность и ингибировал рост раковых клеток поджелудочной железы ($IC_{50} = 61,7$ мкМ) и гепатоцеллюлярных клеток ($IC_{50} = 67,8$ мкМ). Этот пептид является примером синтетического пептида, разработанного на основе природного вещества, который проявляет ингибирующую активность в отношении микробов и потенциально может использоваться в качестве нового противоопухолевого средства.

Плевроцидин

Плевроцидин был первоначально выделен из камбалы (*Pleuronectes americanus*), которая экспрессирует высокие уровни биоактивных пептидов в результате сильного иммунного ответа [155]. Подобно другим AMP, плевроцидин обладает сигнальной последовательностью на N-конце и кислой аминокислотной последовательностью на C-конце, которая может стимулировать секрецию, обеспечивать образование пор и тем самым защищать организм от вредного воздействия микробов [155]. Такие консервативные последовательности являются общими и для других AMP [156]. Используя последовательности из консервативных областей плевроцидина, были обнаружены новые плевроцидин-подобные катионные AMP, обладающие антибактериальной активностью [157]. Два из них, NRC-03 и NRC-07, также обладали противоопухолевой активностью против клеток рака молочной железы [157]. Изучение последовательности NRC-03 показало наличие неструктурированного катионного amino-конца и α -спирального сегмента, связанного с двумя остатками глицина [158]. В ходе исследования последовательности NRC-07 было установлено, что он также может образовывать α -спираль. Последующая оценка противоопухолевого действия показала, что как NRC-03, так и NRC-07 могли убивать клетки рака молочной железы и усиливать токсичность химиотерапевтических препаратов, таких как цисплатин или доцетаксел [158]. При концентрации 50 мкМ оба пептида, NRC-03 и NRC-07, продемонстрировали цитотоксичность в отношении клеток рака молочной железы (75–94%) [157]. Оценка жизнеспособности клеток, обработанных NRC-03 и NRC-07, показала, что эти пептиды вызывали гибель клеток, связываясь с отрицательно заряженными молекулами

на клеточной мембране. Смерть клеток могла также наступать при потере целостности митохондриальной мембраны. Кроме того, оба пептида могли ингибировать рост опухоли молочной железы на мышинной модели ксенографтов [159]. Интересно, что семейство плевроцидинов также проявляет цитотоксичность по отношению к медленно растущим раковым клеткам, которые сверхэкспрессируют Р-гликопротеин [159].

Пептиды семейства Bcl-2 и миметики ВНЗ

Митохондрии играют центральную роль в апоптотическом процессе. Межмембранное пространство митохондрий содержит множество белков, которые являются факторами гибели клеток, классическим примером является цитохром С. Контроль за высвобождением факторов, индуцирующих апоптоз, таких как цитохром С, из митохондрий регулируется семейством белков Bcl-2. Семейство Bcl-2 состоит из двух групп: антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1, и проапоптотических белков, таких как Bax, Bak, Bid, Bim или Bad [160]. Последняя группа подразделяется на мультидоменные эффекторы гибели клеток, такие как Bax или Bak, и белки ВНЗ, такие как Bad, Bim или Bid, которые регулируют активность анти- или проапоптотических факторов [161]. Механизм действия белков семейства Bcl-2 зависит от их способности связываться с органеллами, особенно с митохондриями или эндоплазматическим ретикулом, и вызывать эффекты, которые приводят к высвобождению апоптотических факторов. Характеристика этой активности на молекулярном уровне является сложной задачей, поскольку белки Bcl-2 могут принимать различные конформации в растворимой или мембраносвязанной форме. Однако сходство структуры с порообразующими белками, такими как колицин или токсины, позволило предположить, что белки Bcl-2, вероятно, обладают порообразующей активностью [162–164]. Этот эффект пермеабилзации мембраны был продемонстрирован с помощью белков Bax и Bid (с Bax), при этом было исследовано влияние Bax или Bid на активность порообразования [165, 166]. Из-за своей важности в регуляции апоптотической активности белки Bcl-2 часто мутируют в раковых клетках, чтобы нарушить регуляцию выживания клеток [167–169]. Действительно, сам Bcl-2 является одним из первых примеров онкогенов, что указывает на роль этого семейства белков в онкогенезе и образовании опухоли [170]. Высвобождение факторов, индуцирующих апоптоз, из митохондрий зависит от баланса белков Bcl-2, причем судьба клеток определяется избыточной экспрессией одной группы над другой. Для терапевтической индукции гибели раковых клеток усилия направлены на разработку реагентов, которые либо нарушают баланс между про- и антиапоптотическими белками Bcl-2, либо непосредственно нарушают целостность митохондриальной мембраны. Bax-родственные, порообразующие пептиды и ВНЗ-родственные пептиды и миметики являются яркими примерами этих усилий.

ВНЗ-родственные пептиды и миметики

Сверхэкспрессия антиапоптотических белков, таких как Bcl-2 или Mcl-1, нарушает баланс в пользу выживания клеток и частично лежит

в основе развития лекарственной устойчивости к традиционной терапии или химиотерапии [171, 172]. Из этого следует, что вмешательство в способность антиапоптотических белков Bcl-2 взаимодействовать и ингибировать проапоптотические белки, такие как Вах, может восстанавливать апоптоз в раковых клетках. Это явилось предпосылкой использования пептидов ВНЗ и разработки миметиков ВНЗ. Было показано, что пептид, содержащий домен ВНЗ из Вах, вызывал апоптоз в обработанных клетках, но этот эффект был обусловлен вмешательством во взаимодействие между Вах и Bcl-XL, а не прямой способностью пептида активировать Вах или индуцировать его транслокацию в митохондрии [173]. Такие данные указывали на то, что молекулы на основе доменов ВНЗ белков Bcl-2 могут способствовать апоптозу опухолевых клеток, блокируя связь между проапоптотическими многодоменными белками и антиапоптотическими аналогами. Однако такие пептиды имели плохую клеточную проницаемость, проблемы с растворимостью и стабильностью, а также они были неспособны специфично взаимодействовать с опухолевыми клетками и вызывать их лизис. Чтобы решить эту проблему, пептид Bid ВНЗ был модифицирован с использованием химической сшивки для стабилизации его α -спиральной конформации [174]. Сшитый пептид ВНЗ Bid был способен активировать Вах, был устойчив к деградации протеазами и, сохраняя свою α -спиральную форму, мог проникать через клеточные мембраны и вызывать апоптоз, как было показано *in vitro* и *in vivo* с клетками лейкоза [175]. Успех с модифицированными пептидами ВНЗ и знание структуры белков Bcl-2 и Bcl-XL привели к созданию малых молекул, или миметиков ВНЗ [176]. Это понимание функции белка и того, как полученные пептиды влияют на активность белка, смогло привести к разработке фармакологических препаратов, которые имитировали действие пептида. Три различных класса миметиков ВНЗ имели значительный успех в подавлении роста раковых клеток *in vitro* и при проведении доклинических и клинических испытаний на опухолях животных и человека. Первый из них, пептид Navitoclax/ABT-737, представляет собой молекулярный миметик белка ВНЗ, который проявлял цитотоксичность в моделях опухолей *in vitro* ($IC_{50} < 10$ нМ) и *in vivo* (75 мг/кг/день) [177, 178]. Эти соединения были селективными по отношению к Bcl-2 и Bcl-XL и в меньшей степени к Mcl-1 [179, 180]. Второй пептид Obatoclax имел меньшее сродство к Bcl-2, но большее к Mcl-1, тогда как третий миметик AT-101 обладал умеренным сродством к Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1 и мог нарушать взаимодействия между Bcl-XL и Вах или Bad [181]. Хотя сродство к антиапоптотическим белкам Bcl-2 является особенностью этих соединений (особенно для Obatoclax и AT-101), они также продемонстрировали значительные противоопухолевые эффекты, которые не зависели от их ВНЗ-миметических свойств [182]. Эти «нецелевые» эффекты были такими же значимыми и критическими, как и их ингибирующая активность к Bcl-2/Bcl-XL/Mcl-1 [182]. В клинических испытаниях Navitoclax продемонстрировал токсичность в отношении отдельных гематологических злокачественных новообразований [183, 184].

1.3. Клеточно-проникающие пептиды

Клеточно-проникающие пептиды (СРР) представляют собой большой класс пептидов, состоящих из коротких аминокислотных последовательностей (5–30 остатков). Эти пептиды способны проходить через биологические мембраны и доставлять внутрь клетки многочисленные соединения, включая небольшие молекулы, нуклеиновые кислоты, белки, вирусы, агенты для визуализации опухоли, лекарства для лечения рака [185, 186]. Впервые такой пептид, способный проходить через клеточную мембрану, был обнаружен независимо двумя группами исследователей в 1988 году [187, 188]. Они обнаружили, что трансактивирующий белок вируса иммунодефицита человека (ТАТ 1) способен проникать в культивируемые клетки, транслоцироваться в ядре и трансактивировать экспрессию вирусных генов. Было обнаружено, что альфа-спиральный домен этого белка ТАТ, в основном состоящий из остатков основных аминокислот (аа 48–60), отвечал за эту клеточную интернализацию и ядерную транслокацию [189, 190]. Было показано, что додекапептид GRKKRRQRRRPQ этого белка ТАТ является минимальной функциональной молекулой, и многие СРР были получены из этой исходной последовательности [191]. В 1991 году было показано, что гомеодомен, кодируемый геном *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster*, проникал через мембрану нейронов, транслоцировался в ядре и вызывал морфологическую дифференцировку нейронов [192]. Пептид из 16 аминокислот (RQIKWFWQNRRMKWKK) третьей спирали гомеодомена *Antennapedia*, а именно пептид пенетратин (*Penetratin*), был способен эффективно проходить через клеточные мембраны с помощью энергонезависимого механизма [193]. В течение тридцати лет клеточно-проникающие пептиды использовались в фундаментальных исследованиях, а также для лечения ряда заболеваний, таких как инфекционные, воспалительные, нейродегенеративные и онкологические [194]. Однако только несколько пептидов прошли клинические испытания вследствие ограниченной проницаемости плазматических мембран, низкой эффективности доставки и низкой специфичности для опухолевых клеток-мишеней. Несколько экспериментальных подходов было разработано для получения активных пептидов, способных целенаправленно проникать в раковые клетки и доставлять противоопухолевые препараты внутрь клетки. Преимущества доставки лекарств на основе пептидов по сравнению с другими способами доставки являются весьма многочисленными. Пептиды не являются иммуногенными молекулами, обычно они не цитотоксичны, стабильны в физиологических условиях и способны эффективно доставлять в клетки различные соединения, такие как белки, другие пептиды или нуклеиновые кислоты [195–197].

Химические свойства клеточно-проникающих пептидов

По своему происхождению СРР классифицируются как: 1) СРР, происходящие из белков, включая ТАТ-белок и пенетратин; 2) химерные СРР, такие как транспортан, полученный в результате связывания N-конца нейропептида галанина с токсином мастопараном; и 3) синтетические СРР, содержащие олигоаргинины и многочисленные пептидные нуклеиновые кислоты

(PNAs), образованные синтетическими аналогами нуклеиновых кислот, связанными с псевдопептидным остовом [197, 198]. В настоящее время общедоступная база данных CPP (<http://crdd.osdd.net/raghava/cppsite/>) содержит приблизительно 1700 различных пептидов [199]. Большинство из них представляют собой линейные последовательности (94,5%), преимущественно состоящие из L-аминокислот (84,3%), и в основном получены посредством химического синтеза (54,8%) [199].

На основании их физических и химических свойств CPPs классифицируются как катионные, амфипатические и гидрофобные пептиды [200]. Большинство катионных CPPs происходит из природных пептидов ТАТ и пенетратина и обычно содержит более пяти положительно заряженных аминокислот [201]. Полиаргининовые пептиды показывают самый высокий уровень интернализации клетками и, таким образом, обладают более высоким терапевтическим потенциалом [202]. Фактически гуанидиновые группы в аргининах образуют бидентатные водородные связи с отрицательно заряженными карбоксильными, сульфатными и фосфатными группами белков, мукополисахаридов и фосфолипидов клеточной мембраны, что приводит к интернализации пептидов внутрь клетки в физиологических условиях [203]. Помимо аргинина эффективно способствуют транслокации катионных CPPs через клеточную мембрану и другие аминокислоты. Так, например, добавление четырех триптофановых остатков в середине или вдоль последовательности CPP показало повышение клеточной интернализации [204]. В то же время удаление триптофана в мутированном пенетратине (W48F), в котором остаток Trp48 был замещен на Phe, и в пенетратине (W48F/W56F), в котором Trp48 и Trp56 были замещены на Phe, приводило к уменьшению или полному отсутствию интернализации [205]. Таким образом, было показано, что триптофан играет ключевую роль во взаимодействии CPP с фосфолипидным бислоем плазматической мембраны [206].

1.4. Клеточно-проникающие пептиды и доставка противоопухолевых препаратов

Рак является одной из основных причин смерти во всем мире, а химиотерапия – наиболее распространенный подход к терапии онкологических заболеваний [207].

Однако основными проблемами химиотерапии являются плохое проникновение лекарств в опухолевые ткани, появление лекарственной устойчивости опухолей, а также различные побочные эффекты. Низкое проникновение лекарств в опухолевые ткани обусловлено наличием аденозной соединительной стромы, которая препятствует проникновению молекул в опухолевую ткань (например, при раке поджелудочной железы), а также наличием высокого межклеточного давления и лимфатическими сосудами опухоли. В этом случае только CPPs могут улучшить доставку лекарственного средства в опухолевые клетки, облегчая его интернализацию и при этом не влияя на нормальные ткани. Терапевтические стратегии, в которых используются пептиды, распознающие молекулы-мишени, специфичные для опухолевых клеток, позволяют концентрировать в опухолевой ткани

необходимое количество лекарственного средства, способного подавлять рост опухоли. В этом случае наблюдается повышение чувствительности опухоли к лекарству и понижение токсичности для здоровых тканей, так как лекарство локализуется и накапливается преимущественно в опухоли [208].

CPPs для доставки химиотерапевтических агентов

Конъюгация некоторых противоопухолевых препаратов, таких как таксол, метотрексат (MTX), доксорубин с CPPs, повышает проницаемость мембран, доставку лекарств, период циркуляции лекарств и накопление их в опухолевых клетках [142, 14, 209–211]. Показано, что пептид R8 CPP, связанный с таксолом через дисульфидные связи, улучшал растворимость в воде и фармакокинетику лекарственного средства, а также преодолевал множественную лекарственную устойчивость [209]. Также было показано, что MTX, конъюгированный с двумя различными CPPs, а именно с YTA2 (ацетил-YTAIAWVKAFIRKLRLK-амид) и YTA4 (ацетил-IAWVKAFIRKLRLKGPLG-амид), убивал раковые клетки более эффективно, чем только один MTX [14]. Установлено, что многие CPPs конъюгировали с доксорубицином и тем самым улучшали внутриклеточную доставку препарата. Также установлено, что наиболее часто используемые пептиды TAT и пенетратин вызывали апоптоз опухолевых клеток у хомяков (CHO) и у человека (HUVEC, MDA-MB-231, MCF-7) при низких дозах [210, 212].

Исследования показали, что интернализация некоторых флуоресцентно меченых лекарств (в частности, ламивудина) в клетки аденокарциномы яичников (SKOV3) значительно увеличивалась благодаря конъюгации с циклическим пептидом [WR] 4-AuNP [213]. Этот пептид, содержащий остатки триптофана и аргинина, показал низкую цитотоксичность и улучшал клеточное поглощение и доставку лекарственного средства [213]. Кроме того, винкристин или паклитаксел, конъюгированный с R7 CPP и TATp-модифицированными PEG-PE-мицеллами, показали значительное увеличение цитотоксичности *in vitro* для различных раковых клеток [214].

CPPs и доставка нуклеиновых кислот для противоопухолевой терапии

В настоящее время CPPs широко используют для доставки нуклеиновых кислот в клетки. Разработаны комплексы, состоящие из олигонуклеотидов CPPs и плазмидной ДНК, которые встраивают в наночастицы, обладающие положительным зарядом. Этот заряд позволяет им взаимодействовать с клеточными мембранами и тем самым интернализировать комплексы CPP-лекарства в клетку [215, 216]. Было продемонстрировано, что применение аргинин-обогащенных CPPs (SR9, PR9 и HR9) для переноса плазмидной ДНК в клетки A549 повышало уровень экспрессии генов [217].

Показано, что пептид PepFect14 может доставлять плазмидную ДНК, образуя стабильные наночастицы, которые улучшали эффективность трансфекции в клеточных культурах путем кальвеол-опосредованного эндоцитоза [217–219].

ССР и доставка белков для противоопухолевой терапии

Недавно появилось новое направление трансляционных исследований, которое сосредоточено на использовании терапевтических белков и вакцинных пептидов в противоопухолевой терапии. Первым ответом на вакцину на основе пептида является гуморальный ответ образования антител. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов требует процессинга антигена по пути МНС класса I, а ССР может способствовать цитозольному поглощению вакцинных пептидов через МНСI. Показано, что LAN4, клеточно-проникающий пептид, усиливал клеточную доставку пептидной вакцины, тирозиназы, связанной с белком 2 (TRP2), вызывая противоопухолевый эффект в опухолевых тканях, экспрессирующих TRP2, на моделях мышей [220, 221]. Новый амфипатический ССР, p28, был получен из окислительно-восстановительного белка азурина, выделенного из патогена *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что минимальный белковый домен азурина (aa 50–67), названный p18, обладал клеточно-проникающими свойствами и позволял азурину проникать в раковые клетки человека. Кроме того, показано, что более крупный фрагмент p28 (aa 50–77) оказывал влияние на белок p53, связывался с ним и стабилизировал его, вызывая p53-опосредованный апоптоз и противоопухолевый эффект [222]. Этот ССР p28 также обладал антиангиогенными эффектами и прошел клинические испытания на людях [223–225]. Следует отметить, что клинические исследования по применению ССРs показали несколько их недостатков и ограничений. Установлено, что ССРs были нестабильными и легко расщеплялись протеазами, циркулирующими в плазме крови. Поэтому создание ССРs, устойчивых к протеазам, было первоочередной задачей для устранения этого недостатка [226]. С этой целью ССРs стерически защищали с помощью ПЭГ, прикрепляя его к поверхности с помощью линкера, который затем расщепляли в опухолевой ткани за счет изменения условий окружающей среды и инактивации ПЭГ [227, 228]. Некоторые ССРs использовались для диагностики рака методами молекулярной визуализации, такими как СPECT, ПЭТ и МРТ. Чувствительность таких методов зависит от эффективной доставки контрастных веществ в цитоплазму и (или) в ядра ткани-мишени. Таким образом, ключевой задачей для разработки эффективных методов визуализации опухоли было внедрение ССРs в состав новых контрастных агентов. Нгуен и его сотрудники разработали метод наблюдения за опухолями во время операции, основанный на клеточно-проникающих пептидах, в которых флуоресцентно меченый АССР связывали через доступный линкер с нейтрализующим пептидом [229]. Присутствие протеаз, специфичных для опухолевой ткани, позволяло расщеплять линкер, освобождая пептид АССР, который мог проникать в клетки. На животных моделях было показано, что Cy5-меченый АССР и АСРРD (Cy5 и gadolinium-DOTA) позволяли четко определить границы между опухолью и прилегающей тканью, что способствовало превосходной точности резекции [229]. Хирургическое вмешательство, проводимое с помощью АСРРD, позволяло провести предоперационное обнаружение опухоли всего тела, интраоперационное наведение с помощью флуоресценции в реальном времени, интраоперационный гистологический анализ

состояния опухоли по флуоресценции и послеоперационное количественное определение опухоли с помощью МРТ [229].

СРР и специфичная доставка органелл для противоопухолевой терапии. Митохондриальная доставка

Митохондрии представляют собой двигатели клеток и контролируют несколько запрограммированных механизмов гибели клеток. Один из признаков рака – гипоксическое состояние, которое является смертельным для здоровых клеток. При недостаточном количестве кислорода митохондрии не продуцируют достаточное количество АТФ, опухолевые клетки сверхэкспрессируют индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), и индукция этого фактора усиливает гликолитический путь. Происходит накопление субстратов цикла Кребса, таких как сукцинат. Опухолевые клетки злокачественных образований характеризуются пониженной экспрессией или мутированным белком p53, что позволяет им избежать клеточной гибели, вызванной гипоксией. Мутированный опухоль-супрессорный белок p53 вызывает подавление митохондриального дыхания и усиление гликолиза. Активные формы кислорода вырабатываются в процессе нормальной клеточной функции. Однако дисфункциональная митохондриальная дыхательная цепь производит аномальное количество АФК, которые являются чрезвычайно реактивными и нестабильными. Эта химическая реактивность АФК вызывает перекисное окисление липидов, окисление и деградацию белков, а также повреждение митохондриальной ДНК в виде мутаций, делеций, амплификации генов и перестроек. Митохондриально-опосредованный внутренний путь апоптоза подавляется, и может происходить активация онкогенов и инактивация генов-супрессоров (сверхэкспрессия антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 и Bcl-w). Эти изменения типичны для опухолевых клеток [230, 231].

Поскольку митохондрии играют эту критическую роль в опосредованной гибели клеток, является перспективным создание противоопухолевых лекарств, нацеленных на митохондрии.

В литературе описан класс синтетических и природных пептидов, так называемых митохондриально-проникающих пептидов, которые могут проникать в клетки и доставлять лекарства в митохондрии [232]. Недавно был получен антиоксидант и митохондриально-проникающий пептид mtCPP-1, который проникал в клетки по независимому энергетическому механизму и локализовался на внутренней митохондриальной мембране. Установлено, что mtCPP-1 был способен доставлять карбоксифлуоресцеин в клетку и преимущественно направлять это соединение в митохондрии. Кроме того, этот пептид уменьшал образование АФК [233–235].

Многочисленные исследования, полученные в ходе доклинических и клинических испытаний, четко продемонстрировали способность СРРs увеличивать терапевтический ответ при онкологических заболеваниях. В последнее десятилетие проводились клинические испытания нескольких препаратов на основе СРРs. Например, пептид p28 прошел клинические испытания для лечения p53-положительных прогрессирующих опухолей центральной нервной системы, устойчивых к стандартному лечению. Ре-

зультаты показали, что р28 подавлял деградацию белка р53, ингибировал клеточный цикл и пролиферацию опухолевых клеток и при этом был неиммуногенным и хорошо переносился пациентами с рефрактерным заболеванием [227, 236]. Для лечения некоторых типов рака применяется иринотекан, пролекарство, которое превращается в активный метаболит SN38 под действием карбоксилэстераз печени. Поскольку препарат был плохо растворимым в воде, был разработан новый препарат DTS-108, водорастворимый, содержащий SN38, связанный с высоко заряженным олигопептидом DPV1047 (Vectocell1). Этот препарат успешно прошел доклинические и клинические испытания [237, 238]. Показано, что противоопухолевая эффективность DTS-108 была дозозависимой и превосходила иринотекан по эффективности действия при раке легких человека [239]. Кроме того, DTS-108 прошел I фазу клинического исследования для лечения прогрессирующих и (или) метастатических солидных опухолей [240].

Таким образом, изучение противоопухолевой активности различных пептидов показало, что они проявляют различные механизмы действия, ограничивающие рост опухолевых клеток. Такие механизмы включают ингибирование ангиогенеза, ингибирование белок-белковых взаимодействий, ингибирование ферментов, синтеза белков, блокирование путей передачи сигналов или экспрессии генов. Под воздействием различных неблагоприятных факторов нормальная клетка может перерождаться в раковую, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии рецепторов, белков или ферментов, являющихся молекулярными мишенями опухолевой клетки.

Цель нашего исследования состоит в том, чтобы воздействовать на молекулярную мишень RHAMM/HMMR-онкорепцептор и тем самым подавить жизнеспособность раковых клеток на самых ранних стадиях и заблокировать развитие опухоли.

Глава 2. Общая характеристика системы RHAMM/ГК

В настоящее время известно, что большую роль в возникновении, развитии и прогрессировании рака имеет микроокружение вокруг опухолевой клетки, а именно внеклеточный матрикс [241–243]. Во время развития рака опухолевые клетки взаимодействуют с окружающей их стромой, создавая среду, похожую на ту, которая обнаруживается при заживлении ран с повышенным воспалением, ангиогенезом и ремоделированием стромы. Как опухолевые клетки, так и фибробласты продуцируют провоспалительные хемокины и цитокины, которые рекрутируют и активируют врожденные иммунные клетки, включая нейтрофилы и макрофаги [244]. Все вместе опухолевые клетки, фибробласты и воспалительные клетки продуцируют факторы, которые ремоделируют внеклеточный матрикс, приводя к образованию «опухолевой» микросреды, которая поддерживает рост опухоли и способствует злокачественному прогрессированию. Внеклеточный матрикс состоит из белков и протеогликанов и (или) гликозаминогликанов, которые обеспечивают структурную поддержку и облегчают организацию тканей. Кроме того, специфические компоненты внутриклеточного матрикса способствуют выживанию, пролиферации, миграции, ангиогенезу и инфильтрации иммунных клеток.

Однако некоторые полисахариды и белки внеклеточного матрикса могут также играть отрицательную роль в перерождении нормальной клетки в раковую и в дальнейшей прогрессии онкологического заболевания [249–252].

2.1. Гиалуроновая кислота: структура, свойства и роль в онкогенезе

Основным компонентом внеклеточного матрикса является гиалуроновая кислота [253]. Гиалуроновая кислота (гиалуронат, гиалуронан) – несulfированный гликозаминогликан, входящий в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.) [254, 255].

Гиалуроновая кислота представляет собой несulfированный поли-(2-ацетамидо-2-дезоксид-D-глюко)-D-глюкуроногликан, состоящий из повторяющихся остатков D-глюкуроновой кислоты и D-N-ацетилглюкозамина (брутто-формула $C_{28}H_{44}N_2O_{23}$) (рисунок 3).

ГК синтезируется на клеточной поверхности в виде большого линейного анионного полимера (до 10^7 Да) в различных типах клеток при заживлении ран, а также в опухолях [256, 257]. Существуют три различных изофермента синтазы ГК (HAS1, HAS2, HAS3), которые синтезируют ГК. Эти синтазы ГК являются уникальными гликозилтрансферазами, поскольку они локализованы в цитоплазматической мембране, а не в аппарате Гольджи [257, 258]. Первичная структура всех трех изоформ показывает, что они являются трансмембранными белками и пронизывают цитоплазматическую мембрану несколько раз. Эти три изофермента содержат цитоплазматические каталитические центры, которые синтезируют в результате реакции олиго-

меризации ГК из UDP-N-глюкуроновой кислоты и UDP-N-ацетил-N-глюкозамина [253, 258]. Образующий полимер ГК выделяется непосредственно во внеклеточное пространство через поры в плазматической мембране (рисунок 4).

Повторяющийся дисахарид [(1→3)-β-d-GlcNAc-(1→4)-β-d-GlcA-].

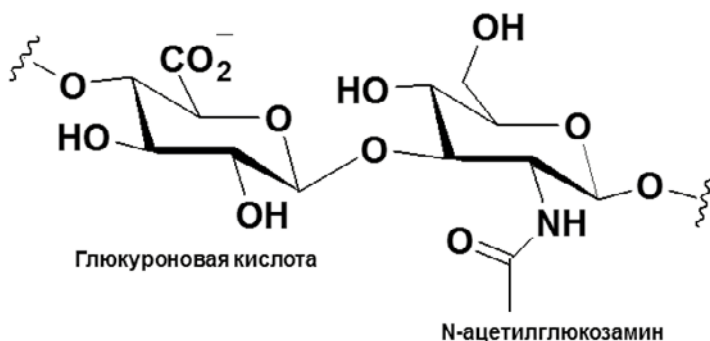


Рис. 3. Структура гиалуроновой кислоты. Адаптировано из: Stern R., 2004 [254].

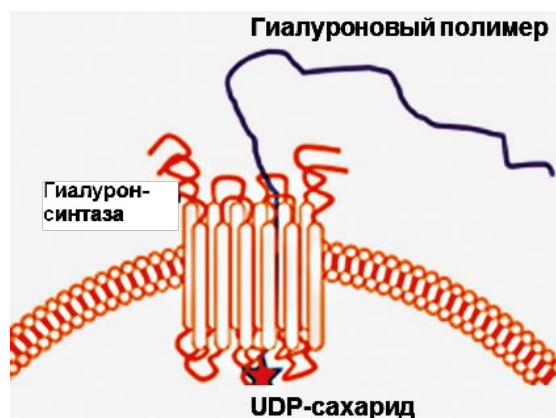


Рис. 4. Синтез ГК в клетке. UDP-сахара связываются с синтазой в цитоплазме, и растущий полимер выделяется через поры во внеклеточное пространство. Адаптировано из: McCarthy J. B. and Turley E. A., 2018 [259].

Результаты исследования клеточных культур продемонстрировали, что инвазивные опухолевые клетки рака молочной железы синтезируют и накапливают большее количество ГК, чем нормальные ткани, и преимущественно экспрессируют больше HAS2 mRNA, чем менее агрессивные опухолевые клетки [260]. Кроме того, HAS2-синтаза способствует инвазии клеток рака молочной железы *in vitro* [261]. Было показано, что сверхэкспрессия HAS2-синтазы в эпителиальных клетках молочной железы трансгенных мышей MMTV-Neu увеличивала образование ГК в опухоли и усиливала рост опухолей молочной железы [262]. Опухоли со сверхэкспрессией HAS2 показали высокий уровень ангиогенеза и рекрутирование стромальных кле-

ток. Эти результаты продемонстрировали, что повышенное содержание ГК в микроокружении опухоли поддерживает механизмы прогрессирования опухоли.

Повышенное содержание ГК наблюдается в различных видах опухолей, включая карциномы рака груди, простаты, легких, мочевого пузыря, рака яичников [263–266]. Было продемонстрировано, что ГК специфически связывается с высоким сродством с интактными клетками, и показано, что ГК повышает подвижность клеток [267, 268]. Эти результаты показали, что ГК может непосредственно влиять на поведение клеток. Позднее было установлено, что ГК играет важную роль в процессах пролиферации, миграции, инвазии, ангиогенеза опухолевых клеток, воспаления, заживления ран, а также в развитии и прогрессировании злокачественных новообразований [269–274].

ГК является физиологическим лигандом и сигнальной молекулой RHAMM-рецептора (также известного как CD168 или HMMR, рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности) [275, 276]. ГК играет важную роль в прогрессировании и прогнозе онкологических заболеваний через RHAMM-опосредованные сигнальные пути. На модельных системах опухолей было показано, что RHAMM-рецептор содержит центр связывания ГК, тубулина и особые области, необходимые для проявления его онкогенных свойств [277, 278].

Молекулы ГК могут проявлять различные эффекты в зависимости от их размера и концентрации [279]. В ряде работ показано, что высокомолекулярная ГК (мол. масса > 100 кДа) отвечает за структурные функции, образование тканей, в то время как низкомолекулярная ГК (мол. масса < 100 кДа) является сигнальной молекулой и, связываясь с RHAMM, передает сигналы в клеточные пути, которые контролируют пролиферацию, ангиогенез, клеточную адгезию, подвижность и инвазивность раковых клеток [280, 281].

Низкомолекулярные фрагменты ГК (< 100 кДа) генерируются активными формами кислорода или азота, а также гиалуронидазами во время тканевого стресса, репарации или раковых заболеваний, и они обладают провоспалительными и проопухолевыми свойствами [282–287]. Показано, что низкомолекулярная ГК ускоряет пролиферацию и инвазивность клеток злокачественной плевральной мезотелиомы и меланомы, и она может быть биомаркером для ранней диагностики этих заболеваний (рисунок 5) [288–290].

Гиалуроновая кислота участвует в активации сигнальных путей. В 1989 году впервые было показано, что ГК стимулирует каскады фосфорилирования тирозина в белках и тем самым влияет на подвижность клеток [291, 292]. Кроме того, было обнаружено, что небольшие количества (нанограммы) ГК активируют различные тирозин и серин/треонин-киназы. К ним относятся тирозинкиназа Src, HER2/Neu-рецептор, киназа фокальной адгезии, протеинкиназа C и MAP1-киназы [293–297]. Вследствие регулирования активности этих киназ ГК ускоряет экспрессию специфичных цитокинов и белков, включенных в ремоделирование внеклеточного матрикса (рисунок 6) [298].

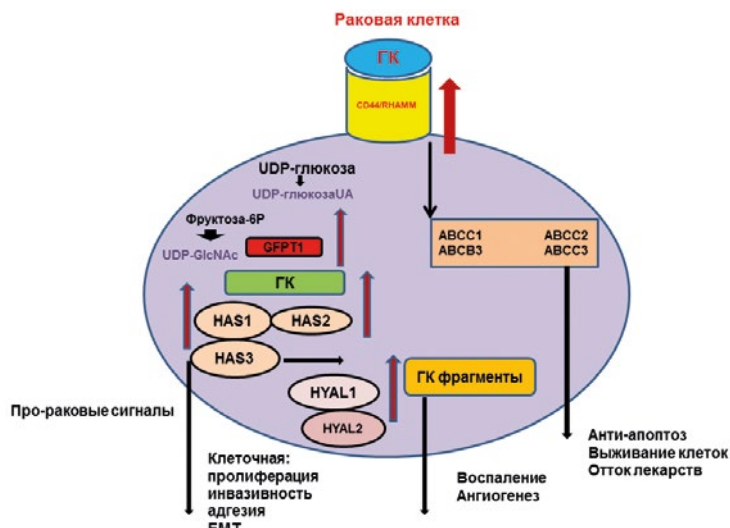


Рис. 5. Роль низкомолекулярной ГК в онкогенезе. Раковые клетки производят повышенные уровни эндогенной ГК, которая экспортируется из клеток и взаимодействует с рецепторами CD44/RHAMM. Галауронидазы (HYAL1, HYAL2) расщепляют ГК на фрагменты, которые способствуют воспалению и ангиогенезу. Низкомолекулярные фрагменты ГК активируют сигнальные пути, которые посылают ряд прораковых сигналов, способствующих пролиферации клеток, инвазии, адгезии, подвижности, эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT) и обновлению стволовых клеток. UDP: уридин дифосфат; HAS: гиалуронсинтаза; HYAL: гиалуронидаза. *Адаптировано с модификациями из: Price Z.K., Lokman N.A. and Ricciardelli C., 2018 [290].*

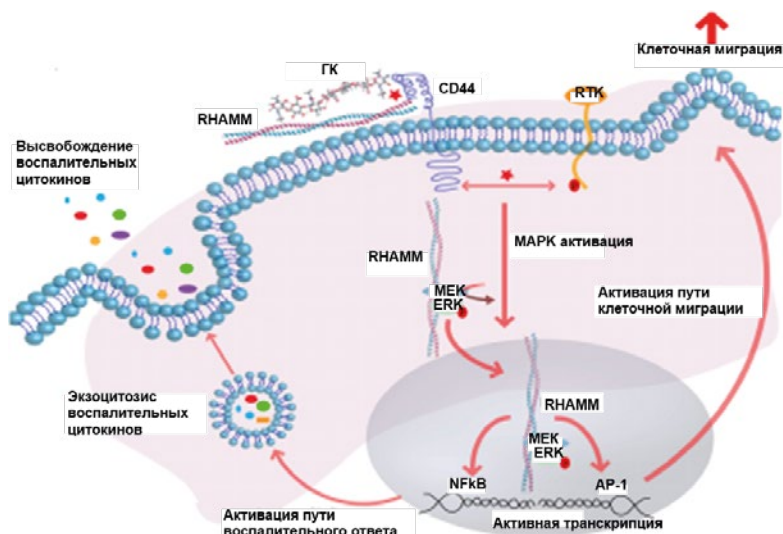


Рис. 6. Гиалуриновая кислота индуцирует рецептор-опосредованный сигналинг через взаимодействие с клеточно-поверхностными ГК-связывающими белками. Сокращения: MEK, MAPK, ERK – киназы; ERK – экстраклеточно регулируемая киназа; RHAMM – рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности; CD44 – кластер дифференциации 44; AP-1 – белок-активатор-1; RTK – рецептор тирозинкиназы; NFkB – ядерный фактор каппа В. *Адаптировано из: Schwertfeger K.L., Cowman M.K. et al., 2015 [298].*

Таким образом, ГК индуцирует рецептор-опосредованные сигнальные пути и вызывает изменения в клеточном транскриптоме [298].

В ряде работ показано, что в опухолевых клетках молочной и предстательной желез, легких, мочевого пузыря, яичников наблюдаются повышенные уровни ГК и RHAMM, которые совместно с HYAL-1-гиалуронидазой способствуют росту опухоли и связаны с плохим прогностическим фактором [299–306]. Исследования, посвященные конкретно гиалуронидазе 1 (Hyal1), показывают, что усиленная экспрессия Hyal1 в клетках рака молочной железы вызывает пролиферацию, миграцию, инвазию и ангиогенез опухолевых клеток [307]. Кроме того, нокаут Hyal1 в клетках рака молочной железы уменьшает рост клеток, адгезию и инвазию клеточной культуры, а также снижает рост опухоли *in vivo* [308]. Повышенные уровни низкомолекулярной ГК могут также ускорять митоз и инвазию клеток в окружающие ткани. Увеличенные уровни низкомолекулярной ГК, обнаруженные в сыворотке пациентов с раком молочной железы, коррелируют с наличием метастазов в лимфатических узлах [309]. Установлено, что ГК индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1 β -макрофагов [310]. Многочисленные исследования выявили инициацию и прогрессирование рака молочной железы под действием цитокина IL-1 β . Экспрессия IL-1 повышается в опухолевых и стромальных клетках в 90% карцином молочной железы [311, 312]. В свою очередь, повышенное содержание IL-1 в микроокружении опухоли приводит к усилению экспрессии циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), которая способствует образованию ранних стадий поражения и является хорошо известным опухолевым промотором [313]. Повышенный уровень IL-1 также приводит к росту опухолей молочной железы и метастазированию, частично благодаря индукции регуляции клеток-мишеней, происходящих из миелоидных клеток (MDSC), которые способствуют развитию иммуносупрессивной среды [314]. Гиалуроновая кислота также контролирует экспрессию хемокинов, включая IL-8/CXCL8 [315]. Хемокины являются провоспалительными цитокинами, которые играют важную роль в рекрутировании лейкоцитов и в клеточной транспортировке. Эти секретируемые белки взаимодействуют с рецепторами, связанными с G-белком на клеточной поверхности, чтобы вызвать перестройку цитоскелета, адгезию к эндотелиальным клеткам и направленную миграцию клеток в определенные участки ткани [316]. Например, IL-8 связывает свои рецепторы, CXCR1 и CXCR2, чтобы стимулировать хемотаксис нейтрофилов [317]. IL-8 сверхэкспрессируется при раке молочной железы и способствует опухолевой инициации и росту посредством стимуляции миграции и инвазии клеток рака молочной железы. Совсем недавно в исследованиях было показано участие IL-8 в регуляции инвазии клеток рака молочной железы [318]. Хемокины макрофагов, которые регулируются ГК, включая CXCL2 и CXCL12, аналогичным образом вовлечены в прогрессирование рака молочной железы и способствуют миграции и инвазии этих раковых клеток [319–321]. Установлено, что CXCL12/CXCR4axis особенно важно для метастазирования опухолевых клеток молочной железы, костного мозга и легких [322]. Эти исследования предполагают, что модуляция провоспалительных цитокинов посредством ГК в микроокружении опухоли представляет собой потенциальный механизм, с помощью которого ГК может способствовать прогрессированию роста опухоли. Эти исследования предполагают проонкоген-

ную роль повышенного содержания ГК и механизмы, с помощью которых ГК может способствовать инициации и прогрессированию опухоли. Например, увеличение количества ГК в опухолевой клетке может обеспечить им защитную оболочку, сводя к минимуму распознавание иммунными клетками, и способствовать снижению повреждений от активных форм кислорода и азота.

Понимание роли, которую играет ГК в развитии и прогрессии рака, имеет важное значение для разработки новых терапевтических подходов, направленных как на опухолевые клетки, так и на проонкогенные функции раковой стромы. Участие ГК и RHAMM-рецептора в сигнальных путях, регулирующих взаимодействия между молекулами в клетке, предполагает их потенциал в качестве биомаркеров для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Блокирование синтеза или сигналинга ГК, а также устранение ГК-связывающей функции одного из его рецепторов RHAMM, который тесно связан с онкогенезом, является новым многообещающим терапевтическим подходом для лечения онкологических заболеваний.

2.2. RHAMM: свойства, структура, область связывания с ГК и тубулином

Злокачественные опухоли характеризуются высоким содержанием компонентов внеклеточного матрикса, включая ГК, протеогликаны, коллагены, фибронектин и ламинин. Во время прогрессирования рака могут наблюдаться значительные изменения в структурных и механических свойствах компонентов ЕСМ. Важно отметить, что содержание ГК обычно выше в злокачественных опухолях по сравнению с доброкачественными тканями и является индикатором прогрессирования рака в некоторых типах опухолей [323]. Ключевые биологические функции ГК обусловлены ее взаимодействиями со специфическими рецепторами клеточной поверхности CD44 и RHAMM, которые играют важную роль в воспалительных процессах и развитии онкологических заболеваний [324–326].

RHAMM/HMMR (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности, *Homo sapiens*) является белком, состоящим из 725 аминокислот (мол. масса – 95 кДа) [327]. RHAMM/HMMR впервые был идентифицирован и выделен из фибробластов мыши в 1992 г. [328]. Показано, что мРНК RHAMM подвергается альтернативному сплайсингу, и при этом образуются различные изоформы белка [329, 330]. В настоящее время идентифицированы 4 изоформы RHAMM из опухолевых клеток (А, В, С и Д, мол. массы 70,02, 75,70, 77,43 и 83,71 кДа) [330, 331]. ГК является физиологическим лигандом RHAMM-рецептора.

В зависимости от локализации различают поверхностный и внутриклеточный RHAMM, который локализуется в цитоплазме и в ядре клетки. Структурно RHAMM является гидрофильным, альфа-спиральным белком, не имеет гидрофобного сигнального пептида или гидрофобных трансмембранных доменов (рисунок 7).

Фактически, в RHAMM отсутствуют структурные свойства, необходимые для традиционного внеклеточного экспорта. Показано, что RHAMM имеет примерно 35% гомологии с аминокислотной последовательностью белка KIF15, члена семейства кинезинов [332, 333]. Как и KIF15, RHAMM

не имеет сигнального пептида для экспорта через аппарат Гольджи либо через эндоплазматический ретикулум. Однако, несмотря на это, RHAMM может экспортироваться на поверхность клетки с помощью нетрадиционных механизмов, таких как экзоцитоз или примембранный блеббинг [33].

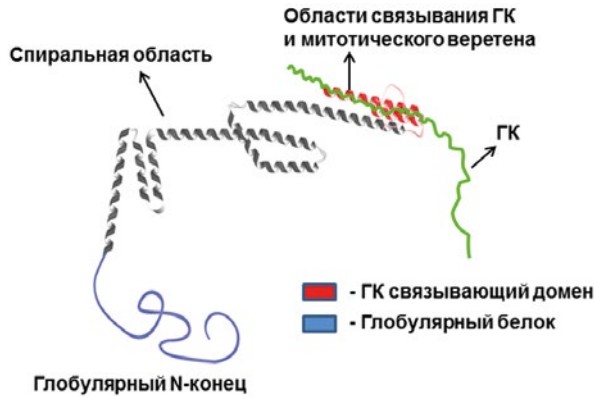


Рис. 7. Структура RHAMM. Адаптировано из: Tolg C., McCarthy J. B., Yazdani A., Turley E. A., 2014 [325].

Поэтому RHAMM функционально относится к числу внутриклеточных белков, которые секретируются и высвобождаются с помощью новых, нетрадиционных механизмов экспорта и которые выполняют различные внеклеточные и внутриклеточные функции [334–336].

RHAMM содержит высококонсервативную область связывания ГК и митотического веретена (рисунок 7). Связывание ГК с RHAMM отличается от взаимодействия ГК с CD44. Показано, что связывание ГК с CD44 происходит посредством взаимодействий с N-концевым «связующим» доменом CD44-рецептора, подобным тем, которые были обнаружены в других типах белков, связывающих ГК, в частности, внеклеточных протеогликанов, таких как версикан, агрекан и белок связывания [337]. Однако в отличие от CD44 установлено, что RHAMM взаимодействует с ГК ионным способом через основную аминокислотную C-концевую область, которая может быть подразделена на два мотива из 10 и 11 аминокислот соответственно [338]. Эти мотивы соответствуют аминокислотам (aa 636–646) и (aa 658–667), которые являются высокоосновными областями (рисунок 8) [338]. RHAMM связывает ГК через структурный домен (мотив BX_7B , где B представляет собой основной аминокислотный остаток, а X представляют собой неосновные остатки), который отличается от доменов связывания CD44 [337, 338]. Установлено, что эти основные остатки в RHAMM необходимы для ионного взаимодействия с ГК, а также с гепарином, и эти взаимодействия разрушаются при увеличении концентрации соли [339]. Важно подчеркнуть, что « X_7 » остатки являются высокоупорядоченными и эволюционно консервативными. Этот мотив содержит остатки лейцина через каждые 7 аминокислотных остатков и консервативные гидрофобные (внутренние) и полярные (внешние) аминокислотные остатки, которые обеспечивают предсказанную спиральную структуру и образуют основной мотив лейциновой застежки-молнии (zipper, bZip) (рисунок 8).



Рис. 8. Консервативные структурные домены в RHAMM: N-концевой домен, связывающий микротрубочки, отделен от С-концевого основного мотива лейциновой молнии (bZIP) с помощью большого спирального домена. С-терминал направляет белок в центросому и регулирует убиквитинирование. Основные мотивы в RHAMM, которые взаимодействуют с гиалуроновой кислотой, обозначены зеленым цветом. Консервативные лейцины обозначены красным цветом для мотива bZIP, который подчеркнут черным. *Адаптировано с модификациями из: He Z., Mei L., Connell M. and Maxwell C.A., 2020 [337].*

Следует отметить, что этот мотив bZip сохраняется у всех хордовых, в том числе у морского кальмара (*Ciona intestinalis*), а также у насекомых [340]. Показано, что лейциновая застежка-молния необходима также для ассоциации RHAMM с митотическим веретеном [337, 341].

Внутриклеточный RHAMM представляет собой ядерный белок, который связывается с тубулином митотического веретена, а также с моторными белками, такими как динеин [341, 342]. RHAMM играет ключевую роль в формировании митотического веретена, а также в регуляции правильной хромосомной сегрегации и геномной стабильности [338, 339]. Установлено, что сверхэкспрессия RHAMM, так же как и его отсутствие, приводят к деформации митотического веретена [343]. Эти эффекты RHAMM являются следствием его стыковки с MEK1/ERK1,2, поскольку поврежденные митотические веретена, возникающие в результате потери экспрессии RHAMM, могут быть восстановлены заново активностью MEK1 [344].

Исследования показали, что RHAMM содержит на N-конце домены, связывающие α -тубулин микротрубочек в период интерфазы митоза клеток (рисунок 7) [345–347]. Распределение RHAMM наблюдалось по всей длине микротрубочек, что было ранее показано также для других белков, ассоциированных с эпителиальными микротрубочками (MAP), включая MAP4 и MAP125 [348, 349]. Совместная локализация RHAMM с тубулином микротрубочек наблюдалась во всех исследованных типах клеток, что убедительно свидетельствует о том, что RHAMM представляет новый член семейства белков MAP.

Результаты исследований показали, что гомология RHAMM с MAP-белками наблюдается полностью в спиральных доменах [348, 349]. Известно, что тубулин-связывающие домены обычно ограничены основными областями, содержащими повторяющиеся мотивы, богатые заряженными аминокислотами. Установлено, что домен взаимодействия RHAMM с тубулином состоит из двух отдельных субдоменов, MTBD-1 и MTBD-2 [338]. Показано, что MTBD-1 включает в себя последовательности из аминокислот aa 40–59. Эта область RHAMM является основной (pI = 10,61), высокозаряженной (45% заряженных остатков) и богатой аминокислотой пролином. MTBD-2

включает последовательности аминокислот aa 76–90 [338]. MTBD-2 является нейтрально заряженной областью и вносит вклад в связывание тубулина посредством пространственной кластеризации положительно заряженных остатков α -спирального сегмента RHAMM [347, 348]. Установлено также, что область связывания RHAMM с тубулином перекрывается с областью связывания ГК [338].

Внеклеточный и внутриклеточный RHAMM имеет разнообразные функции и способен взаимодействовать с различными белками (рисунок 9).

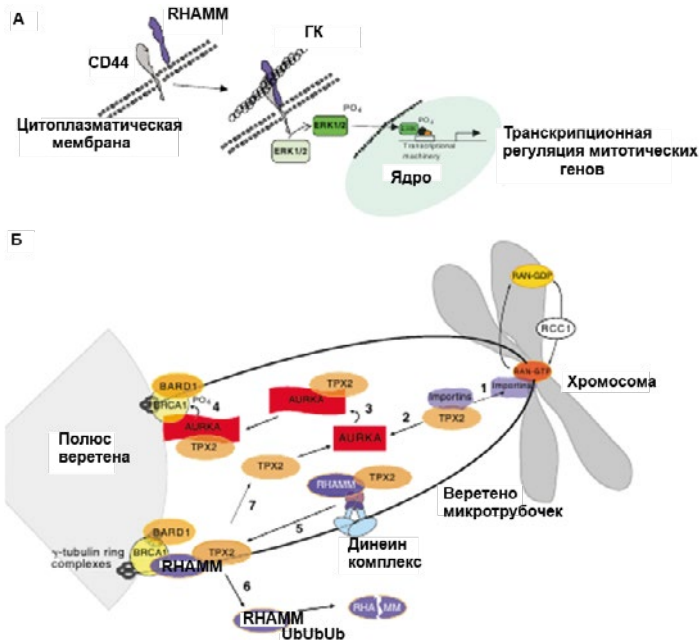


Рис. 9. Внеклеточные и внутриклеточные функции RHAMM. А – RHAMM на клеточной поверхности способствует активации сигнальных каскадов. RHAMM на клеточной поверхности связывается с CD44 и в присутствии ГК активирует ERK1/2 (обозначен как фосфорилированный (PO₄) ERK1/2), что приводит к экспрессии генов, необходимых для подвижности и инвазии. Б – в экстрактах из яиц *X. laevis* градиент RAN-GTP, который определяется активностью связывающего хромосому гуанинового нуклеотид-фактора RCC1, необходим для сборки анастрального митотического веретена. Активность RAN-GTP регулирует функцию ряда белков митотического веретена, включая импортины, которые затем образуют ингибирующие комплексы с обоими факторами сборки веретена и TPX2. Например, связывая импортины (обозначенные как стадия 1), RAN-GTP высвобождает TPX2 (стадия 2), который является основным активатором *Аврора* киназы *А* (AURKA). TPX2 напрямую активирует AURKA путем защиты аутофосфорилированного остатка (стадия 3). AURKA, в свою очередь, может фосфорилировать (PO₄) BRCA1 для облегчения перехода G2-M (стадия 4). По средством взаимодействия с комплексом динеина RHAMM локализуется на полюсе веретена, на котором он взаимодействует с γ -тубулином (стадия 5). RHAMM также взаимодействует с TPX2 и динеином, тем самым обладая потенциалом локализовать TPX2 на полюсе веретена (стадия 5). Комплекс BRCA1-BARD1 модифицирует локализацию TPX2 и сборку веретена, ослабляя функцию RHAMM посредством убиквитинирования (Ub) (стадия 6). Убиквитинирование RHAMM и впоследствии его деградация, вероятно, высвобождают TPX2 из полюса веретена (стадия 7), что влияет на активацию AURKA и прогрессию G2-M. Адаптировано из: Maxwell I. C. A, McCarthy J., Turley E., 2008 [334].

Структурно центральная область RHAMM представляет собой спиральный виток (aa 69–681), который действует в качестве домена потенциальной димеризации и области связывания для других белков. Установлено, что RHAMM взаимодействует с CHICA/FAM83D через аминокислоты 365–546, а аминокислоты 574–602 действуют как кальций-зависимый домен связывания кальмодулина [341, 349, 350]. Благодаря своему взаимодействию с CHICA RHAMM локализует легкую цепь динеина 1 (DYNLL1) и альфа-СК1 в веретено, а также способствует стыковке BACH1 в веретене [349, 351]. Эти белковые комплексы, образующиеся при взаимодействии с RHAMM, играют ключевую роль в правильной ориентации митотического веретена и установлении оси деления клетки.

Показано, что фосфорилированная по тирозину форма RHAMM-Thr703 также локализуется в ядре [351, 352]. RHAMM посттрансляционно модифицируется особенно во время G2M и поляризации клеток во время миграции [353]. Киназы, осуществляющие фосфорилирование RHAMM, включают Src, PKC, ERK1/2 и AURKA (рисунок 8). Фосфорилированная форма RHAMM-Thr703 не только направляет белок в ядро, но также регулирует Rap-зависимый ядерный транспорт белка-мишени TPX2 [352, 354]. TPX2 в настоящее время широко охарактеризован как основной активатор митотической киназы *Aurora kinase A*, а также выполняет и другие функции [355–357]. Для RHAMM характерно образование комплексов с белком TPX2 в зависимости от фазы клеточного цикла [358, 359].

Эти комплексы служат как для регуляции активности митотической киназы, так и для регуляции белка Eg5, отвечающего за подвижность клеток [360–362]. Таким образом, RHAMM служит связующим партнером для белков сборки митотического веретена, таких как TPX2, DYNLL1, CHICA и FAM83D, а также для регулирования его сборки, стабильности и правильного расположения микротрубочек веретена во время митоза.

Функции RHAMM и CD44 в гомеостазе и митозе клетки

В то время как экспрессия CD44 является повсеместной, RHAMM обычно не обнаруживается в большинстве гомеостатических тканей, но его экспрессия увеличивается в ответ на повреждение ткани, клетки и, таким образом, оказывается в первую очередь важной для восстановления гомеостаза после повреждения ткани или клетки [325]. Нокаут-RHAMM^(-/ -)-мыши являются жизнеспособными, но обнаруживают дефекты тканей, включая повреждение сосудов и заживление ран [363]. RHAMM является также необходимым для фертильности взрослых самок мышей [364].

В ряде работ было показано, что взаимодействие ГК с CD44 часто ассоциируется с повышенной подвижностью клеток и инвазивностью, а также CD44 может влиять на рост и лекарственную устойчивость опухолевых клеток [365, 366]. Как и в случае с CD44, RHAMM может находиться на поверхности клеток. Однако, в отличие от CD44, экспрессия поверхностного RHAMM строго регулируется, это происходит только в условиях клеточного стресса. Таким образом, RHAMM является в значительной степени цитоплазматическим белком, локализация поверхностного RHAMM-белка строго регулируется механизмами, сходными с механизмами для других неконвенционально экспор-

тируемых цитоплазматических и ядерных белков. Поверхностный RHAMM регулирует активацию сигнального каскада посредством взаимодействия с другими интегральными рецепторами, такими как CD44 [325]. Кроме того, поверхностный и внутриклеточный RHAMM также участвуют в стимулировании клеточной подвижности и инвазии. Показано, что подвижность клеток зависит от внеклеточных взаимодействий RHAMM и CD44, поскольку дефекты подвижности, проявляемые клетками RHAMM^(-/-), устраняются в течение 4 часов путем добавления рекомбинантного белка RHAMM [277, 281].

RHAMM также участвует в регуляции клеточного цикла, поскольку его экспрессия увеличивается в фазе G2/M клеточного цикла [367, 368]. Как и предсказывалось из-за способности RHAMM контролировать экспрессию генов клеточного цикла, RHAMM также может влиять на пролиферацию клеток, а блокирование поверхностного RHAMM или RHAMM в митотическом веретене приводит к блокированию фазы G2/M клеточного цикла [369, 370].

Сигнальные свойства RHAMM

Поверхностный RHAMM взаимодействует с CD44 и другими интегральными рецепторами, такими как RON, член семейства рецепторов HGF, и PDGFR для активации сигнальных каскадов, в частности RAS-ERK1/2, которые контролируют экспрессию генов клеточного цикла, таких как *cdk1/cdc2*, и генов, связанных с подвижностью клеток, таких как активация генов металлопротеиназы MMP9 [371–374]. Как CD44, так и поверхностный RHAMM также функционируют в качестве корецепторов для активации трансмембранных тирозинкиназ (включая EGFR, MEK/2 и PDGFR) и ERK1/2 (рисунок 10) [375–378].

Оба C44 и RHAMM регулируют интенсивность и длительность действия таких путей передачи сигнала, как ERK1/2, которые инициируются факторами роста [364, 375]. Внутриклеточный RHAMM функционирует в качестве каркасного белка, который непосредственно связывается с ERK1 и образует комплексы с ERK1/2 и MEK1 [380]. RHAMM необходим как для удержания активного ERK1/2 в ядре клетки, так и для экспрессии множества генов, регулируемых ERK1/2 через сигналинг YAP-белка [381, 382]. Предполагается, что это один из механизмов, с помощью которого RHAMM помогает увеличить интенсивность и продолжительность онкогенных сигнальных путей ERK1/2 [323, 383]. Одним из следствий ГК-, CD44- и RHAMM-опосредованного увеличения продолжительности активации ERK1/2 является изменение транскриптома клеток в опухолевой строме (рисунок 10). Эти изменения в экспрессии генов оказывают влияние на активацию путей трансдукции, связанных с миграцией клеток, экспрессией и экспортом медиаторов воспаления [375, 384].

В свою очередь, постоянная активация этих путей в опухолевой строме усиливает проонкогенное воспаление и прогрессирование опухолей рака молочной железы. Таким образом, это представляет собой один из основных механизмов, с помощью которых биологическая «информация», закодированная в ГК, может привести к проонкогенным, или «раковым», изменениям в строме. Позитивные паракринные и аутокринные петли обратной связи между опухолевыми и стромальными клетками могут инициировать

ся медиаторами воспаления, такими как IL-1 α и TGF β , которые увеличивают синтез ГК и экспрессию обоих RHAMM и CD44, которые в совокупности поддерживают миграцию и инвазию клеток в раковой строме [381, 385]. Таким образом, ненормальная регуляция CD44 или RHAMM в раковой строме является очевидным следствием устойчивой активации ERK1/2, что способствует сохранению устойчивой онкогенной передачи сигналов [386–388]. Поскольку CD44 и RHAMM функционально взаимодействуют при определенных условиях, таргетинг RHAMM может быть эффективным способом специфического ограничения функции CD44 в опухолях молочной железы. Существуют также и другие рецепторы, участвующие в клеточных ответах на ГК, TLR2, TLR4 и LIVE-1 [389–393]. Однако роль этих рецепторов в онкогенезе пока недостаточно изучена.

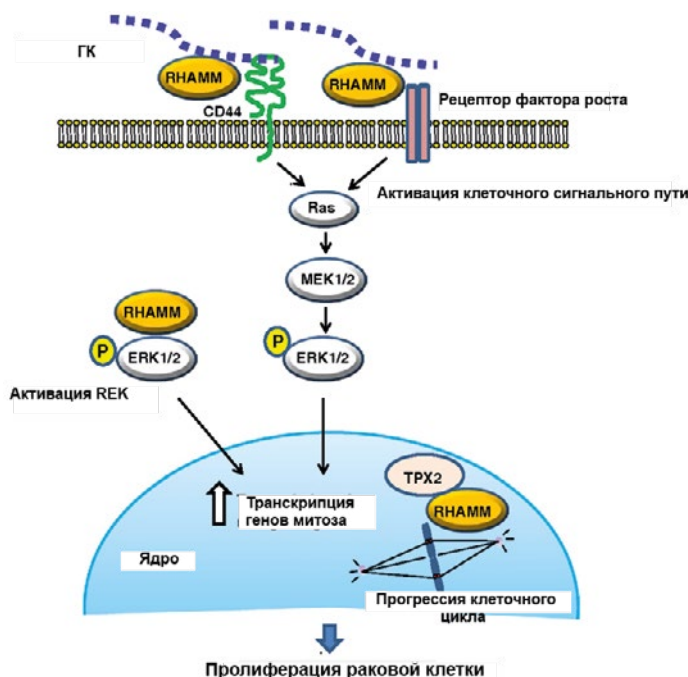


Рис. 10. Роль RHAMM в пролиферации опухолевых клеток. В присутствии ГК внеклеточный RHAMM связывает ГК и взаимодействует с CD44 или рецептором фактора роста, таким как PDGF и EGFR, что приводит к активации Ras, MEK1/2, сигнального пути ERK1/2 и к транскрипции генов митоза. Внутриклеточный RHAMM может активировать ERK, что приводит к индуцированной транскрипции гена, необходимого для пролиферации раковой клетки. Ядерный RHAMM участвует в сборке митотического веретена, связываясь с TPX2. Комплекс RHAMM/TPX2 способствует аномальному прогрессированию клеточного цикла при злокачественном состоянии. Адаптировано с модификациями из: Shigeishi H., Higashikawa K., Takechi M., 2014 [379].

2.3. ГК и RHAMM – мишени для терапии онкологических заболеваний

ГК выполняет разнообразные функции в микроокружении опухоли (таблица 2).

Таблица 2

Эффекты ГК на опухолевые клетки.*Адаптировано с модификациями из Price Z. K., 2018 [290].*

Типы клеток	ГК (кДа)	Функциональная роль и эффекты ГК
Рак яичников		
SKOV-3	1000	ГК способствует миграции и росту клеток через Rac1 и Ras
SKOV-3	500	ГК способствует миграции клеток через CDC42 и ERK1
Рак молочной железы		
MDA-MB-231	400–500	ГК способствует росту клеток и инвазивности через RhoA, RhoC и ROK
MCF-7	500	ГК стимулирует экспрессию MDR1 и Bcl-x _L , рост клеток и инвазивность
MDA-MB-231	3–5	ГК ускоряет инвазивность клеток
Хориокарцинома		
JEG-3	1500–1800	ГК способствует миграции клеток через RHAMM, PI3K и MAPK

Сокращения: Rac1 – Ras-родственный C3-ботулину субстрат 1; Cdc42 – контрольный белок клеточного деления 42; ERK – внеклеточно сигнально регулируемая киназа; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; RhoC – семейство генов Ras-гомологов, член C; RhoA – Ras-гомолог семейства генов, член A; ROK – Rho-ассоциированная протеинкиназа; RHAMM – рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности; MAPK – митоген-активированная протеинкиназа.

ГК обеспечивает не только клеточную поддержку и гидрофильный матрикс, но также регулирует межклеточную адгезию, миграцию, рост и дифференцировку клеток [394, 395]. Кроме того, формируя межклеточные покрытия, ГК может защищать опухолевые клетки от иммунной атаки [396, 397]. Некоторые опухолевые клетки продуцируют повышенное количество ГК или индуцируют выработку ГК путем высвобождения факторов роста и цитокинов. Эти соединения могут регулировать активность ферментов гиалуронсинтазы и гиалуронидазы. Установлено, что сверхэкспрессия ГК повышает способность фибросаркомы и клеток меланомы к образованию метастазов, в то время как прекращение синтеза HAS2 блокирует рост опухоли простаты мышиных ксенографтов [398, 399]. В опухоли также может происходить накопление низкомолекулярной ГК за счет АФК-индуцированной фрагментации ГК [400]. В результате этого низкомолекулярная ГК накапливается в паренхиме опухоли и в стромальных тканях, что способствует метастазированию раковых клеток [401–404]. Кроме того, сверхэкспрессия ГК в опухолевых клетках может индуцировать эпителиальные изменения раковых клеток в направлении миграционного фибробластического фенотипа [405]. ГК может также привлекать мезенхимальные стволовые клетки, которые являются предшественниками фибробластов, ассоциированных с опухолью [406].

Модели на трансгенных мышах показали, что ГК активирует ангиогенез и рост опухоли [406, 407]. Таким образом, учитывая взаимодействие ГК с RHAMM-рецептором и его роль в развитии и прогрессировании злока-

чественных новообразований, таргетинг ГК представляет собой перспективный терапевтический подход к лечению онкологических заболеваний. Существует множество потенциальных точек метаболического пути ГК, которые могут быть мишенями, включая синтез ГК, сверхэкспрессию, образование низкомолекулярной ГК или взаимодействие ГК с рецепторами. В настоящее время общепринятым подходом является применение 4-MU (4-methylumbelliferone), ингибитора синтеза ГК, для лечения рака молочной железы (рисунок 11) [408]. Многочисленные исследования показали, что 4-MU уменьшает пролиферацию, миграцию опухолевых клеток рака молочной железы и снижает рост опухоли у мышей [409–413]. Кроме того, было показано, что обработка мышей с метастатическими поражениями костей с 4-MU снижала накопление ГК и рост остеолитических поражений [414, 415].

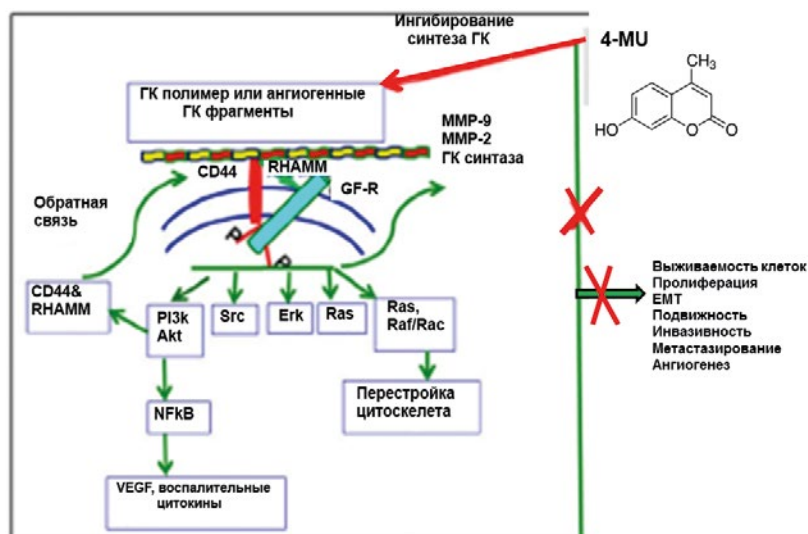


Рис. 11. Молекулярная основа противоопухолевой активности 4-MU. Адаптировано из: Nagy N. et al., 2015 [408].

Связывание ГК с клеточно-поверхностными рецепторами, CD44 и RHAMM, запускает различные сигнальные события, включая сложные взаимодействия между рецепторами ГК и рецептором ростового фактора тирозинкиназ, и активацию нижестоящих эффекторов, таких как Akt, NFkB, src, ERK, Ras/Raf/Rac-1. Эти сигнальные события вызывают экспрессию воспалительных цитокинов, VEGF, матричных металлопротеиназ (MMP-2, MMP-9), а также ГК-синтаз и CD44/RHAMM. Индуцируя эти сигнальные события и влияя на эффекторы, ГК стимулирует выживание клеток, пролиферацию, эпителиально-мезенхимальное взаимодействие, инвазию и подвижность, что приводит к росту и прогрессированию опухоли. Поскольку 4-MU ингибирует синтез ГК, он блокирует первую стадию в этом сигнальном каскаде и, таким образом, проявляет высокую противоопухолевую и антиметастатическую активность.

Установлено, что 4-MU хорошо переносился животными, что свидетельствует о том, что блокирование каталитической функции гиалуронсинтазы представляет собой перспективную терапевтическую стратегию. Недавно также было продемонстрировано, что снижение синтеза ГК в сочетании с химиотерапией усиливает терапевтический ответ лекарства [409]. Важно подчеркнуть необходимость комбинационного таргетинга, воздействующего как на онкогенные сигнальные пути опухолевых клеток, так и на микроокружение опухоли. В связи с этим элиминация ГК в микроокружении опухоли с использованием гиалуронидаз также была исследована в качестве потенциальной терапевтической стратегии для некоторых раковых заболеваний, в частности для рака предстательной и молочной желез [417–419]. Установлено, что обработка клеток рака молочной железы гиалуронидазой бактериофага ингибировала рост, миграцию и инвазивность клеточной культуры [420]. Показано также, что рекомбинантная гиалуронидаза, которая устраняет стромальную ГК, позволяла увеличить доступ лекарств к опухолевым клеткам [417–419].

Становится все более очевидным, что будущие перспективы лечения воспаления и (или) рака должны включать таргетинг специфичных сигнальных путей в опухолевых клетках.

Одним из таких подходов является разработка ГК-связывающих пептидов, которые могут специфично блокировать ГК-стимулированную передачу сигналов. Первые попытки в этом направлении привели к созданию пептида PEP-1, который был идентифицирован методом последовательного связывания 12-мерного фагового дисплея с иммобилизованной ГК [421]. Было показано, что PEP-1 уменьшал пролиферацию стволовых клеток желудка и понижал *H. pylori*-индуцированную эпителиальную пролиферацию желудка *in vivo* [422]. Кроме того, PEP-1 в сочетании с селективной активацией рецептора аденозина A2 ингибировал воспаление, связанное с артритом [423, 424]. Пептид PEP-1 также уменьшал метастазирование опухоли и повышал выживаемость мышей [425]. Хотя PEP-1 был эффективным в этих исследованиях, не было продемонстрировано, что он ингибирует взаимодействия ГК со специфичным рецептором. Совсем недавно был разработан уникальный пептид RHAMM-миметик (P-15), используя 15-мерный подход фагового дисплея [426]. Этот пептид P-15, который связывается с ГК, является уникальным в нескольких отношениях. В отличие от PEP-1 пептид P-15 содержит VX₇B-мотив связывания ГК, обнаруженный в RHAMM. Этот пептид способен связывать низкомолекулярные фрагменты ГК с высоким сродством, может ингибировать связывание ГК с RHAMM, но не блокирует связывание ГК с CD44. Показано, что пептид P-15 ингибирует ГК-стимулированную миграцию фибробластов RHAMM^(+/+), но не влияет на миграцию нокаут-фибробластов RHAMM^(-/-). Кроме того, установлено, что P-15 уменьшал воспаление, ангиогенез и фиброплазию клеток RHAMM^(+/+), но не RHAMM^(-/-). Необходимо отметить, что разработки ГК-связывающихся пептидов продолжаются и недавно был разработан новый пептид VN-P, состоящий из 42 аминокислот, который содержит три ГК-связывающих VX₇B-мотива и проявляет противоопухолевые эффекты, в частности ингибирует пролиферацию опухолевых клеток и рост опухоли меланомы у ксенографтов мышей [427].

Глава 3. Таргетинг RНАММ для лечения раковых заболеваний

3.1. RНАММ-пептиды, используемые в качестве вакцин

RНАММ играет ключевую роль при воспалительных и онкологических заболеваниях. Показано, что RНАММ вовлечен в диабет, артрит и многие виды рака, включая солидные опухоли и лейкомии [428, 429]. RНАММ-рецептор избыточно экспрессируется при различных онкологических заболеваниях, включая рак яичников, рак молочной, предстательной и поджелудочной желез, рак почек, мочевого пузыря, множественную миелому, лейкомию, лимфому и рак толстой кишки (таблица 3) [379, 430–439].

Таблица 3

Экспрессия RНАММ в различных типах опухолей.

Адаптировано с модификациями из: Shigeishi H. et al., 2014 [379].

Тип рака	Корреляция между RНАММ и клинико-патологическими параметрами	Методы анализа
Рак головы и шеи	У пациентов с высокой экспрессией мРНК RНАММ ниже показатели выживания. Экспрессия RНАММ коррелировала с экспрессией TPX2.	ПЦР или иммунохимия ПЦР
Рак молочной железы	Высокая цитоплазматическая экспрессия RНАММ была обнаружена в инвазивных раковых клетках. Высокая экспрессия RНАММ коррелировала с мутацией с BRCA1.	Иммунохимия
Рак предстательной железы	Повышенная экспрессия RНАММ способствует устойчивости андрогенно-депривационной терапии при раке предстательной железы.	Иммунохимия
Рак эндометрия	Повышенная экспрессия RНАММ значительно коррелировала с появлением метастаз лимфатического узла.	Иммунохимия
Рак почки	Экспрессия мРНК RНАММ коррелировала с метастазированием опухоли.	ПЦР
Рак мочевого пузыря	Экспрессия RНАММ коррелировала с инвазивностью опухолей и низкой выживаемостью.	Иммунохимия
Лейкемия	Высокая экспрессия RНАММ связана с низкой выживаемостью.	Иммунохимия

Известно, что ГК-связывающие функции RНАММ определяют его роль в прогрессировании раковых заболеваний, поскольку накопление и фрагментация ГК также необходимы для этих процессов [440, 441]. Поэтому были разработаны пептиды, которые имитируют либо сам RНАММ, либо ГК, и было показано, что они влияют на заживление ран, воспалительные и опухолевые процессы (таблица 4).

Таблица 4

Таргетинг RHAMM для лечения онкологических заболеваний.*Адаптировано из: Misra S. et al., 2015 [442].*

Типы рака	Функция RHAMM в развитии рака	Применение ГК-связывающего пептида
Плоскоклеточный рак пищевода	Инвазивность	Рер-1
Множественная миелома и синдром миелодисплазии	Антиапоптоз	RHAMM-R3-пептиды
Злокачественные опухоли периферических нервных оболочек или множественная миелома	Апоптотическая устойчивость	Блокирование RHAMM
Опухоли-нейробластомы	Апоптотическая устойчивость	RHAMM-иммунотерапия, таргетинг AURKA и BARD1
Острый миелоидный лейкоз	Противоопухолевая активность	RHAMM-R3-пептид

В то время как большинство белков, экспрессируемых нормальными тканями, не являются антигенными и не вызывают иммунного ответа из-за «самостоятельной толерантности», давно известно, что опухоли продуцируют антигенные белки, и они классифицируются как антигены, ассоциированные с опухолью (ТАА) [443]. Это часто белковые продукты мутантных генов и онкогенных вирусов, но они также могут быть белками, которые либо вырабатываются в очень небольших количествах, либо имеют ограниченные профили экспрессии в нормальных тканях. Поскольку их воздействие на иммунную систему ограничено, они обычно не вызывают иммунный ответ. Однако экспрессия ТАА резко увеличивается в опухолевых клетках, и это увеличение вызывает иммунный ответ. Таким образом, ТАА являются важными мишенями для иммунотерапии при некоторых видах рака. RHAMM является примером такого высокоантигенного белка с ограниченной экспрессией в нормальных тканях [444].

Первые попытки классификации ТАА использовали методы клонирования цитотоксичных Т-лимфоцитов [445, 446]. Позднее был проведен серологический скрининг библиотек экспрессии кДНК (SEREX), что привело к увеличению количества белков ТАА, связанных как с солидными опухолями, так и с гемопозитическими опухолями (то есть опухолями, развившимися из клеток кроветворной системы, – лейкомия, лейкоз и др.) [447, 448]. Скрининг SEREX идентифицировал RHAMM как потенциальный антиген, ассоциированный с лейкомией, при остром миелолейкозе и хроническом миелоидном лейкозе, а также в таких солидных опухолях, как рак молочной железы, яичников, почек, при меланоме и других видах рака [449, 450]. Высокая экспрессия RHAMM связана с агрессивным протеканием многих раковых заболеваний, а также является индикатором плохого исхода при раке молочной железы, множественной миеломе, колоректальном раке и других злокачественных новообразованиях [449–456]. В одном исследовании 28% пациентов с амилоидной лейкомией имели повышенный уровень RHAMM. Многовариантный анализ показал, что экспрессия RHAMM в > 5% лейкозных бластов идентифицировала подгруппу пациентов с амилоидной лейкомией с неблагоприятной общей выживаемостью [457].

Установлено, что пациенты с амилоидной лейкемией часто дают рецидивы и их 5-летняя выживаемость является относительно низкой [458]. Ликвидация остаточных лейкозных клеток у этих пациентов после трансплантации стволовых клеток дала сильный стимул для разработки иммунных методов лечения этого онкологического заболевания. RHAMM был идентифицирован как один из наиболее многообещающих антигенов для лечения амилоидной лейкемии. Были идентифицированы RHAMM-пептиды, которые образуются естественным путем и которые специфически распознаются Т-клетками у здоровых добровольцев и пациентов с амилоидной лейкемией [459, 460]. Показано, что RHAMM-R3-пептид вызывал самый высокий Т-клеточный ответ, и увеличение цитотоксического эффекта Т-лимфоцитов после применения RHAMM-R3-пептида наблюдалось после вакцинации дендритными клетками, полученными из лизатов клеток CLL (таблица 4). Кроме того, присутствие CD8⁺ RHAMM-специфических Т-клеток было связано с селективной элиминацией хемотрезистентной популяции клеток В-CLL [461]. Проводились клинические испытания фазы I/II для R3-пептида при заболеваниях амилоидной лейкемией, миелодиспластическим синдромом, множественной миеломой на пациентах, получавших либо 300, либо 1000 мкг пептида. RHAMM-R3-пептид продемонстрировал высокую эффективность и низкую токсичность для пациентов [462, 463]. Пациенты, получавшие любую из этих доз, продемонстрировали иммунологические и положительные клинические ответы на пептидную вакцину R3, и это свидетельствует о том, что RHAMM-пептиды являются перспективными для дальнейшей таргетной иммунотерапии пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями [462, 464]. В настоящее время RHAMM-пептиды и аутологичные дендритные клетки, полученные из лизатов опухолей, используют в качестве неспецифических вакцин для индукции иммунного ответа при амилоидной лейкемии и В-CLL бластов.

В дополнение к этим гематологическим злокачественным новообразованиям был использован ряд моделей опухолей у мышей для изучения эффективности иммунотерапии на основе RHAMM. Xenopus (x) RHAMM был идентифицирован как ксеногенная мишень для иммунотерапии с использованием перекрестно-реактивного анализа SEREX [465]. ДНК-вакцина на основе xRHAMM индуцировала защитный противоопухолевый иммунитет против локального роста и метастазирования меланомы B16 у мышей. Кроме того, под действием этой ДНК-вакцины ингибировался ангиогенез и стимулировался апоптоз опухолевых клеток, что согласуется с предыдущими сообщениями о роли RHAMM в этих процессах. Также сообщалось о противоопухолевой активности при вакцинации дендритными клетками, трансфицированными RHAMM, на модели глиомы мыши [466].

Опухоли нейробластомы были чувствительны к иммунотерапии на основе RHAMM из-за взаимодействий этого рецептора с AURKA-BRCA1/BARD1-RHAMM-TPX2 в модуле центросомы в рамках этого рефрактерного заболевания [467–469]. Таким образом, противоопухолевые вакцины являются новым терапевтическим средством, которое может играть более заметную роль в лечении раковых заболеваний в будущем.

3.2. Рекомбинантные пептиды, RНАММ-миметики

Проводились также разработки рекомбинантных пептидов, RНАММ-миметиков, с целью использования их для лечения раковых заболеваний. Показано, что рекомбинантные пептиды, RНАММ-миметики, значительно снижали образование первичных опухолей, а также метастазирование опухолей у животных [470]. Эта противоопухолевая активность была связана с ингибированием подвижности опухолевых клеток и блокированием фазы G2M клеточного цикла. Блокирование клеточного цикла происходило в результате снижения экспрессии *cdc2* и *cyclinB1* [470].

3.3. Пептиды, ГК-миметики, связывающиеся с RНАММ

Ряд исследований проводился по разработке пептидов, ГК-миметиков, связывающихся с RНАММ. В нескольких исследованиях использовались случайные фаговые библиотеки, а также рациональный дизайн для идентификации пептидов, которые связываются с RНАММ и блокируют взаимодействия RНАММ с ГК, как новые подходы к специфичной замене ГК-связывающих свойств этого белка [471, 472]. В одном из этих методов использовали фаговую библиотеку, которая содержала высокие уровни отрицательно заряженных L- и D-аминокислот, и первоначально скрининг охватывал те пептиды, которые связывались с рекомбинантным ГК-связывающим фрагментом RНАММ [473, 474]. Положительные кандидаты были проверены на их способность конкурировать с ГК за связывание с рекомбинантным RНАММ с помощью метода ELISA. Было показано, что эти пептиды (например, B2-A) специфично связываются с основными аминокислотами в RНАММ-белке, которые, как известно, участвуют в его взаимодействии с ГК. Однако биологические эффекты этих пептидов не были исследованы.

В настоящее время продолжают разработки пептидов, ГК-миметиков, в качестве терапевтических средств для лечения онкологических заболеваний [475–477].

Здесь мы рассмотрели экспериментальные доказательства того, что синтетические пептиды, блокирующие специфичные функции RНАММ, обладают противоопухолевыми эффектами и являются перспективными кандидатами для лечения раковых заболеваний. Однако незначительное количество исследований о терапевтическом потенциале RНАММ и RНАММ-таргет-пептидов для лечения раковых заболеваний свидетельствует о необходимости более интенсивных исследований в этом направлении.

Глава 4. Идентификация, дизайн и синтез пептидов, специфично связывающихся с RHAMM/HMMR

Повышенная экспрессия RHAMM наблюдается при различных видах онкологических заболеваний. Поэтому RHAMM-рецептор является терапевтической мишенью для лечения рака.

4.1. BLAST-поиск и сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков

Предыдущие исследования выявили отрицательно заряженные пептиды, напоминающие по структуре гиалуроновую кислоту с отрицательно заряженными карбоксильными остатками, которые связывались RHAMM [471–474]. Эти результаты предсказали, что отрицательно заряженные пептиды являются важными для связывания с ГК-связывающей областью RHAMM, и это привело нас к гипотезе, что известные лиганды для ГК-связывающей области RHAMM и гомологичные белки могут представлять потенциальные пептиды, обладающие специфичным сродством к RHAMM. Установлено, что ГК-связывающая область RHAMM/HMMR находится на С-конце и состоит из двух спиралей, которые содержат ключевые гидрофобные и основные аминокислоты, необходимые для связывания с ГК [338, 345, 380, 472]. Установлено ранее, что синтетические пептиды, представляющие этот домен, а не случайные последовательности, ингибируют связывание ГК с рекомбинантным RHAMM [471, 474–477]. Эти результаты предсказали, что взаимодействие олигосахарида ГК с RHAMM носит в основном ионный характер, с незначительным вкладом от гидрофобных остатков. Ранее было показано, что RHAMM также связывается с α - и β -субъединицами тубулина через N-терминальную последовательность и последовательность, которая находится на С-конце, а именно с ГК-связывающей областью RHAMM [478] (рисунок 12). Димеры α - и β -тубулина содержат высококонсервативную спиральную область и последовательность гипервариабельного карбоксильного концевой хвоста (СТТ) с кислотными остатками, мало чем отличающимися по плотности отрицательного заряда от ГК [479–482] (рисунок 12). Эти аминокислотные остатки тубулина протеолитически высвобождаются в виде коротких пептидов, которые модулируют динамику микротрубочек путем связывания с положительно заряженной последовательностью в MAP, которая напоминает аминокислотную последовательность области связывания ГК в RHAMM [483–485].

Известно, что тубулин является мишенью для противоопухолевых препаратов (таксол, доцетаксел, паклитаксел) и колхицина. Ранее было показано, что колхицин связывается с тубулином, препятствуя формированию микротрубочек [486]. Это его свойство используется в терапии воспалительных (подагры) и онкологических заболеваний [487, 488].

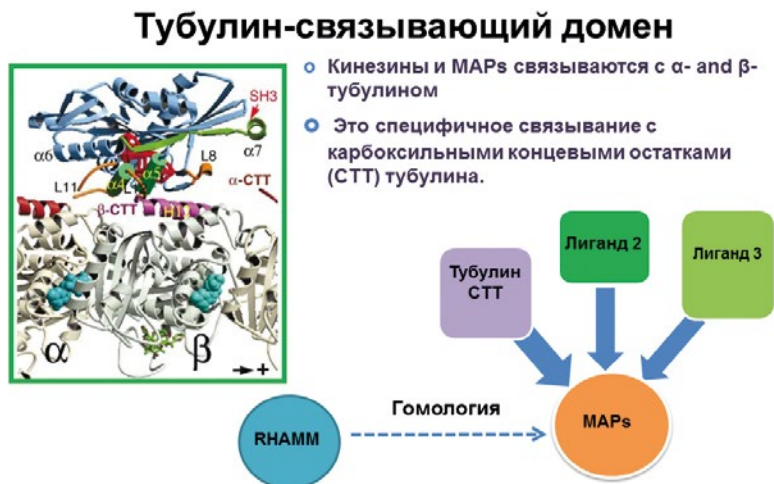


Рис. 12. Схема тубулин-связывающего домена MAP и кинезинов. Адаптировано из: Maxwell *et al.*, 2003 [345].

Поскольку эти области MAPs и кинезинов связываются непосредственно с отрицательно заряженными СТТ-концами тубулина, было показано, что аминокислотные последовательности СТТ могут также связываться с основными аминокислотами RHAMM [489, 490].

В совокупности эти исследования показали, что взаимодействие RHAMM с тубулином молекулярно похоже на взаимодействие RHAMM и ГК и что короткая аминокислотная последовательность СТТ может действовать как имитатор ГК (рисунок 13).

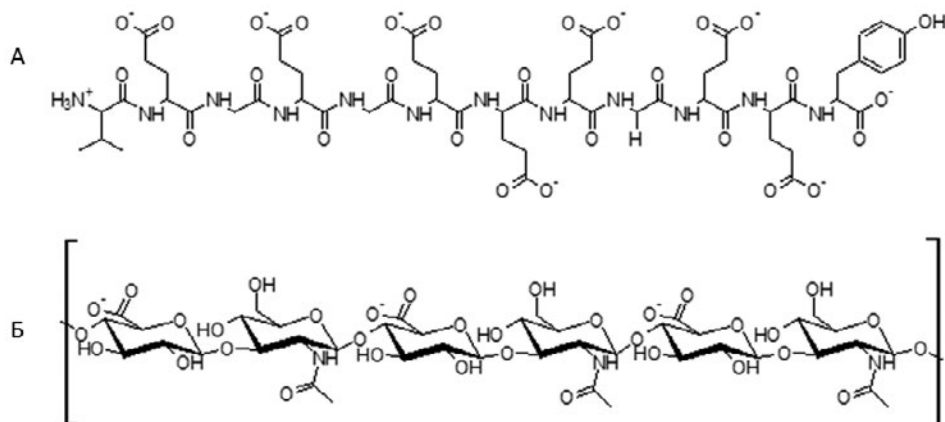


Рис. 13. Химическая структура предполагаемого пептида, имитатора ГК (А) и структура ГК (Б), указывающая на карбоксильные остатки, необходимые для связывания с RHAMM.

На основании вышесказанного предположили, что пептиды с отрицательно заряженными аминокислотами, такими как глутаминовая (Glu) и аспарагиновая (Asp), будут имитировать структуру ГК. Ранее было об-

наружено, что RHAMM связывается с α - и β -субъединицами тубулина, так как СТТ-концы последовательностей этих субъединиц содержат много аминокислот с отрицательным зарядом [478, 487, 489]. Таким образом, это указывало на то, что синтетические пептиды, полученные из карбоксильных концов α - или β -тубулина, могут быть использованы для специфичного, адресного связывания с RHAMM.

На основании этого были разработаны новые пептиды-лиганды и исследована специфичность их взаимодействия с RHAMM с использованием различных методов, таких как рекомбинантный RHAMM и клеточный анализ (таблица 5, рисунок 14).

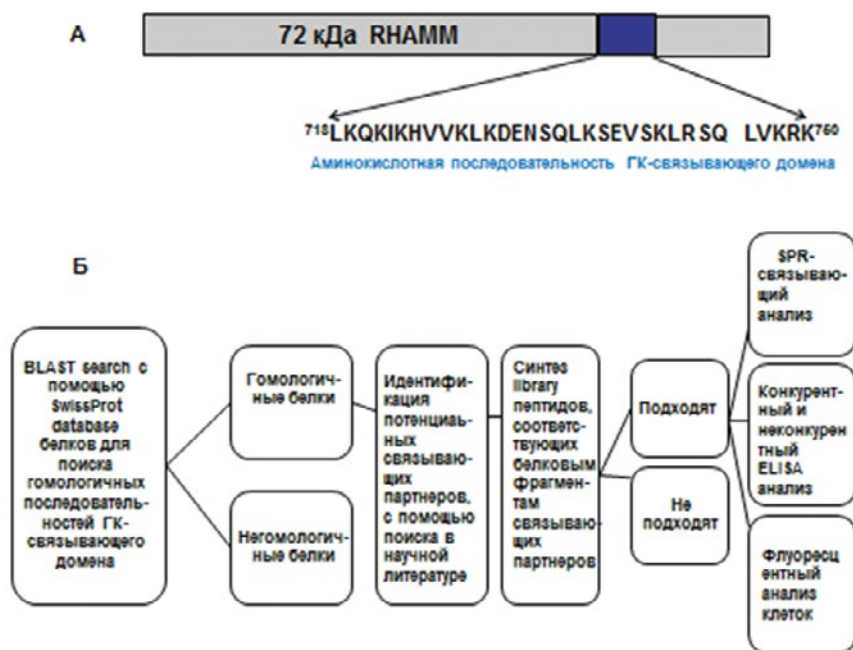


Рис. 14. Схема модели для дизайна и идентификации RHAMM-лигандов. А – диаграмма RHAMM (мол. масса 72 кДа), содержащего ГК-связывающий домен (аа 718–750), необходимый для RHAMM- и ГК-взаимодействий. Б – схема дизайна и исследования специфичности связывания пептидов-лигандов с RHAMM.

ГК-связывающий домен использовался в качестве аминокислотной последовательности для поиска гомологичных последовательностей белков с помощью программы BLAST (Basic local alignment search tool). Затем были получены предполагаемые партнеры-лиганды с гомологичными аминокислотными последовательностями. Библиотека пептидов была синтезирована на основе укороченных (truncated) последовательностей лигандов и скрининга методом поверхностного плазмонного резонанса для определения пептидов-лигандов с высоким сродством связывания с RHAMM. Потенциальные пептиды-лиганды, специфично взаимодействующие с RHAMM, затем дополнительно определяли с использованием различных методов *in vitro*.

Аминокислотная последовательность (аа 718–750), соответствующая ГК-связывающей области RHAMM, впервые использовалась в поисковой программе BLAST для составления списка белков, показывающих гомологию с последовательностью в этой области (рисунок 14а, рисунок 15).

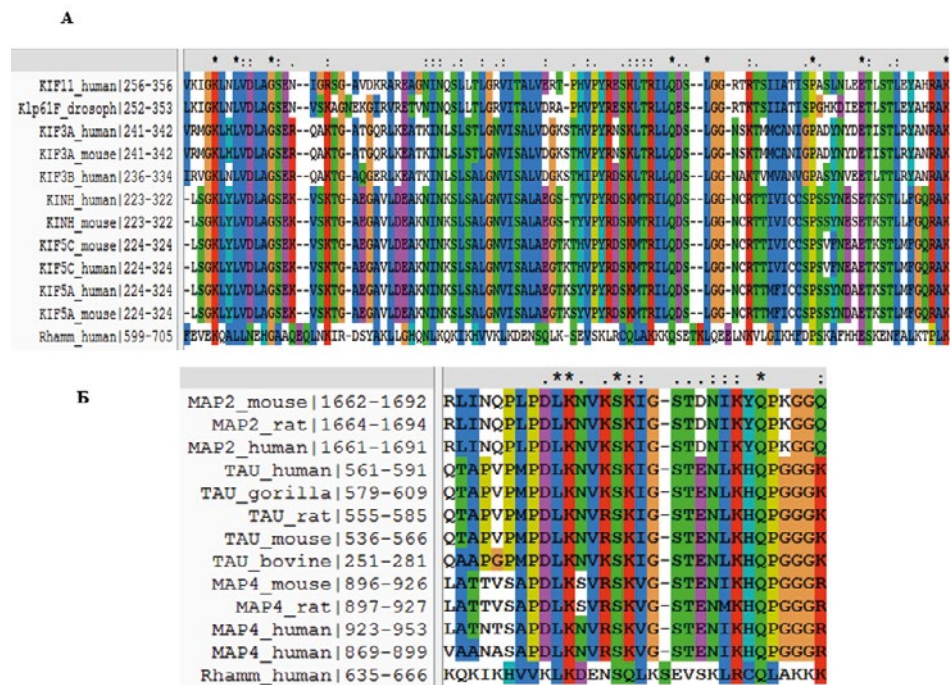


Рис. 15. Сравнение ГК-домена RHAMM с тубулин-связывающим доменом тубулин-ассоциированных белков. Сравнение последовательности ГК-связывающего домена RHAMM против: (А) – моторного домена моторных белков микротрубочек и (Б) – тубулин-связывающего домена белков, ассоциированных с микротрубочками (MAPs). Каждая аминокислотная последовательность сравнивалась с ГК-доменом RHAMM с помощью программы ClustalX2. ГК-связывающий домен RHAMM показан красным цветом. Одинаковые, консервативные и полуконсервативные аминокислотные остатки обозначены как (*), (:) и (.) соответственно.

Попарные сравнения между RHAMM и доменами, связывающими микротрубочки MAP (например, MAP1-4, TAU), а также кинезинами (например, KIF11, Klp61), выявили только умеренную гомологию общей последовательности (17–24%) с ГК-связывающим доменом RHAMM (рисунок 15). Однако установлено, что RHAMM и многие из этих белков имеют сходные области основных аминокислотных остатков во вторичной структуре α - и β -спиралей (рисунок 12).

4.2. Синтез пептидов

Пептиды, соответствующие СТТ-областям аминокислотных последовательностей α - и β -тубулина, которые состоят из кислых остатков, были синтезированы твердофазным методом (рисунок 16).

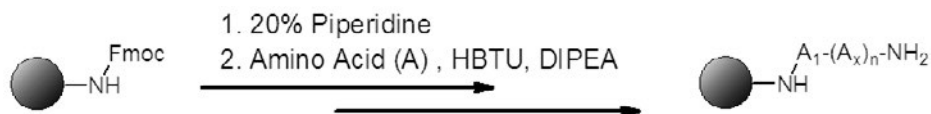


Рис. 16. Схема синтеза пептидов.

Последовательности тубулина были выбраны на основе наиболее распространенных изоформ тубулина, в частности, из α - и β -тубулина и наиболее кислой области белка. Большинство этих последовательностей было получено из СТТ-изоформ тубулина, но некоторые содержали последовательности α 1a- (соединения 6, 7 и 8) и β 3a-СТТ (соединения 13 и 14). Флуоресцентно меченые пептиды были получены с мечением модифицированного N-конца с помощью флуоресцеина или N-ацетилцистеина с добавлением спейсера аминоксановой кислоты для увеличения расстояния между пептидом и красителем (или цистеином) (рисунк 17).

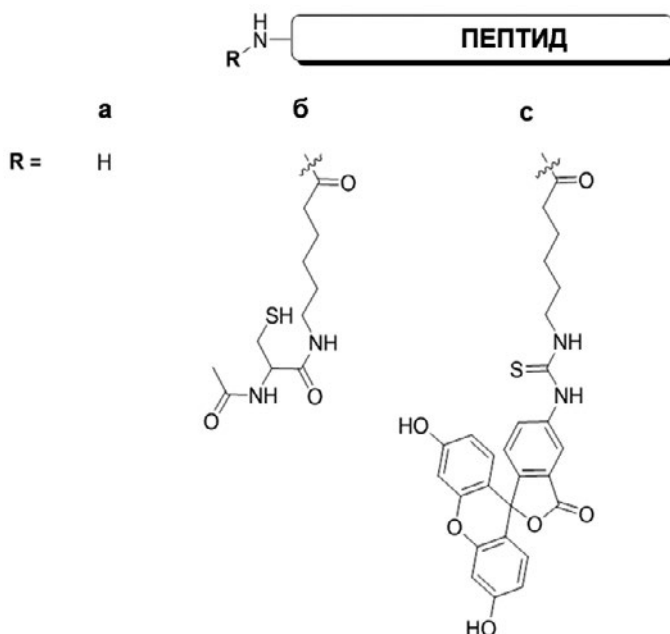


Рис. 17. Схема состава пептидов-лигандов: а – общая структура пептидов, используемых для исследования; б – структура пептидов, конъюгированных с N-ацетилцистеином; в) структура пептидов, конъюгированных с FITC.

На основании анализа СТТ аминокислотной последовательности изоформ тубулина были получены и далее охарактеризованы двадцать пептидов. Синтезированные пептиды анализировали с помощью масс-спектрометрического метода (ESI-MS) и ВЭЖХ (таблица 5). В таблице 5 представлены теоретически рассчитанные и экспериментальные значения M/Z , полученные с помощью ESI-MS. Степень чистоты пептидов (%) определяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ при 220 нм.

Таблица 5

Анализ синтезированных пептидов с использованием ESI-MS и ВЭЖХ.

Аминокислотные последователь- ности	Фрагменты тубулина	Тип	Номер соединения	Теоретический M/Z	Наблюдаемый M/Z	Степень чистоты (%)
DSADGEDEGE E EY	α Ia (438–449)	CTT	1a	657.7 [M+2H] ²⁺	658.2 [M+2H] ²⁺	98
VEGEGEEEEGE E EY	α Ia (440–451)	CTT	2a	677.7 [M+2H] ²⁺	677.6 [M+2H] ²⁺	98
			2b	807.3 [M+2H] ²⁺	807.6 [M+2H] ²⁺	98
			2c	928.8 [M+2H] ²⁺	927.9 [M+2H] ²⁺	98
SVEAEAE E EGE EY	α IIIc (439–450)	CTT	3a	670.8 [M+2H] ²⁺	670.7 [M+2H] ²⁺	97
			3b	800.3 [M+2H] ²⁺	800.5 [M+2H] ²⁺	98
			3c	921.8 [M+2H] ²⁺	922.1 [M+2H] ²⁺	98
IDSYEDEDEGE E	α IVa (437–448)	CTT	4a	714.7 [M+2H] ²⁺	715.2 [M+2H] ²⁺	99
DSFEENE EGE E F	α VIII (438–449)	CTT	5a	730.3 [M+2H] ²⁺	730.8 [M+2H] ²⁺	97
LEKDYE E VGVDS	α Ia (428–439)	H12	6a	691.3 [M+2H] ²⁺	691.8 [M+2H] ²⁺	99
GEFSEARDMAA	α Ia (416–427)	H12	7a	656.3 [M+2H] ²⁺	656.5 [M+2H] ²⁺	98
FVHWYVGE E GMEE	α Ia (404–415)	H12	8a	741.3 [M+2H] ²⁺	741.9 [M+2H] ²⁺	99
GEFE E EGEDEA	β IIa (434–445)	CTT	9a	684.7 [M+2H] ²⁺	685.2 [M+2H] ²⁺	98
EEDFGEEAE E EEA	β Ia (433–444)	CTT	10a	691.8 [M+2H] ²⁺	691.9 [M+2H] ²⁺	99
			10b	821.3 [M+2H] ²⁺	821.7 [M+2H] ²⁺	99
			10c	942.8 [M+2H] ²⁺	943.1 [M+2H] ²⁺	98
GEFE E EAE E EEA	β IV (433–444)	CTT	11a	683.7 [M+2H] ²⁺	684.3 [M+2H] ²⁺	97
			11b	813.3 [M+2H] ²⁺	813.6 M+2H] ²⁺	97
			11c	934.8 [M+2H] ²⁺	935.1 M+2H] ²⁺	96
EAFEDE E E E EIDG	β VI (435–446)	CTT	12a	706.8 [M+2H] ²⁺	706.3 [M+2H] ²⁺	99
			12b	835.3 [M+2H] ²⁺	835.6 M+2H] ²⁺	99
			12c	956.8 [M+2H] ²⁺	957.1 M+2H] ²⁺	98
SNMNDLVSEYQQ	β IIIa (413–424)	H12	13a	714.4 [M+2H] ²⁺	713.8 [M+2H] ²⁺	99
RYQLHPYR	β IIIa (425–432)	H12	13b	725.8 [M+2H] ²⁺	726.9 [M+2H] ²⁺	99
FTEAESNMNDLV	β IIIa (408–419)	H12	14a	684.8 [M+2H] ²⁺	685.2 [M+2H] ²⁺	99
			14b	814.4 [M+2H] ²⁺	813.8 [M+2H] ²⁺	98
			14c	935.8 [M+2H] ²⁺	936.1 [M+2H] ²⁺	97
RPDYISWGTQEQ	γ I (440–451)	CTT	15a	740.4 [M+2H] ²⁺	740.4 [M+2H] ²⁺	98
VQQLIDEYHAAT	γ I (428–439)	H12	16a	693.8 [M+2H] ²⁺	693.2 [M+2H] ²⁺	95
DNPDEMDTSREI	γ I (416–427)	H12	17a	711.3 [M+2H] ²⁺	711.4 [M+2H] ²⁺	99
GEGEEGE E	α Ia (443–450)	CTT	18	670.7 [M+2H] ²⁺	670.6 [M+2H] ²⁺	98
DFGEEAE E	β Ia (435–442)	CTT	19	690.8 [M+2H] ²⁺	690.9 [M+2H] ²⁺	99

4.3. Получение и очистка рекомбинантного RHAMM-CT-белка

Для идентификации пептидов, обладающих высоким сродством к ГК-связывающему домену RHAMM, использовали различные физико-химические методы анализа, такие как SPR, ELISA-анализ связывания пептидов с рекомбинантным RHAMM-белком *in vitro*. С этой целью получали рекомбинантный RHAMM-CT-белок. В биологическом материале содержание RHAMM-белка крайне низкое, поэтому разработка препаративных методов получения нативного RHAMM-белка является нецелесообразной. В связи с этим получение RHAMM-белка осуществлялось с помощью генно-инженерных методов. RHAMM-белок содержит ГК-связывающий домен, который находится около карбоксильного конца (CT) и состоит из основных аминокислот, таких как лизин (Lys), аргинин (Arg) или лейцин (Leu). ГК-связывающий домен RHAMM-CT представляет собой основной «Leu-zipper» – домен, который состоит из остатков основных аминокислот и не содержит кислых остатков (⁷¹⁸LKQKIKHVVKLKDNSQL KSEVSKLRSQ LVKRK⁷⁵⁰). Установлено, что взаимодействие ГК с RHAMM основано на ионных контактах между положительно заряженными остатками в белке и отрицательно заряженными карбоксильными группами на ГК, а также на гидрофобных взаимодействиях между липофильными участками RHAMM-белка [335–337].

Для анализа специфичности связывания пептидов выделяли рекомбинантный белок RHAMM-CT (aa 706–767, M. W. 7,2 кДа, pI = 10,1) из *E. coli*, несущий рекомбинантную плазмиду pPAL7-RHAMM-CT (рисунок 18). Для этого в качестве экспрессионной системы был выбран штамм *E. coli* BL21 (DE3). В качестве источника гена RHAMM-CT была использована библиотека генов *Mus musculus* (house mice). Фрагмент гена RHAMM, соответствующий последовательности, кодирующей RHAMM-CT (⁷⁰⁶RDSYAQLLGH QNLKQKIKHVVKLKDNSQL KSEVSKLRSQ LVKRKQNELR LQGELDKLQI⁷⁶⁷) и несущий ГК-связывающий домен, был выделен методом амплификации. Затем RHAMM-CT клонировали в вектор pPAL7 и экспрессировали в штамм *E. coli* BL21 (DE3) (рисунок 18).

Данный штамм *E. coli* BL21 (DE3) обеспечивал высокий и стабильный уровень экспрессии целевого белка. Экспрессию гена RHAMM-CT человека осуществляли в штамме *E. coli*, трансфицированном рекомбинантной плазмидой pPAL7, в культуральной среде сначала в отсутствие индуктора *lac*-промотора изопропилтио-β-D-галактопиранозид (IPTG). По достижении мутности среды OD₆₀₀ 0,4–0,6 добавляли IPTG до концентрации 2 мМ и продолжали экспрессию под контролем индуцированного *lac*-промотора. Из бактериальных клеток получали лизаты и далее очистку рекомбинантного белка RHAMM-CT осуществляли методом аффинной хроматографии с помощью системы очистки Fusion-Tag Profinity eXact™ («BioRad», США) (рисунок 19).

Данная система очистки использует иммобилизованную, специально сконструированную субтилизинпротеазу, которая распознает и специфично связывается (K_D < 100 pM) с небольшой N-концевой коэкспрессированной аффинной меткой (tag-EEDKLFKAL) в fusion-RHAMM-CT-белке. Мутантная субтилизинпротеаза S189, функциональный лиганд, иммобилизован-

ный на матрице, была специально разработана для аффинной хроматографии [490]. Субтилизинпротеаза S189 является чрезвычайно стабильной и эффективно восстанавливается *in vitro*. На колонку, упакованную агарозой Superflow™, наносили лизат, полученный из *E. coli* BL21 (DE3), при этом субтилизинпротеаза распознавала и связывала аффинно меченый белок tag-RHAMM-CT из смеси белков в лизате. Затем колонку промывали буфером для удаления неспецифично связанных белков. После этого через колонку пропускали фторидсодержащий буфер (100 мМ фторид калия) для элюции. Фторид калия индуцировал субтилизинпротеазу, которая быстро и специфично отщепляла последовательность из девяти аминокислот (EEDKLFKAL) от RHAMM-CT-белка. Таким образом, субтилизинпротеаза осуществляла специфическое расщепление и удаление метки из fusion-RHAMM-CT-белка непосредственно на колонке, что приводило к высвобождению высокоочищенного рекомбинантного RHAMM-CT-белка с нативной аминокислотной последовательностью.

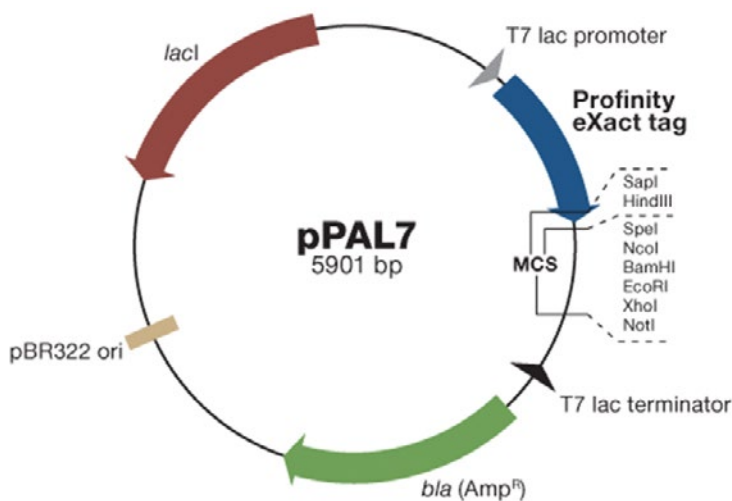


Рис. 18. Экспрессионный вектор pPAL7, который использовался для биосинтеза рекомбинантного RHAMM-CT (аа 706–767, молекулярная масса 7,2 кДа, $pI = 10,1$) в штамме-продуценте *E. coli* BL21 (DE3). Адаптировано из: Bryan P.N., 2000 [490].



Рис. 19. Схема стадий очистки RHAMM-CT-белка с помощью системы Fusion-Tag Profinity eXact. Адаптировано из: Bryan P.N., 2000 [490].

Уровень продукции RHAMM-СТ в штамме *E. coli*, трансфицированном вектором pPAL7, составлял около 50 мг/л культуры. На рисунке 20 представлены данные анализа рекомбинантного белка RHAMM-СТ (aa 706–767, молекулярная масса 7,2 кДа, pI = 10,1), очищенного из *E. coli*. Степень чистоты выделенного белка проверяли методом одномерного электрофореза (10% SDS-ПААГ). Как видно из представленных данных, RHAMM-СТ представляет собой практически гомогенный белок (чистота более 90%) с мол. массой ~ 7,2 кДа, соответствующей массе RHAMM-СТ (рисунок 20А). Идентификацию RHAMM проводили с использованием моноклональных анти-RHAMM-антител методом Вестерн-блот-анализа (рисунок 20 Б).

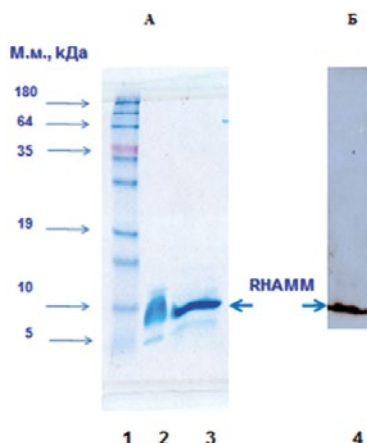


Рис. 20. (А) – анализ рекомбинантного белка RHAMM-СТ методом электрофореза (10% SDS-ПААГ) и (Б) – Вестерн-блот-анализа. 1 – стандарты молекулярных масс; 2 – RHAMM-СТ (6 мкг); 3 – RHAMM-СТ (3 мкг); 4 – идентификация RHAMM-СТ (3 мкг) с анти-RHAMM-антителами.

4.4. Анализ специфичности связывания пептидов с RHAMM-СТ

Специфичность связывания пептидов-лигандов с рецептором является необходимым условием для использования этих пептидов в лечении и диагностике раковых заболеваний. Поэтому на следующем этапе работы была исследована специфичность связывания полученных пептидов с RHAMM-СТ.

4.4.1. Анализ связывания пептидов-лигандов с RHAMM-СТ с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Поверхностный плазмонный резонанс использовали для первоначальной идентификации пептидов, проявляющих сродство к RHAMM-СТ. Вначале для того, чтобы определить условия для оптимальной иммобилизации RHAMM-СТ с сенсорной пластиной, RHAMM-СТ наносили на пластину при различных значениях pH. Плотность белка для каждой pH-иммобилизации определяли из среднего ответа SPR шести измерений и показали, что максимальная иммобилизация происходит при pH = 9,7 (таблица 6). Иммобилизация RHAMM был немного ниже при pH = 10,1 – вероятно, частично из-за потери заряда RHAMM в его изоэлектрической точке.

Таблица 6

Эффективность иммобилизации RHAMM-СТ на сенсорной пластине SPR в зависимости от pH. Белок RHAMM-СТ иммобилизовали с использованием бикарбонатного буфера (pH 7,0–10,1) при скорости потока 30 мкл/мин. Плотность лиганда определяли по среднему SPR-отклику шести измерений (\pm S. E. D). Белок связывали с сенсорной пластиной с использованием «cross»-сшивающих реагентов, EDAC (100 мМ) и сулфо-NHS (25 мМ).

pH буфера	Концентрация RHAMM (мкг/мл)	Плотность лиганда (ед.)
10,1	30	1445,1 \pm 31,4
9,7	30	1547,8 \pm 29,0
9,1	30	1499,5 \pm 34,4
7,0	30	1475,4 \pm 13,7
9,7	0	27,22 \pm 3,57

Для анализа связывания пептидов с RHAMM пептиды (10 мкМ) впрыскивали на сенсорные пластины, покрытые RHAMM-СТ (рисунок 21). Сенсограммы из пластин, которые не содержали иммобилизованный RHAMM, использовали в качестве отрицательного контроля, и эти значения вычитали из полученных значений экспериментальных сенсограмм. Таким образом, мы идентифицировали пептиды-лиганды, взаимодействующие с RHAMM. Эти пептиды представлены на рисунке 21: VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEEEVA, EAFEDEEEEIDG и FTEAESNMNDLV.

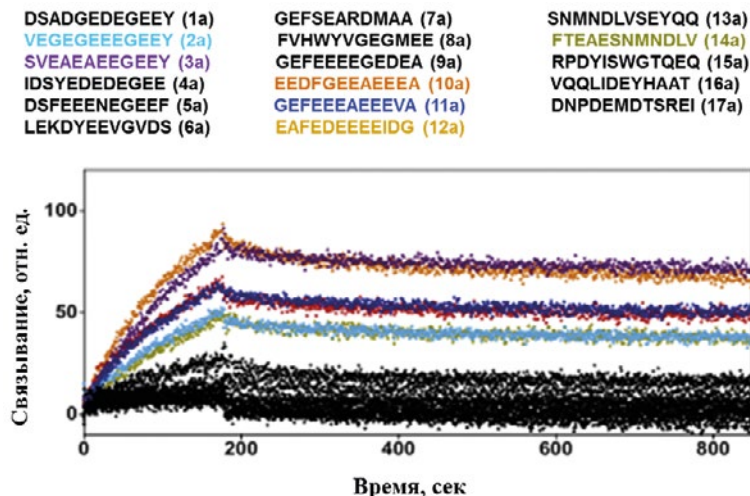


Рис. 21. Анализ пептидов-лигандов, связывающихся с RHAMM-СТ. Сенсограммы получены при взаимодействии пептидов (концентрация 10 мкМ) с RHAMM-СТ. В результате были выявлены пептиды (цветные линии, VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEEEVA, EAFEDEEEEIDG, FTEAESNMNDLV), которые продемонстрировали высокое сродство к RHAMM-СТ (черные линии представляют собой пептиды с низким сродством).

На следующем этапе нашего исследования мы использовали также метод поверхностного плазмонного резонанса. Однако в данном случае мы вначале наносили пептиды-лиганды на сенсорные пластины, а затем добавляли к ним рекомбинантный RHAMM-СТ. Для этого пептиды модифицировали цистеином и ковалентно иммобилизовали на сенсорной пластине с помощью кросс-сшивающих реагентов EDAC (100 мМ) и сульфо-NHS (25 мМ). Затем различные концентрации RHAMM-СТ (500, 750 и 1000 нмоль) добавляли к пептидам на поверхности сенсорной пластины и снимали спектры связывания белка с пептидами (рисунок 22).

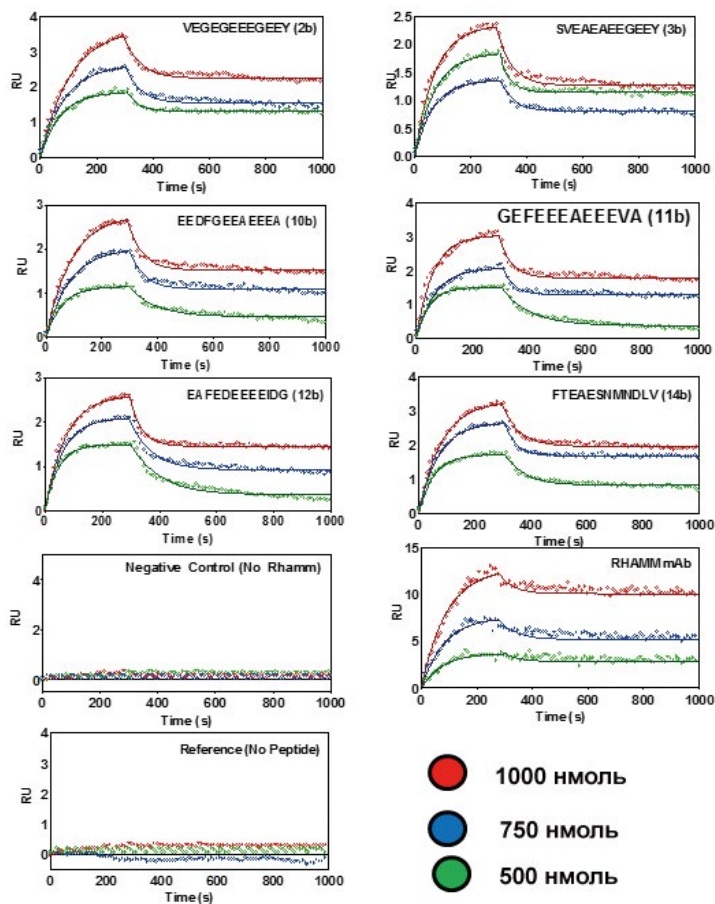


Рис. 22. Кинетический профиль пептидов-лигандов, взаимодействующих с RHAMM-СТ. Семь сенсограмм, показывающих связывание пептидов с RHAMM. Каждая сенсограмма соответствует ответам трех концентраций RHAMM (● – 1000 нмоль ● – 750 нмоль и ● – 500 нмоль), взаимодействующих с каждым из иммобилизованных пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEAEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV). При этом фоновое значение вычитали из полученных экспериментальных значений сенсограмм. В качестве отрицательного контроля использовали сенсорную пластину без добавления RHAMM-СТ (отрицательный контроль, No Rhamm), а также контрольную пластину без добавления пептидов (Reference, No peptide). В качестве положительного контроля использовали пластину с моноклональными RHAMM-антителами (RHAMM mAb).

После этого нами были рассчитаны константы связывания пептидов с RHAMM-СТ. На рисунке 22 представлены сенсограммы, показывающие специфичное взаимодействие исследуемых пептидов с RHAMM-СТ. Эти результаты показали, что связывание RHAMM-СТ с пептидами является дозозависимым и увеличивается с повышением концентрации белка. Сенсограммы связывания RHAMM-СТ с пептидами соответствовали кинетической модели связывания Ленгмюра 1 : 1. На основании полученных данных были рассчитаны средние величины констант диссоциации (K_D) для пептидов при различных концентрациях RHAMM-СТ (таблица 7).

Таблица 7

Определение величин K_{ON} , K_{OFF} и K_D для пептидов-лигандов.

Аминокислотная последовательность	Концентрация, нмоль	k_{ON} (нмоль сек ⁻¹)	k_{OFF} (сек ⁻¹) (10^{-3})	K_D , нмоль	Сред. K_D , нмоль
SVEAEAEEGEEY	1000	1404	0,502	358,2	331,1 ± 24,5
(3b)	750	1594	0,517	324,6	
	500	1620	0,503	310,4	
GEFEEAEEEVA	1000	855	0,102	119,8	130 ± 12,9
(11b)	750	1189	0,172	144,7	
	500	1485	0,187	126,0	
VEGEGEEEGEEY	1000	5046	0,124	24,5	24,2 ± 0,4
(2b)	750	9371	0,224	23,8	
	500	9436	0,234	24,4	
EEEEAEEDFGEEA	1000	5347	0,173	32,4	32,6 ± 1,1
(10b)	750	5808	0,196	33,8	
	500	7014	0,222	31,7	
EAFEDEEEEIDG	1000	1090	0,219	201,4	211,3 ± 8,6
(12b)	750	1101	0,237	215,4	
	500	1594	0,346	217,0	
FTEAESNMNDLV	1000	3202	0,10	31,9	30,2 ± 1,5
(14b)	750	4033	0,11	29,0	
	500	4189	0,12	29,6	
RHAMM-антитела	1000	37484	0,22	5,96	5,53 ± 0,4
	750	42913	0,23	5,45	
	500	45172	0,23	5,18	

Как видно из таблицы 7, пептиды (VEGEGEEEEGEEY, $K_D = 24$ нмоль), (EEDFGEEAEAAA, $K_D = 32$ нмоль) и (FTEAESNMNDLV, $K_D = 30$ нмоль) показали наиболее низкие константы диссоциации (в наномолярном диапазоне), что свидетельствует о высоком сродстве связывания этих пептидов с RHAMM-CT.

4.4.2. Анализ связывания FITC-пептидов с RHAMM-CT

Далее связывание пептидов-лигандов с рекомбинантным RHAMM-CT было проанализировано с помощью FITC-меченых пептидов методом ELISA (рисунок 23).

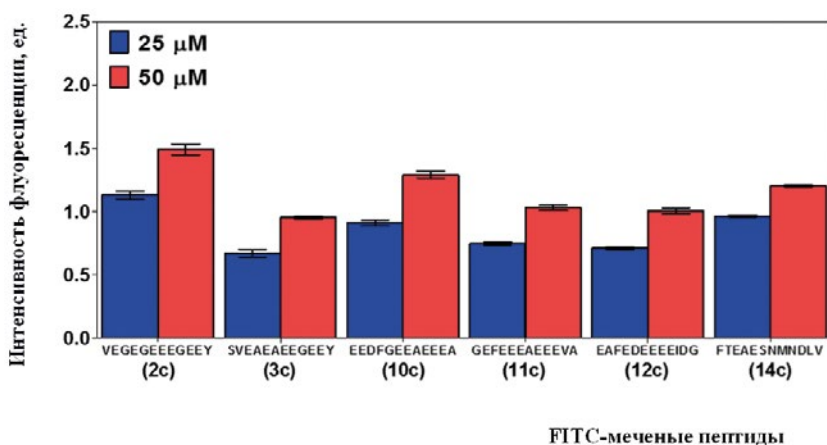


Рис. 23. Анализ связывания FITC-меченых пептидов (VEGEGEEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, GEFEEAEEEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) с RHAMM-CT.

Исследование связывания FITC-пептидов с RHAMM-CT проводили при концентрации пептидов 25 мкМ и 50 мкМ. Отрицательный контроль (без иммобилизованного RHAMM), который показал минимальную фоновую флуоресценцию, вычитали для каждого измерения. Результаты показали, что пептиды (VEGEGEEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA и FTEAESNMNDLV) наиболее эффективно связывались с RHAMM-CT при концентрации 50 мкМ.

4.4.3. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности пептидов

Мы проводили сравнительный анализ аминокислотных последовательностей шести пептидов, которые связывались с RHAMM-CT, используя программы Cobalt Multiple Alignment Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) и ClustalX2.

Сравнительный анализ показал, что из шести пептидов четыре пептида (VEGEGEEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA, SVEAEAEEGEEY и GEFEEAEEEVA) содержали в своем составе похожий фрагмент **EEEEEZ** (рисунок 24).



Рис. 24. Аминокислотная последовательность RHAMM-СТ. А – аминокислотные остатки, необходимые для связывания с ГК, выделены красным цветом (К – лизин, R – аргинин, H – гистидин). Б – аминокислотные последовательности пептидов-лигандов, содержащие похожий фрагмент EEXEEZ. Идентичные последовательности обозначены синим цветом (E – глутаминовая кислота) и подчеркнуты, в то время как полуконсервативные последовательности выделены желтым цветом (G – глицин, A – аспарагиновая кислота, Y – тирозин, E – глутаминовая кислота).

Мы предположили, что аминокислотные остатки глутаминовой кислоты (E) этого фрагмента способны связываться с основными остатками (лизин, аргинин, гистидин) RHAMM-СТ за счет ионных взаимодействий.

Следует отметить, что некоторые пептиды, представляющие аминокислотные остатки β-субъединицы тубулина (такие как FTEAESNMNDLV и RYQLHPYR), не содержат в своем составе фрагмент **EEXEEZ**. Однако эти пептиды также продемонстрировали высокое сродство связывания с RHAMM. Это указывает на то, что в связывании пептидов участвуют и другие типы взаимодействий (гидрофобные, водородные, вандерваальсовы).

Таким образом, сравнительный анализ показал, что пептиды-лиганды имеют в своем составе фрагмент EEXEEZ, который может быть областью связывания с RHAMM-СТ. Кроме того, в связывании пептидов участвуют, по-видимому, конформационные, гидрофобные и водородные взаимодействия.

4.4.4. Анализ конкурентного связывания FITC-пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ

Пептиды оценивали на предмет их способности конкурировать с ГК за центр связывания на RHAMM-СТ с использованием метода ELISA (рисунок 25).

Рекомбинантный RHAMM-СТ иммобилизовали на планшете и добавляли к нему флуоресцеин-меченые пептиды. Затем добавляли различные концентрации немеченой ГК (1,25; 2,5; 5 и 10 мкг/мл). Результаты показали, что возрастающие концентрации ГК замещают FITC-пептиды на ГК-связывающем центре. Это свидетельствует о том, что ГК конкурирует с пептидами за связывание с RHAMM-СТ. Следует отметить, что ГК наиболее эффективно конкурировала с пептидами VEGEGEEEEGEEY, EEEAEEDFGEEA и FTEAESNMNDLV.

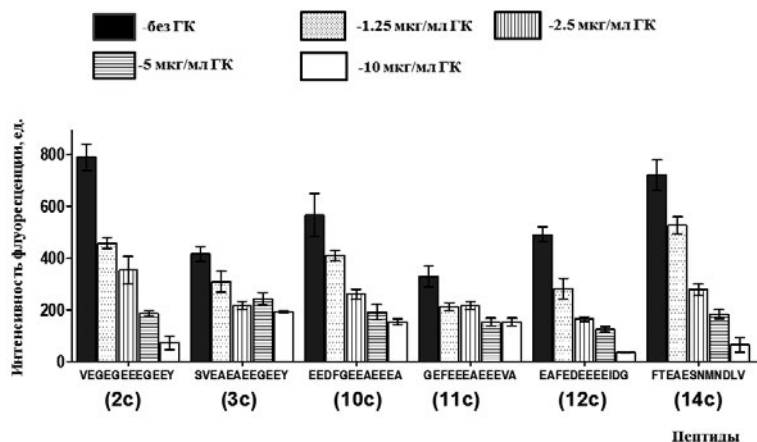


Рис. 25. Конкурентное замещение FITC-пептидов гиалуроновой кислотой на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ. Используемая концентрация пептидов 10 мкг/мл.

На следующем этапе мы продолжили исследование конкурентного связывания пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ. Однако в этом эксперименте мы использовали немеченые пептиды, а ГК метили флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (рисунок 26). Результаты показали, что ГК конкурентно замещала пептиды на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ. При этом ГК наиболее эффективно конкурировала с пептидами EEEAEEDFGEEA, GEFEEAEAEVA и FTEAESNMNDLV.

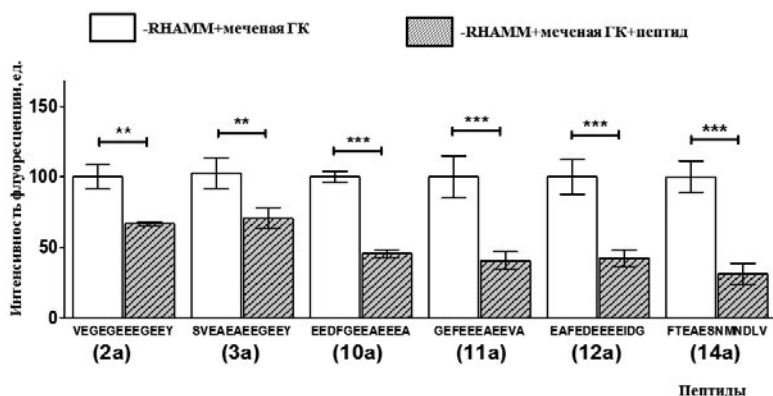


Рис. 26. Конкурентное замещение пептидов гиалуроновой кислотой (меченой Alexa Fluor 647). Используемая концентрация пептидов 10 мкг/мл и ГК 10 мкг/мл. ** – $p \leq 0,005$, *** – $p \leq 0,0005$ по отношению к RHAMM-СТ + меченая ГК.

4.4.5. Анализ связывания гликозаминогликанов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ

Чтобы подтвердить связывание пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ, мы также исследовали связывание пептидов в присутствии других гликозаминогликанов, таких как аггрекан, гепарин и хондроитина сульфат (рисунок 27, 28). Как видно из рисунка 27, аггрекан не способен

вытеснять пептиды из ГК-центра связывания. Также на рисунке 28 показано, что гепарин и хондроитин сульфат при различных концентрациях (1, 5 и 10 мкг/мл) не конкурируют с пептидами за связывание с ГК-связывающим центром на RHAMM-СТ. Только добавление ГК приводит к замещению пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ.

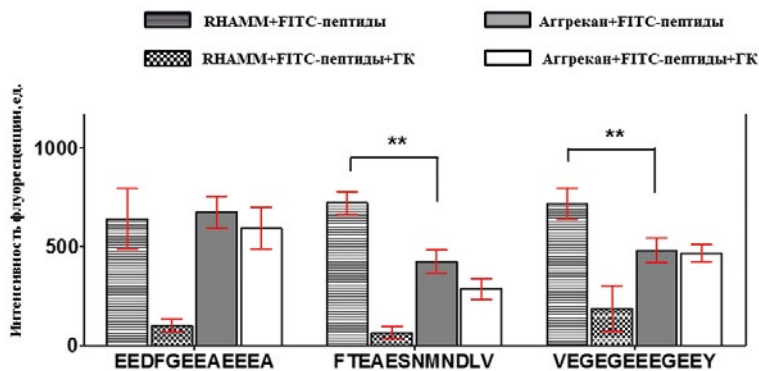


Рис. 27. Анализ связывания пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ в присутствии агрекана и ГК. ** – $p \leq 0,005$ по отношению к RHAMM-СТ + FITC-пептиды.

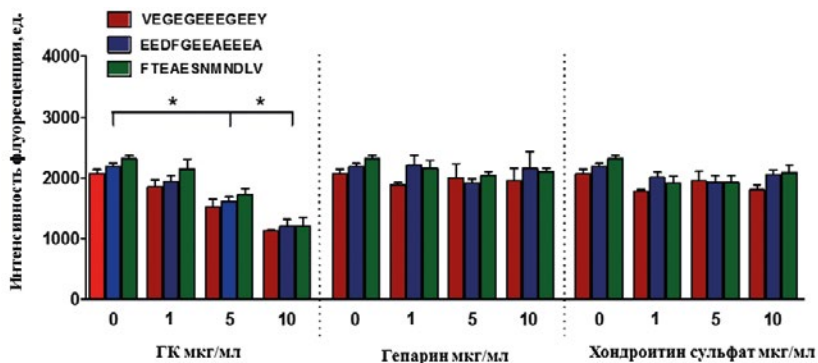


Рис. 28. Анализ связывания пептидов на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ в присутствии гепарина, хондроитина сульфата и ГК. * – $p \leq 0,05$ по отношению к RHAMM-СТ + FITC-пептиды.

Таким образом, результаты показали, что полученные пептиды специфично связываются на ГК-связывающем центре RHAMM-СТ.

4.4.6. Анализ связывания пептидов с CD44 и RHAMM-СТ

Кроме RHAMM имеется ряд белков, которые также связывают ГК, и наиболее хорошо охарактеризованным из них является рецептор CD44, содержащий ГК-связывающий модуль [491]. Однако взаимодействия ГК с RHAMM отличаются от взаимодействий ГК с CD44 тем, что связывание ГК с RHAMM основано в большей степени на ионных взаимодействиях, в то время как связывание ГК с CD44 происходит в основном через дисульфидные связи, а также водородные и гидрофобные [491].

Чтобы определить, способны ли пептиды-лиганды также связываться с CD44, мы исследовали связывание пептидов с RHAMM-СТ и ГК-связывающим модулем CD44, используя метод ELISA (рисунок 29). Для этих экспериментов RHAMM-СТ или CD44 наносили на планшеты, затем добавляли к ним либо FITC-пептиды, либо FITC-пептиды и ГК. Далее определяли связывание FITC-пептидов по интенсивности флуоресценции.

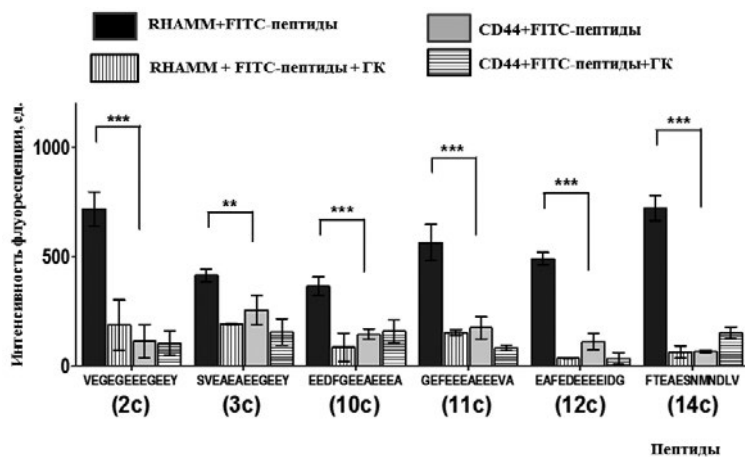


Рис. 29. Анализ связывания FITC-пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAEA, GEFEEEEAEAEVA, EAFEDDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) с CD44 или RHAMM-СТ. Отрицательный контроль (без иммобилизации RHAMM или CD44) вычитали для каждого измерения. Используемая концентрация пептидов 10 мкг/мл и ГК 10 мкг/мл. ** – $p \leq 0,005$, *** – $p \leq 0,0005$ по отношению к RHAMM-СТ + FITC-пептиды.

Результаты показали, что FITC-пептиды связывались с RHAMM-СТ и конкурировали за центр связывания с ГК. Как видно из рисунка 29, FITC-пептиды также связывались с CD44, однако интенсивность связывания была в 6–8 раз ниже, чем для RHAMM-СТ. Следует отметить, что добавление ГК к этим образцам практически не влияло на интенсивность флуоресценции, и только два пептида конкурировали с ГК за центр связывания на CD44 (EAEAEEDFGEEA и GEFEEEEAEAEVA). Таким образом, мы показали, что связывание пептидов с RHAMM-СТ характеризуется большим сродством, чем с CD44.

4.5. Анализ стабильности пептидов

Стабильность пептидов в кровотоке и достаточно быстрое выведение их из организма являются необходимым условием для применения пептидов с целью визуализации и терапии рака. Поэтому в следующей части работы мы исследовали стабильность и период полураспада синтезированных пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAEA, GEFEEEEAEAEVA, EAFEDDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) в сыворотке крови. Стабильность каждого пептида в сыворотке *in vitro* оценивали в течение 11 часов, количественное определение оставшегося интактного пептида определяли с помощью ВЭЖХ. Для анализа пептиды добавляли в эмбрио-

нальную бычью сыворотку при 37 °C и отбирали аликвоты с 30-минутными интервалами. В каждой точке реакцию останавливали осаждением сывороточного белка трифторуксусной кислотой и растворы центрифугировали для дальнейшего анализа пептидов. Пептиды демонстрировали стабильность в сыворотке с приемлемым временем полураспада примерно 2–4 часа (рисунок 30). Процент интактных пептидов с 30-минутными интервалами в течение 11 часов представляли как функцию времени.

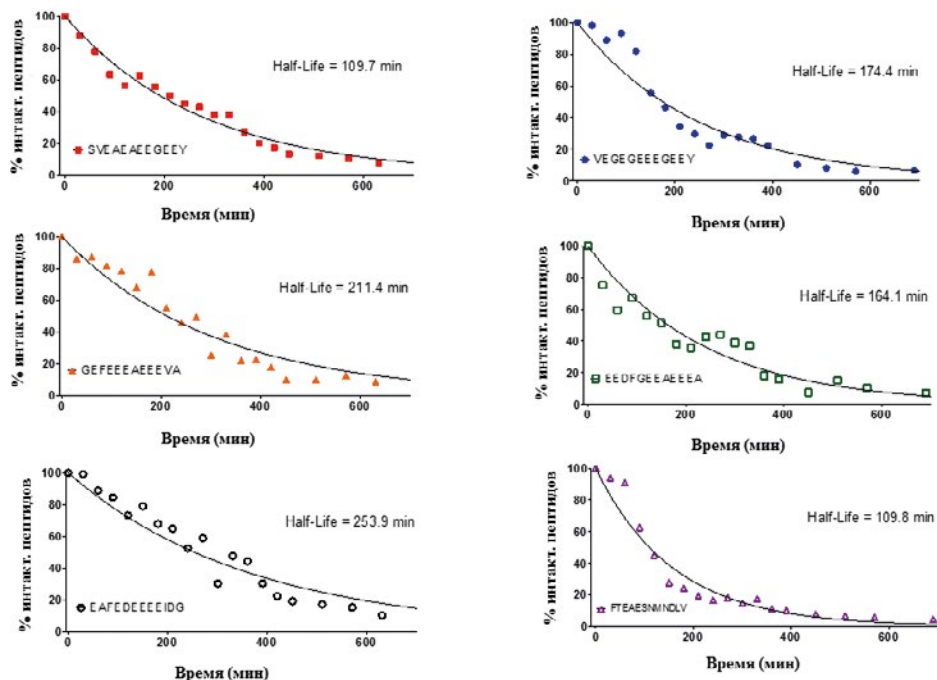


Рис. 30. Исследование стабильности шести пептидов (VEGEGEEEGEEY, SVEAEAEEGEEY, EEDFGEEAEAEA, GEFEEAEEEVA, EAFEDEEEIDG, FTEAESNMNDLV) в физиологических условиях в эмбриональной бычьей сыворотке.

Таким образом, результаты показали, что пептиды являются достаточно стабильными и имеют разумное время полураспада, необходимое для визуализации раковых клеток и воздействия на их метаболизм.

Глава 5. Взаимодействие FITC-пептидов с клетками

Для применения пептидов в качестве тераностиков необходимо показать специфичность взаимодействия пептидов именно с опухолевыми клетками. Поэтому на следующем этапе мы исследовали связывание пептидов с поверхностью раковых и нормальных клеток.

5. 1. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака молочной железы

Чтобы определить, способны ли пептиды взаимодействовать с RHAMM- и CD44-рецепторами, расположенными на поверхности интактных клеток, мы исследовали связывание FITC-пептидов с опухолевыми клетками человека методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Для экспериментов мы использовали клетки рака молочной железы (MDA-MB-231) и клетки рака предстательной железы (PC3m-LN4), которые, как известно, сверхэкспрессируют RHAMM, CD44 и ГК [492–494]. Ранее было показано, что эти клетки также связывают флуоресцентно меченую ГК [495].

Для этого исследования мы выбрали FITC-пептиды (EEDFGEEAEAAA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV), которые продемонстрировали ранее высокое сродство и специфичность связывания с RHAMM. Перед добавлением FITC-пептидов клетки предварительно инкубировали с анти-IgG-, анти-CD44- или анти-RHAMM-антителами. Клетки, которые не обрабатывали антителами, показали интенсивную флуоресценцию, что указывало на связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток (рисунок 31, 1-й ряд сверху). Предварительная инкубация клеток с анти-IgG-антителами, которые взаимодействуют с рецептором FcR и не связываются с RHAMM, не приводила к заметному изменению флуоресценции. Это свидетельствует о том, что блокирование рецептора FcR не влияет на связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток (рисунок 31, 2-й ряд сверху). Следует отметить, что клетки, обработанные анти-CD44-антителами (рисунок 31, 3-й ряд сверху), также показали достаточно интенсивную флуоресценцию. Это свидетельствует о том, что блокирование CD44 не влияет на связывание FITC-пептидов с клетками.

Как видно на рисунке 31 (4-й ряд сверху), значительное снижение флуоресценции наблюдалось только в том случае, когда клетки обрабатывали анти-RHAMM-антителами, которые блокировали связывание FITC-пептидов с RHAMM. Таким образом, результаты показали, что FITC-пептиды специфично связывались с RHAMM на поверхности клеток рака молочной железы.

Количественный анализ связывания FITC-пептидов клетками MDA-MB-231 представлен на рисунке 32.

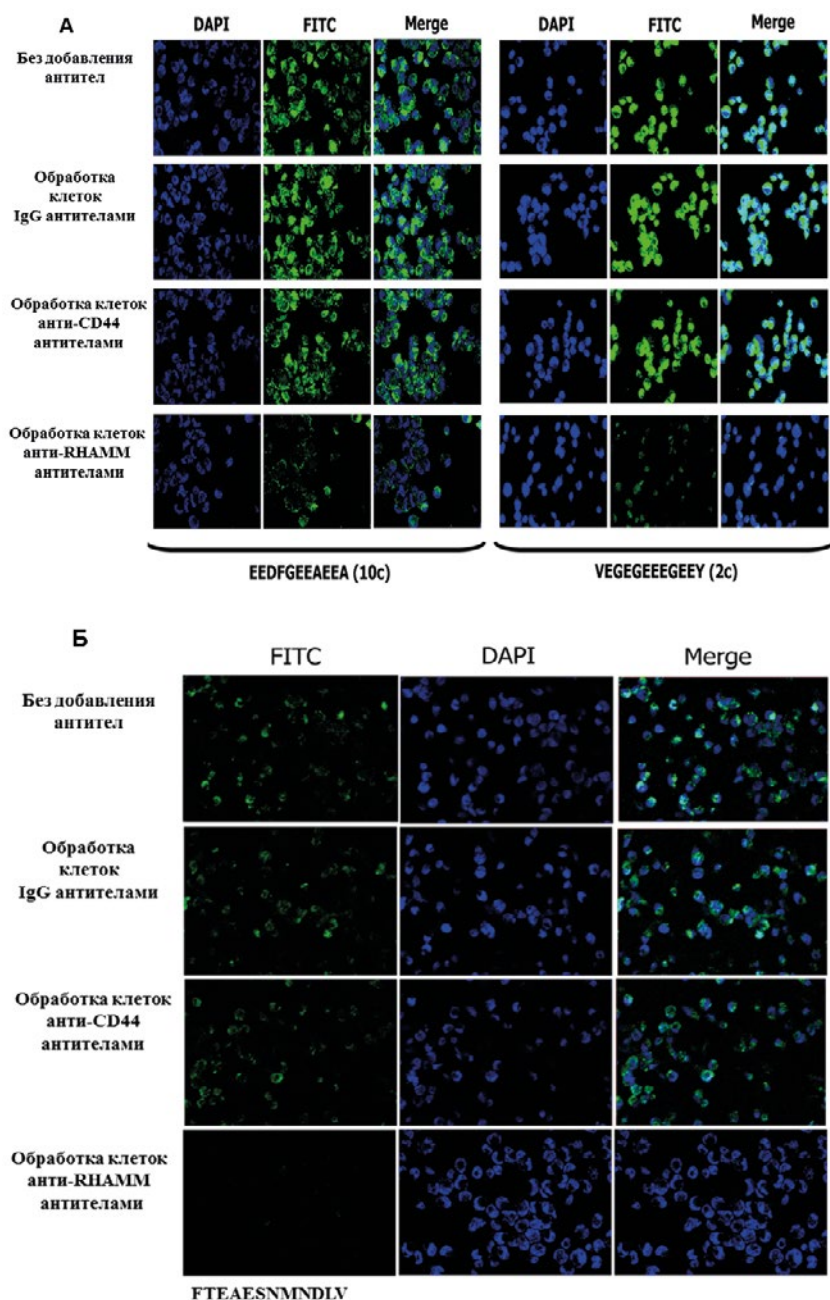


Рис. 31. Визуализация связывания FITC-пептидов: А – (EEDFGEEAEEEA, VEGEGEEEGEEY, Б – (FTEAESNMNDLV) клетками рака молочной железы. Ядра окрашены синим цветом (DAPI), а FITC-пептиды изображены зеленым цветом (FITC). Клетки, которые не обрабатывали антителами, и клетки, обработанные анти-IgG-антителами, служили в качестве положительного контроля.

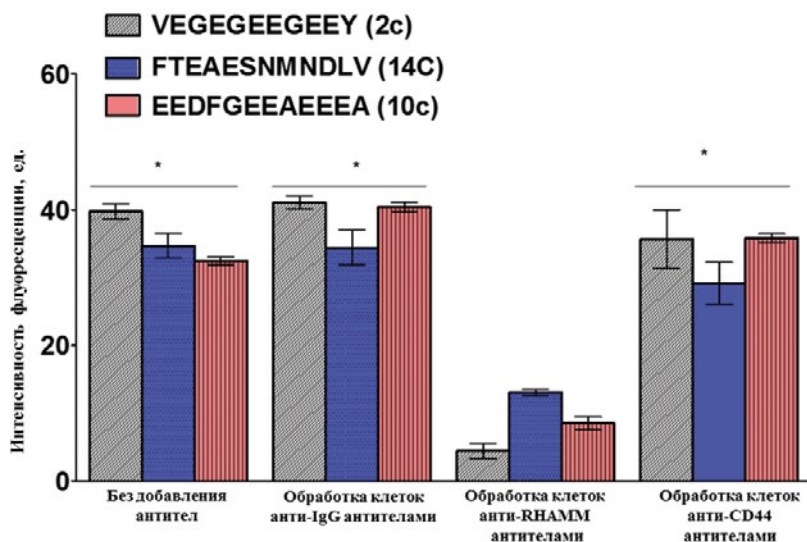


Рис. 32. Количественная оценка связывания FITC-пептидов клетками MDA-MB-231. Используя программное обеспечение ImageJ, были выбраны области интереса, соответствующие ядрам раковых клеток (общее число клеток = 6158, $n = 4$). Средняя флуоресценция каждого ROI была получена с использованием 8-битных изображений и представлена в виде гистограммы. * – $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, обработанным анти-RHAMM-антителами.

5.2. Связывание FITC-пептидов с поверхностью клеток рака предстательной железы

На следующем этапе работы мы исследовали также связывание FITC-пептидов (EEDFGEEAEEEA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) с клетками рака предстательной железы (PC3m-LN4) с помощью конфокальной микроскопии (рисунок 33). В качестве примера мы показали связывание с клетками пептида FTEAESNMNDLV.

Эксперимент проводили аналогично описанному выше эксперименту для клеток рака молочной железы. Заметное снижение интенсивности флуоресценции наблюдалось, когда RHAMM блокировали на поверхности клеток анти-RHAMM-антителами, что свидетельствует о связывании пептида с рецептором. Клетки, предварительно обработанные с анти-IgG- или анти-CD44-антителами, не показали значительного снижения сигнала флуоресценции.

Количественный анализ связывания FITC-пептидов клетками PC3m-LN4 представлен на рисунке 34.

Таким образом, результаты показали, что FITC-пептид специфично связывался с RHAMM на поверхности клеток рака предстательной железы.

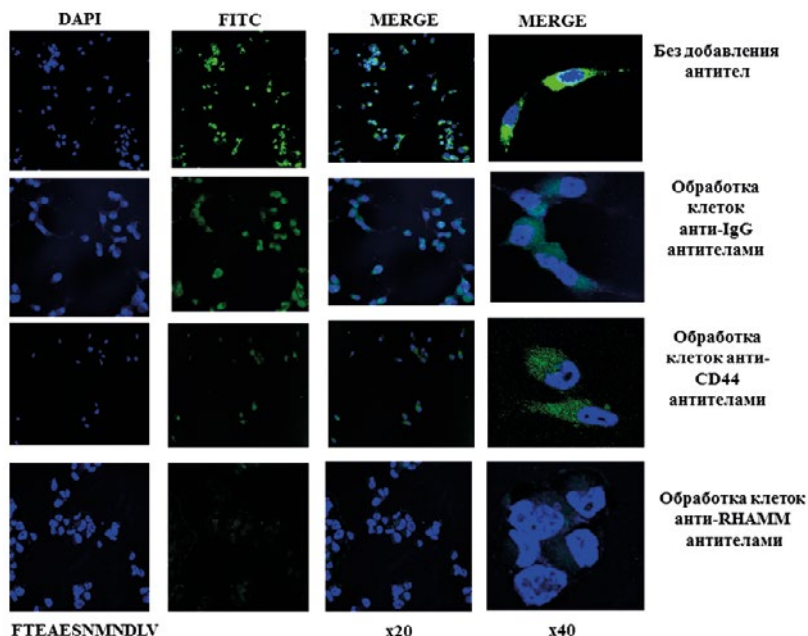


Рис. 33. Визуализация связывания FITC-пептида (FTEAESNMNDLV) клетками рака предстательной железы с помощью конфокальной микроскопии. Для окрашивания ядер клеток был использован DAPI (синий цвет), а FITC-пептид окрашен зеленым цветом (FITC). Перед добавлением FITC-пептида клетки инкубировали с анти-IgG-, анти-CD44- или анти-RHAMM-антителами. Клетки, которые не обрабатывали антителами, или клетки, обработанные антителами IgG, служили в качестве положительного контроля.

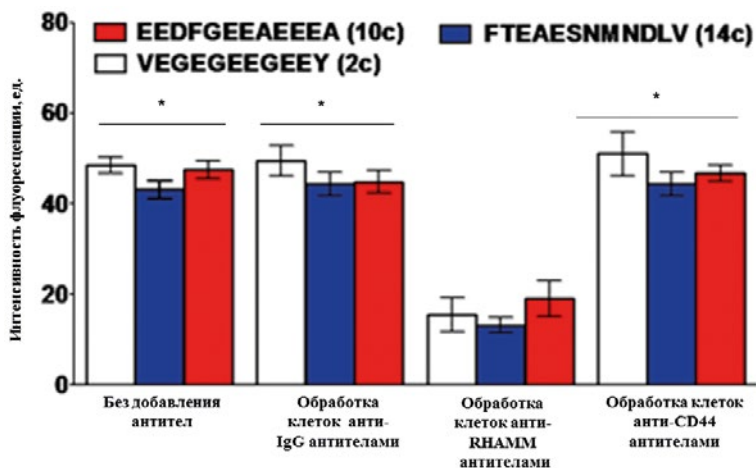


Рис. 34. Количественная оценка связывания FITC-пептидов PC3m-LN4 клетками. Используя программное обеспечение ImageJ, были выбраны области интереса, соответствующие ядрам раковых клеток (общее число клеток = 1048, $n = 3$). Средняя флуоресценция каждого ROI была получена с использованием 8-битных изображений и представлена в виде гистограммы. Данные были проанализированы с использованием One-way ANOVA. Статистически значимые различия помечены * ($p \leq 0,05$ по отношению к клеткам, обработанным анти-RHAMM-антителами).

5.3. Исследование интернализации RHAMM-таргет-пептидов с RHAMM^(-/-)-фибробластами и RHAMM^(+/+)-фибробластами

Чтобы проверить, является ли RHAMM необходимым для интернализации пептидов в клетке, мы изучали взаимодействие FITC-пептидов с RHAMM^(-/-)-фибробластами, в которых отсутствует этот рецептор, а также с фибробластами, трансфицированными с RHAMM^(+/+). Для этого RHAMM^(-/-)-фибробласты инкубировали с FITC-пептидами (EEDFGEEAEEEE, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) и затем анализировали методом конфокальной микроскопии (рисунок 35).

Результаты показали, что в фибробластах RHAMM^(-/-) не наблюдалось FITC-флуоресценции. Однако добавление FITC-пептидов к фибробластам, трансфицированным с RHAMM^(+/+), продемонстрировало появление интенсивной флуоресценции (рисунок 36). Это указывает и подтверждает полученные нами ранее данные, что связывание FITC-пептидов происходит именно с RHAMM.

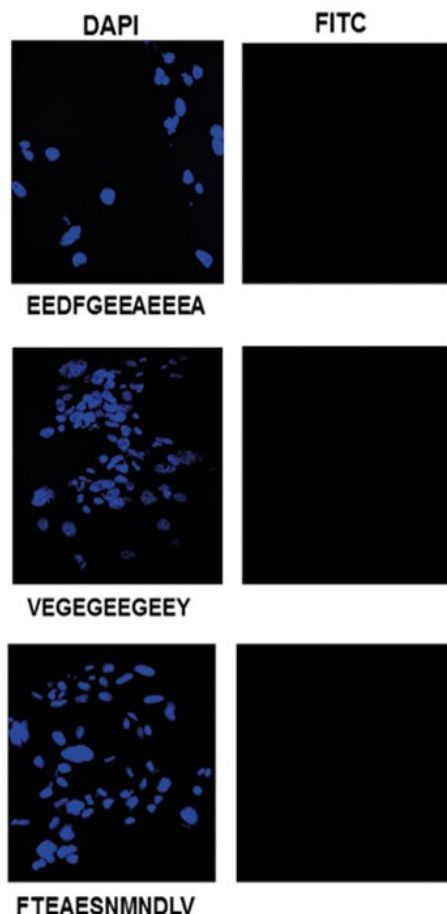


Рис. 35. Визуализация FITC-пептидов в RHAMM^(-/-)-клетках.

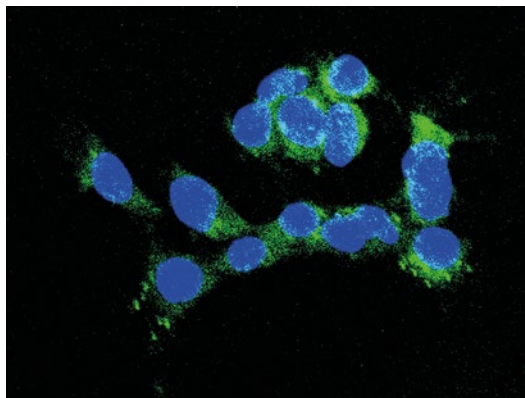


Рис. 36. Визуализация FITC-пептида EEDFGEEAEEEE в RHAMM^(+/+)-клетках.

Таким образом, на этом этапе исследования мы идентифицировали пептиды, представляющие собой укороченные остатки изоформ тубулина, которые действуют как миметики ГК. Мы впервые показали, что пептиды специфично связываются как с рекомбинантным RHAMM, так и с RHAMM-рецептором на поверхности опухолевых клеток. Мы также показали, что эти пептиды являются стабильными в сыворотке крови. Подобная специфичность взаимодействия пептидов с RHAMM позволяет предположить, что эти пептиды могут быть использованы для визуализации опухолевых клеток с целью диагностики раковых заболеваний.

Глава 6. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на клетки рака молочной железы

В предыдущих экспериментах мы идентифицировали, синтезировали и охарактеризовали пептиды, специфично взаимодействующие с RHAMM-рецептором. На основании полученных данных мы назвали эти пептиды RHAMM-таргет-пептидами и использовали это название в последующих экспериментах. На следующем этапе работы мы исследовали терапевтический потенциал RHAMM-таргет-пептидов, а именно влияние пептидов на выживаемость, апоптоз и (или) некроз и инвазивность клеточных культур опухолевых клеток (молочной и предстательной желез).

6.1. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на выживаемость клеток рака молочной железы

Мы исследовали эффект пептидов (EEDFGEEAEEEE, VEGEGEEGEEY и FTEAESNMNDLV) на выживаемость клеток рака молочной железы. Чтобы понять, могут ли пептиды ингибировать рост опухолевых клеток, клетки MDA-MB-231 обрабатывали пептидами при низкой концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) в течение 48 час. Жизнеспособность клеток анализировалась с помощью резазурина (реагент AlamarBlue). Результаты показали, что все три пептида ингибировали рост опухолевых клеток (рисунок 37).

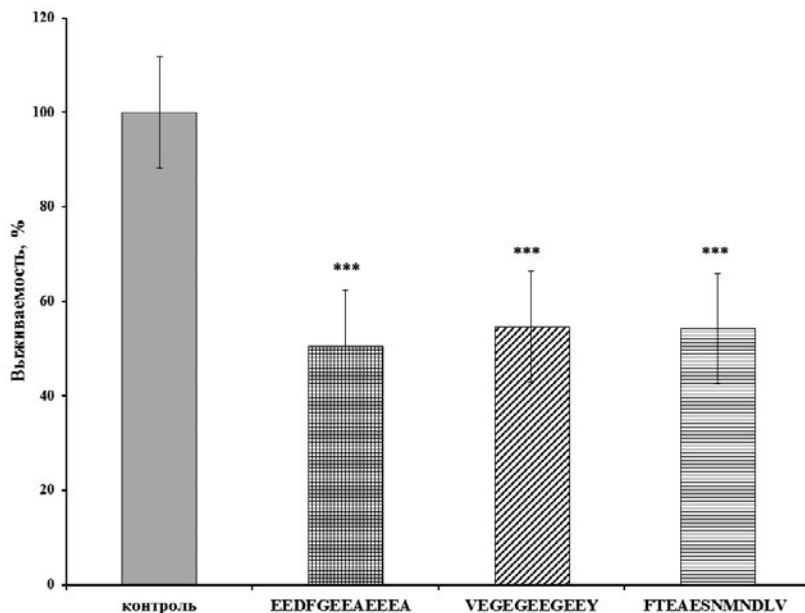


Рис. 37. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на выживаемость клеток MDA-MB-231.
*** – $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без добавления пептидов.

Инкубация с пептидами в течение 48 часов подавляла жизнеспособность клеток MDA-MB-231 на 50%. Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеток рака молочной железы значительно подавлялась низкими концентрациями пептидов, что является реальным преимуществом для использования этих пептидов в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

6.2. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз и некроз опухолевых клеток молочной железы

Так как выживаемость клеток значительно подавлялась RHAMM-таргет-пептидами, было важно классифицировать, какой тип гибели наблюдался в клетках MDA-MB-231. Анализ типа гибели клеток проводили методом ELISA, используя Cell Death Detection Kit (Roche, USA). Результаты показали, что при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) RHAMM-таргет-пептиды (EEDFGEEAEFFA, VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) индуцировали усиление апоптоза в клетках MDA-MB-231 примерно в 4–5 раз (рисунок 38).

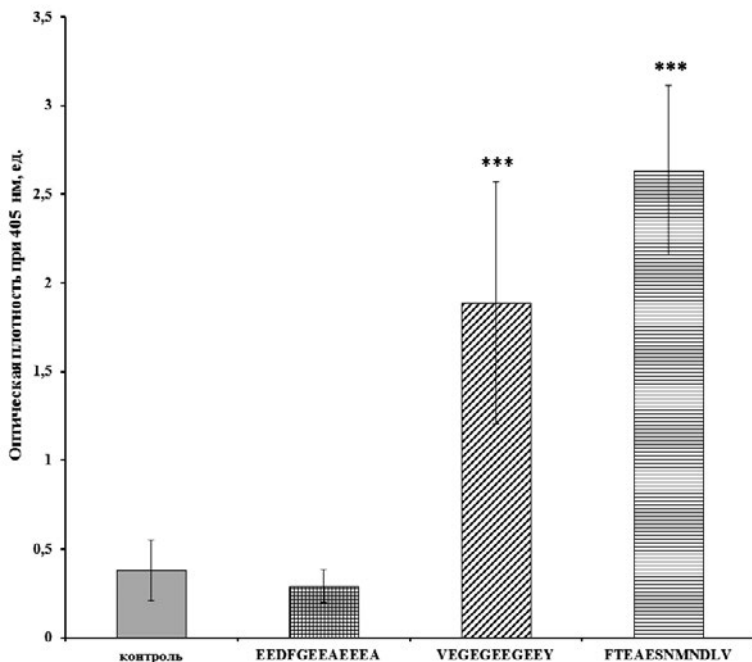


Рис. 38. Индукция апоптоза в клетках MDA-MB-231 посредством RHAMM-таргет-пептидов. *** – $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без инкубации с пептидами.

Эти результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды вовлечены в апоптозные пути в клетках MDA-MB-231. Затем мы исследовали влияние RHAMM-таргет-пептидов на некроз клеток MDA-MB-231. Наши результаты показали, что два пептида (VEGEGEEEGEEY и FTEAESNMNDLV) значительно увеличивали некротическую гибель клеток MDA-MB-231 (примерно в 4 раза) (рисунок 39).

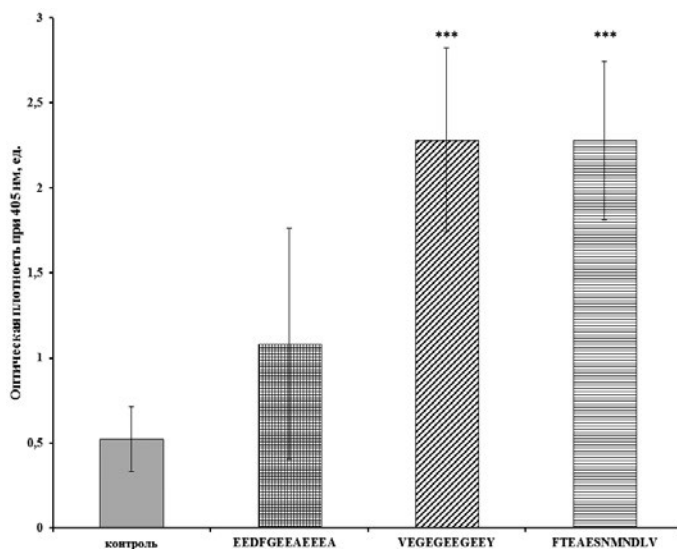


Рис. 39. Индукция некроза в клетках MDA-MB-231 посредством RHAMM-таргет-пептидов. *** – $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Для того чтобы подтвердить специфичность действия пептидов на опухолевые клетки, мы изучали влияние RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз и некроз в нормальных клетках (MEF-фибробласты). Результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды не оказывали значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток (рисунок 40, 41). Наблюдаемые небольшие различия не были статистически значимыми.

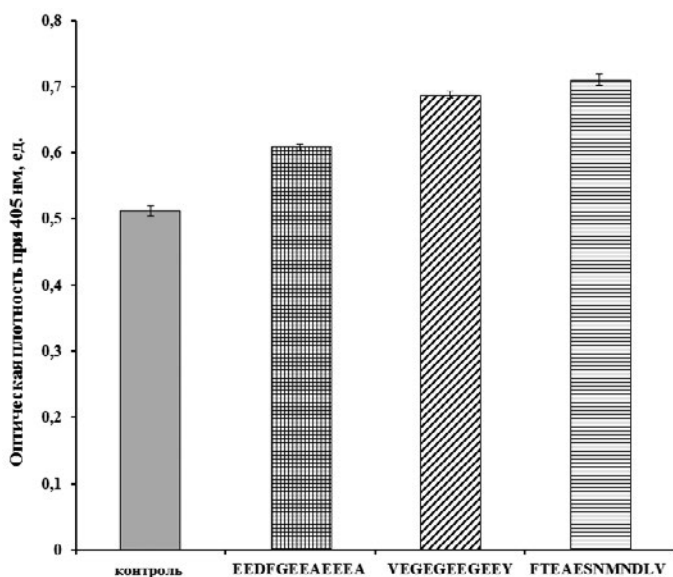


Рис. 40. Влияние RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз MEF-фибробластов. В качестве контроля использовали клетки без обработки пептидами.

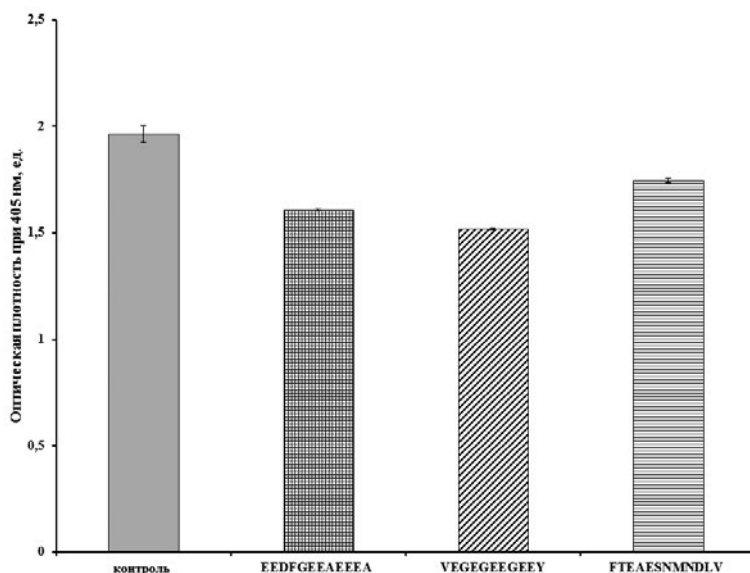


Рис. 41. Влияние RHAMM-таргет-пептидов на некроз MEF-фибробластов. Контроль представляет клетки без инкубации с пептидами.

Мы также исследовали влияние пептидов на клетки, в которых отсутствует RHAMM (фибробласты RHAMM^(-/-)). Было установлено, что все три пептида практически не оказывали влияния на апоптоз и некроз RHAMM^(-/-)-клеток (рисунок 42, 43). Это согласуется с нашими данными, что пептиды действуют только на клетки, сверхэкспрессирующие RHAMM.

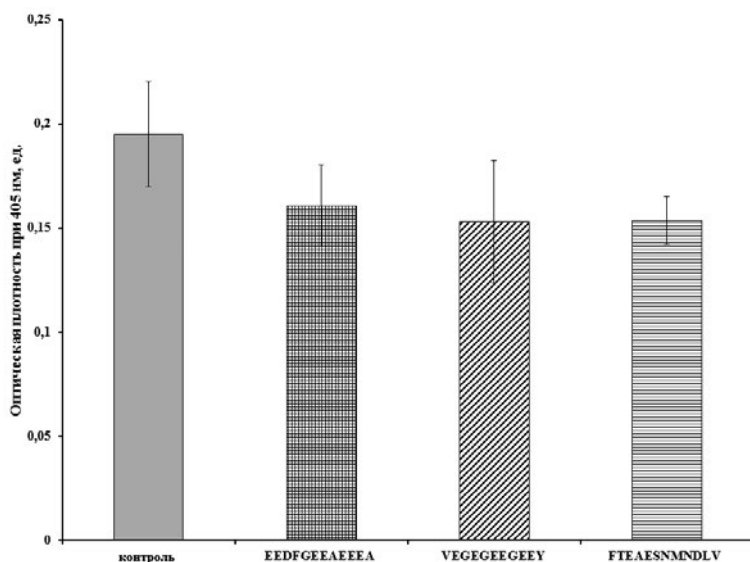


Рис. 42. Влияние RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз фибробластов RHAMM^(-/-). Контрольные клетки не инкубировали с пептидами.

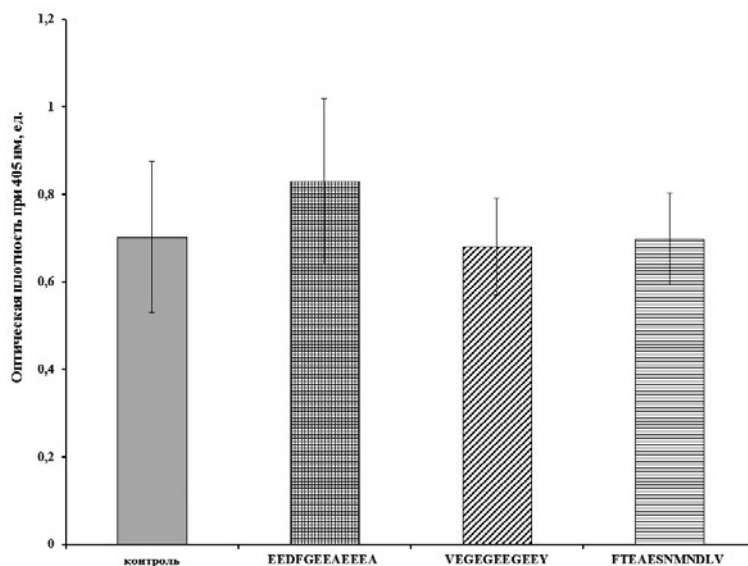


Рис. 43. Влияние RHAMM-таргет-пептидов на некроз фибробластов RHAMM^(-/-). Контроль представляет клетки без добавления пептидов.

Эти результаты подтверждают, что эффект RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз и некроз является специфичным для опухолевых клеток и RHAMM-опосредованным. В целом полученные данные показали, что низкие концентрации RHAMM-таргет-пептидов индуцировали гибель раковых клеток молочной железы.

6.3. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на активность каспаз 3/7

Поскольку результаты исследований показали индукцию апоптоза в клетках под действием пептидов, мы также исследовали влияние RHAMM-таргет-пептидов на активность каспаз 3/7, отвечающих за митохондриальный путь апоптоза.

Пептиды (EEDFGEEAEEEE, VEGEGEEGEEY и FTEAESNMNDLV, 10 мкг/мл) добавляли к клеткам MDA-MB-231 и инкубировали в течение 24 часов. Затем активность каспаз 3/7 измеряли колориметрическим методом (расщепление меченого субстрата каспаз DEVD – p-нитроанилида), используя Caspase-3/7 Colorimetric Assay Kit (GenScript, USA). Результаты показали, что активность каспаз 3/7 увеличилась на 30% в клетках MDA-MB-231 по сравнению с контрольными клетками, не обработанными пептидами (рисунок 44).

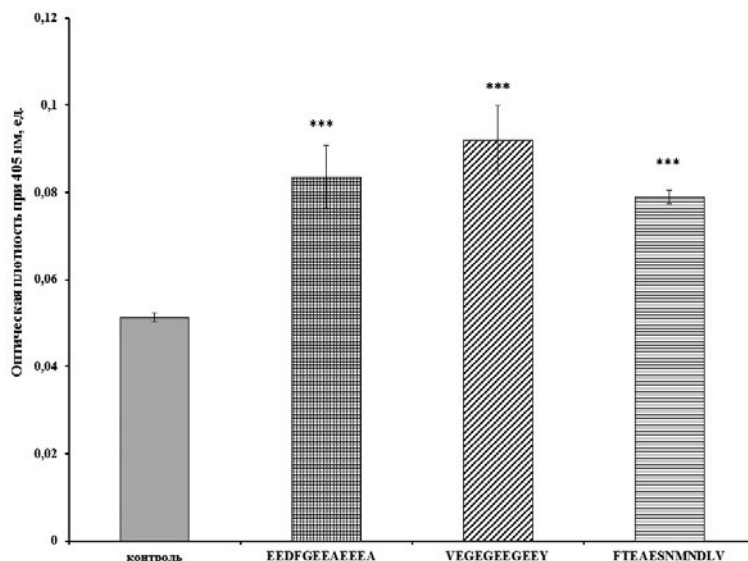


Рис. 44. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на активность каспаз 3/7 в клетках MDA-MB-231. *** – $p \leq 0,0005$ по отношению к контрольным клеткам без инкубации с пептидами.

Эти данные подтверждают участие каспаз 3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках MDA-MB-231, так как все три пептида значительно активировали активность этих ферментов.

Таким образом, наши результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды ингибировали жизнеспособность, индуцировали апоптоз и некроз клеток рака молочной железы. Эти данные позволяют предположить, что RHAMM-таргет-пептиды могут быть использованы в качестве препаратов для адресной терапии рака, поскольку они являются специфичными для опухолевых клеток.

Глава 7. Исследование влияния RNAММ-таргет-пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы

Процессы инвазивности опухолевых клеток и образование метастазов являются основными проблемами при лечении онкологических заболеваний. Поэтому на следующем этапе мы исследовали антиметастатический потенциал пептидов на клеточном уровне.

7.1. Анализ инвазивности опухолевых клеток MDA-MB-231 во времени

Чтобы оценить развитие инвазивности клеток во времени, вначале мы анализировали деградацию желатина клетками через 16, 24 и 40 часов (рисунков 45 А, Б, С), используя QCMTM Gelatin Invadopodia assay (red) kit (Millipore, USA). На конфокальных изображениях видно, что инвазивность клеток прогрессировала во времени. Вначале она практически отсутствовала (через 16 часов), затем наблюдалась незначительная деградация желатина (через 24 часа), а через 40 часов инвазивность клеток достигала максимальной величины.

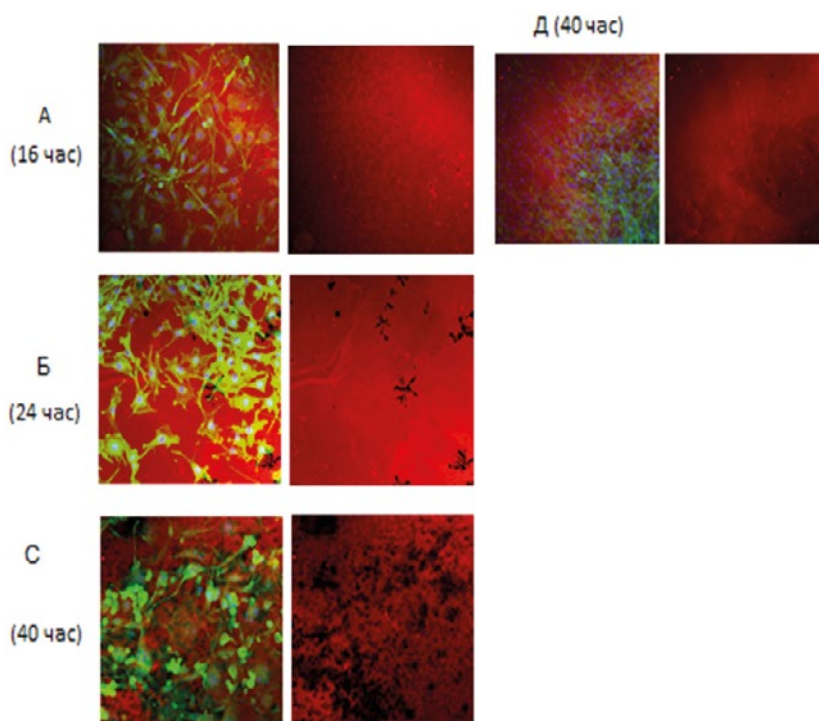


Рис. 45. Анализ инвазивности клеток MDA-MB-231 во времени: А – через 16 часов, Б – через 24 часа, С – через 40 часов, Д – инвазивность MEF-фибробластов (контроль) через 40 часов. Увеличение $\times 20$.

Следует отметить, что для инвазивных клеток MDA-MB-231 наблюдается протеолиз желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, на изображениях эта область черного цвета (рисунок 45, Б, С). Инвазивные клетки MDA-MB-231 имеют большое количество инвадоподий, высокую концентрацию актина на концах клетки (рисунок 45 С). Для сравнения инвазивности опухолевых и нормальных клеток мы также анализировали инвазивность MEF-фибробластов через 40 часов (рисунок 45 Д). Как видно, фибробласты не деградировали желатин, что указывает на отсутствие инвазивности в нормальных клетках. Количественный анализ площади деградации с помощью программы ImageJ показал, что клетки MDA-MB-231 начинали деградировать желатин через 24 часа, площадь деградации возрастала от ~ 8% до ~ 90% в интервале между 24 и 40 часами (рисунок 46).

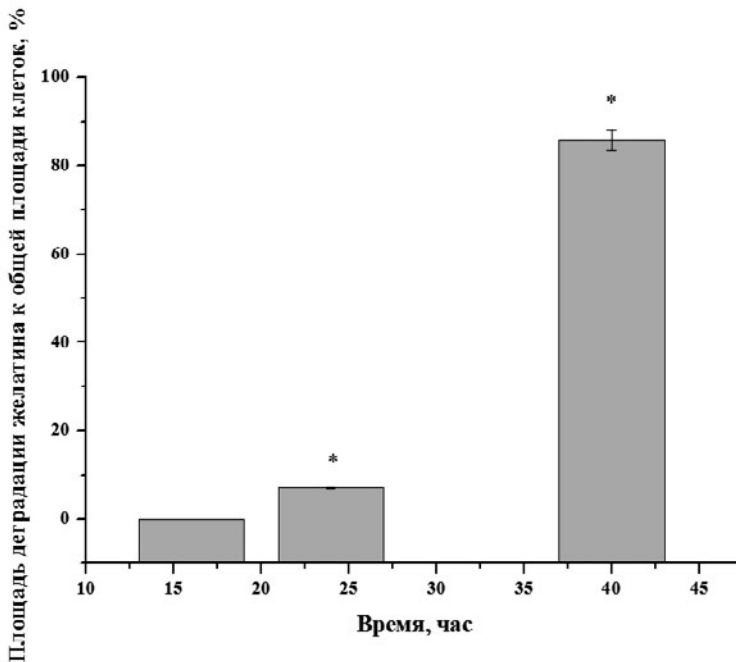


Рис. 46. Количественный анализ деградации желатина клетками MDA-MB-231 во времени с помощью ImageJ software. * – $p \leq 0,05$ по отношению к деградации желатина клетками через 16 часов.

Поскольку наиболее высокий уровень деградации желатина наблюдался через 40 часов, в следующих экспериментах по влиянию пептидов на инвазивность клеток мы использовали это время выращивания клеток на желатиновых подложках.

Таким образом, было установлено, что инвазивность клеток MDA-MB-231 возрастала во времени и уровень деградации желатина достигал ~ 90% через 40 часов, тогда как нераковые клетки (фибробласты) не деградировали желатин совсем.

7.2. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы

Чтобы анализировать, могут ли RHAMM-таргет-пептиды ингибировать инвазивность клеток рака молочной железы, клетки MDA-MB-231 высевали на Cy^3 -флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли пептиды или только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 часов. После фиксации и окраски клеток снимали изображения на конфокальном микроскопе и анализировали площадь деградации желатина клетками. Анализ изображений показал, что клетки MDA-MB-231, не обработанные пептидами, демонстрировали высокий уровень деградации желатина (область черного цвета) (рисунок 47 А).

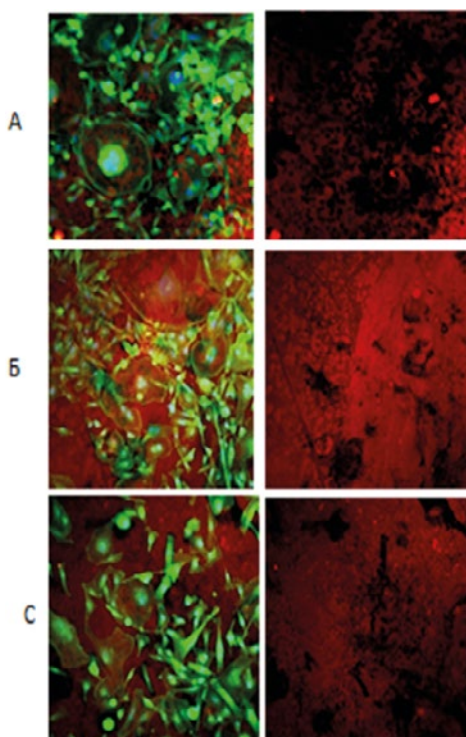


Рис. 47. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток линии MDA-MB-231. А – клетки, не обработанные пептидами (контроль), Б – клетки, обработанные пептидом EEDFGEEAEEEE, С – клетки, обработанные пептидом VEGEGEEEGEEY. Увеличение $\times 20$.

В то же время предварительная обработка клеток RHAMM-таргет-пептидами (EEDFGEEAEEEE и VEGEGEEEGEEY) приводила к уменьшению площади деградации желатина, визуально область черного цвета резко сокращалась, что указывало на ингибирование инвазивности раковых клеток (рисунок 47 Б, С).

Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, не обработанные пептидами, деградировали желатин на $\sim 90\%$, а клетки, обработанные пептидом EEDFGEEAEEEE,

деградировали только 13% площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует о том, что инвазивность клеток РМЖ уменьшилась на 77% (в сравнении с контролем). Клетки, предварительно инкубированные с пептидом VEGEGEEEEGEY, деградировали 20% площади желатина и демонстрировали ингибирование инвазивности на 70% (рисунок 48).

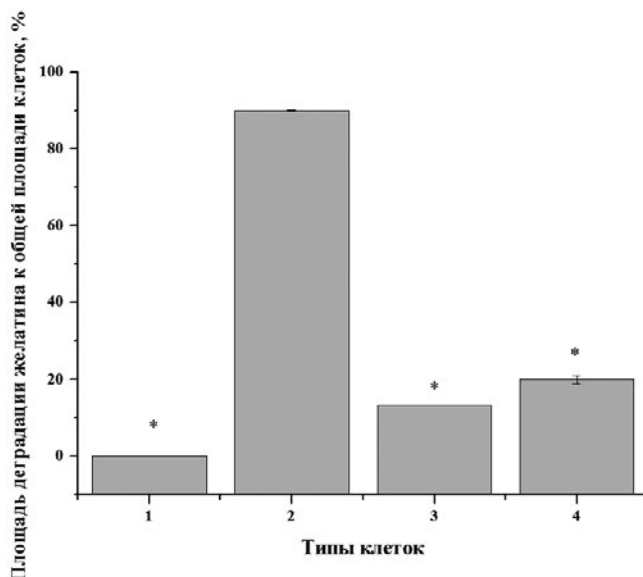


Рис. 48. Количественный анализ деградации желатина различными типами клеток с помощью программы ImageJ: 1 – MEF-фибробласты, 2 – клетки MDA-MB-231, 3 – клетки MDA-MB-231 + пептид EEDFGEEAEEEE; 4 – клетки MDA-MB-231 + пептид VEGEGEEEEGEY. * – $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Эти результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды ингибируют образование инвадоподий и, соответственно, инвазивность опухолевых клеток РМЖ.

Таким образом, это свидетельствует о том, что RHAMM-таргет-пептиды обладают антиметастатическим потенциалом и могут использоваться для блокирования образования метастазов.

7.3. Анализ гетерогенности популяции клеток MDA-MB-231 в процессе развития инвазивности

Известно, что опухоли являются гетерогенными и содержат несколько субпопуляций, что, вероятно, обеспечивает выживание и дает преимущества для роста первичных опухолей и образования метастазов [496, 497]. Гетерогенность опухолевых клеток объясняет прогрессирование опухоли, процессы рецидива и предполагает новые подходы для терапии [498, 499]. Несмотря на достижения в оценке генотипической и фенотипической гетерогенности опухолей, анализ субпопуляций опухолевых клеток в процессе инвазивности методом флуоресцентной микроскопии в литературе

отсутствует. Поэтому мы анализировали популяцию опухолевых клеток (MDA-MB-231) в процессе развития инвазивности с помощью конфокальной микроскопии. При визуальном анализе изображений было установлено, что наблюдаются заметные морфологические (и, следовательно, биохимические) различия между клетками внутри популяции клеточной линии MDA-MB-231. Как было описано ранее, анализ инвазивности клеток во времени показал, что клетки MDA-MB-231 не деградировали желатин в течение 16 часов и незначительная деградация наблюдалась только через 24 часа. В течение этого времени (до 24 часов) все клетки были однородными, имели одинаковый размер и форму, длинные инвадоподии, связи между филаментами (рисунок 49 А, Б). Интенсивная инвазивность клеток в желатиновый матрикс и его деградация наблюдались только через 40 часов (рисунок 49 С). На изображениях видно, что в этот период отмечается увеличенная и четко выраженная концентрация актина на концах инвадоподий клеток, появляются актиновые филаменты толстого диаметра, площадь деградации желатина возрастает и полностью соответствует форме и размеру клеток, что свидетельствует об образовании большого количества инвадоподий (рисунок 49 А, Б, С, увеличение $\times 60$).

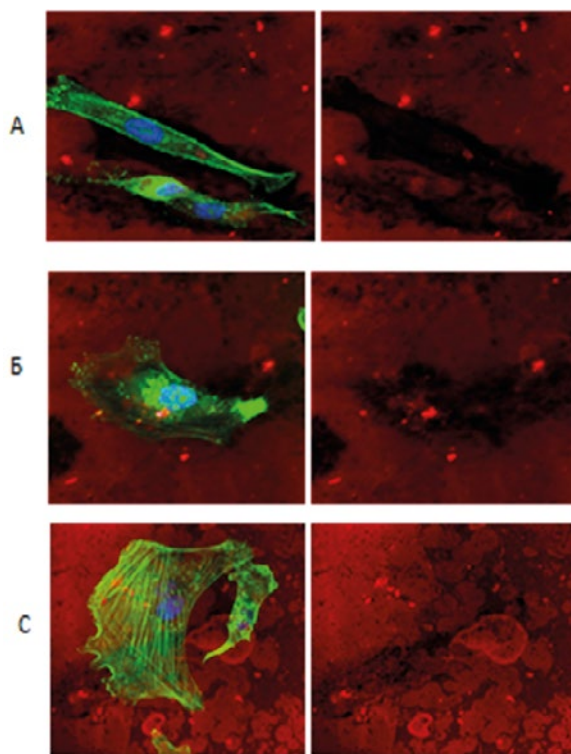


Рис. 49. Клетки MDA-MB-231, не обработанные пептидами, при увеличении $\times 60$. А – клетки с высокой концентрацией актина в цитоплазме и по краям клетки, Б – концентрированная локализация актина на концах инвадоподий, С – гигантская клетка с упорядоченной организацией актиновых филаментов, рядом – мелкая инвазивная клетка с длинной инвадоподией и концентрированной локализацией актина.

Кроме того, наблюдается появление «гигантских» клеток (senescence cells, клетки старения) в популяции, что коррелирует с началом интенсивной инвазивности (рисунок 47 А; рисунок 49 С; рисунок 50 А, Б). Эти гигантские клетки имеют другую морфологию, а именно большой размер (они были приблизительно в 10 раз больше по сравнению с обычными клетками), и у них отсутствуют длинные инвадоподии. В этих клетках наблюдается упорядоченная структурная организация актина, актиновые филаменты организованы в форме прямых и толстых пучков. Кроме того, эти клетки старения имеют либо крупное ядро, либо наблюдается многоядерность, количество ядер варьирует от 2 до 6 в клетке (ядра сгруппированы вместе). Из литературы известно, что наличие би- и многоядерных клеток (senescence cells) объясняется нарушением экспрессии мембранного белка супервиллина, который взаимодействует с RHAMM-рецептором, координирует актин и двигательные функции микротрубочек в течение клеточного цикла и таким образом влияет на подвижность клеток, ERK-сигналинг, цитокинез и матриксную инвазивность [500]. Поскольку появление подобных гигантских клеток коррелирует с началом интенсивной инвазивности, можно предположить, что процесс инвазивности сопровождается нарушением в цитокинезе клеток и часть клеток претерпевает морфологические изменения. На конфокальных изображениях видно, что гигантские клетки находятся в окружении мелких клеток и связаны с ними (рисунок 49 С; рисунок 47 А; рисунок 50 А, Б). Следует отметить, что именно клетки мелкого размера являются инвазивными и наиболее интенсивно деградируют желатиновый матрикс. Эти мелкие клетки имеют типичную злокачественную, поляризованную клеточную морфологию, эллиптическую форму, длинные взаимосвязанные инвадоподии, интенсивную концентрацию актина на концах инвадоподий, позволяющую им проникать внутрь матрикса.

7.4. Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RHAMM-таргет-пептидами

На следующем этапе мы исследовали влияние пептидов на морфологию клеток линии MDA-MB-231. Нами показано, что обработка клеток RHAMM-таргет-пептидами приводила к значительным изменениям в структурной организации актина в клетках. На конфокальных изображениях видно, что после инкубации клеток с пептидом EEDFGEEAEEEA также наблюдалось два типа клеток, а именно гигантские и мелкие клетки (рисунок 47 Б, С; рисунок 50 А, Б, С).

Однако в данном случае в гигантских клетках наблюдалась полная дезорганизация актина (рисунок 50 А). Обработка клеток RHAMM-таргет-пептидами индуцировала образование коротких актиновых филаментов, актиновые фибриллы располагались хаотично в цитоплазме, актин не накапливался на концах клетки, наблюдался стресс актиновых волокон, происходило нарушение целостности цитоплазматической мембраны клетки (рисунок 50 Б). Количественный анализ числа гигантских клеток на область изображения показал, что клетки, не обработанные пептидами, содержали большое количество гигантских клеток (~ 13 клеток на область изображе-

ния) (рисунок 51). Однако клетки, обработанные RНАММ-таргет-пептидами, демонстрировали меньшее количество гигантских клеток (~ 3–5 клеток на область изображения).

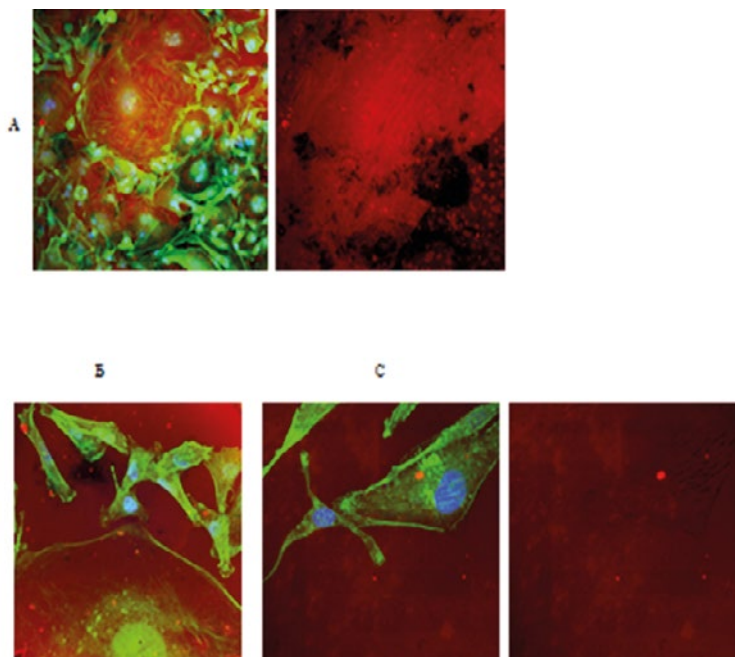


Рис. 50. Морфологические изменения актина в клетках MDA-MB-231, обработанных пептидом EEDFGEEAEEEE. А – гигантская биядерная клетка с дезорганизацией актина, хаотичным расположением коротких актиновых филаментов, Б – гигантская клетка с нарушенной целостностью лидирующего края клетки, С – мелкие инвазивные клетки с диффузной локализацией актина, нечетко выраженными инвадоподиями, незначительно деградирующие желатин. Увеличение $\times 60$.

Эти данные указывают на то, что гигантские клетки могут быть вовлечены в процесс развития инвазивности, а обработка клеток RНАММ-таргет-пептидами препятствует их появлению. Возможно, что блокирование RНАММ с помощью пептидов нарушает его взаимодействие с мембранным белком супервillinом и приводит к уменьшению количества больших клеток, дезорганизации актина и снижению инвазивности [500].

На конфокальных изображениях видно, что инкубация клеток с RНАММ-таргет-пептидами также приводит к различным морфологическим изменениям актина в маленьких клетках, обычно характеризующихся высокой инвазивностью. После обработки пептидами эти мелкие клетки имеют меньшее количество инвадоподий, у них пучки актиновых филаментов становятся более тонкими и короткими, наблюдается диффузная локализация актина в цитоплазме клетки. Кроме того, эти клетки после обработки пептидами незначительно деградируют желатин по сравнению с контрольными клетками, не обработанными пептидами (рисунок 47 Б, С; рисунок 50).

Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что блокирование RHAMM с помощью RHAMM-таргет-пептидов приводит к ингибированию инвазивности клеток РМЖ. В целом это свидетельствует о том, что RHAMM-таргет-пептиды обладают антиметастатическим потенциалом.

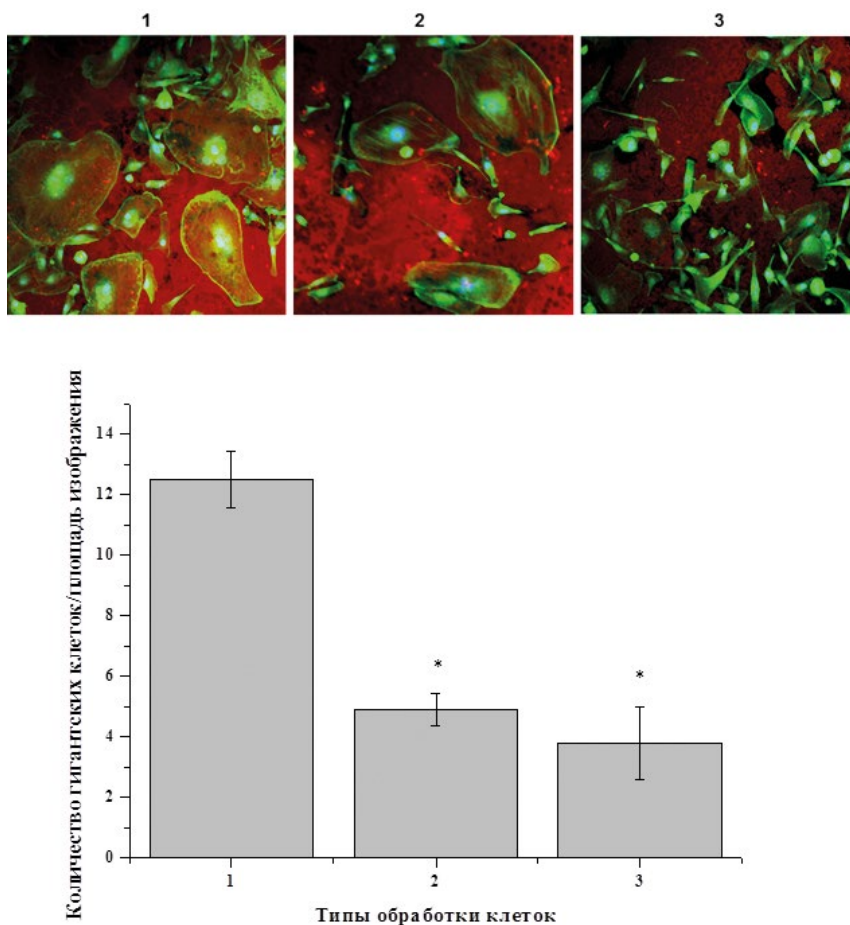


Рис. 51. Конфокальные изображения и количественный анализ гигантских клеток в популяции клеточной линии MDA-MB-231. 1 – клетки MDA-MB-231 без добавления пептидов; 2 – клетки MDA-MB-231 + пептид EEDFGEEAEEEA; 3 – клетки MDA-MB-231 + пептид VEGEGEEEGEEY. * – $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

Глава 8. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на жизнеспособность клеток рака предстательной железы

На следующем этапе мы изучали влияние RHAMM-таргет-пептидов на жизнеспособность клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4), для которых также характерна повышенная экспрессия RHAMM. Клетки PC3m-LN4 обрабатывались пептидами при низкой концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) в течение 0,5; 3; 24 и 48 часов. Как видно на рисунке 52, в интервале от 0 до 48 часов наблюдалось ингибирование активности митохондриальных дегидрогеназ, что сопровождалось снижением интенсивности флуоресценции клеток, обработанных пептидами, по отношению к контрольным клеткам. Результаты показали, что оба пептида (EEDFGEEAEAAA и VEGEGEEEGEEY) ингибировали жизнеспособность клеток рака предстательной железы во времени (рисунок 53). Максимальное падение жизнеспособности наблюдалось после инкубации с пептидами в течение 48 часов, жизнеспособность клеток PC3m-LN4 понижалась на ~ 90% (рисунок 53). Таким образом, мы показали, что пептиды способны подавлять жизнеспособность клеток предстательной железы значительно сильнее, чем клеток рака молочной железы.

Это свидетельствует о том, что клетки предстательной железы являются более чувствительными к обработке пептидами.

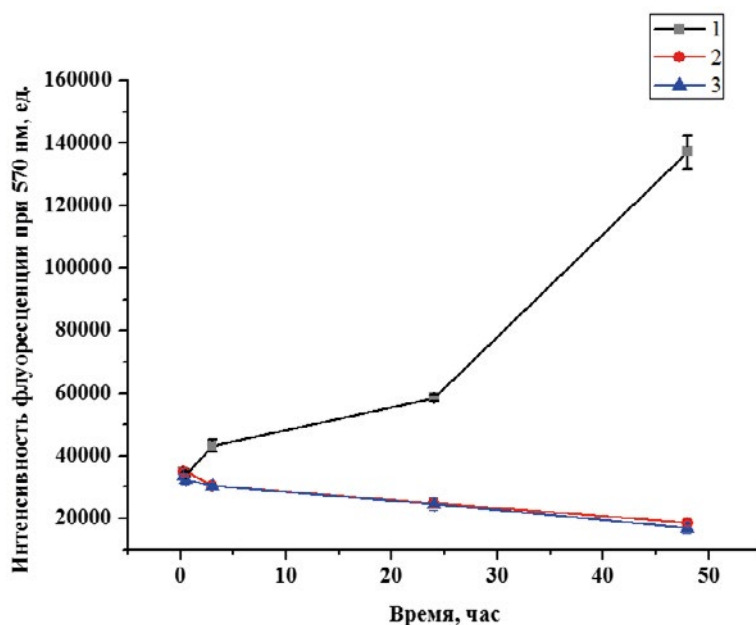


Рис. 52. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на жизнеспособность клеток рака простаты (PC3m-LN4) во времени: 1 – клетки PC3m-LN4; 2 – PC3m-LN4 + пептид EEDFGEEAEAAA; 3 – PC3m-LN4 + пептид VEGEGEEEGEEY.

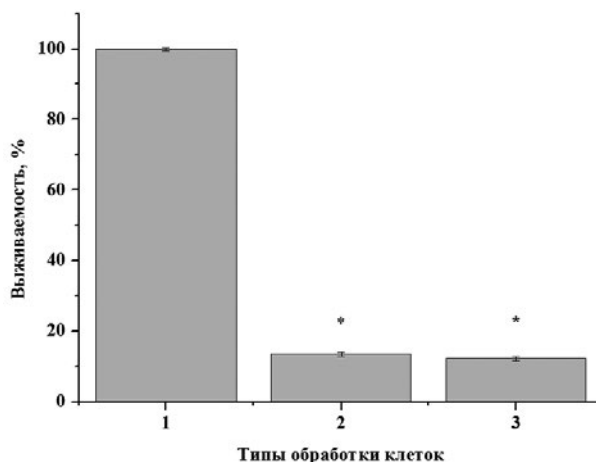


Рис. 53. Ингибирующий эффект RHAMM-таргет-пептидов на жизнеспособность клеток PC3m-LN4 через 48 часов. 1 – клетки PC3m-LN4; 2 – PC3m-LN4 + пептид EEDFGEEAEEEE; 3 – PC3m-LN4 + пептид VEGEGEEEGEEY. * – $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

8.1. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы

Для того чтобы понять, отчего наблюдается гибель клеток под воздействием пептидов, мы изучали влияние пептидов на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы. Для этого мы использовали ELISA^{PLUS} Kit («Roche Diagnostic», USA). Следует отметить, что клетки без обработки пептидами показали небольшой уровень апоптоза, поскольку каждая экспоненциально растущая клеточная культура содержит некоторое количество мертвых клеток (в норме приблизительно 3%) вследствие спонтанной дифференциации и взросления клеточной линии. Однако обработка клеток пептидами показала, что RHAMM-таргет-пептиды (2×10^{-7} М) повышали апоптоз в клетках PC3m-LN4 примерно в 2 раза (таблица 8).

Таблица 8

Эффект RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз и некроз клеток PC3m-LN4, фибробластов и фибробластов RHAMM^(-/-). * – $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам PC3m-LN4 без обработки пептидами.

№	Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
1	PC3m-LN4	2,113	2,104
2	PC3m-LN4 + пептид EEDFGEEAEEEE	*3,440	*0,545
3	PC3m-LN4 + пептид VEGEGEEEGEEY	*3,661	*0,655
4	Фибробласты	0,644	2,429
5	Фибробласты + пептид EEDFGEEAEEEE	0,644	2,211

№	Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
6	Фибробласты + пептид VEGEGEEEGEEY	0,645	2,259
7	Фибробласты RHAMM ^(-/-)	0,217	0,927
8	Фибробласты RHAMM ^(-/-) + пептид EEDFGEEAEEEE	0,199	0,829
9	Фибробласты RHAMM ^(-/-) + пептид VEGEGEEEGEEY	0,209	0,765

При исследовании эффекта пептидов на некроз клеток PC3m-LN4 нами было выявлено, что оба пептида значительно ингибировали некротическую гибель клеток рака предстательной железы (приблизительно в 4 раза) (таблица 8).

Следует отметить: в предыдущих экспериментах мы показали, что эти пептиды стимулировали некроз клеток рака молочной железы. Это свидетельствует о разном механизме действия пептидов на клетки рака предстательной железы и на клетки рака молочной железы.

Чтобы понять, является ли действие пептидов специфичным только для опухолевых клеток, мы изучали влияние RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и фибробластов RHAMM^(-/-). Результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды не оказывали эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток (таблица 8). Оба пептида также практически не оказывали влияния на апоптоз и некроз фибробластов RHAMM^(-/-) (таблица 8). Наблюдаемые небольшие различия не были статистически достоверными. Эти результаты продемонстрировали, что RHAMM-таргет-пептиды связываются с RHAMM и их действие является специфичным для клеток рака предстательной железы.

8.2. Исследование влияния RHAMM-таргет-пептидов на активность каспаз 3/7 в клетках рака предстательной железы

На следующем этапе мы исследовали влияние RHAMM-таргет-пептидов (EEDFGEEAEEEE и VEGEGEEEGEEY) на активность каспаз 3/7 в клетках PC3m-LN4. Для этого мы применяли Caspase-3/7 Colorimetric Assay Kit (GenScript, USA). К клеткам добавляли RHAMM-таргет-пептиды (2×10^{-7} М) и инкубировали в течение 24 часов. Результаты показали, что активность каспаз 3/7 увеличилась примерно в 2 раза в клетках, обработанных пептидами, по сравнению с контрольными необработанными клетками (рисунок 54). Эти данные согласуются с индукцией апоптоза под воздействием пептидов в этих клетках.

Эти данные свидетельствуют об участии каспаз 3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках PC3m-LN4.

Таким образом, наши результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды ингибировали жизнеспособность и стимулировали апоптоз клеток рака предстательной железы. Эти данные позволяют предположить, что RHAMM-таргет-пептиды являются перспективными кандидатами для терапии рака предстательной железы.

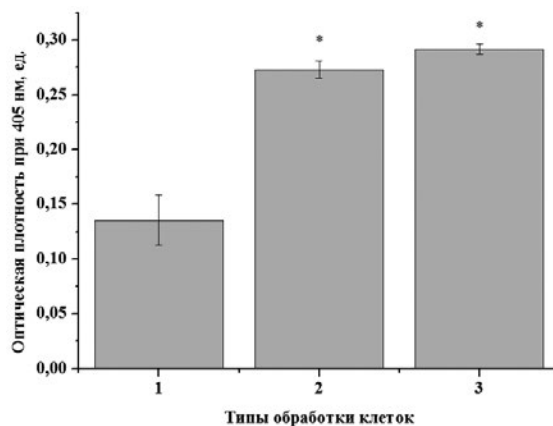


Рис. 54. Индукция активности каспаз 3/7 посредством RHAMM-таргет-пептидов в клетках рака простаты (PC3m-LN4). 1 – PC3m-LN4; 2 – PC3m-LN4 + пептид EEDFGEEAEEEE; 3 – PC3m-LN4 + пептид VEGEGEEEGEEY. * – $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидами.

8.3. Изучение связывания пептидов (FITC-GE GEEGEE и FITC-DFGEEAEE) с клетками рака предстательной железы

Мы исследовали связывание пептидов FITC-GE GEEGEE и FITC-DFGEEAEE с клетками предстательной железы (PC3m-LN4). В этом эксперименте мы использовали 8-мерные пептиды (GE GEEGEE и DFGEEAEE), которые представляют собой укороченные версии 12-мерных пептидов (VEGEGEEEGEEY и EEDFGEEAEEEE). Следует отметить, что эти укороченные пептиды также содержат в своем составе консервативный фрагмент **EE XEEZ**. Поэтому нам было интересно исследовать, способны ли эти 8-мерные пептиды также связываться с RHAMM.

Клетки обрабатывали FITC-пептидами и анализировали связывание пептидов методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Результаты показали, что оба FITC-пептида связываются клетками, однако связывание FITC-GE GEEGEE-пептида было немного сильнее, чем FITC-DFGEEAEE (рисунок 55 а, ряд 1, 2).

Для идентификации рецептора, связывающего пептиды, мы исследовали блокирование клеточной поверхности тремя различными антителами, а именно анти-FcR-, анти-CD44- и анти-RHAMM-антителами. Результаты показали, что предварительная инкубация клеток с анти-IgG-антителами, которые связываются с FcR-рецептором и тем самым блокируют его, не приводила к заметному изменению флуоресценции по отношению к клеткам без обработки (рисунок 55 а, ряд 1, 2) и, таким образом, не влияла на связывание пептидов с клетками (рисунок 55 б). Эти результаты указывают на то, что пептиды не связываются с FcR-рецептором клеток. Предварительная обработка клеток PC3m-LN4 с анти-CD44-антителами, которые связываются с CD44-рецептором (рисунок 55 в), также не влияла на уровень флуоресценции клеток по отношению к клеткам без обработки (рисунок 55 а, ряд 1, 2). Эти данные указывают на то, что пептиды не связываются с CD44-рецепто-

ром. Однако предварительная инкубация клеток с анти-RHAMM-антителами с последующим добавлением пептидов приводила к полному отсутствию флуоресценции (рисунок 55 г). Эти результаты свидетельствуют о том, что пептиды FITC-GEGEEGEE и FITC-DFGEEAEE связываются именно с RHAMM-рецептором на поверхности клеток рака предстательной железы.

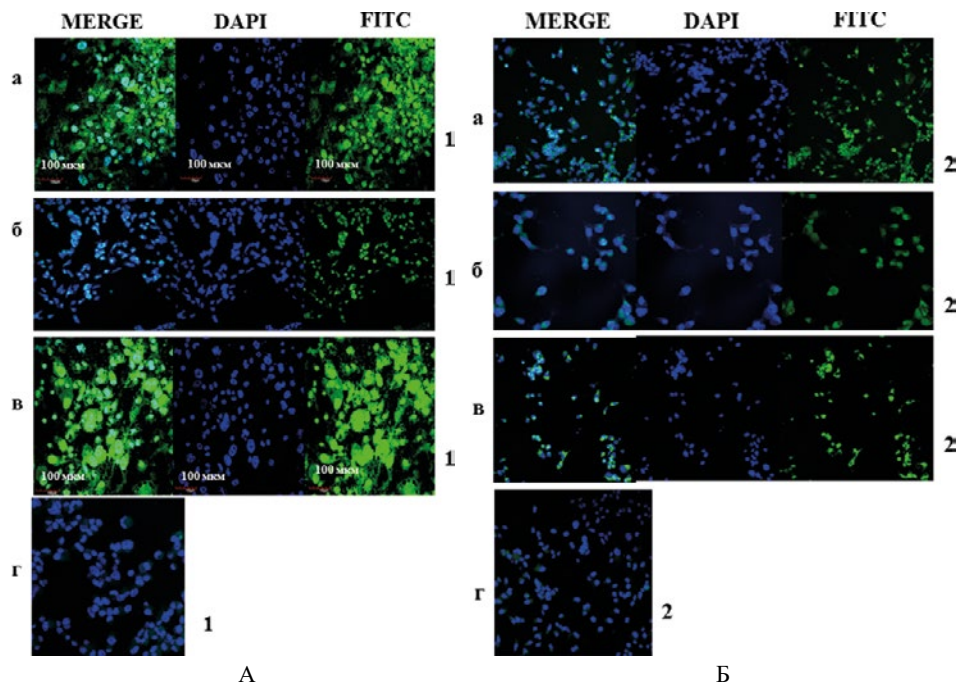


Рис. 55. Связывание пептидов FITC-GEGEEGEE (A1) и FITC-DFGEEAEE (B2) с клетками: а – клетки PC3m-LN4, обработанные FITC-пептидами; б – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-FcR-антителами; в – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-CD44-антителами; г – клетки PC3m-LN4, предварительно обработанные анти-RHAMM-антителами. Результаты регистрировали при $E_x/E_m = 358/461$ нм (флуоресценция DAPI) и $E_x/E_m = 495/519$ нм (флуоресценция FITC).

Количественный анализ связывания пептидов FITC-GEGEEGEE или FITC-DFGEEAEE с клетками проводили с помощью программы ImageJ (рисунок 56). Как видно из рисунка 56, пептид FITC-GEGEEGEE показывает величину флуоресценции 51, а пептид FITC-DFGEEAEE – величину 45, то есть связывание пептида FITC-GEGEEGEE немного выше, чем пептида DFGEEAEE. Однако данные различия в интенсивности флуоресценции между пептидами не являются статистически значимыми. В то же время данные значения флуоресценции (51 и 45) являются статистически значимыми по сравнению с величинами флуоресценции после обработки клеток анти-RHAMM-антителами (10 и 8), что указывает на связывание пептидов с RHAMM-рецептором. Эксперименты по предварительной инкубации клеток с анти-FcR-антителами (IgG-антитела) и анти-CD44-антителами проводили в качестве сравнения, чтобы показать, что блокирование FcR-и CD44-рецепторов не мешает FITC-пептидам связываться с клетками. Коли-

ческий анализ интенсивности флуоресценции после обработки IgG-антителами показывает величины 49 и 42, которые сопоставимы с величинами 51 и 45 для пептидов FITC-GEDEEGEE и FITC-DFGEEAEE без обработки клеток антителами. Сравнительный анализ интенсивности флуоресценции после обработки анти-CD44-антителами показывает величины 60 и 49, которые также сопоставимы с величиной 51 (для пептида FITC-GEDEEGEE) и величиной 45 (для пептида FITC-DFGEEAEE) без обработки антителами. Различия между этими тремя типами обработки клеток являются статистически незначимыми. Эти результаты свидетельствуют о том, что оба пептида не связываются ни с FcR-рецептором, ни с CD44-рецептором. Величины интенсивности флуоресценции являются статистически значимыми лишь по отношению к величинам флуоресценции после обработки клеток анти-RHAMM-антителами (10 и 8). Как видно из рисунка 56, предварительная обработка клеток с анти-RHAMM-антителами приводит к значительному ингибированию связывания пептидов с поверхностью клеток.

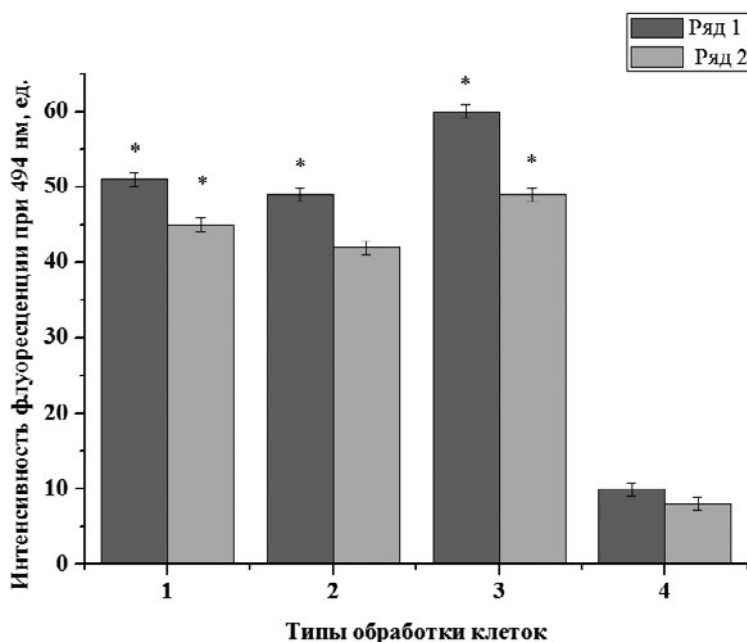


Рис. 56. Количественный анализ связывания пептидов FITC-GEDEEGEE (ряд 1) и FITC-DFGEEAEE (ряд 2) с клетками PC3m-LN4: 1 – клетки PC3m-LN4; 2 – PC3m-LN4 + анти-IgG-антитела; 3 – PC3m-LN4 + анти-CD44-антитела; 4 – PC3m-LN4 + анти-RHAMM-антитела. С помощью программного обеспечения ImageJ были выбраны ROI раковых клеток (общее количество клеток 6158). Среднее значение флуоресценции каждого ROI было получено с использованием 8-битных изображений и представлено в виде гистограммы. Данные были проанализированы с помощью One-Way ANOVA. Различия считались достоверными при (* – $p < 0,05$). Звездочка указывает на существенную разницу между клетками, обработанными RHAMM-антителами, и всеми остальными типами обработки.

Таким образом, количественный анализ всех данных свидетельствует о том, что FITC-пептиды (GEDEEGEE и DFGEEAEE) селективно связы-

ваются с RHAMM-рецептором на поверхности опухолевых клеток PC3m-LN4. Кроме того, мы показали, что короткие пептиды, содержащие в своем составе фрагмент EEXEEZ, сохраняют способность специфично связываться с RHAMM. Это подтверждает важную роль этого фрагмента.

8.4. Сравнительный анализ инвазивности клеток рака предстательной железы, мышинных эмбриональных фибробластов и клеток меланомы кожи

Вначале мы проводили сравнительный анализ инвазивности раковых клеток предстательной железы, мышинных эмбриональных фибробластов и опухолевых клеток меланомы кожи. С этой целью мы использовали QCMTM Gelatin Invadopodia assay (red) kit (Millipore, USA). PC3m-LN4-клетки высевали на Cu^3 -флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 часов. Для контроля также высевали фибробласты (MEF, неинвазивные) и клетки меланомы кожи (WM1552с, неинвазивные) на Cu^3 -флуоресцеин-желатиновые подложки в ростовой среде. После фиксации и окраски клеток получали изображения на конфокальном микроскопе и анализировали площадь деградации желатина клетками. Чтобы оценить инвазивность клеток, проводили анализ деградации желатина клетками через 40 часов. На конфокальных изображениях видно, что клетки PC3m-LN4 интенсивно деградируют Cu^3 -флуоресцентно-меченый желатин (рисунок 57 а, ряд 1).

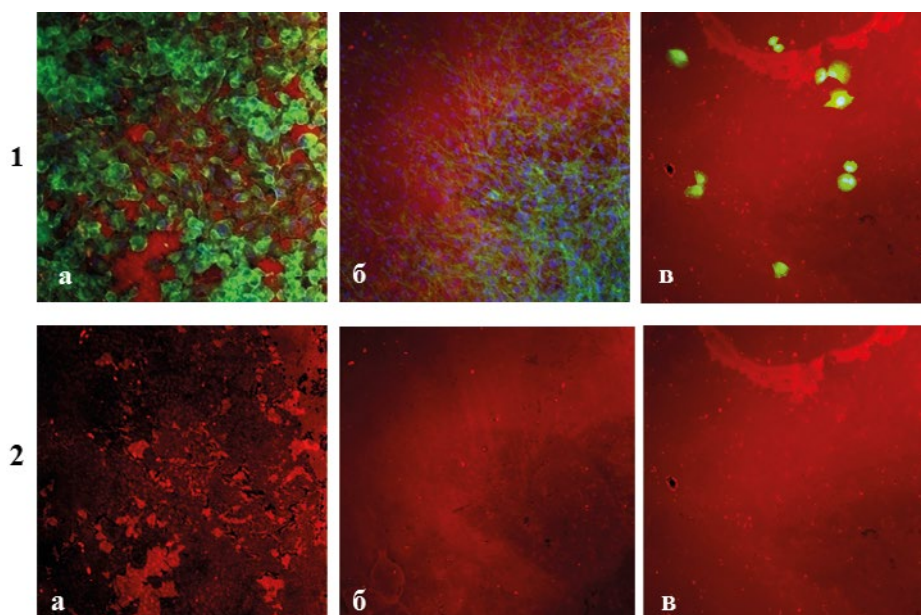


Рис. 57. Анализ инвазивности клеток РПЖ, фибробластов и клеток кожной меланомы. Конфокальные изображения клеток (1) и деградации желатина (2): а – клетки PC3m-LN4; б – MEF-клетки; в – WM1552с-клетки. Желатин окрашен красителем Cu^3 (красная флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Увеличение $\times 20$.

Для инвазивных клеток PC3m-LN4 наблюдается протеолиз желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, на конфокальных изображениях эта область черного цвета (рисунок 57 а, ряд 2). Инвазивные клетки имеют большое количество инвадоподий, высокую концентрацию актина на концах клетки. Для сравнения инвазивности опухолевых и нормальных клеток также анализировали инвазивность фибробластов (MEF) и клеток меланомы кожи (WM1552c) через 40 часов (рисунок 57 б, в, ряд 1). Как видно, фибробласты и клетки меланомы кожи не деградировали желатин, что указывает на отсутствие инвазивности в нормальных клетках (фибробластах) и раковых клетках меланомы, которые являются неинвазивными и не образуют инвадоподий (рисунок 57 б, в, ряд 2). Количественный анализ изображений проводили используя программу ImageJ software. Мы показали, что клетки PC3m-LN4 деградируют желатин на 95% через 40 часов, в то же время инвазивность фибробластов составляет 1%, а клеток меланомы 0,8% (рисунок 58). Наблюдаемый незначительный уровень деградации желатина обусловлен небольшой подвижностью фибробластов и клеток меланомы.

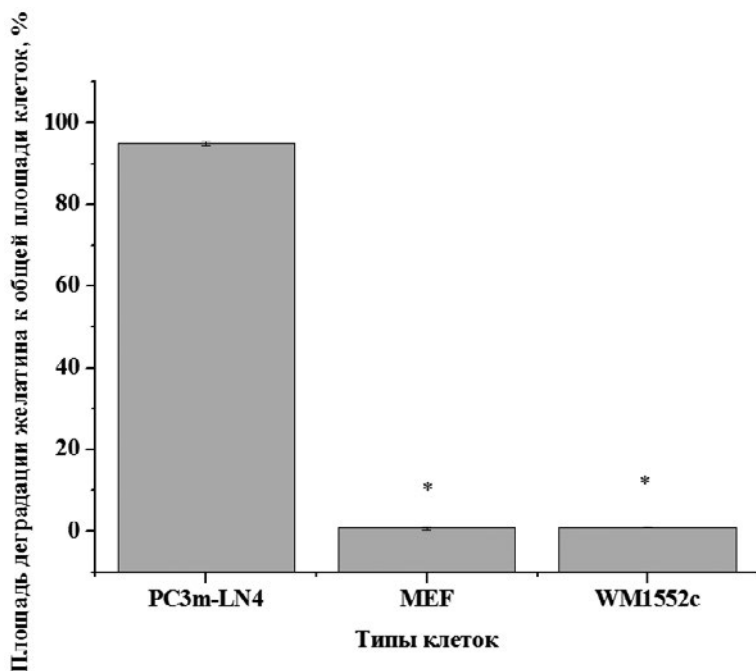


Рис. 58. Количественный анализ деградации желатина раковыми клетками PC3m-LN4, фибробластами (MEF) и клетками меланомы кожи (WM1552c) с помощью программы ImageJ.

* – $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам PC3m-LN4.

8.5. Эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток РПЖ

Для того чтобы анализировать эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность опухолевых клеток, клетки PC3m-LN4 предварительно обрабатывали пептидами GEGEEGEE и DFGEEAEE. Результаты показали, что обработка клеток пептидами приводила к значительному уменьшению площади деградации желатина по сравнению с клетками без инкубации с пептидами (рисунок 59 а, б, в, ряд 1).

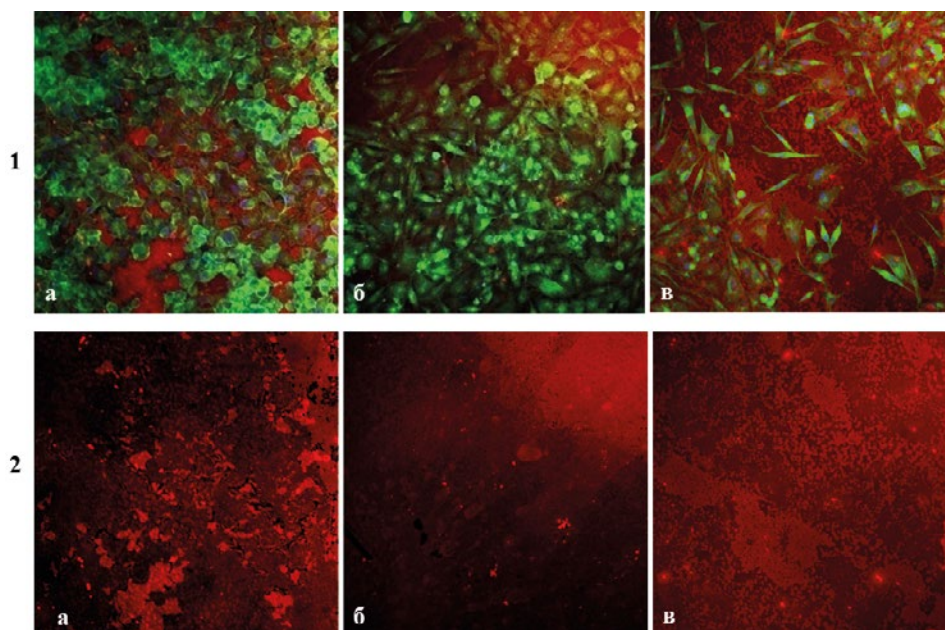


Рис. 59. Эффект пептидов на инвазивность раковых клеток. Конфокальные изображения клеток (1) и деградации желатина (2): а) PC3m-LN4 клетки без добавления пептидов; б) клетки, обработанные пептидом GEGEEGEE; в) клетки, обработанные пептидом DFGEEAEE. Желатин окрашен красителем Cu^3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Увеличение $\times 20$.

Область черного цвета (отсутствие флуоресценции) резко сокращалась, что указывает на уменьшение числа инвадоподий и на ингибирование инвазивности раковых клеток (рисунок 59 б, в, ряд 2). Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, обработанные пептидом GEGEEGEE, деградировали только 7% площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует о том, что инвазивность клеток РПЖ уменьшилась на 93% (рисунок 60).

Клетки, обработанные пептидом DFGEEAEE, деградировали лишь 11% желатина. Этот результат указывает на то, что предварительная обработка клеток пептидом DFGEEAEE приводила к снижению инвазивности на 89% (рисунок 60).

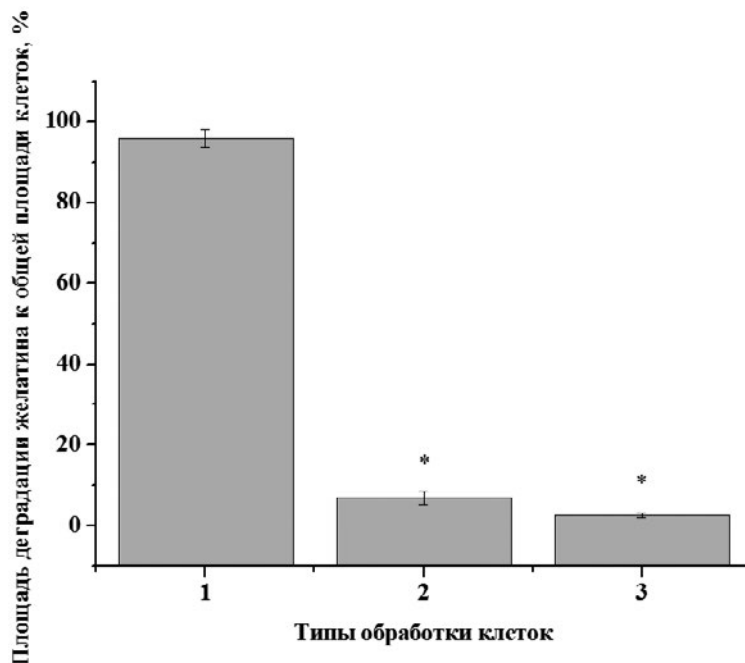


Рис. 60. Количественный анализ деградации желатина клетками PC3m-LN4 с помощью программы ImageJ: 1 – клетки без обработки пептидами, 2 – клетки, предварительно обработанные пептидом GEGEEGEE, 3 – клетки, предварительно обработанные пептидом DFGEEAEE. * – $p \leq 0,05$ по отношению к клеткам без обработки пептидами.

Эти результаты показали, что синтетические пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE) эффективно ингибировали образование инвадоподий в раковых клетках. Таким образом, это свидетельствует о том, что RHAMM-таргет-пептиды являются перспективными кандидатами для блокирования процессов инвазивности и метастазирования РПЖ.

Глава 9. Визуализация клеток рака яичников с помощью пептида VEGEGEEGEEY

В настоящее время разработка неинвазивных методов диагностики рака яичников на самой ранней стадии является весьма актуальной. Для того чтобы неинвазивная визуализация опухолевых клеток *in vivo* стала осуществимой, необходима разработка правильно сконструированных зондов для визуализации.

Задачей данного исследования было изучение возможности использования VEGEGEEGEEY-пептида в качестве визуализирующего зонда для диагностики рака яичников. Ранее было показано, что содержание ГК и RHAMM повышено при раке яичников и коррелирует с прогрессией и метастазированием опухоли [501]. Однако в литературе отсутствуют данные о взаимодействии ГК с клетками рака яичников. Поэтому в данной работе мы вначале исследовали связывание ГК с клетками рака яичников. Затем мы изучили связывание VEGEGEEGEEY-пептида с RHAMM на поверхности опухолевых клеток.

9.1. Связывание ГК-Су5.5 с поверхностью клеток рака яичников

Мы исследовали связывание ГК-Су5.5 (220 кДа) с поверхностью клеток рака яичников (SKVO3), которые характеризуются повышенной экспрессией RHAMM. Показано, что при добавлении ГК-Су5.5 к культуре клеток на поверхности клеток наблюдалась интенсивная флуоресценция (величина флуоресценции была равна 23 ед. (рисунок 61 а – г, 62 (1)).

Это указывает на то, что ГК-Су5.5 эффективно связывалась с поверхностью клеток рака яичников. Связывание ГК-Су5.5 блокировалось анти-RHAMM-антителами, поскольку при этом регистрировалось заметное снижение флуоресценции (интенсивность флуоресценции уменьшалась до 1,3 ед.). Это свидетельствует о том, что ГК-Су5.5 специфично связывается с RHAMM на поверхности клеток SKVO3 (рисунок 61 д, 62 (2)). Предварительная обработка клеток избытком немеченой ГК приводила к значительному уменьшению флуоресценции (интенсивность флуоресценции понижалась до 2 ед.), что указывает на связывание ГК-Су5.5 (рисунок 61 е, 62 (3)) именно с ГК-связывающим центром RHAMM-рецептора. Мы также показали, что предварительная инкубация клеток с немеченым VEGEGEEGEEY-пептидом приводила к заметному понижению флуоресценции (интенсивность флуоресценции уменьшалась до 3 ед.), что свидетельствует о связывании пептида на ГК-связывающем центре RHAMM (рисунок 61 ж, 62 (4)). Таким образом, эти данные указывают на то, что ГК-Су5.5 и VEGEGEEGEEY-пептид специфично связываются с RHAMM.

Количественный анализ связывания ГК-Су5.5 проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (рисунок 62). Нами были выбраны области изображения (ROI, region of interest) опухолевых клеток, общее количество проанализированных клеток составило 4150.

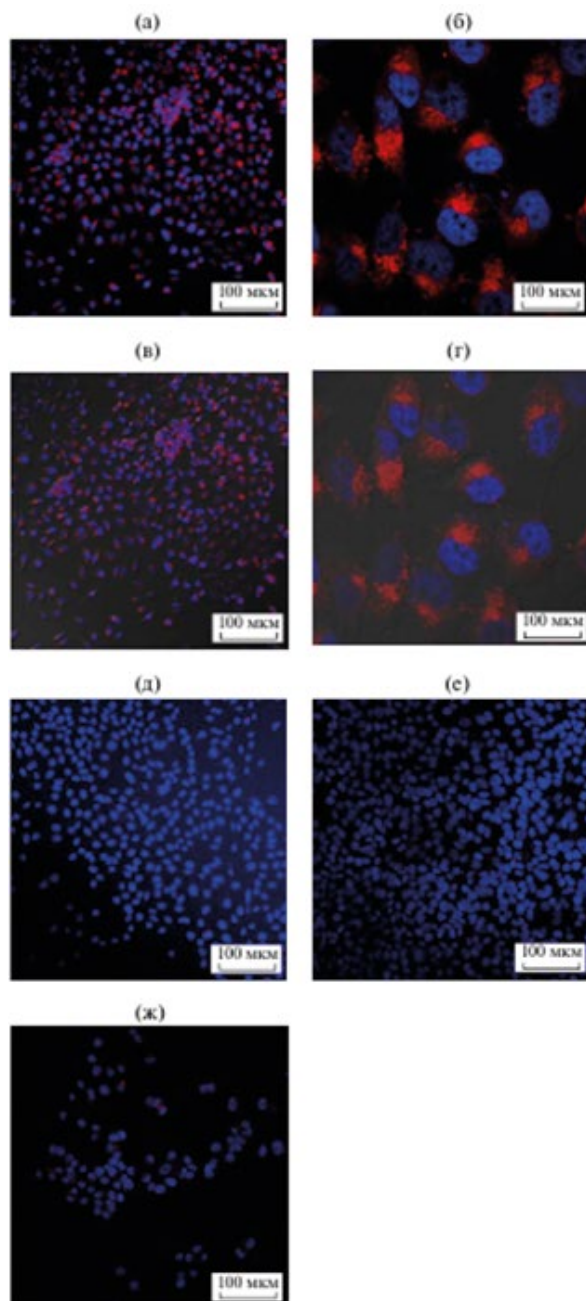


Рис. 61. Связывание ГК-Сy5.5 на поверхности клеток рака яичников. *a* – клетки SKVO3, обработанные ГК-Сy5.5; *б* – изображение *a* при увеличении $\times 40$; *в* – трехмерное изображение клеток SKVO3, обработанных ГК-Сy5.5; *г* – трехмерное изображение клеток SKVO3, обработанных ГК-Сy5.5 при увеличении $\times 40$; *д* – клетки, предварительно обработанные немеченой ГК; *е* – клетки, предварительно обработанные VEGEGEEEGEEY-пептидом. Результаты регистрировали при $E_x/E_m = 358/461$ нм (флуоресценция DAPI) и $E_x/E_m = 675/694$ нм (флуоресценция Cy5.5).

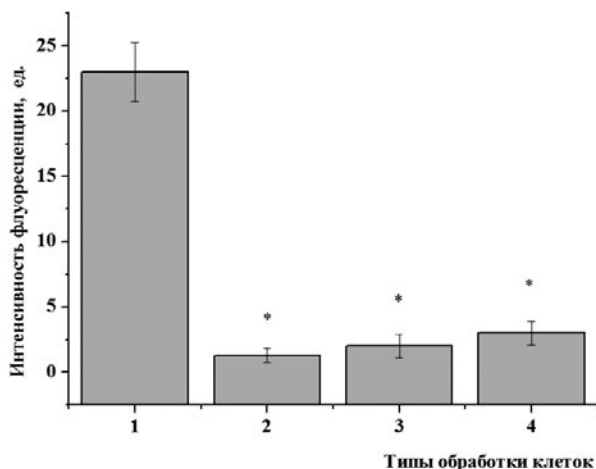


Рис. 62. Количественный анализ связывания ГК-Cu5.5 с поверхностью клеток рака яичников. 1 – ГК-Cu5.5, 2 – ГК-Cu5.5 + анти-RHAMM-антитела, 3 – ГК-Cu5.5 + ГК, 4 – ГК-Cu5.5 + VEGEGEEEGEEY-пептид. Среднее значение флуоресценции получено с использованием 8-битных изображений. Различия считали статистически значимыми при $* p \leq 0,05$. Звездочка указывает на существенную разницу между клетками, обработанными ГК-Cu5.5, и всеми остальными типами обработки.

9.2. Связывание VEGEGEEEGEEY-пептида с RHAMM на поверхности клеток рака яичников

С целью возможности использования пептидов для визуализации клеток рака яичников мы исследовали связывание пептида VEGEGEEEGEEY с RHAMM на поверхности клеток рака яичников (SKVO3), которые отличаются сверхэкспрессией RHAMM. Для этого мы метили пептид флуоресцентным красителем и анализировали связывание пептида FITC-VEGEGEEEGEEY методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Показано, что пептид FITC-VEGEGEEEGEEY эффективно связывался с поверхностью клеток рака яичников, о чем свидетельствует высокий уровень флуоресценции в клетках (интенсивность флуоресценции составляет 52 ед.) (рисунок 63 а).

Для сравнения мы также обрабатывали пептидом FITC-VEGEGEEEGEEY нормальные клетки (MEF, мышинные эмбриональные фибробласты). Результаты показали низкий уровень флуоресценции в клетках (величина флуоресценции равна 4 ед.), что указывает на незначительное связывание пептида FITC-VEGEGEEEGEEY с поверхностью этих клеток (рисунок 63 б).

Это свидетельствует о том, что пептид FITC-VEGEGEEEGEEY селективно связывался с клетками рака яичников.

На следующем этапе мы предварительно инкубировали клетки SKVO3 с анти-RHAMM-антителами, а затем добавляли пептид FITC-VEGEGEEEGEEY. Мы установили, что после такой обработки уровень флуоресценции клеток значительно понизился (величина флуоресценции снизилась до 1,3 ед.). Эти данные указывают на то, что пептид FITC-VEGEGEEEGEEY связывался именно с поверхностным RHAMM (рисунок 63 в). Следует отметить, что предварительная инкубация клеток SKVO3

с анти-IgG-антителами не приводила к заметному изменению флуоресценции. Интенсивность флуоресценции оставалась на том же уровне (46 ед.) по отношению к клеткам без блокирования. Таким образом, мы показали, что обработка клеток анти-IgG-антителами не влияла на связывание пептида FITC-VEGEGEEEGEEY с поверхностью клеток (рисунок 63 г), так как эти антитела взаимодействуют с рецептором FcR, а не с RHAMM.

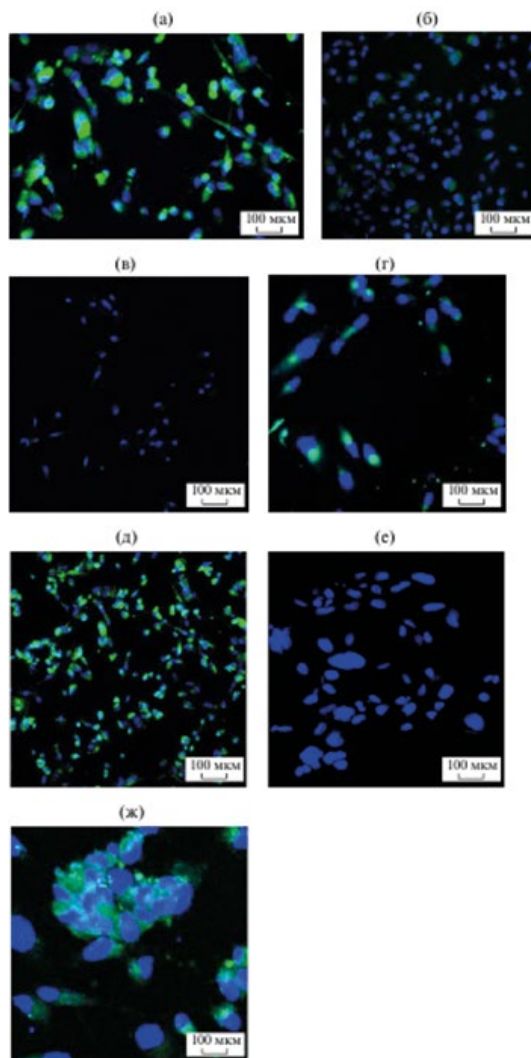


Рис. 63. Связывание FITC-VEGEGEEEGEEY-пептида с RHAMM в клетках. *а* – клетки SKVO3, обработанные FITC-пептидом; *б* – эмбриональные фибробласты мыши, обработанные FITC-пептидом; *в* – клетки SKVO3, предварительно обработанные анти-RHAMM-Ab; *г* – клетки SKVO3, предварительно обработанные IgG-Ab; *д* – клетки SKVO3, предварительно обработанные анти-CD44-Ab; *е* – фибробласты RHAMM^(-/-), обработанные FITC-пептидом; *ж* – фибробласты RHAMM^(+/+), обработанные FITC-пептидом. Интенсивность флуоресценции регистрировали при $E_x/E_m = 358/461$ нм (флуоресценция DAPI) и $E_x/E_m = 495/519$ нм (флуоресценция FITC).

Кроме того, предварительная обработка клеток анти-CD44-антителами, которые блокируют CD44-рецептор и не связываются с RHAMM, также не влияла на уровень флуоресценции клеток по отношению к клеткам без добавок (интенсивность флуоресценции составила 50,6 ед.) (рисунок 63 д). Это свидетельствует о том, что пептид FITC-VEGEGEEEEGEEY не связывался с рецептором CD44, а специфично взаимодействовал с RHAMM на поверхности клеток рака яичников.

Чтобы подтвердить эти результаты, мы также анализировали связывание пептида FITC-VEGEGEEEEGEEY с фибробластами RHAMM^(-/-) и трансфицированными фибробластами RHAMM^(+/+). Показано, что при отсутствии RHAMM в клетках уровень флуоресценции был незначительным (1,3 ед.), т.е. FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид не связывался с поверхностью фибробластов RHAMM^(-/-) (рисунок 63 е). Однако в трансфицированных фибробластах RHAMM^(+/+) наблюдалась интенсивная флуоресценция (уровень флуоресценции был 46 ед.), что свидетельствовало о связывании пептида FITC-VEGEGEEEEGEEY именно с RHAMM (рисунок 63 ж).

Количественный анализ связывания пептида FITC-VEGEGEEEEGEEY с поверхностью клеток SKOV3 представлен на рисунке 64.

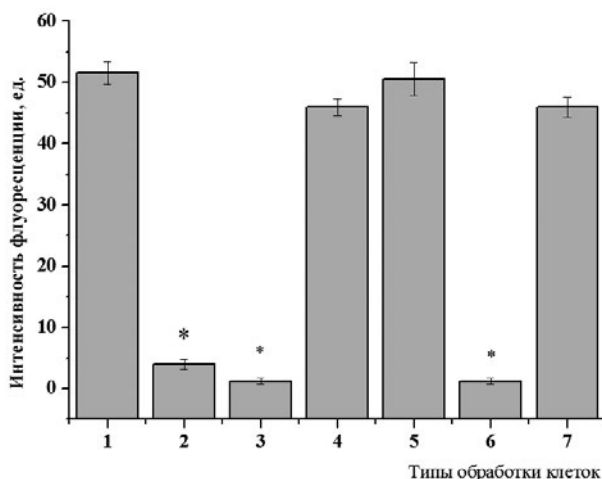


Рис. 64. Количественный анализ связывания пептида FITC-VEGEGEEEEGEEY с поверхностью клеток SKOV3. 1 – FITC-пептид, 2 – FITC-пептид + клетки MEF, 3 – FITC-пептид + анти-RHAMM-Ab, 4 – FITC-пептид + IgG-Ab, 5 – FITC-пептид + CD44-Ab, 6 – FITC-пептид + фибробласты RHAMM^(-/-), 7 – FITC-пептид + фибробласты RHAMM^(+/+). Среднее значение флуоресценции каждой области исследования получено с использованием 8-битных изображений. Статистический анализ данных проводили методом One Way ANOVA. Различия считали статистически значимыми при * $p \leq 0,05$. Звездочка указывает на существенную разницу между клетками, обработанными FITC-пептидом, и всеми остальными типами обработки.

Таким образом, полученные результаты указывают на специфичность связывания пептида FITC-VEGEGEEEEGEEY с поверхностным RHAMM и позволяют сделать вывод, что этот пептид можно использовать в качестве молекулярного зонда для ранней диагностики рака яичников.

Глава 10. Исследование влияния пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток рака предстательной железы

Для исследования мы выбрали пептид RYQLHPYR (*ArgTyrGlnLeuHisProTyrArg*), который не содержит в своем составе общий для других пептидов фрагмент EEXEEZ, однако он также способен связываться с RHAMM, как было показано нами ранее. Мы попытались выснить, сохраняет ли пептид с такой аминокислотной последовательностью свои функции в клетке. Задачей данного исследования было оценить влияние пептида RYQLHPYR на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность клеток рака предстательной железы.

Вначале мы измеряли эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4), для которых характерна повышенная экспрессия RHAMM-рецептора [502]. С этой целью клетки PC3m-LN4 обрабатывались пептидом при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} M) в течение 24 часов. В качестве контроля мы использовали фибробласты мыши (MEF), которые обрабатывали аналогично. Результаты показали, что пептид ингибировал жизнеспособность опухолевых клеток через 24 часа на ~80%, однако не влиял на рост фибробластов мыши (рисунок 65).

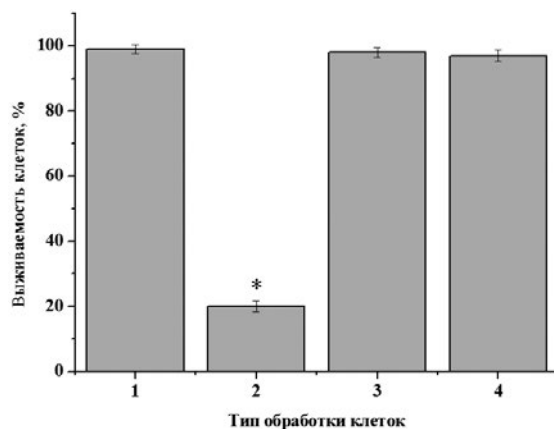


Рис. 65. Эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток: 1 – клетки предстательной железы (PC3m-LN4), 2 – клетки PC3m-LN4 + пептид; 3 – фибробласты; 4 – фибробласты + пептид. Различия считали статистически значимыми при $* p \leq 0,05$. Звездочка указывает на существенную разницу между клетками, обработанными FITC-пептидом, и всеми остальными типами обработки.

Это свидетельствует о том, что пептид RYQLHPYR, связываясь с RHAMM-рецептором, значительно ингибирует активность митохондриальных дегидрогеназ клетки, которые играют центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, около 40% протонного градиента для синтеза АТФ создаются именно этим комплексом [503]. Таким образом, результаты показали, что RYQLHPYR-пептид при

низких концентрациях обладает цитотоксическим действием за счет модуляции RHAMM-рецептора.

10.1. Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы

Так как мы показали, что жизнеспособность клеток PC3m-LN4 значительно подавлялась пептидом, было важно классифицировать, какой тип гибели (апоптоз или некроз) наблюдался в клетках PC3m-LN4. Анализ типа гибели клеток проводили методом ELISA. Мы показали, что клетки, обработанные пептидом (концентрация 2×10^{-7} М), продемонстрировали высокий уровень апоптоза, а именно – пептид увеличивал апоптоз в опухолевых клетках приблизительно в 10 раз (таблица 9).

Таблица 9

Эффект пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеток PC3m-LN4, фибробластов и фибробластов RHAMM^(-/-)-клеток.
Различия являются статистически значимыми при * – $p \leq 0,05$.

Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
PC3m-LN4	0,257	0,114
PC3m-LN4 + пептид	2,213*	0,277*
Фибробласты	0,621	2,324
Фибробласты + пептид	0,656	2,231
Фибробласты RHAMM ^(-/-)	0,423	2,269
Фибробласты RHAMM ^(-/-) + пептид	0,690	1,710

Эти результаты указывают на то, что RYQLHPYR-пептид и RHAMM вовлечены в апоптозные пути, которые индуцируют потерю энергии и ингибирование работы мембранных насосов клетки [504].

Затем мы исследовали эффект пептида на некроз клеточной линии PC3m-LN4. Наши результаты показали, что пептид стимулировал некротическую гибель опухолевых клеток приблизительно в 2,5 раза (таблица 9). Эти результаты свидетельствуют о том, что индукция апоптоза под действием пептида сопровождается последующим развитием некроза опухолевых клеток. Следует отметить, что в современной онкологии индукция некроза используется как один из методов лечения злокачественных опухолей. Для подтверждения специфичности действия пептида RYQLHPYR на опухолевые клетки мы изучали влияние пептида на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и фибробластов RHAMM^(-/-). Результаты показали, что пептид не оказывал значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток (таблица 9). Как видно из таблицы 9, уровень апоптоза в фибробластах был практически одинаковым до обработки пептидом и после (оптическая плотность 0,621 ед. и 0,656 ед. соответственно). Установлено, что изначально уровень некроза в фибробластах был 2,324 ед., а после добавки пептида он составил 2,231 ед. Статистический анализ данных показал, что наблю-

даемые незначительные различия в уровне апоптоза и некроза в контрольных и обработанных пептидом фибробластах не являются статистически значимыми. Это свидетельствует о том, что пептид не влияет на уровень апоптоза и некроза в фибробластах, потому что в фибробластах нет такого высокого уровня экспрессии RHAMM, который наблюдается в опухолевых клетках. Это указывает на то, что в раковых клетках действие пептида является RHAMM-опосредованным, то есть индукция апоптоза и некроза запускается через сигнальные пути рецептора.

Чтобы подтвердить участие RHAMM в индукции апоптоза и некроза, мы исследовали влияние пептида на апоптоз и некроз нокаут-фибробластов RHAMM^(-/-), в которых отсутствует данный рецептор. Как видно из таблицы 9, пептид не влиял на уровень апоптоза и некроза в фибробластах RHAMM^(-/-). Наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза и некроза в контрольных фибробластах и обработанных пептидом не являются статистически значимыми. Эти данные указывают на то, что индукция апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептида действительно является RHAMM-опосредованной.

Таким образом, результаты показали, что пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RHAMM-рецептор. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о специфичности действия RHAMM-таргет-пептидов на опухолевые клетки молочной железы [505, 506].

10.2. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз 3/7

Из литературы известно, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный путь и путь через рецепторы апоптоза [507]. Оба пути вызывают активацию каспаз и запуск каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Митохондрии являются ключевым регулятором каспазного каскада и апоптоза, при этом наблюдается выброс цитохрома C в цитоплазму, активация каспазы 9 и затем каспаз 3/7 [507].

Поскольку мы наблюдали цитостатический эффект и индукцию апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептида, мы исследовали влияние данного пептида на митохондриальный тип апоптоза. Активация каспаз 3/7 является основным индикатором митохондриального апоптоза, поэтому мы изучали эффект пептида на активность каспаз 3/7 в клетках PC3m-LN4. Фибробласты мыши (MEF) использовали в качестве контрольных клеток. К клеткам добавляли пептид (2×10^{-7} М) и инкубировали в течение 24 часов. Затем активность каспаз 3/7 измеряли с помощью Caspase-3/7 Colorimetric Assay Kit (GenScript, USA). Результаты показали, что активность каспаз 3/7 увеличилась примерно в 2 раза в клетках PC3m-LN4, обработанных пептидом, по сравнению с клетками, не обработанными пептидом (рисунок 66). Пептид не оказывал влияния на активность каспаз 3/7 в фибробластах (данные не показаны). Эти данные подтверждают участие каспаз 3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках PC3m-LN4, так как пептид значительно повышал активность каспаз 3/7.

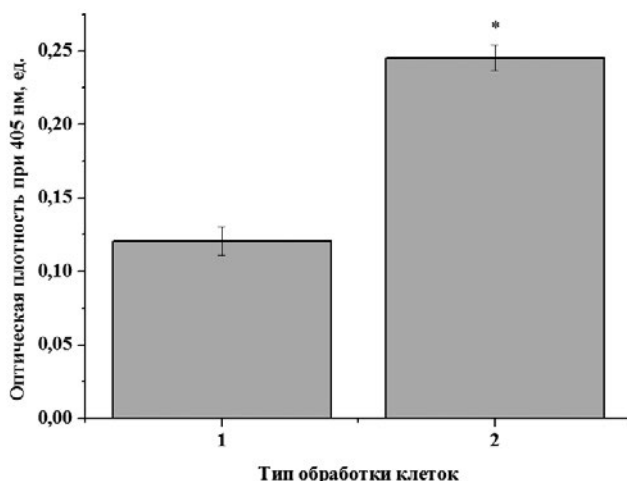


Рис. 66. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз 3/7 в опухолевых клетках предстательной железы (PC3m-LN4). 1 – PC3m-LN4; 2 – PC3m-LN4 + пептид. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки FITC-пептидом.

Таким образом, наши результаты показали, что под действием пептида наблюдается активация каспаз 3/7, что свидетельствует об индукции митохондриального пути апоптоза. Следовательно, RHAMM-рецептор участвует в передаче сигналов в митохондриальный путь апоптоза.

10.3. Исследование влияния пептида RYQLHPYR на инвазивность клеток РПЖ

Чтобы анализировать, может ли RYQLHPYR-пептид ингибировать инвазивность клеток РПЖ, клетки высевали на Cy^3 -флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли пептид или только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 часов. После фиксации и окраски клеток, согласно QCMTM Gelatin Invadopodia assay (red) kit (Millipore, USA), снимали изображения и анализировали площадь деградации желатина клетками методом конфокальной микроскопии. На рисунке 67 (а – ж) представлены изображения клеток PC3m-LN4 без обработки пептидом.

Показано, что инвазивные клетки PC3m-LN4 вызывают лизис желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, на конфокальных изображениях эта область черного цвета (рисунок 67 а, г). Инвазивные PC3m-LN4-клетки имеют большое количество инвадоподий и высокую концентрацию актина на концах клетки (рисунок 67 а, в). Однако клетки, обработанные пептидом, претерпели морфологические изменения, количество инвадоподий уменьшилось, и площадь деградации желатина резко сократилась, что свидетельствует о подавлении инвазивности клеток (рисунок 68 а, г).

Количественный анализ изображений показал, что клетки PC3m-LN4, не обработанные пептидом, значительно деградировали желатин, и площадь его деградации составила около 90% от общей площади клеток (рисунок 69 (1)).

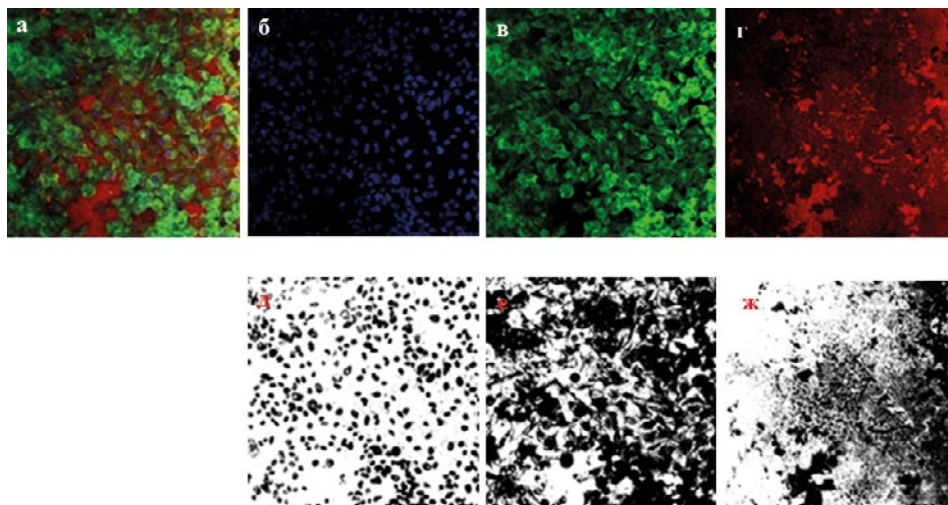


Рис. 67. Анализ инвазивности клеток PC3M-LN4. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (г). Желатин окрашен красителем Su^3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д – число клеток, е – площадь клеток (черный цвет), ж – площадь деградации желатина (белый цвет). Увеличение $\times 20$.

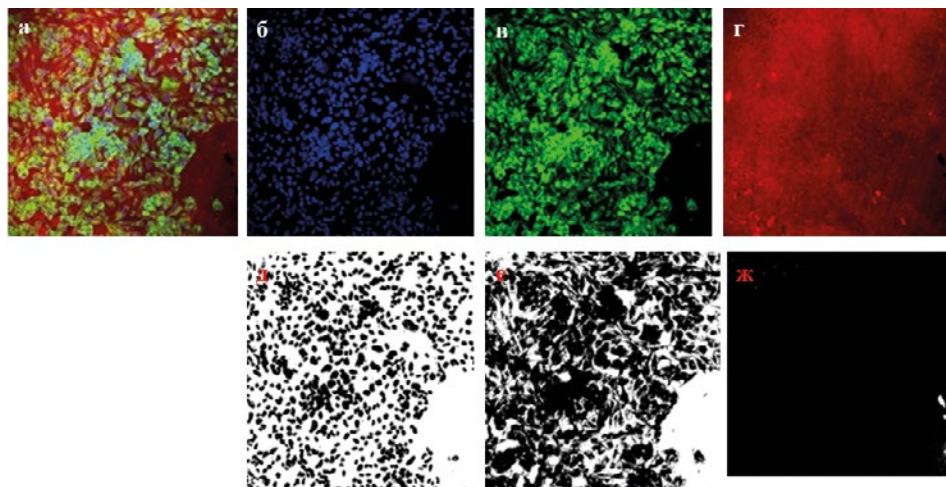


Рис. 68. Эффект пептида RYQLHPYR на инвазивность опухолевых клеток. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (г): клетки PC3m-LN4, обработанные пептидом. Желатин окрашен красителем Su^3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен красителем FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д – число клеток, е – площадь клеток (черный цвет), ж – площадь деградации желатина (белый цвет). Увеличение $\times 20$.

На рисунке 67 д – ж и 68 д – ж представлены изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software, показывающие число кле-

ток (черного цвета), площадь клеток (черного цвета) и площадь деградации желатина (белого цвета). Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, обработанные пептидом, деградировали только 0,14% площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует об ингибировании инвазивности клеток на 99,86% в сравнении с контролем (рисунок 69).

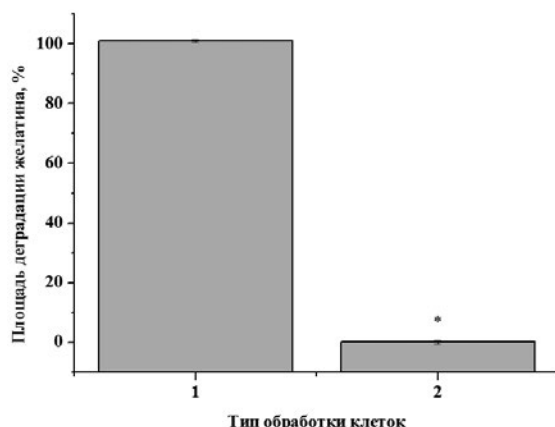


Рис. 69. Количественный анализ деградации желатина клетками PC3m-LN4 (1) и клетками, обработанными пептидом RYQLHPYR (2), с помощью программы ImageJ. * $p \leq 0,05$ по отношению к контрольным клеткам без обработки пептидом.

Эти результаты показали, что пептид RYQLHPYR значительно ингибировал инвазивность опухолевых клеток РПЖ. Эти данные согласуются с ранее опубликованными результатами, что RHAMM-таргет-пептиды ингибировали инвазивность опухолевых клеток молочной железы [506, 508–510]. Таким образом, эти результаты указывают на то, что пептид RYQLHPYR обладает антиметастатическим действием.

Таким образом, наши результаты продемонстрировали, что пептид RYQLHPYR индуцирует апоптоз, некроз и тем самым ингибирует жизнеспособность и инвазивность клеток рака предстательной железы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пептид RYQLHPYR обладает терапевтическим потенциалом для лечения рака простаты.

10.4. Влияние RHAMM-таргет-пептидов на рост опухоли у ксенографтов (мышинная опухолевая модель)

В следующей части работы мы исследовали эффект RHAMM-таргет-пептидов на рост опухолей у ксенографтов (иммунодефицитные мыши). Иммунодефицитные животные традиционно используются для получения моделей различных злокачественных опухолей. Создать такую модель можно путем имплантации перевиваемой культуры клеток с целью адаптации ее к росту у мышей.

Клетки рака предстательной железы (PC3mLN4) растили до логарифмической фазы, затем получали клеточную суспензию методом трипсинизации до концентрации клеток 2×10^7 /мл. К клеткам добавляли пепти-

ды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR, конечная концентрация 40 мкг/мл). К контрольным клеткам (без пептидов) добавляли равное количество ростовой среды. Затем клеточную суспензию (100 мкл, концентрация клеток 2×10^7 /мл) вводили в левую подкожную переднюю часть, в подмышечную впадину 5-недельных nude-мышей в асептических условиях. Через 1 неделю у всех мышей, инокулированных клетками рака предстательной железы (PC3mLN4), под мышкой ощущалась небольшая выпуклость. У всех мышей через 2 недели начали развиваться опухоли, и после этого мы измеряли массу тела мышей и объем опухоли. Через 15 дней было заметно, что размер опухоли у мышей в контрольной группе (без инкубации с пептидами) возрастает, а в экспериментальной группе (клетки, предварительно инкубированные с пептидами) рост опухоли замедляется. С 20-го дня стало заметно, что объем опухоли в группе мышей, обработанных пептидами, был значительно меньше, чем в группе мышей, инокулированных клетками PC3mLN4, не обработанными пептидами (контрольные опухоли). На 35-й день эксперимента животных умерщвляли, опухоли вырезали и взвешивали. В качестве количественного критерия эффективности действия пептидов использовали соотношение размеров или массы опухолевого узла в единицу времени в лечебной и контрольной группе животных, выраженное в процентах: T/C % (treatment/control). Минимально значимым служит $T/C \leq 42\%$. Это означает, что эффективным считается такое лечение, которое позволяет уменьшить опухоль более чем наполовину [511, 512].

Показано, что средний вес опухоли был 0,226 г в контрольной группе и 0,091 г в экспериментальной группе (пептид GEGEEGEE), что указывает на 58% ингибирования опухоли пептидом (таблица 10). Мыши, инокулированные клетками, предварительно инкубированными с пептидом DFGEEAEE, имели вес опухоли, равный 0,0825 г, что указывает на 63,5% ингибирования опухоли пептидом (таблица 10). Вес опухоли в группе мышей, обработанных пептидом RYQLHPYR, был значительно меньше, чем в других группах, и составил 0,0123 г, что указывает на ингибирование роста опухоли на 94,6% (таблица 10). Все эти значения являются статистически значимыми по отношению к мышам, инокулированных раковыми клетками без предварительной инкубации с пептидами ($*p \leq 0,05$).

Таблица 10

Ингибирование роста подкожных ксенографтов рака предстательной железы человека под действием RHAMM-таргет-пептидов.

Различия являются статистически значимыми при $*p \leq 0,05$ по сравнению с контрольными опухолями (без обработки пептидом).

Препарат	Путь введения	Доза, мг/кг	Вес опухоли, г	Ингибирование опухоли, %	T/C, %
Контрольная группа	подкожно	2,5	0,226	0,0	0,0
GEGEEGEE	подкожно	2,5	*0,091	59,8	40,2
DFGEEAEE	подкожно	2,5	*0,0825	63,5	36,5
RYQLHPYR	подкожно	2,5	*0,0123	94,6	5,4

Заключение

В данной работе были впервые идентифицированы и синтезированы RНАММ-таргет-пептиды, исследовано влияние RНАММ-таргет-пептидов на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток различных клеточных культур, а именно клеток рака молочной и предстательной желез, клеток рака яичников. В ходе работы были получены новые, ранее неизвестные данные, способствующие развитию представлений о роли RНАММ-рецептора и RНАММ-таргет-пептидов в онкологии. Впервые показано, что модуляция функции RНАММ-рецептора с помощью RНАММ-таргет-пептидов влияет на процессы выживаемости клеток, на апоптоз, некроз и инвазивность раковых клеток. Впервые показано, что RНАММ-таргет-пептиды являются тераностиками и могут использоваться для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Идентификация, дизайн и синтез RНАММ-таргет-пептидов

В настоящее время установлено, что RНАММ является онкорепректором, который сверхэкспрессируется при различных раковых заболеваниях человека (рак молочной, предстательной желез, рак яичников, желудка, прямой кишки и т. п.), и эта чрезмерная экспрессия связана с плохим клиническим исходом [502, 513–518]. Повышенное накопление ГК, этого внеклеточного лиганда для RНАММ, также является плохим прогностическим фактором при раке молочной железы, раке яичников, раке предстательной железы и некоторых других формах рака [501, 502, 515, 516, 518, 519]. Таким образом, пептиды-лиганды, которые имитируют ГК и конкурируют с ГК за связывание с RНАММ, могут быть полезны как для диагностических, так и для терапевтических целей при онкологических заболеваниях.

В этом исследовании мы идентифицировали и синтезировали пептиды, специфично взаимодействующие с ГК-связывающим доменом RНАММ. Мы предположили, что связывание пептидов может происходить из-за того, что области связывания ГК и тубулина на карбоксильном конце RНАММ перекрываются, а также потому, что связывание ГК и тубулина с RНАММ в значительной степени основано на ионных взаимодействиях [277, 278, 281, 282, 299, 338, 341]. Поэтому мы предположили, что отрицательно заряженные СТТ-аминокислотные последовательности тубулина будут связываться с ГК-связывающим доменом RНАММ и конкурировать с ГК за этот центр связывания. Следует отметить: недавние исследования показали, что белки клеточной поверхности могут связываться с белками цитоскелета в поврежденных или апоптотических клетках, и это взаимодействие является специфическим, имеет высокое сродство и важно для обнаружения поврежденных клеток [520, 521]. Таким образом, идентификация пептидов-лигандов, которые связываются с «внутриклеточными» белками цитоскелета и с «внеклеточным» RНАММ, может иметь важное физиологическое значение и стать не только основой для разработки нового терапевтического подхода, но также может помочь понять новые внутренние/внешние функции как RНАММ, так и ГК. Чтобы идентифицировать последо-

вательности тубулина, которые связываются с RHAMM, мы использовали поиск в базе данных и проводили попарные сравнения между RHAMM и белками, которые связываются с СТТ-последовательностями тубулина (например, MAP). Таким образом, теоретически было установлено специфическое взаимодействие между RHAMM и новыми пептидами-лигандами, являющимися аналогами СТТ-последовательности тубулина. На основании полученных данных были синтезированы пептиды высокой степени чистоты. Далее мы исследовали специфичность связывания этих пептидов с RHAMM с помощью различных физико-химических, биохимических методов, а также методов клеточного анализа и молекулярной биологии. Результаты нашего исследования показали, что полученные пептиды способны связываться с рекомбинантным RHAMM-СТ, конкурировать с ГК за центр связывания на рецепторе. Дальнейший анализ показал, что пептиды (VEGEGEEEGEEY, EEDFGEEAEAAA и FTEAESNMNDLV) обладали наиболее высоким сродством к RHAMM и имели высокие константы связывания, равные 24–32 нмоль.

В нашем исследовании мы впервые продемонстрировали, что эти пептиды специфично связывались и поглощались клетками рака молочной, предстательной желез и рака яичников RHAMM-зависимым образом. Мы показали, что клетки, не содержащие RHAMM (фибробласты RHAMM^(-/-)), были неспособны связывать пептиды. В то же время фибробласты RHAMM^(+/+) связывали пептиды с высокой эффективностью. Поскольку ранее было показано, что ГК также связывается с CD44-рецептором [522], мы исследовали связывание пептидов с этим рецептором. Используя CD44-антитела, мы показали, что пептиды также связываются с CD44-рецептором, но это связывание было намного слабее, чем связывание пептидов с RHAMM-рецептором. Вероятно, это объясняется тем, что ГК взаимодействует с RHAMM в основном ионным способом в отличие от взаимодействий ГК с CD44, которые включают дисульфидные, гидрофобные и водородные связи [523, 524].

В нашем исследовании мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды являются стабильными в бычьей сыворотке достаточно продолжительное время (период полувыведения составляет примерно 2–4 часа). Эти результаты предполагают, что RHAMM-таргет-пептиды можно использовать для визуализации раковых клеток *in vivo*, а также в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

Мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды, идентифицированные в настоящем исследовании, содержат ключевой гексапептидный мотив, отвечающий за взаимодействие с RHAMM. Этот мотив EEXEEZ (где X представляет собой A или G, а Z представляет собой Y или E) присутствует в синтетических пептидах α Ia (VEGEGEEEGEEY, DSADGEDEGEEY), α IIIc (SVEAEAEEGEEY), β Ia (EEDFGEEAEAAA) и β IV-СТТ (GEFEEAEAAEVA). Наши результаты согласуются с предыдущими сообщениями о том, что короткая последовательность EEGEE может участвовать в связывании тубулина и MAP, семейства белков, которые имеют гомологию последовательностей с RHAMM [525–528]. Несмотря на роль кислых функциональных групп во взаимодействии ГК и RHAMM,

результаты также предполагают, что случайное появление или увеличение этих кислых остатков в области СТТ, по-видимому, не влияет напрямую на взаимодействие RHAMM – тубулин. Удивительно, что пептиды, содержащие мотивы DEXEEZ (как видно из пептидов DSADGEDEGEY и IDSYEDEGEY) и EEXEDZ (например, пептид GEFEEEEGEDEA), не прошли первоначальный скрининг, что позволяет предположить, что остатки Asp в первой и пятой последовательностях не могут заменять аналогичный кислотный остаток Glu в этом мотиве. Это предполагает, что взаимодействие области СТТ с RHAMM осуществляется за счет не только ионных, но и гидрофобных и водородных связей.

Таким образом, в этом исследовании мы идентифицировали и синтезировали новые пептиды-лиганды, которые специфично взаимодействуют с RHAMM. Следовательно, возможно, что эти RHAMM-таргет-пептиды будут служить антагонистами, которые могут блокировать взаимодействие ГК/RHAMM, тем самым модулируя функции RHAMM. На основании этого далее мы изучили потенциал RHAMM-таргет-пептидов для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Влияние RHAMM-таргет пептидов на выживаемость опухолевых клеток

Мы впервые исследовали влияние RHAMM-таргет-пептидов (EEDFGEEAEAEA, VEGEGEEEGEY, FTEAESNMNDLV и RYQLHPYR) на выживаемость опухолевых клеток молочной (MDA-MB-231) и предстательной желез (PC3m-LN4), для которых характерна повышенная экспрессия RHAMM-рецептора. Впервые установили, что низкие концентрации RHAMM-таргет-пептидов значительно подавляли жизнеспособность опухолевых клеток молочной и предстательной желез (от 50 до 90%). Анализ жизнеспособности клеток мы проводили с помощью резазурина, который измеряет активность митохондриальных дегидрогеназ в клетке. Поэтому мы показали, что пептиды, связываясь с RHAMM-рецептором, значительно ингибировали активность митохондриальных дегидрогеназ клетки, которые играют центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, так как основное количество АТФ создается именно этим комплексом [503].

Следует отметить, что опухолевые клетки предстательной железы оказались более чувствительными к воздействию пептидов, чем клетки рака молочной железы. Вероятно, это объясняется различными биохимическими свойствами этих клеточных линий. Мы показали, что действие RHAMM-таргет-пептидов является специфичным, так как они понижали жизнеспособность опухолевых клеток, однако не влияли на рост нормальных клеток, а именно фибробластов мыши. Это свидетельствует о том, что эффект RHAMM-таргет-пептидов на клетки является RHAMM-опосредованным.

Таким образом, результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды способны модулировать активность RHAMM-рецептора и обладают терапевтическим потенциалом для лечения онкологических заболеваний.

*Влияние RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз
и некроз опухолевых клеток*

Из литературы известно, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный путь и внешний сигнальный путь через рецепторы апоптоза [528, 529]. Оба пути приводят к активации каспаз и запуску каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Внешний сигнальный путь осуществляется через поверхностные рецепторы смерти клетки, специально предназначенные для включения программы апоптоза [528, 530]. Такими рецепторами смерти являются рецепторы Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5 [528–533]. Внешний сигнальный путь апоптоза индуцируется физиологическими факторами – индукторами апоптоза, такими как гормоны, ростовые факторы, цитокины и др. [534, 535]. Посредством рецепторов смерти могут быть активированы три иницирующие каспазы: 2, 8 и 10 [536]. В отличие от внешнего сигнального пути апоптоза, митохондриальный путь активации апоптоза индуцируется действием цитотоксических агентов, радиации, повреждением ДНК, воздействием глюкокортикоидов, изменением теломеров [529]. Эти белки вызывают пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома С, белка AIF в цитоплазму, активацию каспаз 2, 3, 7 и 9, истощение митохондриального пула АТФ, что и приводит к апоптозу [537–541]. Мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды ингибировали активность митохондриальных дегидрогеназ и тем самым подавляли жизнеспособность опухолевых клеток. Далее мы исследовали, какой тип гибели наблюдается в раковых клетках. Мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды значительно индуцировали апоптоз в опухолевых клетках молочной железы и предстательной железы (в 2–5 раз). Наибольший эффект оказывал пептид RYQLHPYR, который увеличивал апоптоз в клетках рака предстательной железы в 10 раз. Эти результаты продемонстрировали, что RHAMM-таргет-пептиды и RHAMM вовлечены в митохондриальный путь активации апоптоза, который индуцирует потерю энергии и ингибирование работы мембранных насосов клетки [542].

Активация каспаз 3/7 является основным индикатором митохондриального апоптоза, поэтому мы изучали эффект RHAMM-таргет-пептидов на активность каспаз 3/7 в опухолевых клетках молочной и предстательной желез. Мы впервые показали, что активность каспаз 3/7 значительно увеличилась под действием пептидов в клеточных культурах (MDA-MB-231 и PC3m-LN4). При этом пептиды не оказывали влияния на активность каспаз 3/7 в фибробластах. Эти результаты подтвердили, что RHAMM-таргет-пептиды связываются с RHAMM-рецептором и индуцируют митохондриальный путь апоптоза [543, 544].

Поскольку апоптоз клеток обычно сопровождается некрозом, мы исследовали также влияние RHAMM-таргет-пептидов на некроз клеток рака молочной и предстательной желез. Мы впервые показали, что пептиды (VEGEEGEGEEY и FTEAESNMNDLV) значительно увеличивали (примерно в 4 раза) некротическую гибель раковых клеток молочной железы. Однако эффект RHAMM-таргет-пептидов на раковые клетки предстательной железы был противоположным. Наши результаты показали, что пептиды

(EEDFGEEAEEEE, VEGEGEEEGEEY) значительно ингибировали некротическую гибель PC3m-LN4 клеток (примерно в 4 раза). Следует отметить, что поведение этих пептидов сходно с PARP-ингибиторами, которые стимулируют апоптоз клеток и в то же время ингибируют некроз опухолевых клеток через ингибирование фермента PARP (поли-АДФ-рибозо-полимеразы) [545]. Однако пептид RYQLHPYR стимулировал некроз клеток рака предстательной железы приблизительно в 2,5 раза. Такие различия в действии пептидов, очевидно, связаны с различной структурой пептидов, а также с различиями в метаболизме опухолевых клеточных культур.

Что касается литературных данных об использовании некроза для лечения рака, то они являются противоречивыми. С одной стороны, имеются исследования, показывающие, что индукция некроза используется как один из современных методов лечения злокачественных опухолей [546, 547]. С другой стороны, ингибирование некроза является хемотрофической стратегией при лечении онкологических заболеваний [548].

Для подтверждения специфичности действия RHAMM-таргет-пептидов на опухолевые клетки мы изучали также влияние пептидов на апоптоз и некроз нормальных клеток (фибробластов). Результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды не оказывали значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток. Уровень апоптоза и некроза в фибробластах был практически одинаковым до обработки пептидами и после. Это свидетельствует о том, что пептиды не влияли на уровень апоптоза и некроза в фибробластах, потому что в фибробластах нет такого высокого уровня экспрессии RHAMM, который наблюдается в опухолевых клетках. Это указывает на то, что в раковых клетках пептиды связываются с RHAMM-рецептором и таким образом индуцируют апоптоз и некроз через сигнальные пути рецептора.

Чтобы подтвердить участие RHAMM-рецептора в апоптозе и некрозе, мы исследовали влияние пептидов на апоптоз и некроз фибробластов RHAMM^(-/-), в которых отсутствует данный рецептор. Мы показали, что пептиды не влияли на уровень апоптоза и некроза в фибробластах RHAMM^(-/-). Эти данные указывают на то, что индукция апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептидов является RHAMM-опосредованной.

Таким образом, мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды селективно влияли на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и их действие осуществлялось за счет модуляции RHAMM-рецептора. В целом эти результаты продемонстрировали, что RHAMM-таргет-пептиды имеют противоопухолевый потенциал для лечения онкологических заболеваний.

Влияние RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность опухолевых клеток

В настоящее время установлено, что основной причиной возникновения метастазов является инвазивность раковых клеток через слой внеклеточного матрикса [549]. Внеклеточный матрикс представляет собой сложную структуру, которая окружает и поддерживает клетки в тканях. Его основными компонентами являются протеогликаны, коллаген, гликопротеины, гиалу-

роновая кислота и протеолитические ферменты [550]. Во время прогрессии рака существенные изменения можно наблюдать в структурных и механических свойствах компонентов матрикса. Внеклеточный матрикс необходим для ключевых клеточных событий, таких как подвижность клеток, адгезия, пролиферация, инвазивность и метастазирование [551]. Внеклеточный матрикс обеспечивает физический плацдарм, к которому опухолевые клетки присоединяются и мигрируют. Стадии инвазивности включают прикрепление клетки к матриксу (адгезию), расщепление проксимальных молекул матрикса, миграцию клетки в новое пространство матрикса и продвижение клетки через образуемое отверстие в матриксе [552, 553]. Каждая из этих стадий осуществляется с помощью набора различных белков, включая протеазы, интегрины, GTP-азы, киназы, рецепторы (CD44, RHAMM) и цитоскелетон-взаимодействующие белки. Ключевым признаком клетки, отвечающим за деградацию матрикса, является образование инвадоподий или подосом с протеолитической активностью [554, 555]. Многие белковые молекулы участвуют в образовании инвадоподий. Несколько ключевых молекулярных событий включают Src-опосредованное фосфорилирование «scaffolding» – белка Tks54, активацию белка N-WASP и регуляцию кортактина с помощью $Agr^2/3$ -комплекса, индукцию полимеризации актина [556–558], генерацию реактивных форм кислорода под действием фермента НАДН-дегидрогеназы [559], повышенную экспрессию металлопротеиназы, локализацию кортактина в инвадоподиях [560].

В ряде работ показано, что ГК и RHAMM-рецептор играют важную роль в процессах инвазивности опухолевых клеток и образовании метастазов при различных онкологических заболеваниях [555, 558, 561, 562]. Обнаружено, что RHAMM-изоформа В способствует росту опухоли и образованию метастазов в лимфатических узлах и печени [563]. Установлено, что RHAMM участвует в процессах патогенеза рака головы и шеи, а также – что сверхэкспрессия этого белка может увеличивать инвазивность раковых клеток, метастазирование рака эндометрия и рака желудка [564–567]. Известно, что RHAMM является важным прогностическим индикатором развития опухоли и сосудистой инвазии у больных с раком толстой кишки [568]. Показано, что RHAMM-рецептор требуется для передвижения *gas*-трансформированных клеток саркомы, цитокин-стимулированных фибробластов и Т-лимфоцитов, злокачественных В-клеток и клеток карциномы молочной железы [259, 564–566]. Взаимодействия между ГК и RHAMM способствуют подвижности клеток через путь сигнальной трансдукции фермента тирозинкиназы, которая регулирует координационную адгезию [511, 566]. Тирозинкиназа *pp60c-SRC* взаимодействует с RHAMM в клетках и является необходимой для RHAMM-опосредованной клеточной подвижности. Известно, что взаимодействия между ГК и RHAMM приводят к повышенному фосфорилированию тирозина в белке RHAMM, что является важным механизмом для инициации локомоции и регуляции миграции опухолевых клеток [271, 511]. Вполне возможно, что RHAMM/SRC-путь индуцирует фокальную адгезию, чтобы сигнализировать изменениям цитоскелетона, необходимые для повышенной подвижности клеток, наблюдаемой при инвазивности и метастазировании опухоли [569]. Следует отметить,

что повышенный синтез низкомолекулярной ГК также является диагностическим маркером прогрессирования и метастазирования многих злокачественных опухолей и коррелирует с плохим прогнозом [253, 262, 271, 570]. Именно низкомолекулярная ГК модулирует активность RHAMM во время прогрессирования опухоли, содействует нарушению эндотелиальных межклеточных контактов и, таким образом, способствует инвазивности раковых клеток и образованию метастазов [273, 279, 571–574]. На основании вышесказанного ГК и RHAMM рассматривались как потенциальные мишени для терапии рака. Многочисленные исследования проводились, чтобы разработать таргетные подходы, целенаправленно действующие на ГК и RHAMM, включая создание низкомолекулярных ингибиторов, антител и вакцин [575–577]. Данные разработки были направлены на ингибирование внутриклеточной передачи сигнала от ГК к RHAMM, чтобы повлиять на подвижность и инвазивность опухолевых клеток. Однако они имели ряд недостатков, например – использование антител является дорогостоящим, а низкомолекулярные ингибиторы были неспецифичными [576, 577].

В данном исследовании мы использовали новый подход для модуляции активности RHAMM-рецептора с помощью пептидов-антагонистов, чтобы ослабить или блокировать сигналы, запускаемые ГК, и тем самым влиять на инвазивность опухолевых клеток. Наш подход включает использование RHAMM-таргет-пептидов, которые способны конкурировать с ГК и специфично связываться с RHAMM. В данном исследовании мы изучали действие RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток РМЖ.

Ингибирование инвазивности опухолевых клеток молочной железы под действием RHAMM-таргет-пептидов

На первом этапе исследования мы изучали развитие инвазивности раковых клеток (MDA-MB-231), культивируемых на желатиновых подложках, в течение времени методом конфокальной микроскопии. Результаты исследования показали, что вначале раковые клетки практически не были инвазивными, однако через 24 часа клетки начинали деградировать желатин, то есть их инвазивность возрастала и достигала значительной величины через 40 часов культивирования. Площадь деградации желатина при этом увеличивалась от ~ 8% до ~ 90% в интервале между 24 и 40 часами. Следует отметить, что наблюдаемое повышение инвазивности клеток сопровождалось образованием большого количества инвадоподий и высокой концентрацией актина на концах клеток. При этом сравнительный анализ инвазивности опухолевых клеток и фибробластов (нормальных клеток) показал, что фибробласты не деградировали желатин, что указывало на отсутствие инвазивности в нормальных клетках. Таким образом, мы установили, что инвазивность клеток РМЖ возрастала во времени, тогда как нормальные клетки, фибробласты не обладали инвазивностью. Затем мы анализировали эффект RHAMM-таргет-пептидов на инвазивность клеток. Мы впервые показали, что обработка раковых клеток (MDA-MB-231) пептидами (EEDFGEEAEAAA и VEGEGEEEGEEY) подавляла инвазивность опухолевых клеток на ~ 70–80%.

В то же время клетки, не обработанные пептидами, продолжали демонстрировать высокий уровень деградации желатина (~ 90%). Эти результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды ингибировали образование инвадоподий и, соответственно, инвазивность клеток РМЖ. Таким образом, мы показали, что RHAMM-таргет-пептиды обладают антиметастатическим потенциалом *in vitro*.

*Анализ гетерогенности популяции клеток MDA-MB-231
в процессе инвазивности*

Известно, что в ходе развития рака популяция опухолевых клеток обычно становится неоднородной, так как рак является динамическим заболеванием. В результате этой гетерогенности опухоль может включать разнообразный набор клеток, несущих различные молекулярные «сигнатуры» с разными уровнями чувствительности к лечению. Эта гетерогенность может привести к неравномерному распределению генетически различных субпопуляций опухолевых клеток по участкам заболевания (пространственная неоднородность) или к временным вариациям молекулярного состава раковых клеток (временная гетерогенность). Подобная гетерогенность опухолевых клеток объясняет прогрессирование опухоли, процессы рецидива и предполагает новые подходы для терапии [578–582]. Поэтому изучение неоднородности опухолевых клеток является важным для разработки новых эффективных индивидуализированных методов лечения. Мультирегиональное секвенирование, секвенирование отдельных клеток, анализ образцов аутопсии и продольный анализ образцов жидкой биопсии – все это новые технологии, обладающие значительным потенциалом для анализа сложной клональной архитектуры рака. Однако анализ гетерогенности опухолевых клеток в процессе инвазивности в литературе отсутствует. Поэтому мы исследовали гетерогенность популяции раковых клеток при развитии инвазивности методом конфокальной микроскопии. Результаты сравнительного анализа популяции опухолевых клеток (MDA-MB-231) в процессе их роста показали визуальную гетерогенность популяции. Мы впервые обнаружили, что вначале раковые клетки незначительно деградировали желатин, то есть их инвазивность была низкой. При этом популяция клеток выглядела однородной, клетки были одинакового размера и формы, визуально не наблюдалось морфологических изменений. Однако, по мере деления клеток, через 40 часов мы наблюдали изменения в локализации и структуре актина в клетке, актин концентрировался на концах инвадоподий, и при этом возрастала деградация желатина, то есть инвазивность клеток увеличивалась. Следует отметить, что популяция клеток при этом становилась неоднородной. Наряду с клетками мелкого размера мы наблюдали «гигантские» клетки, которые превосходили во много раз обычные по размеру клетки, отличались эти клетки наличием большого количества ядер (до 6 в клетке) и отсутствием инвадоподий. Из литературы известно, что появление многоядерных клеток связано с нарушением экспрессии мембранного белка супервиллина [583]. Известно, что данный белок взаимодействует с RHAMM-рецептором, тем самым координируя действие актина и двигательные функции микротрубочек митотического веретена во время клеточного цикла, и таким образом

влияет на миграцию клеток, ERK-сигнальные пути, цитокинез и инвазивность клеток [583]. Мы впервые показали, что появление гигантских клеток совпадало с началом интенсивной инвазивности, что приводило к гетерогенности популяции опухолевых клеток. Однако следует отметить, что эти гигантские клетки не были инвазивными, они не имели филаментов, их актиновые волокна внутри клетки образовывали упорядоченную структуру. Инвазивными были мелкие клетки, которые окружали гигантские клетки и были связаны с ними своими филаментами. Следует подчеркнуть, что эти мелкие клетки обладали длинными инвадоподиями с высокой концентрацией актина на концах и они интенсивно деградировали желатин. Появление и роль гигантских клеток в популяции пока являются непонятными. Можно предположить, что гигантские клетки, возможно, стимулировали подвижность этих мелких клеток и тем самым повышали их инвазивность. Однако необходимы дальнейшие исследования для понимания их роли в популяции и в процессе инвазивности.

Морфологические изменения актина в клетках РМЖ при обработке RHAMM-таргет-пептидами

Мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды вызывают значительные изменения в структурной организации актина в опухолевых клетках. Следует обратить внимание, что после обработки клеток RHAMM-таргет-пептидами популяция клеток остается гетерогенной, в ней присутствуют также два типа клеток: гигантские и мелкие клетки. Однако обработка гигантских клеток пептидами приводит к полной дезорганизации актина в клетках. Мы наблюдали в гигантских клетках хаотичное, дезорганизованное расположение актиновых фибрилл в цитоплазме, стресс актиновых волокон, нарушение целостности цитоплазматической мембраны клеток. Количественный анализ числа клеток старения на область изображения [15] показал, что обработка клеток RHAMM-таргет-пептидами приводила к уменьшению количества гигантских клеток (приблизительно в 3–4 раза) по сравнению с популяцией клеток, не обработанных пептидами [15, 16, 18]. На основании этого можно предположить, что гигантские клетки старения вовлечены в процесс развития инвазивности [15], а RHAMM-таргет-пептиды препятствуют их появлению [16]. Возможно, что связывание RHAMM-таргет-пептидов с RHAMM-рецептором нарушает его взаимодействие с мембранным белком супервиллином, что и приводит к уменьшению количества клеток старения, дезорганизации актина, уменьшению числа инвадоподий и тем самым к снижению инвазивности клеток [15, 16, 495]. Поскольку RHAMM-таргет-пептиды уменьшают количество клеток старения, это указывает на то, что пептиды обладают сенолитическим (антивозрастным) потенциалом [15, 16].

Следует отметить, что инкубация мелких клеток с RHAMM-таргет-пептидами также приводит к различным морфологическим изменениям актина. Мы впервые показали, что обработка таких клеток пептидами уменьшала количество инвадоподий в клетках, пучки актиновых филаментов становились более тонкими и короткими, наблюдалась диффузная локализация актина в цитоплазме клетки. В целом это приводило к тому, что инвазивность

клеток, обработанных пептидами, значительно снижалась по сравнению с контрольными клетками. Ранее было показано, что динамические изменения актина регулируют многие клеточные функции, включая экспрессию генов, поддержание морфологической формы и полярности клеток, деление, миграцию, инвазивность клеток и образование метастазов [584–586]. Эти функции актина обусловлены его взаимодействием с RНАММ-рецептором и колокализацией с кортактином [587–589]. На основании этого мы предполагаем, что RНАММ-таргет-пептиды, связываясь на RНАММ-рецепторе вместо ГК, блокируют его взаимодействие с актином. Это вызывает структурную дезорганизацию актина, нарушает самоорганизацию актиновых филаментов, индуцирует морфологические изменения в клетке и тем самым подавляет формирование инвадоподий. Таким образом, результаты данного исследования указывают на то, что блокирование RНАММ-рецептора с помощью RНАММ-таргет-пептидов приводит к ингибированию инвазивности клеток РМЖ. В целом это свидетельствует о том, что RНАММ-таргет-пептиды проявляют антиметастатический эффект.

Влияние RНАММ-таргет-пептидов на инвазивность клеток РПЖ

РПЖ развивается из тканей желез простаты и, как все злокачественные опухоли, имеет тенденцию к метастазированию [590–592]. РПЖ может давать ранние метастазы, то есть даже опухоль небольших размеров может начать распространяться в другие органы. Чаще всего образование метастазов рака простаты наблюдается в лимфатических узлах, костях (таз, бедра, позвоночник) и внутренних органах (легкие, печень, надпочечники) [593]. Базальная мембрана вокруг предстательной железы служит барьером для раковых клеток. Однако появление метастазов обусловлено тем, что опухолевые клетки сначала образуют выпячивания, инвадоподии, которыми прикрепляются к базальной мембране предстательной железы, затем протеазы инвадоподий расщепляют белки внеклеточного матрикса, создают отверстия в базальной мембране, через которые раковые клетки разносятся по всему организму [594, 595]. В настоящее время, несмотря на определенный прогресс в области лечения РПЖ с помощью хирургии, радиационной терапии и химиотерапии, основными проблемами в онкологии остаются отсутствие специфичности противоопухолевых препаратов и образование метастазов [596]. Таргетная, целенаправленная химиотерапия является мощным средством для решения таких проблем [597, 598]. Применение селективных пептидов, которые связываются с известным рецептором, имеет большие перспективы, потому что их основной механизм действия направлен на конкретную молекулярную мишень раковых клеток, модуляцию ее активности, приводящей к гибели клетки. Мы предположили, что пептиды, специфично взаимодействующие с RНАММ, могут модулировать его активность и влиять на процессы инвазивности и метастазирования раковых клеток. В качестве объекта исследования были выбраны агрессивные, инвазивные клетки рака предстательной железы (линия PC3m-LN4), которые характеризуются высокой экспрессией RНАММ, и обычно эта сверхэкспрессия связана с плохим прогностическим фактором [599]. В данном исследовании мы впервые

синтезировали пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR), показали специфичность их взаимодействия с RHAMM на поверхности клеток рака предстательной железы. Для сравнения мы анализировали связывание пептидов также с CD44- или FcR-рецепторами, и наши результаты показали отсутствие связывания пептидов с этими рецепторами. Основываясь на специфичности связывания пептидов с RHAMM-рецептором, который участвует в процессах инвазивности раковых клеток, далее мы исследовали эффект этих пептидов на образование инвадоподий в клетках.

Мы впервые показали, что предварительная инкубация агрессивных раковых клеток с пептидами приводила к значительному ингибированию инвазивности (80–90%) клеток рака предстательной железы. Эти результаты согласуются с данными об участии RHAMM-рецептора в процессах инвазивности раковых клеток и свидетельствуют о том, что пептиды блокируют активность RHAMM-рецептора и таким образом ингибируют образование инвадоподий в опухолевых клетках РПЖ. Результаты нашего исследования показали, что RHAMM-таргет-пептиды являются перспективными кандидатами для разработки противоопухолевых препаратов. В следующей работе мы изучали влияние RHAMM-таргет-пептидов на процессы метастазирования *in vivo*.

Противоопухолевая активность RHAMM-таргет-пептидов на моделях ксенографтов (мышинная опухолевая модель)

Мы впервые показали, что предварительная инкубация клеток рака простаты (PC3m-LN4) с RHAMM-таргет-пептидами (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR) приводила к замедлению роста опухолей в экспериментальной группе по сравнению с контрольной. Результаты нашего исследования продемонстрировали, что RHAMM-таргет-пептиды ингибировали рост опухолей от 58 до 94%. В частности, пептид GEGEEGEE вызывал 58%-ное ингибирование, а пептид DFGEEAEE ингибировал на 63,5%. Наибольшей противоопухолевой активностью обладал пептид RYQLHPYR, который ингибировал рост опухолей на 94,6%. Вероятно, такие различия в степени ингибирования роста опухоли связаны со структурой пептидов.

Ранее мы показали, что RHAMM-таргет-пептиды индуцируют апоптоз, некроз раковых клеток и блокируют инвазивность опухолевых клеток *in vitro* [505, 506, 508–510]. В данном исследовании мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды проявляют противоопухолевую активность *in vivo*. Эти результаты могут послужить основой для применения RHAMM-таргет-пептидов с целью лечения онкологических заболеваний.

Визуализация клеток рака яичников пептидом VEGEGEEGEEY

Рак яичников находится на шестом месте по распространению от общего количества онкологических заболеваний и является наиболее часто диагностируемым видом рака у женщин, второй наиболее распространенной гинекологической злокачественной опухолью у женщин и самой фатальной опухолью женской репродуктивной системы [600]. Заболевание протекает в скрытой форме, демонстрируя неопределенные симптомы, и проявляется

уже на поздних стадиях, когда опухоль достигает больших размеров. В настоящее время эффективные методы выявления рака яичников на ранних стадиях отсутствуют. В 75% случаев рак яичников диагностируется лишь на 3-й или 4-й стадиях [601]. Существующие методы диагностики, такие как биопсия, УЗИ, ПЭТ, КТ, МРТ, лапаротомия не позволяют диагностировать рак на ранней стадии из-за маленького размера опухоли. Определение маркера СА 125 в крови также не позволяет диагностировать рак яичников на ранних стадиях [602]. К сожалению, только некоторые виды рака яичника секретируют белок СА 125 на ранней стадии заболевания. Секреция белка прямо зависит от размера опухоли. Поскольку основной целью скрининга является обнаружение опухоли как можно меньших размеров ($< 0,5$ см), этот маркер не считается достаточно значимым для диагностики. Кроме того, уровень СА 125 может возрастать при других состояниях, в том числе при эндометриозе, фиброзе, менструации и даже при беременности [603].

Отсутствие конкретных признаков и симптомов рака яичников и дефицит программ скрининга приводят к поздней диагностике этого заболевания, что, в свою очередь, приводит к плохой выживаемости этих пациентов.

Поэтому разработка новых методов и подходов к ранней диагностике рака яичников, визуализация раковых клеток в организме представляет важную проблему. Одним из подходов к созданию новых методов ранней диагностики опухолей является изучение свойств раковых клеток, идентификация индикаторов развития рака и определение молекулярной мишени в опухолевой клетке. Неинвазивная визуализация биологических процессов *in vivo* требует создания новых зондов молекулярной визуализации.

В настоящее время существуют два основных класса зондов: неспецифические и таргетные, целевые. Неспецифические зонды подчеркивают различия между тканями по проницаемости и уровням перфузии. Дизайн неспецифических зондов основан на таких общих свойствах, как размер, заряд и гидрофильность, чтобы определить их распределение в организме [604]. Эти зонды обычно используются для визуализации физиологических процессов, таких как изменения объема крови, перфузии и кровотока в ангиогенезе [605]. Существует множество нецелевых зондов, которые в настоящее время используются в таких методах, как ПЭТ (^{13}N -аммоний) и СPECT ($^{99\text{mTc}}$ -sestamibi), для перфузионной визуализации [606, 607]. Например, наночастицы из золота, которые накапливаются в опухолях вследствие увеличения проницаемости клеточной мембраны, также используются как зонды в доклинических исследованиях [608].

Таргетные зонды в отличие от неспецифических зондов нацелены на специфичные молекулы, которые находятся в опухолях. Обычно зонд состоит из двух основных компонентов: таргетного, который может представлять собой химическое соединение, пептид или другую биомолекулу (Ab), способную распознавать и связываться с высоким сродством с конкретным биологическим рецептором, и метки, которая обеспечивает сигнал для обнаружения. В зависимости от выбранного способа метка может представлять собой органические флуорофоры или неорганические квантовые точки для оптического изображения, или радиоизотопы для ядерного изображения [609].

Таргетный компонент зонда может варьировать между химическим соединением (маленькой молекулой), пептидом или антителами (Ab). Химические соединения небольшого размера обладают несколькими привлекательными свойствами. Они имеют низкую молекулярную массу, что позволяет им получать доступ ко многим биологическим целям в организме. Химические соединения нелегко обнаруживаются и расщепляются ферментами. Они могут быть модифицированы, что приводит к большому количеству разнообразных соединений. Однако химические соединения имеют ряд недостатков. Синтез их является трудоемким, длительным и редко приводит к хорошим результатам визуализации [610]. Другой важный недостаток – это ограниченное количество радионуклидов, которое может быть встроено в химические соединения (маленькие молекулы). Вследствие их низкой молекулярной массы в них невозможно встроить такой громоздкий радионуклид, как ^{68}Ga , поэтому присутствие такого молекулярного зонда к клеткам будет значительно ниже.

Пептиды имеют много преимуществ по сравнению с другими таргетными компонентами. Использование автоматизированных, твердофазных методов позволяет легко и быстро получать пептиды и их аналоги с повышенной стабильностью и увеличенным периодом полураспада в биологических системах. Кроме того, существует большое количество неприродных коммерчески доступных аминокислот, что расширяет химическое разнообразие пептидов. Такие модифицированные пептиды сложно обнаружить, в организме они расщепляются ферментами. Кроме того, пептиды остаются стабильными в условиях радиоактивного мечения, когда используются повышенные температуры и органические растворители [611]. Благодаря более высокой молекулярной массе по сравнению с химическими реагентами пептиды способны встраивать в себя различные радионуклиды, включая громоздкие металл-радионуклиды, не понижая аффинности зонда. Также показано, что пептиды обладают высоким сродством к своей мишени даже при наномолярных концентрациях. Пептиды имеют ряд преимуществ перед Ab. Так, они лучше проникают в ткани и опухоли и быстрее выводятся из организма [612, 613]. Синтез пептидов является более простым, быстрым и дешевым, чем получение Ab. Кроме того, получаемые Ab не всегда являются абсолютно специфичными.

В настоящее время пептиды, благодаря их преимуществам перед другими таргетными молекулами, все чаще используются в качестве средств визуализации. Это можно видеть по увеличению числа молекулярных зондов на основе пептидов в клинических испытаниях. В качестве примера можно привести [^{18}F] Galacto-RGD, который используется для контроля роста опухоли и метастазов, и $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -UBI 29–41 (убиквицин), который используется для визуализации инфекций [614, 615].

Разработка молекулярного зонда на основе пептида состоит из нескольких стадий. Для создания молекулярного зонда вначале необходимо найти подходящий биомаркер, синтезировать пептид, оценить аффинность и специфичность пептида к мишени *in vitro*, провести биологическую оценку на основе анализа конкурентного связывания, исследовать стабильность пептида в сыворотке и далее изучить его эффективность *in vivo* на животных моделях, чтобы определить, требуется ли его дальнейшая оптимизация.

В различных исследованиях уже выявлены некоторые биомаркеры рака яичников, способствующие раннему обнаружению опухолей, оценке прогноза и ответа на лечение [600, 613, 616–618]. Однако современные клинические диагностические средства все еще имеют ограниченную эффективность определения ранней стадии рака яичников. В развитии рака яичников участвуют различные генетические факторы и факторы окружающей среды. Например, эстрогены участвуют в опухолевой прогрессии за счет увеличения пролиферации клеток в дополнение к повышению инвазивности или подвижности клеток [616]. Установлено, что ГК, ее олигомеры и гиалуронан-связывающие рецепторы (CD44, RHAMM) играют важную роль в прогрессии опухолей яичников [617]. Повышенный синтез мРНК RHAMM обнаружен в карциноме яичников. Показано, что RHAMM участвует в процессах клеточного роста, формировании метастазов рака яичников [618]. В соответствии с данными Oncomine Research (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>), RHAMM является биомаркером онкологических заболеваний и может использоваться для идентификации раковых клеток молочной и предстательной желез [619, 620]. Ранее был разработан метод диагностики и прогнозирования рака путем обнаружения комплексов гиалуронана или пептидов с CD44/RHAMM. Показано, что меченые RHAMM-связывающие агенты могут применяться в культуре и *in vivo* для идентификации опухолевых клеток, которые проявляют агрессивный фенотип и характеризуются высоким синтезом RHAMM и CD44 [619]. Важная роль ГК и RHAMM в прогрессии опухолей яичников указывает на них как на индикаторы развития рака яичников и возможные мишени для ранней диагностики данного заболевания. Повышенный синтез RHAMM в опухолевых клетках по сравнению с нормальными эпителиальными клетками обеспечивает возможность специфичной маркировки раковых клеток [621, 622]. Таргетные RHAMM-пептиды имеют большую перспективу для разработки новых методов диагностики рака яичников, поскольку они обладают несколькими уникальными свойствами. Во-первых, такие пептиды устойчивы к деградации гиалуронидазами. Во-вторых, пептиды действуют в основном как антагонисты, а не агонисты. В-третьих, пептиды не распознаются рецепторами эндотелиальных клеток печени и поэтому могут длительно циркулировать в крови [623]. В-четвертых, эти пептиды могут быть специфичны для изоформ RHAMM или изоформ CD44, присутствующих при патологических состояниях.

Ранее пептиды-лиганды, которые проявляют аффинность и специфичность к RHAMM, были сконструированы нами с помощью биоинформатических методов и исследованы *in vitro* [619, 620]. Нами было показано специфичное связывание VEGEGEEEGEEY-пептида с рекомбинантным белком RHAMM с помощью методов ProteOn™ XPR36 (система для изучения белковых взаимодействий) и SPR-анализа (поверхностный плазмонный резонанс), определена константа диссоциации пептида с RHAMM, равная 24 нмоль [508]. Методом ELISA установлено, что FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид конкурирует с ГК за связывание с рекомбинантным белком RHAMM. Кроме того, показано, что VEGEGEEEGEEY-пептид селективно связывается с RHAMM, избыточно синтезируемым в других клеточных системах,

в частности в клетках рака молочной и предстательной желез [505, 505, 624–626].

Однако взаимодействие VEGEGEEEEGEEY-пептида с клетками рака яичников не было изучено. Поэтому мы синтезировали FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид и идентифицировали его молекулярную мишень с целью использования этого пептида в дальнейшем в качестве зонда для ранней диагностики рака яичников *in vivo*. Нами показано, что ГК и VEGEGEEEEGEEY-пептид связываются с RHAMM на поверхности клеток рака яичников, поскольку блокирование RHAMM анти-RHAMM-Ab приводило к ингибированию связывания ГК и пептида. Установлено, что VEGEGEEEEGEEY-пептид конкурирует с ГК за центр связывания на RHAMM. Показано, что FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид эффективно связывается с поверхностью клеток рака яичников, в которых повышен синтез RHAMM, и не взаимодействует с фибробластами, нормальными, незлокачественными клетками. Известно, что клетки здоровых яичников также содержат RHAMM и что пониженное содержание этого рецептора приводит к гипфертильности самок [626]. Однако поскольку RHAMM (таргетная молекула) в клетках рака яичников синтезируется в избытке по сравнению с нормальными клетками яичников, этот FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид можно использовать для идентификации клеток рака яичников, так как при связывании этого пептида с поверхностным RHAMM интенсивность флуоресцентного сигнала в раковых клетках будет выше, чем в нормальных. Именно на этом основана идея использования этого пептида для диагностики клеток рака яичников. Нами показано, что FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид может использоваться для мечения и молекулярной визуализации клеток рака яичников на самой ранней стадии. Иммунологический анализ также показал, что FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид связывается именно с поверхностным RHAMM, а не с FcR- или CD44-рецепторами, которые присутствуют также в нормальных клетках. Специфичность связывания FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептида с поверхностным RHAMM подтверждена с помощью фибробластов с нокаутом RHAMM^(-/-) и трансфицированных фибробластов RHAMM^(+/+). Ранее было показано, что RHAMM играет важную роль в таких процессах заживления тканей, как деление клеток, образование митотического веретена и прогрессия клеточного цикла. Например, установлено, что добавление рекомбинантного белка RHAMM (изоформа 70 кДа) к фибробластам RHAMM^(-/-) обеспечивает восстановление подвижности фибробластов, сравнимой с фибробластами дикого типа [627]. В фибробластах и гладкомышечных клетках пораженных тканей также наблюдалось быстрое увеличение синтеза RHAMM [646]. Более того, потеря RHAMM уменьшала миграцию фибробластов в пораженных тканях и ингибировала их дифференцировку в миофибробласты [325, 628]. В нашей работе мы использовали фибробласты RHAMM^(-/-) и RHAMM^(+/+) в качестве контроля для подтверждения гипотезы, что FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептид связывается именно с RHAMM. Нами показано, что связывание FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептида с поверхностью фибробластов происходило только при наличии в их составе RHAMM. Подобная селективность взаимодействия FITC-VEGEGEEEEGEEY-пептида только с RHAMM позволяет предположить, что этот пептид может быть исполь-

зован для специфичной маркировки и визуализации клеток рака яичников с целью ранней диагностики данного заболевания.

Мы показали, что VEGEGEEEGEEY-пептид может быть эффективным зондом для неинвазивной молекулярной визуализации RHAMM *in vivo*. Такой молекулярный зонд будет способен выявлять выборочно и на самой ранней стадии опухолевые клетки в первичной и метастатической карциноме.

До данного научного исследования в литературе отсутствовали работы по идентификации и изучению физиологической активности пептидов, селективно взаимодействующих с RHAMM. Поэтому настоящую работу можно считать первым исследованием в этой области. В данной работе нами впервые идентифицированы и синтезированы RHAMM-таргет-пептиды, которые представляют собой аминокислотные последовательности альфа- и бета-субъединиц белка тубулина. На основании первоначального скрининга методом SPR были определены константы диссоциации пептидов по отношению к RHAMM и выбрано несколько наиболее перспективных кандидатов для дальнейших исследований. Наши исследования показали, что пептиды, обладающие наибольшим сродством к RHAMM, содержали в своем составе идентичный фрагмент **EEHEEZ**. Также результаты исследования показали, что пептиды, представляющие аминокислотные остатки β -субъединицы тубулина, также демонстрировали высокое сродство связывания с RHAMM. Таким образом, мы показали, что в связывании пептидов участвуют ионные, гидрофобные, водородные и конформационные взаимодействия.

В ходе работы впервые были получены данные о связывании пептидов с recombinant RHAMM. Результаты исследования показали, что пептиды конкурентно и эффективно замещали ГК на ГК-связывающем центре RHAMM. Следует подчеркнуть, что полученные пептиды были достаточно стабильны в сыворотке крови и показали разумное время полураспада. В этой работе мы впервые показали, что пептиды специфично связываются именно с клеточно-поверхностным RHAMM опухолевых клеток молочной, предстательной желез и рака яичников. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что RHAMM-таргет-пептиды могут применяться для специфичной маркировки и визуализации опухолевых клеток с целью ранней диагностики онкологических заболеваний.

В данном исследовании мы впервые исследовали терапевтический потенциал RHAMM-таргет-пептидов. В частности, мы изучили влияние пептидов на жизнеспособность клеток рака молочной и предстательной желез. Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеток рака молочной и предстательной желез значительно подавлялась низкими концентрациями пептидов, что свидетельствует о преимуществе этих пептидов для применения в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов. Кроме того, мы исследовали влияние пептидов на апоптоз и некроз раковых клеток. Наши исследования впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды значительно повышали индукцию апоптоза и некроза в опухолевых клетках. Следует отметить, что пептиды не влияли на апоптоз и некроз RHAMM^(-/-) фибробластов. Впервые нами показано, что индукция апоптоза происходит

по митохондриальному пути, так как наблюдается активация каспаз 3/7. Таким образом, мы впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды действуют только на раковые клетки, то есть их эффект является специфичным и RHAMM-опосредованным.

В ходе исследования также было показано, что блокирование RHAMM с помощью RHAMM-таргет-пептидов приводит к ингибированию инвазивности клеток РМЖ и РПЖ. Эти результаты подтверждают литературные данные об участии RHAMM в процессах миграции, инвазивности опухолевых клеток. В данной работе мы также впервые показали, что RHAMM-таргет-пептиды, связываясь на RHAMM-рецепторе, индуцируют морфологические изменения в клетках, вызывают структурную дезорганизацию актина и тем самым подавляют формирование инвадоподий. Таким образом, полученные результаты показали, что RHAMM-таргет-пептиды обладают антиметастатическим потенциалом.

Следует отметить, что большая часть работы по изучению влияния RHAMM-таргет-пептидов выполнена в условиях *in vitro* в бесклеточных системах или на клеточных культурах. Однако мы также показали, что RHAMM-таргет-пептиды *in vivo* подавляют рост опухолей у ксенографтов (иммунодефицитные мыши). Эти данные позволяют предположить, что RHAMM-таргет-пептиды могут быть использованы для таргетной терапии рака, поскольку они являются специфичными для опухолевых клеток и легко синтезируемыми соединениями.

В этом смысле полученные нами данные открывают новое направление для терапии онкологических заболеваний с помощью пептидов-антагонистов, адресно направленных на индукцию процессов апоптоза, ингибирование жизнеспособности и инвазивности опухолевых клеток. Однако необходимы дальнейшие исследования о модуляции активности RHAMM с помощью RHAMM-таргет-пептидов, идентификация белков апоптоза, взаимодействующих с RHAMM. Хотелось бы более глубоко изучить влияние RHAMM-таргет-пептидов на появление «гигантских» клеток и понять их роль в процессах инвазивности. Также необходимо изучить роль RHAMM – зависимого сигнального пути в регуляции синтеза и функционирования белков множественной лекарственной устойчивости. Для практического использования RHAMM-таргет-пептидов в онкологии необходимы дальнейшие исследования механизма их действия с последующей перспективой проведения доклинических испытаний. Таким образом, начатая нами тема исследования имеет перспективу дальнейшей разработки.

В настоящее время изучение молекулярных механизмов взаимодействия RHAMM-таргет-пептидов с RHAMM-рецептором для диагностических, прогностических и терапевтических целей является одним из приоритетных направлений биомедицины.

Выводы

1. Впервые идентифицированы и синтезированы пептиды, аминокислотные последовательности которых получены из карбоксильных концов α - или β -тубулина.

2. Показано, что синтезированные пептиды проявляют высокое сродство связывания с RНАММ и являются стабильными в сыворотке крови.

3. Впервые показано, что RНАММ-таргет-пептиды специфично связываются с рекомбинантным RНАММ и поверхностным рецептором опухолевых клеток. Благодаря специфичной природе взаимодействия пептидов с RНАММ-рецептором RНАММ-таргет-пептиды могут использоваться в молекулярной диагностике онкологических заболеваний на ранней стадии.

4. Выявлена взаимосвязь между структурой пептидов и их способностью связываться с RНАММ-рецептором. Аминокислотный фрагмент EEXEEZ в составе RНАММ-таргет-пептидов способствует эффективному связыванию с RНАММ.

5. Впервые получены экспериментальные данные о терапевтическом потенциале RНАММ-таргет-пептидов. RНАММ-таргет-пептиды модулируют активность RНАММ и адресно индуцируют апоптоз, некроз и подавляют жизнеспособность опухолевых клеток. Выявлено, что RНАММ-таргет-пептиды действуют адресно на раковые клетки при низких концентрациях (10 мкг/мл, 2×10^{-7} М), что является реальным преимуществом для использования этих пептидов в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

6. Продемонстрировано, что 8-мерные пептиды (GEGEEGEE и DFGEEAEE) сохраняют свойства 12-мерных пептидов: специфично связываются с раковыми клетками, подавляют инвазивность клеток на 93 и 89% соответственно ($p < 0,05$). Эти данные свидетельствуют о возможности использования RНАММ-таргет-пептидов в клеточной терапии рака.

7. RНАММ-таргет-пептиды индуцируют митохондриальный путь апоптоза: стимулируют активность каспаз 3/7 на 30% ($p < 0,05$).

8. RНАММ-таргет-пептиды обладают антиметастатической активностью, ингибируют инвазивность опухолевых клеток на $\sim 80\%$ ($p < 0,05$).

9. Обнаружено, что популяция раковых клеток молочной железы является гетерогенной и состоит из двух типов клеток: крупных многоядерных неинвазивных (клетки старения) и мелких инвазивных клеток. Установлено, что RНАММ-таргет-пептиды индуцируют стресс актиновых волокон, подавляют образование инвадоподий и уменьшают количество клеток старения в 4 раза ($p < 0,05$), что свидетельствует об их сенолитическом потенциале.

10. Впервые в условиях *in vitro* установлено, что ГК-Су5.5 и FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид специфично связываются с RНАММ на поверхности клеток рака яичников, при этом пептид не взаимодействует с нокаут-фибробластами RНАММ^(-/-), однако интенсивно связывается с фибробластами, трансфицированными с RНАММ^(+/+). Эта селективность

взаимодействия пептида с раковыми клетками указывает на то, что FITC-VEGEGEEEGEEY-пептид можно использовать в качестве неинвазивного зонда для ранней молекулярной диагностики рака яичников.

11. Впервые показано, что RHAMM-таргет-пептиды (GEGEEGEE, DFGEEAEE и RYQLHPYR) проявляют противоопухолевую активность *in vivo*, подавляя рост опухолей мышинных ксенографтов на 58%, 63,5% и 94,6% ($p < 0,05$) соответственно. Полученный комплекс данных свидетельствует о том, что RHAMM-таргет-пептиды, благодаря своей стабильности и способности специфично связываться с опухолевыми клетками, подавлять их жизнеспособность, инвазивность, имеют потенциал для использования в качестве тераностиков злокачественных новообразований различной локализации.

Рекомендации по использованию научных выводов и перспективы дальнейших исследований

Данные, полученные в этом исследовании, свидетельствуют о том, что RНАММ-таргет-пептиды могут применяться для специфичной маркировки и визуализации опухолевых клеток с целью ранней диагностики онкологических заболеваний (рака молочной и предстательной желез, рака яичников). В данной работе впервые исследован терапевтический потенциал RНАММ-таргет-пептидов. В ходе проведенного исследования показано, что RНАММ-таргет-пептиды при низких концентрациях подавляют жизнеспособность опухолевых клеток, индуцируют апоптоз и некроз, ингибируют инвазивность клеток рака молочной и предстательной желез. Установлено, что действие пептидов является специфичным и RНАММ-опосредованным. Поэтому полученные результаты являются научно значимыми и открывают новое направление для терапии онкологических заболеваний с помощью пептидов-антагонистов, адресно направленных на опухолевые клетки. Вместе с тем необходимы дальнейшие исследования молекулярного механизма действия RНАММ-таргет-пептидов, блокирующих сигнальный путь RНАММ/ГК. Кроме того, необходимо более детальное изучение «гигантских» клеток, понимание их роли в процессах инвазивности, а также влияния на них RНАММ-таргет-пептидов. Для практического использования RНАММ-таргет-пептидов в онкологии необходимы дальнейшие исследования с проведением доклинических испытаний. Таким образом, начатая нами тема исследования имеет перспективу дальнейшей разработки. Следует подчеркнуть, что в настоящее время изучение молекулярных механизмов взаимодействия RНАММ-таргет-пептидов с RНАММ-рецептором для диагностических, прогностических и терапевтических целей является одним из приоритетных направлений биомедицины.

Список научных публикаций авторов

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК:

1. Akentieva N.P., Topunov A.F. RHAMM-Target Peptides as Molecular Imaging Probes for the Imaging of RHAMM-Expressing Cancer Cells. // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2021. V. 12. № 1. P. 2–24.

2. Akentieva N.P., Topunov A.F. RHAMM-target Peptides Inhibit Proliferation and Viability of Cancer Cells. // *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2021. V. 11. № 4. P. 12252–12266.

3. Akentieva N. P. Antitumor Effects of RHAMM-Target Peptides on Prostate Tumor Xenografts in Nude Mice. // *Chinese Journal of Surgical Oncology*. 2020. V. 1 (1). P. 1–6. ISSN 16727118, 10008179. Coverage. 1986–1999. 2005–2019. DOI: 10.31487/j.CJSO. 2020.01.01.

4. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. Изучение противоопухолевой активности синтетического пептида RYQLHPYR на клетках рака предстательной железы. // *Российский биотерапевтический журнал*. 2019. Том 18 (2). Стр. 40–50. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-40-50. ISSN 1726–9784.

5. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. Визуализация клеток рака яичников пептидом VEGEGEEGEEY. // *Биологические мембраны*. 2018. Том 35. № 2. Стр. 131–142. DOI: 10.7868/S0233475518020044.

6. Akentieva N. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells. // *Eurobiotechnology Journal*. 2017. V. 1 (2). P. 138–148. DOI: 10.24190/ISSN2564-615X/2017/02.05.

7. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. Ингибирование инвазивности раковых клеток под действием синтетических пептидов (GEGEEGEE и DFGEEAEE). // *Биологические мембраны*. 2017. Том 33 (1). Стр. 19–31. DOI: 10.7868/S0233475516060037.

8. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. RHAMM (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности)-таргет пептиды индуцируют апоптоз клеток рака предстательной железы. // *Вопросы онкологии*. 2016. Том 62. № 3. Стр. 512–518. ISSN 0507–3758.

9. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. Ингибирующий эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы. // *Вопросы онкологии*. 2016. Том 62. № 6. Стр. 831–837. ISSN 0507–3758.

10. Акентьева Н.П., Шушанов С.С., Котельников А.И. Эффект RHAMM-селективных пептидов на выживаемость клеток рака молочной железы. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015. Том 159. № 5. Стр. 618–621. DOI: 10.1007/s10517-015-3041-3.

11. Esguerra K.V., Tolg C., Akentieva N., Price M., Cho C.F., Lewis J.D., McCarthy J. B., Turley E.A., Luyt L.G. Identification, design and synthesis of tubulin-derived peptides as novel hyaluronan mimetic ligands for the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM/HMMR). // *Integrative Biology* 2015. 7 (12). P. 1547–1560. DOI: 10.1039/c5ib00222b.

12. Rizzardi A.E., Vogel R.I., Koopmeiners J.S., Forster C.L., Marston L.O., Rosener N.K., Akentieva N., Price M.A., Metzger G.J., Warlick C.A., Henriksen J.C., Turley E.A., McCarthy J. B., Schmechel S.C. Elevated Hyaluronan and Hyaluronan-Mediated Motility Receptor Are Associated With Biochemical Failure in Patients With Intermediate-Grade Prostate Tumors. // *Cancer*. 2014. V. 120 (12). P. 1800–1809. DOI: 10.1002/cncr.28646.

13. Veisch M., Breadner D., Ma J.N., Akentieva N., Savani R.C., Harrison R., Mikilus D., Collis L., Gustafson S., Lee T.Y. Imaging of Homeostatic, Neoplastic, and

Injured Tissues by HA-Based Probes. // *Biomacromolecules*. 2012. V. 13 (1). P. 12–22. DOI: 10.1021/bm201143c.

14. Tolg C., Hamilton S.R., Zalinska E., McCulloch L., Amin R., Akentieva N., Winnik F., Savani R., Bagli D.J., Luyt L.G. A RHAMM Mimetic Peptide Blocks Hyaluronan Signaling and Reduces Inflammation and Fibrogenesis in Excisional Skin Wounds. // *American Journal of Pathology*. 2012. V. 181 (4). P. 1250–1270. DOI: 10.1016/j.ajpath. 2012.06.036.

15. Chen Z.W., Chen L.H., Akentieva N., Lichti C.F., Darbandi R., Hastings R., Covey D.F., Reichert D.E., Townsend R.R., Evers A.S. A neurosteroid analogue photolabeling reagent labels the colchicine-binding site on tubulin: A mass spectrometric analysis. // *Electrophoresis*. 2012. V. 33 (4). P. 666–674. DOI: 10.1002/elps.201100434.

16. Bordet T., Buisson B., Michaud M., Steidl E., Akentieva N., Evers A., Massaad C., Schumacher M., Ostuni M.A., Lacapère J.-J., Galea P., Drouot C., Maux D., Henderson C.E. and Pruss R. Identification and Characterization of TRO19622 (4-Cholesten-3-one, Oxime), a novel compound for the treatment Amyotrophic Lateral Sclerosis. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007. V. 322. №2. P. 709–720.

Патенты

1. Naor D. RHAMM-derived peptide for treatment of diabetes/D. Naor, N.P. Akentieva, E. Turley. International Patent №12459. June 2013. 40 Yissum Research Development company of the Hebrew University of Jerusalem, Israel. United States Provisional Patent Application №62/560,790 «Rhamm-derived peptide for treatment of diabetes». Ref: 2513453 SL/nb.

Тезисы и материалы докладов на научных конференциях:

1. Akentieva N.P., Esguerra K.V.N., Ward C., Tolg C., Ma J., Veiseh M., Zhang J., Koropatnick J., Bissell M.J., Shepherd T., McCarthy J., Lewis J., Luyt L., Turley E. The discovery of hyaluronan peptide mimics as selective ligands for RHAMM in ovarian cancer. // Poster session presented at: 50th Annual Meeting American Society of Cell Biology, Philadelphia, PA, USA. www.ascb.org/meetings. 2010. Author index: 2253/B651. P. 191.

2. Akentieva N.P., Esguerra K.V.N., Ward C., Tolg C., Veiseh M., Zhang J., Koropatnick J., Bissell M.J., Shepherd T., McCarthy J., Lewis J., Luyt L.G., Turley E. The discovery of hyaluronan peptide mimics as selective ligands for RHAMM in ovarian cancer. // Poster session presented at: 2010 ASCB Annual Meeting, Pittsburg, PA, USA. Abstracts published: *Mol. Biol. Cell*. 2010. V. 21. P. 4299.

3. Akentieva N., Esguerra K.V.N., Ward C., Tolg C., Ma J., Veiseh M., Zhang J., Koropatnick J., Bissell M.J., Shepherd T., McCarthy J., Lewis J., Turley E., Luyt L.G. Design and characterization of peptide ligands that target Rhamm/HMMR in tumour cells. // Poster session presented at: CIHR – strategic training program in cancer research & technology transfer (CARTT) and the Department of Oncology. Research & Education Day. 2011. University of WESTERN ONTARIO, London, ON, Canada. June 17th, 2011. P. 17.

4. Akentieva N.P., Esguerra K.V.N., Toelg C., Ma J., Breadner D., Veisen M., Zhang J., Koropatnick J., Bissell M.J., Ting Lee, Turley E., Luyt L. Design of hyaluronan peptide mimics as molecular imaging probes that target breast cancer cells. // *Cancer Care Ontario Research Day*. Oral Presentation. Toronto, Canada. April 8th 2010. P. 15.

5. Esguerra K.V.N., Akentieva N.P., Ward C., Shepherd T.G., Turley E.A., Luyt L.G. Tubulin-derived peptides as ligands for RHAMM/HMMR expressing cancer cells. // 94th Canadian Chemistry Conference. Oral Presentation. Montreal, QC, Canada. June 2011. P. 8.

6. Akentieva N. P., Esguerra K. V. N., Tolg C., Talmer P., Koropatnick J., McCarthy J., Lewis J., Luyt L. G., Turley E. I. Characterization of hyaluronic-mimetic peptides, targeting Rhamm/HMMR, as anti-cancer agents. // Poster session presented at: London Health Research Day. London, ON, Canada. March 20th, 2012. P. 12.

7. Akentieva N., Esguerra K. V. N., Tolg C., Talmer P., Koropatnick J., McCarthy J., Lewis J., Luyt L. G., Turley E. I. Characterization of hyaluronic-mimetic peptides, targeting Rhamm/HMMR, as anti-cancer agents. // Poster session presented at: Oncology Research and Education Day. London, ON, Canada. June 2012. P. 6.

8. Esarik A., Esguerra K. V. N., Akentieva N., Turley E. A., Luyt L. G. Molecular imaging of highly invasive breast cancer subsets using novel peptide mimetics. // Poster session presented at: Oncology Research and Education Day. London, ON, Canada. 2012. P. 7.

9. Esarik A., Esguerra K. V. N., Akentieva N., Turley E. A., Luyt L. G. Tubulin-derived Peptides as Molecular Imaging Probes for Aggressive Breast Cancer Tumours. // 96th Canadian Chemistry Conference. Oral Presentation. Quebec city, Canada. 2013. P. 11.

10. Esarik A., Esguerra K. V. N., Akentieva N., Ma J., Talmer P., Turley E. A., Luyt L. G. Hyaluronan Peptide Mimetics for the Imaging of RHAMM-Expressing Carcinomas. // Poster session presented at: Oncology Research and Education Day. London, ON, Canada. 2013. P. 6.

11. Акентьева Н. П. Изучение противоопухолевой активности RHAMM-таргет пептидов *in vitro*. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал. 2015. Том 14. № 1. С. 58.

12. Акентьева Н. П., Котельников А. И. Дизайн и характеристика RHAMM-специфичных пептидов как перспективных биомаркеров для диагностики и терапии раковых заболеваний. // Международный междисциплинарный форум Moscow Science Week. Устный секционный доклад. Москва, Россия. 8–12 сентября 2014 г. С. 2.

13. Акентьева Н. П., Котельников А. И. Характеристика RHAMM-специфичных пептидов как перспективных кандидатов для таргетной терапии рака молочной железы. // Международный междисциплинарный форум Moscow Science Week. Стендовый доклад. Москва, Россия. 8–12 сентября 2014 г. С. 4.

Список литературы

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. // Int. J. Cancer. 2015. V. 136. №5. P. E359–386.
2. Lehrer R.I. Primate defensins. // Nat. Rev. Microbiol. 2004. V. 2 (9). P. 727–738.
3. Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. // Lancet Infect. Dis. 2001. V. 1. №3. P. 156–164.
4. Koczulla A.R., Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. // Drugs. 2003. V. 63 (4). P. 389–406.
5. Otvos L.Jr. Antibacterail peptides and proteins with multiple cellular targets. // J. Pept. Sci. 2005. V. 11. №11. P. 697–706.
6. Nicolaou K.C., Murphy F., Barluenga S., Baudoin O., Wei Hx., Gray D.L., Ohshima T. Total synthesis of sanglifehrin A. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1999. V. 38. №16. P. 2447–2451.
7. Xia Z., Smith C.D. Total synthesis of dendroamide A, a novel cyclic peptide that reverses multiple drug resistance. // J. Org. Chem. 2001. V. 66. №10. P. 3459–3466.
8. Davies J.S. The cyclization of peptides and depsipeptides. // J. Peptide Sci. 2003. V. 9. №8. P. 471–501.
9. Lyu P., Ge L., Ma R., Wei R., McCrudden C. M., Chen T., Shaw C., Kwok H.F. Identification and pharmaceutical evaluation of novel frog skin-derived serine proteinase inhibitor peptide-PE-BBI (*Pelophylax esculentus* Bowman-Birk inhibitor) for the potential treatment of cancer. // Sci. Rep. 2018. V. 8. №1. P. 14502.
10. Zainodini N., Hassanshahi G., Hajizadeh M., Falahati-Pour S.K., Mahmoodi M., Mirzaei M.R. Nisin induces cytotoxicity and apoptosis in human astrocytoma cell line (SW1088). // Asian. Pac. J. Cancer Prev. 2018. V. 19. №8. P. 2217–2222.
11. Tanner J.D., Deplazes E., Mancera R.L. The biological and biophysical properties of the spider peptide gomesin. // Molecules. 2018. V. 23. №7. pii: E1733.
12. Veloria J.R., Chen L., Li L., Breen G.A.M., Lee J., Goux W.J. Novel cell-penetrating-amyloid peptide conjugates preferentially kill cancer cells. // Med. chem. comm. 2017. V. 9. №1. P. 121–130.
13. Lindgren M., Rosenthal-Aizman K., Saar K., Eiríksdóttir E. et al. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 71. №4. P. 416–425.
14. Liang J.F. and Yang V.C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. №22. P. 5071–5075.
15. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. №3. P. 238–250.
16. Mader J.S., Hoskin D.W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. // Expert. Opin. Investig. Drugs. 2006. V. 15. №8. P. 933–946.
17. Yuan J., You X., Ni G., Wang T., Cavezza Sh., Pan X., Liu X. Iodine-125 labeled australian frog tree host-defense peptides caerin 1.1 and 1.9 better inhibit human breast cancer cells growth than the unlabeled peptides. ¹²⁵I-caerin 1.9 may better be used for the treatment of breast cancer. // Hell. J. Nucl. Med. 2018. V. 21. №2. P. 115–120.
18. Ukhanova T.M., Kulinich E.A., Kudinova V.K. Therapeutic dose characteristics of the chimeric peptide MM-D37K when administered parenterally to BALB/C NUDE mice with human colorectal cancer HCT-116. // Russian Biotherapeutic Journal. 2017. V. 16. №2. P. 36–41.

19. Xiang Y., Shan W., Huang Y. Improved anticancer efficacy of doxorubicin mediated by human-derived cell-penetrating peptide dNP2. // *Int. J. Pharm.* 2018. V. 551. № 1–2. P. 14–22.
20. Kritzer J.A., Stephens O.M., Guarracino D.A., Reznik S.K., Schepartz A. Beta-peptides as inhibitors of protein-protein interactions. // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. V. 13. № 1. P. 11–16.
21. Qvit N., Mochly-Rosen D. Highly specific modulators of protein kinase C localization: applications to heart failure. // *Drug discov. today dis. mech.* 2010. V. 7. № 2. P. e87–e93.
22. Zhang X.X., Eden H.S., Chen X. Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates. // *J. Control Release.* 2012. V. 159. № 1. P. 2–13.
23. Thayer A.M. Improving peptides. // *Chemical and Engineering News.* 2011. V. 89. № 22. P. 13–20.
24. Borghouts C., Kunz C., Groner B. Current strategies for the development of peptide-based anticancer therapeutics. // *J. Pept. Sci.* 2005. V. 11. № 11. P. 713–726.
25. Platt V.M., Szoka F.C. Jr. Anticancer therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. // *Mol. Pharm.* 2008. V. 5. № 4. P. 474–486.
26. Vives E., Schmidt J., Pelegrin A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1786. № 2. P. 126–138.
27. Ijaz M., Wang F., Shahbaz M., Jiang W., Fathy A.H., Nesa E.U. The role of Grb² in cancer and peptides as Grb² antagonists. // *Protein Pept. Lett.* 2018. V. 24. № 12. P. 1084–1095.
28. Lisabeth E.M., Falivelli G., Pasquale E.B. Eph receptor signaling and ephrins. // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2013. V. 5. № 9. pii: a009159.
29. Lamberto I., Lechtenberg B.C., Olson E., Mace P.D., Dawson P.E., Riedl S.J., Pasquale E.B. Development and structural analysis of a nanomolar cyclic peptide antagonist for the EphA4 receptor. // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. P. 2787–2795.
30. Wang Y., Menendez A., Fong C., ElAlich H. Z., Chang W., Bikle D.D. Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation. // *Bone Miner. Res.* 2014. V. 29. P. 1900–1913.
31. Accardo A., Aloj L., Aurilio M., Morelli G., Tesaro D. Receptor binding peptides for targetselective delivery of nanoparticles encapsulated drugs. // *Int. J. Nanomedicine.* 2014. V. 9. P. 1537–1557.
32. Patel A.R., Chougule M., Singh M. EphA2 targeting pegylated nanocarrier drug delivery system for treatment of lung cancer. // *Pharm. Res.* 2014. V. 31. P. 2796–2809.
33. Maxwell C.A., McCarthy J., Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121 (Pt 7). P. 925–932.
34. Turley E.A., Naor D. RHAMM and CD44 peptides-analytic tools and potential drugs. // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2012. V. 17. P. 1775–1794.
35. Tabarkiewicz J., Giannopoulos K. Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia. // *Transplant Proc.* 2010. V. 42. № 8. P. 3293–3296.
36. Casalegno-Garduno R., Schmitt A., Schmitt M. Clinical peptide vaccination trials for leukemia patients. // *Expert Rev. Vaccines.* 2011. V. 10. № 6. P. 785–799.
37. Копыльцов Е.И., Новиков А.И., Косенок В.К., Леонов О.В., Голубь Н.Н., Акулинин В.А., Ясмин Д., Massard G. Онкологические заболевания органов мочеполовой системы. // *Онкология. Кн. 4.* Омск: изд-во Центра МО и ИТ Омской гос. мед. академии, 2008. С. 197.
38. ВОЗ. Рак молочной железы: профилактика и борьба. WHO. Дата обращения 10 июня 2019.

39. Никогосян С.О., Кузнецов В.В. Современная диагностика рака яичников. // Российский онкологический журнал. 2013. № 5. С. 52–57.
40. Kalyanaraman B., Joseph J., Kalivendi S., Wang S., Konorev E., Kotamraju S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. // *Mol. Cell Biochem.* 2002. V. 234–235. № 1–2. P. 119–124.
41. Naumov G.N., Townson J.L., MacDonald I. C., Wilson S.M., Bramwell V.H., Groom A.C., Chambers A.F. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2003. V. 82. P. 199–206.
42. Dey N., Williams C., Leyland-Jones B., De P. Mutation matters in precision medicine: A future to believe in. // *Cancer Treat Rev.* 2017. V. 55. P. 136–149.
43. Phillips K.A., Deverka P.A., Sox H.C., Khoury M.J., Sandy L.G. et al. Making genomic medicine evidence-based and patient-centered: a structured review and landscape analysis of comparative effectiveness research. // *Genet. Med.* 2017. V. 19. № 10. P. 1081–1091.
44. Roukos D.H. Spatiotemporal diversification of inpatient genomic clones and early drug development concepts realize the roadmap of precision cancer medicine. // *Drug Discov. Today.* 2017. V. 22. № 8. P. 1148–1164.
45. Lheureux S., Denoyelle C., Ohashi P.S., De Bono J.S., Mottaghy F.M. Molecularly targeted therapies in cancer: a guide for the nuclear medicine physician. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2017. V. 44 (Suppl 1). P. 41–54.
46. Gorovits B., Krinos-Fiorotti C. Proposed mechanism of off-target toxicity for antibody-drug conjugates driven by mannose receptor uptake. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2013. V. 2. P. 217–223.
47. Ryan J.M., Wasser J.S., Adler A.J., Vella A. T. Enhancing the safety of antibody-based immunomodulatory cancer therapy without compromising therapeutic benefit: Can we have our cake and eat it too? // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2016. V. 16. № 5. P. 655–674.
48. Kobus T., Vykhodtseva N., Pilatou M., Zhang Y., McDannold N. Safety validation of repeated blood-brain barrier disruption using focused ultrasound. // *Ultrasound. Biol.* 2016. V. 42. № 2. P. 481–492.
49. Kobus T., Zervantonakis I.K., Zhang Y., McDannold N.J. Growth inhibition in a brain metastasis model by antibody delivery using focused ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption. // *J. Control Release.* 2016. V. 238. P. 281–288.
50. Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. Nanocrystal targeting *in vivo*. // *Proc. Natl. USA.* 2002. V. 99. № 20. P. 12617–12621.
51. Boohaker R.J., Lee M.W., Vishnubhotla P., Perez J.M., Khaled A.R. The use of therapeutic peptides to target and to kill cancer cells. // *Curr. Med. Chem.* 2012. V. 19. № 22. P. 3794–3804.
52. Fuertes G., Gimenez D., Esteban-Martin S., Garcia-Saez A., Sanchez O., Salgado J. Role of membrane lipids for the activity of pore forming peptides and proteins. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 677. P. 31–55.
53. Fuertes G., Gimenez D., Esteban-Martin S., Sanchez-Munoz O.L., Salgado J. A lipocentric view of peptide-induced pores. // *Eur. Biophys. J.* 2011. V. 40. P. 399–415.
54. Rekdal O., Haug B.E., Kalaaji M., Hunter H.N. et al. Relative spatial positions of tryptophan and cationic residues in helical membrane-active peptides determine their cytotoxicity. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 233–244.
55. Branco M.C., Sigano D.M., Schneider J.P. Materials from peptide assembly: towards the treatment of cancer and transmittable disease. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011. V. 15. P. 427–434.

56. Bevers E.M., Comfurius P., Zwaal R.F. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. // *Lupus*. 1996. V. 5. P. 480–487.
57. Utsugi T., Schroit A.J., Connor J., Bucana C.D., Fidler I.J. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. // *Cancer Res*. 1991. V. 51. P. 3062–3066.
58. Riedl S., Rinner B., Asslaber M., Schaidner H., Walzer S. et al. In search of a novel target – phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1808. P. 2638–2645.
59. Riedl S., Zwegay D., Lohner K. Membrane-active host defense peptides – challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. // *Chem. Phys. Lipids*. 2011. V. 164. P. 766–781.
60. Bafna S., Kaur S., Batra S.K. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. // *Oncogene*. 2010. V. 29. P. 2893–2904.
61. Fadnes B., Rekdal O., Uhlin-Hansen L. The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparan sulfate on the surface of the tumor cells. // *BMC Cancer*. 2009. V. 9. P. 183–193.
62. Viel-Ronen S., Lau S.K., Pinteric M., Lau D., Liu N., Tsao M. S., Jothy S. Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma. // *Mod. Pathol*. 2008. V. 21. P. 817–825.
63. Sherbet G.V. Membrane fluidity and cancer metastasis. // *Exp. Cell Biol*. 1989. V. 57. P. 198–205.
64. Sok M., Sentjurs M., Schara M., Stare J., Rott T. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. // *Ann. Thorac. Surg*. 2002. V. 73. P. 1567–1571.
65. May G.L., Wright L.C., Dyne M., Mackinnon W.B., Fox R.M., Mountford C.E. Plasma membrane lipid composition of vinblastine sensitive and resistant human leukaemic lymphoblasts. // *Int. J. Cancer*. 1988. V. 42. P. 728–733.
66. Zwaal R.F., Schroit A.J. Pathophysiological implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. // *Blood*. 1997. V. 89. P. 1121–1132.
67. Hambley T.W., Hait W.N. Is anticancer drug development heading in the right direction? // *Cancer Res*. 2009. V. 69. P. 1259–1262.
68. Jain R.K. Transport of molecules, particles and cells in solid tumors. // *Annu. Rev. Biomed. Eng*. 1999. V. 1. P. 241–263.
69. Heldin C.H., Rubin K., Pietras K., Ostman A. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. // *Nat. Rev. Cancer*. 2004. V. 4. P. 806–813.
70. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. // *Cancer Res*. 1986. V. 46. P. 6387–6392.
71. Brooks P.C., Clark R.A., Cheresh D.A. Requirement of vascular integrin αv $\beta 3$ for angiogenesis. // *Science*. 1994. V. 264. P. 569–571.
72. Nilsson F., Kosmehl H., Zardi L., Neri D. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. // *Cancer Res*. 2001. V. 61. P. 711–716.
73. Pilch J., Brown D.M., Komatsu M., Jarvinen T.A. et al. Peptides selected for binding to clotted plasma accumulate in tumor stroma and wounds. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 2800–2804.
74. Ye F., Wu X., Jeong E.K., Jia Z., Yang T. et al. A peptide targeted contrast agent specific to fibrin-fibronectin complexes for cancer molecular imaging with MRI. // *Bioconj. Chem*. 2008. V. 19. P. 2300–2303.

75. Green M., Loewenstein P.M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. // *Cell*. 1988. V. 55. P. 1179–1188.
76. Frankel A.D., Pabo C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. // *Cell*. 1988. V. 55. P. 1189–1193.
77. Torchilin V.P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. P. 548–558.
78. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. // *Science*. 1998. V. 279. P. 377–380.
79. Sawant R., Torchilin V. Intracellular delivery of nanoparticles with CPPs. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 683. P. 431–451.
80. Snyder E.L., Meade B.R., Saenz C.C., Dowdy S.F. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. E36.
81. Cantelmo A.R., Cammarota R., Noonan D.M., Focaccetti C. et al. Cell delivery of Met docking site peptides inhibit angiogenesis and vascular tumor growth. // *Oncogene*. 2010. V. 29. P. 5286–5298.
82. Lee J.Y., Choi Y.S., Suh J.S., Kwon Y.M., Yang V.C. et al. Cell-penetrating chitosan/doxorubicin/TAT conjugates for efficient cancer therapy. // *Int. J. Cancer*. 2011. V. 128. P. 2470–2480.
83. Sawant R.M., Hurley J.P., Salmaso S., Kale A. et al. “SMART” drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. // *Bioconjug. Chem.* 2006. V. 17. P. 943–949.
84. Kale A.A., Torchilin V.P. “Smart” drug carriers: PEGylated TATp-modified pH-sensitive liposomes. // *J. Liposome Res.* 2007. V. 17. P. 197–203.
85. Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V.P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. // *J. Control Release*. 2012. V. 160. №2. P. 264–273.
86. Yin H., Yang J., Zhang Q. et al. iRGD as a tumor-penetrating peptide for cancer therapy. // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 15. №5. P. 2925–2930.
87. Elayadi A.N., Samli K.N., Prudkin L., Liu Y.H., Bian A. et al. A peptide selected by biopanning identifies the integrin $\alpha_v\beta_6$ as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. P. 5889–5895.
88. Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. P. 9–22.
89. Pasqualini R., Koivunen E., Kain R., Lahdenranta J. et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 722–727.
90. Corti A., Curnis F., Arap W., Pasqualini R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. // *Blood*. 2008. V. 112. P. 2628–2635.
91. Cai L.L., Liu P., Li X., Huang X. et al. RGD peptide-mediated chitosan-based polymeric micelles targeting delivery for integrin overexpressing tumor cells. // *Int. J. Nanomedicine*. 2011. V. 6. P. 3499–3508.
92. Jiang X., Sha X., Xin H., Chen L. et al. Self-aggregated pegylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles decorated with c(RGDyK) peptide for targeted paclitaxel delivery to integrin-rich tumors. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. P. 9457–9469.
93. Ndinguri M.W., Solipuram R., Gambrell R.P., Aggarwal S., Hammer R.P. Peptide targeting of platinum anti-cancer drugs. // *Bioconjug. Chem.* 2009. V. 20. P. 1869–1878.

94. Pastorino F., Brignole C., Marimpietri D., Cilli M. et al. Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 7400–7409.
95. Pastorino F., Brignole C., Di P.D., Nico B. et al. Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 10073–10082.
96. Lei H., Cao P., Miao G., Lin Z., Diao Z. Expression and functional characterization of tumor-targeted fusion protein composed of NGR peptide and 15-kDa actin fragment. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 162. P. 988–995.
97. Takara K., Hatakeyama H., Ohga N., Hida K., Harashima H. Design of a dual-ligand system using a specific ligand and cell penetrating peptide, resulting in a synergistic effect on selectivity and cellular uptake. // *Int. J. Pharm.* 2010. V. 396. P. 143–148.
98. Gilbert M.R., Kuhn J., Lamborn K.R., Lieberman F., Wen P.Y. et al. Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03–02, a phase II trial with measures of treatment delivery. // *J. Neurooncol.* 2012. V. 106. P. 147–153.
99. Reardon D.A., Fink K.L., Mikkelsen T., Cloughesy T.F. et al. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. P. 5610–5617.
100. Santoro A., Pressiani T., Citterio G., Rossoni G. et al. Activity and safety of NGR-hTNF, a selective vascular-targeting agent, in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. // *Br. J. Cancer.* 2010. V. 103. P. 837–844.
101. Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P., Kotamraju V.R. et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. // *Cancer Cell.* 2009. V. 16. P. 510–520.
102. Sugahara K.N., Teesalu T., Karmali P.P., Kotamraju V.R. et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. // *Science.* 2010. V. 328. P. 1031–1035.
103. Sun X., Li Y., Liu T., Li Z., Zhang X., Chen X. Peptide-based imaging agents for cancer detection. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 110–111. P. 38–51.
104. Majumdar D., Peng X.H., Shin D.M. The medicinal chemistry of theragnostics, multimodality imaging and applications of nanotechnology in cancer. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2010. V. 10. № 12. P. 1211–1226.
105. Zhang X., Feng S., Liu J., Li Q. et al. Novel small peptides derived from VEGF125-136: potential drugs for radioactive diagnosis and therapy in A549 tumor-bearing nude mice. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 4278.
106. Watt H.L., Kharmate G., Kumar U. Biology of somatostatin in breast cancer. // *Mol. Cell Endocrinol.* 2008. V. 286. № 1–2. P. 251–261.
107. Laakkonen P., Vuorinen K. Homing peptides as targeted delivery vehicles. // *Integr. Biol. (Camb).* 2010. V. 2. № 7–8. P. 326–337.
108. Teesalu T., Sugahara K.N., Ruoslahti E. Mapping of vascular ZIP codes by phage display. // *Methods Enzymol.* 2012. V. 503. P. 35–56.
109. Del Pozo E., Neufeld M., Schlüter K., Tortosa F. et al. Endocrine profile of a long-acting somatostatin derivative SMS 201–995. Study in normal volunteers following subcutaneous administration. // *Acta Endocrinol. (Copenh).* 1986. V. 111. № 4. P. 433–439.
110. Dasgupta P., Singh A., Mukherjee R. N-terminal acylation of somatostatin analog with long chain fatty acids enhances its stability and anti-proliferative activity in human breast adenocarcinoma cells. // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. V. 25. № 1. P. 29–36.
111. Luboldt W., Zöphel K., Wunderlich G., Abramyuk A., Luboldt H.J., Kotzerke J. Visualization of somatostatin receptors in prostate cancer and its bone

metastases with Ga-68-DOTATOC PET/CT. // *Mol. Imaging. Biol.* 2010. V. 12. № 1. P. 78–84.

112. Dalm S.U., Verzijlbergen J.F., De Jong M. Review: Receptor targeted nuclear imaging of breast cancer. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 2. P. pii: E260.

113. Begum A.A., Moyle P.M., Toth I. Investigation of bombesin peptide as a targeting ligand for the gastrin releasing peptide (GRP) receptor. // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. V. 24. № 22. P. 5834–5841.

114. Mansi R., Wang X., Forrer F., Kneifel S., Tamma M.L. et al. Evaluation of a 1,4,7,10-tetra-aza-cyclododecane-1,4,7,10-tetra-acetic acid-conjugated bombesin-based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 16. P. 5240–5249.

115. Parry J.J., Andrews R., Rogers B.E. Micro-PET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2007. V. 101. № 2. P. 175–183.

116. Cescato R., Waser B., Fani M., Reubi J.C. Evaluation of ^{177}Lu -DOTA-sst² antagonist versus ^{177}Lu -DOTA-sst² agonist binding in human cancers in vitro. // *J. Nucl. Med.* 2011. V. 52. № 12. P. 1886–1890.

117. Mansi R., Minamimoto R., Mäcke H., Iagaru A.H. Bombesin-targeted PET of prostate cancer. // *J. Nucl. Med.* 2016. V. 57 (Suppl 3). P. 67S–72S.

118. Nanda P.K., Wienhoff B.E., Rold T.L., Sieckman G.L. et al. Positron-emission tomography (PET) imaging agents for diagnosis of human prostate cancer: agonist vs. antagonist ligands. // *In Vivo.* 2012. V. 26. № 4. P. 583–592.

119. Yang M., Gao H., Zhou Y., Ma Y. et al. F-labeled GRPR agonists and antagonists: a comparative study in prostate cancer imaging. // *Theranostics.* 2011. V. 1. P. 220–229.

120. Wieser G., Mansi R., Grosu A.L., Schultze-Seemann W. et al. Positron emission tomography (PET) imaging of prostate cancer with a gastrin releasing peptide receptor antagonist from mice to men. // *Theranostics.* 2014. V. 4. № 4. P. 412–419.

121. De Vincentis G., Remediani S., Varvarigou A.D., Di Santo G. et al. Role of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -bombesin scan in diagnosis and staging of prostate cancer. // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2004. V. 19. № 1. P. 81–84.

122. Ananias H.J., Yu Z., Hoving H.D., Rosati S., Dierckx R.A., Wang F. et al. Application of ($^{99\text{m}}$) Technetium-HYNIC (tricine/TPPTS) – Aca-Bombesin (7–14) SPECT/CT in prostate cancer patients: a first-in-man study. // *Nucl. Med. Biol.* 2013. V. 40. № 7. P. 933–938.

123. Eberle A.N., Bapst J.P., Calame M., Tanner H., Froidevaux S. MSH radiopeptides for targeting melanoma metastases. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 681. P. 133–142.

124. Zhang C., Zhang Z., Lin K.S., Pan J. et al. Preclinical melanoma imaging with ^{68}Ga -labeled α -melanocyte-stimulating hormone derivatives using PET. // *Theranostics.* 2017. V. 7. № 4. P. 805–813.

125. Guldbrandsen K.F., Hendel H.W., Langer S.W., Fischer B.M. Nuclear molecular imaging strategies in immune checkpoint inhibitor therapy. // *Diagnostics (Basel).* 2017. V. 7. № 2. pii: E23.

126. Wong A.N.M., McArthur G.A., Hofman M.S., Hicks R.J. The advantages and challenges of using FDG PET/CT for response assessment in melanoma in the era of targeted agents and immunotherapy. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2017. V. 44 (Suppl 1). P. 67–77.

127. Larimer B.M., Wehrenberg-Klee E., Dubois F., Mehta A. et al. Granzyme B PET imaging as a predictive biomarker of immunotherapy response. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 9. P. 2318–2327.

128. Wang Z., Wang G. APD: the antimicrobial peptide database. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. D590–D592.
129. Pastorino F., Di Paolo D., Piccardi F. et al. Enhanced antitumor efficacy of clinical-grade vasculature-targeted liposomal doxorubicin. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. №22. P. 7320–7329.
130. Chernysh S., Kim S.I., Bekker G., Pleskach V.A. et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 12628–12632.
131. Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 5449–5453.
132. Cruciani R.A., Barker J.L., Zasloff M., Chen H.C., Colamonici O. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 3792–3796.
133. Soballe P.W., Maloy W.L., Myrnga M.L., Jacob L.S., Herlyn M. Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides. // *Int. J. Cancer.* 1995. V. 60. P. 280–284.
134. Lehmann J., Retz M., Sidhu S.S., Suttman H. et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. // *Eur. Urol.* 2006. V. 50. P. 141–147.
135. Matsuzaki K., Sugishita K., Harada M., Fujii N., Miyajima K. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2: with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1327. P. 119–130.
136. Liu S., Yang H., Wan L., Cai H.W. et al. Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2011. V. 32. P. 79–88.
137. Lincke C.R., van der Blik A.M., Schuurhuis G.J., van der Velde-Koerts T., Smit J.J., Borst P. Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. P. 1779–1785.
138. Srisailam S., Kumar T.K., Arunkumar A.I., Leung K.W., Yu C., Chen H.M. Crumpled structure of the custom hydrophobic lytic peptide cecropin B3. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. P. 4278–4284.
139. Hoskin D.W., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 357–375.
140. Chen H.M., Wang W., Smith D., Chan S.C. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1336. P. 171–179.
141. Hui L., Leung K., Chen H.M. The combined effects of antibacterial peptide cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. // *Anticancer Res.* 2002. V. 22. P. 2811–2816.
142. Moore A.J., Devine D.A., Bibby M.C. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. // *Pept. Res.* 1994. V. 7. P. 265–269.
143. Suttman H., Retz M., Paulsen F., Harder J. et al. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. // *BMC. Urol.* 2008. V. 8. P. 5.
144. Jean S.R., Ahmed M., Lei E.K., Wisnovsky S.P., Kelley S.O. Peptide-Mediated Delivery of Chemical Probes and Therapeutics to Mitochondria. // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49. №9. P. 1893–1902.
145. Kulaeva O.A., Klyukova M.S., Rise M.N., Tikhonovich I.A., Zhukov V.A. Plant defensins: biological role, mechanism, and analysis methods. // *Agricultural Biology.* 2017. V. 52. №1. P. 3–12.

146. Kagan B. L., Selsted M. E., Ganz T., Lehrer R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 210–214.
147. Droin N., Hendra J. B., Ducoroy P., Solary E. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. // *J. Proteomics*. 2009. V. 72. P. 918–927.
148. Melle C., Ernst G., Schimmel B., Bleul A., Thieme H. et al. Discovery and identification of alpha-defensins as low abundant, tumor-derived serum markers in colorectal cancer. // *Gastroenterology*. 2005. V. 129. P. 66–73.
149. McKeown S. T., Lundy F. T., Nelson J., Lockhart D. et al. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) *in vitro*. // *Oral. Oncol*. 2006. V. 42. P. 685–690.
150. Gera J. F., Lichtenstein A. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. // *Cell Immunol*. 1991. V. 138. P. 108–120.
151. Chavakis T., Cines D. B., Rhee J. S., Liang O. D., Schubert U. et al. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. // *FASEB. J*. 2004. V. 18. P. 1306–1308.
152. Lichtenstein A., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. *In vitro* tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. // *Blood*. 1986. V. 68. P. 1407–1410.
153. Nishimura M., Abiko Y., Kurashige Y., Takeshima M., Yamazaki M. et al. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines. // *J. Dermatol. Sci*. 2004. V. 36. P. 87–95.
154. Kim I. W., Kim S. J., Kwon Y. N., Yun E. Y. et al. Effects of the synthetic coprisin analog peptide, CopA3 in pathogenic microorganisms and mammalian cancer cells. // *J. Microbiol. Biotechnol*. 2012. V. 22. P. 156–158.
155. Cole A. M., Weis P., Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. // *J. Biol. Chem*. 1997. V. 272. P. 12008–12013.
156. Yoshida K., Mukai Y., Niidome T., Takashi C. et al. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. // *J. Pept. Res*. 2001. V. 57. P. 119–126.
157. Patrzykat A., Gallant J. W., Seo J. K., Pytyck J., Douglas S. E. Novel antimicrobial peptides derived from flatfish genes. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003. V. 47. P. 2464–2470.
158. Gao W., Yang X., Lin Z., He B., Mei D. et al. The use of electronic-neutral penetrating peptides cyclosporin A to deliver pro-apoptotic peptide: A possibly better choice than positively charged TAT. // *J. Control Release*. 2017. V. 261. P. 174–186.
159. Hilchie A. L., Doucette C. D., Pinto D. M., Patrzykat A., Douglas S., Hoskin D. W. Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. // *Breast Cancer Res*. 2011. V. 13. P. R102.
160. Leber B., Lin J., Andrews D. W. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. // *Oncogene*. 2010. V. 29. P. 5221–5230.
161. Shamas-Din A., Brahmabhatt H., Leber B., Andrews D. W. BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1813. P. 508–520.
162. Chou J. J., Li H., Salvesen G. S., Yuan J., Wagner G. Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. // *Cell*. 1999. V. 96. P. 615–624.
163. Muchmore S. W., Sattler M., Liang H., Meadows R. P. et al. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. // *Nature*. 1996. V. 381. P. 335–341.

164. Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. // *Cell*. 2000. V. 103. P. 645–654.
165. Saito M., Korsmeyer S.J., Schlesinger P.H. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. // *Nat. Cell Biol.* 2000. V. 2. P. 553–555.
166. Epand R.F., Martinou J.C., Fornallaz-Mulhauser M., Hughes D.W., Epand R.M. The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 32632–32639.
167. Higashiyama M., Doi O., Kodama K., Yokouchi H., Tateishi R. High prevalence of bcl-2 oncoprotein expression in small cell lung cancer. // *Anticancer Res.* 1995. V. 15. P. 503–505.
168. Olopade O.I., Adeyanju M.O., Safa A.R., Hagos F. et al. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. // *Cancer J. Sci. Am.* 1997. V. 3. P. 230–237.
169. Dosaka-Akita H., Katabami M., Hommura H., Fujioka Y., Katoh H., Kawakami Y. Bcl-2 expression in non-small cell lung cancers: higher frequency of expression in squamous cell carcinomas with earlier pT status. // *Oncology*. 1999. V. 56. P. 259–264.
170. Vaux D.L., Cory S., Adams J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. // *Nature*. 1988. V. 335. P. 440–442.
171. Miyashita T., Reed J.C. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. // *Blood*. 1993. V. 81. P. 151–157.
172. Schmitt C.A., Rosenthal C.T., Lowe S.W. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. P. 1029–1035.
173. Moreau C., Cartron P.F., Hunt A., Meflah K., Green D.R., Evan G., Vallette F.M., Juin P. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 19426–19435.
174. Walensky L.D., Kung A.L., Escher I., Malia T.J. et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. // *Science*. 2004. V. 305. P. 1466–1470.
175. Petros A.M., Medek A., Nettesheim D.G., Kim D.H. et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 3012–3017.
176. Day C.L., Smits C., Fan F.C., Lee E.F. et al. Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 380. №5. P. 958–971.
177. Van Delft M.F., Wei A.H., Mason K.D., Vandenberg C.J. et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. // *Cancer Cell*. 2006. V. 10. P. 389–399.
178. Mason K.D., Vandenberg C.J., Scott C.L., Wei A.H. et al. *In vivo* efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 17961–17966.
179. Yecies D., Carlson N.E., Deng J., Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate Mcl-1 and BFL-1. // *Blood*. 2010. V. 115. P. 3304–3313.
180. Konopleva M., Contractor R., Tsao T., Samudio I., Ruvolo P.P. et al. Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. // *Cancer Cell*. 2006. V. 10. P. 375–388.
181. Lessene G., Czabotar P.E., Colman P.M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008. V. 7. P. 989–1000.
182. Khaw S.L., Huang D.C., Roberts A.W. Overcoming blocks in apoptosis with BH3-mimetic therapy in hematological malignancies. // *Pathology*. 2011. V. 43. P. 525–535.
183. Roberts A.W., Seymour J.F., Brown J.R., Wierda W.G., Kipps T.J. et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results

of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. // J. Clin. Oncol. 2012. V. 30. P. 488–496.

184. Wilson W.H., O'Connor O.A., Czuczman M.S., LaCasce A.S., Gerecitano J.F. et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. // Lancet. Oncol. 2010. V. 11. P. 1149–1159.

185. Heitz F., Morris M.C., Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. // Br. J. Pharmacol. 2009. V. 157. P. 195–206.

186. Guidotti G., Brambilla L., Rossi D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. // Trends. Pharmacol. Sci. 2017. V. 38. P. 406–424.

187. Frankel A.D., Pabo C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. // Cell. 1988. V. 5. P. 1189–1193.

188. Ptasińska N., Gucwa K., Olkiewicz K. et al. Conjugates of Ciprofloxacin and Levofloxacin with Cell-Penetrating Peptide Exhibit Antifungal Activity and Mammalian Cytotoxicity. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 13. P. 4696.

189. Ruben S., Perkins A., Purcell R., Joung K. et al. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. // J. Virol. 1989. V. 63. P. 1–8.

190. Vives E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 16010–16017.

191. Park J., Ryu J., Kim K.A., Lee H.J. et al. Mutational analysis of a human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transduction domain which is required for delivery of an exogenous protein into mammalian cells. // J. Gen. Virol. 2002. V. 83. P. 1173–1181.

192. Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1864–1868.

193. Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A. The third helix of the *Antennapedia* home domain translocates through biological membranes. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 10444–10450.

194. Vasconcelos L., Parn K., Langel U. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. // Ther. Deliv. 2013. V. 4. P. 573–591.

195. Martin M.E., Rice K.G. Peptide-guided gene delivery. // AAPS J. 2007. V. 9. P. E18–E29.

196. Borrelli A., Tornosello A.L., Tornosello M.L., Franco M., Buonaguro F.M. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents. // Molecules. 2018. V. 23. № 295. P. 1–28.

197. Sawant R., Torchilin V. Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. // Mol. Biosyst. 2010. V. 6. P. 628–640.

198. Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. // Drug Discov. Today. 2012. V. 17. P. 850–860.

199. Agrawal P., Bhalla S., Usmani S.S., Singh S. et al. CPPsite 2.0: a repository of experimentally validated cell-penetrating peptides. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. D1098–D1103.

200. Pooga M., Langel U. Classes of cell-penetrating peptides. // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1324. P. 3–28.

201. Takechi Y., Tanaka H., Kitayama H., Yoshii H., Tanaka M., Saito H. Comparative study on the interaction of cell-penetrating polycationic polymers with lipid membranes. // Chem. Phys. Lipids. 2012. V. 165. P. 51–58.

202. Alhakamy N.A., Berkland C.J. Polyarginine molecular weight determines transfection efficiency of calcium condensed complexes. // *Mol. Pharm.* 2013. V. 10. P. 1940–1948.
203. Rothbard J.B., Jessop T.C., Lewis R.S., Murray B.A., Wender P.A. Role of membrane potential and hydrogenbonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 9506–9507.
204. Rydberg H.A., Matson M., Amand H.L., Esbjorner E.K., Norden B. Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. P. 5531–5539.
205. Deshayes S., Decaffmeyer M., Brasseur R., Thomas A. Structural polymorphism of two CPP: an important parameter of activity. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1778. P. 1197–1205.
206. Bechara C., Sagan S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? // *FEBS Lett.* 2013. V. 587. P. 1693–1702.
207. Farkhani S.M., Valizadeh A., Karami H., Mohammadi S., Sohrabi N., Badrzadeh F. Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. // *Peptides.* 2014. V. 57. P. 78–94.
208. Ruoslahti E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 110–111. P. 3–12.
209. Dubikovskaya E.A., Thorne S.H., Pillow T.H., Contag C.H., Wender P.A. Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octa arginine transporters. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 12128–12133.
210. Aroui S., Brahim S., De W.M., Breard J., Kenani A. Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. // *Cancer Lett.* 2009. V. 285. P. 28–38.
211. Dawidczyk C.M., Russell L.M., Searson P.C. Recommendations for benchmarking preclinical studies of nanomedicines. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. P. 4016–4020.
212. Aroui S., Brahim S., Waard M.D., Kenani A. Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 391. P. 419–425.
213. Nasrolahi S.A., Mandal D., Tiwari R.K., Guo L., Lu W., Parang K. Cyclic peptide-capped gold nanoparticles as drug delivery systems. // *Mol. Pharm.* 2013. V. 10. P. 500–511.
214. Chen J., Li S., Shen Q. Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA-PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012. V. 47. P. 430–443.
215. Pannier A.K., Shea L.D. Controlled release systems for DNA delivery. // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 1. P. 19–26.
216. Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1816. P. 232–246.
217. Liu B.R., Lin M.D., Chiang H.J., Lee H.J. Arginine-rich cell-penetrating peptides deliver gene into living human cells. // *Gene.* 2012. V. 505. P. 37–45.
218. Veiman K.L., Mager I., Ezzat K., Margus H. et al. PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. // *Mol. Pharm.* 2013. V. 10. № 11. P. 199–210.
219. Mevel M., Haudebourg T., Colombani T., Peuziat P. et al. Important role of phosphoramido linkage in imidazole-based dioleoyl helper lipids for liposome stability and primary cell transfection. // *J. Gene Med.* 2016. V. 18. № 1–3. P. 3–15.

220. Dinca A., Chien W.M., Chin M.T. Intracellular delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. №2. P. 263.
221. Zhang T.T., Kang T.H., Ma B., Xu Y., Hung C.F., Wu T.C. LAH4 enhances CD8+ T cell immunity of protein/peptide-based vaccines. // *Vaccine.* 2012. V. 30. P. 784–793.
222. Yamada T., Mehta R.R., Lekmine F., Christov K. et al. A peptide fragment of azurin induces a p53-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. №10. P. 2947–2958.
223. Mehta R.R., Yamada T., Taylor B.N., Christov K. et al. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt. // *Angiogenesis.* 2011. V. 14. №3. P. 355–369.
224. Warso M.A., Richards J.M., Mehta D., Christov K. et al. A first-in-class, first-in-human, phase I trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours. // *Br. J. Cancer.* 2013. V. 108. P. 1061–1070.
225. Raucher D., Ryu J.S. Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. // *Trends Mol. Med.* 2015. V. 21. P. 560–570.
226. Verdurmen W.P., Bovee-Geurts P.H., Wadhvani P., Ulrich A.S. et al. Preferential uptake of L-versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner. // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. P. 1000–1010.
227. Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V.P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. // *J. Control Release.* 2012. V. 160. №2. P. 264–273.
228. Kuai R., Yuan W., Li W., Qin Y. et al. Targeted delivery of cargoes into a murine solid tumor by a cell-penetrating peptide and cleavable poly (ethylene glycol) co-modified liposomal delivery system via systemic administration. // *Mol. Pharm.* 2011. V. 8. P. 2151–2161.
229. Nguyen Q.T., Olson E.S., Aguilera T.A., Jiang T. et al. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 4317–4322.
230. Biswas S., Torchilin V.P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. V. 66. P. 26–41.
231. Borrelli A., Schiattarella A., Bonelli P., Tuccillo F.M., Buonaguro F.M., Mancini A. The functional role of MnSOD as a biomarker of human diseases and therapeutic potential of a new isoform of a human recombinant MnSOD. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 476789.
232. Horton K.L., Stewart K.M., Fonseca S.B., Guo Q., Kelley S.O. Mitochondria-penetrating peptides. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 375–382.
233. Kardani K., Milani A., Shabani S.H., Bolhassani A. Cell penetrating peptides: the potent multi-cargo intracellular carriers. // *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2019. V. 16. №11. P. 1227–1258.
234. Cerrato C.P., Pirisinu M., Vlachos E.N., Langel U. Novel cell-penetrating peptide targeting mitochondria. // *FASEB J.* 2015. V. 29. P. 4589–4599.
235. Szeto H.H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. // *AAPS J.* 2006. V. 8. P. E521–E531.
236. Jia L., Gorman G.S., Coward L.U., Noker P.E. et al. Preclinical pharmacokinetics, metabolism, and toxicity of azurin-p28 (NSC745104) a peptide inhibitor of p53 ubiquitination. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011. V. 68. P. 513–524.
237. Smith N.F., Figg W.D., Sparreboom A. Pharmacogenetics of irinotecan metabolism and transport: an update. // *Toxicol. In Vitro.* 2006. V. 20. P. 163–175.

238. De Coupade C., Fittipaldi A., Chagnas V., Michel M. et al. Novel human-derived cell-penetrating peptides for specific subcellular delivery of therapeutic biomolecules. // *Biochem. J.* 2005. V. 390. P. 407–418.
239. Meyer-Losic F., Nicolazzi C., Quinonero J., Ribes F. et al. DTS-108, a novel peptidic prodrug of SN38: *in vivo* efficacy and toxicokinetic studies. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. P. 2145–2153.
240. Coriat R., Faivre S.J., Mir O., Dreyer C. et al. Pharmacokinetics and safety of DTS-108, a human oligopeptide bound to SN-38 with an esterase-sensitive cross-linker in patients with advanced malignancies: a Phase I study. // *Int. J. Nanomed.* 2016. V. 11. P. 6207–6216.
241. Bhat R., Bissell M.J. Of plasticity and specificity: dialectics of the micro- and macro-environment and the organ phenotype. // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* 2014. V. 3. №2. P. 147–163.
242. Boudreau A., van't Veer L.J., Bissell M.J. An “elite hacker”: breast tumors exploit the normal microenvironment program to instruct their progression and biological diversity. // *Cell Adh. Migr.* 2012. V. 6. №3. P. 236–248.
243. Zhang P., Lo A., Huang Y., Huang G. et al. Identification of genetic loci that control mammary tumor susceptibility through the host microenvironment. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8919.
244. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. // *Nature.* 2002. V. 420. P. 860–867.
245. Rani P., Pal D., Hegde R.R., Hashim S.R. Acetamides: chemotherapeutic agents for inflammation-associated cancers. // *J. Chemother.* 2016. V. 28. №4. P. 255–265.
246. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. // *Cell.* 2006. V. 124. P. 263–266.
247. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. // *Cell.* 2010. V. 141. P. 39–51.
248. Ruffell B., Affara N.I., Coussens L.M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. // *Trends Immunol.* 2012. V. 33. P. 119–26.
249. Becker-Weimann S., Xiong G., Furuta S., Han J. et al. NFκB disrupts tissue polarity in 3D by preventing integration of microenvironmental signals. // *Oncotarget.* 2013. V. 4. №11. P. 2010–2020.
250. Brownfield D.G., Venugopalan G., Lo A., Mori H., Tanner K., Fletcher D.F., Bissell M.J. Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules. // *Curr. Biol.* 2013. V. 23. №8. P. 703–709.
251. Yuzhalin A.E., Lim S.Y., Kutikhin A.G., Gordon-Weeks A. Dynamic matrixome: ECM remodeling factors licensing cancer progression and metastasis. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2018. V. 1870. №2. P. 207–228.
252. Brassart-Pasco S., Brézillon S., Brassart B., Ramont L., Oudart J.B., Monboisse J.C. Tumor microenvironment: extracellular matrix alterations influence tumor progression. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 397.
253. Itano N., Kimata K. Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. P. 268–274.
254. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. // *Eur. J. Cell Biol.* 2004. V. 83. №7. P. 317–325.
255. Holmes M.W.A., Bayliss M.T., Muir H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. // *Biochem. J.* 1988. V. 250. P. 435–441.
256. Nikitovic D., Tzardi M., Berdiaki A., Tsatsakis A., Tzanakakis G.N. Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 169–179.

257. Tammi R.H., Kultti A., Kosma V.M., Pirinen R., Auvinen P., Tammi M.I. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. № 4. P. 288–295.
258. Weigel P.H. Hyaluronan Synthase: The mechanism of initiation at the reducing end and a pendulum model for polysaccharide translocation to the cell exterior. // *Int. J. Cell Biol.* 2015. V. 2015. P. 367579.
259. McCarthy J. B., El-Ashry D., Turley E.A. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. P. 48.
260. Li Y., Li L., Brown T.J., Heldin P. Silencing of hyaluronan synthase 2 suppresses the malignant phenotype of invasive breast cancer cells. // *Int. J. Cancer.* 2007. V. 120. P. 2557–2567.
261. Bernert B., Porsch H., Heldin P. Hyaluronan synthase 2 (HAS2) promotes breast cancer cell invasion by suppression of tissue metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1). // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 42349–42359.
262. Koyama H., Hibi T., Isogai Z., Yoneda M. et al. Hyper production of hyaluronan in neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: possible involvement of versican/PDGF-M. // *Am. J. Pathol.* 2007. V. 170. № 3. P. 1086–1099.
263. Simpson M.A., Lokeshwar V.B. Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. // *Front. Biosci.* 2008. V. 13. P. 5664–5680.
264. Tolg C., Liu M., Cousteils K. et al. Cell-specific expression of the transcriptional regulator RHAMM provides a timing mechanism that controls appropriate wound reepithelialization. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 16. P. 5427–5448.
265. Reckamp K.L. Molecular targets beyond the big 3. // *Thorac. Surg. Clin.* 2020. V. 30. № 2. P. 157–164.
266. Morera D.S., Hennig M.S., Talukder A., Lokeshwar S.D. et al. Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets. // *Br. J. Cancer.* 2017. V. 117. № 10. P. 1507–1517.
267. Underhill C.B. and Toole B.P. Binding of hyaluronate to the surface of cultured cells. // *J. Cell Biol.* 1979. V. 82. P. 475–484.
268. Turley E.A. The control of adrenocortical cyto differentiation by extracellular matrix. // *Differentiation.* 1980. V. 17. P. 93–103.
269. Ma X., Pearce J.D., Wilson D.B., English W.P., Edwards M.S., Geary R.L. Loss of the hyaluronan receptor RHAMM prevents constrictive artery wall remodeling. // *J. Vasc. Surg.* 2014. V. 59. № 3. P. 804–813.
270. Toole B.P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. // *Nat. Rev. Cancer.* 2004. V. 4. P. 528–539.
271. Bourguignon L.Y., Wong G., Earle C., Krueger K., Spevak C.C. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 36721–36735.
272. Bohaumilitsky L., Huber A.K., Stork E.M., Wengert S., Woelfl F. and Boehm H. A trickster in disguise: hyaluronan's ambivalent roles in the matrix. // *Front. Oncol.* 2017. V. 7. P. 242.
273. Shigeeda W., Shibazaki M., Yasuhira S., Masuda T. et al. Hyaluronic acid enhances cell migration and invasion via the YAP1/TAZ-RHAMM axis in malignant pleural mesothelioma. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 55. P. 93729–93740.
274. Wu R.L., Huang L., Zhao H.C. and Geng X.P. Hyaluronic acid in digestive cancers. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2017. V. 143. P. 1–16.

275. Samuelsson C., Gustafson S. Studies on the interaction between hyaluronan and a rat colon cancer cell line. // *Glycoconj. J.* 1998. V. 15. №2. P. 169–175.
276. Entwistle J., Hall C.L., Turley E.A. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. // *J. Cell Biochem.* 1996. V. 61. №4. P. 569–577.
277. Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994. V. 6. №5. P. 726–733.
278. Skandalis S.S., Karalis T., Heldin P. Intracellular hyaluronan: importance for cellular functions. // *Semin. Cancer Biol.* 2020. V. 62. P. 20–30.
279. Cyphert J.M., Trepus C.S., Garantzios S. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. // *Int. J. Cell Biol.* 2015. V. 2015. P. 563818.
280. Sato N., Kohi S., Hirata K., Goggins M. Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: once again in the spotlight. // *Cancer Sci.* 2016. V. 277. P. 1939–1956.
281. Misra S., Hascall V.C., Markwald R.R., Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 201.
282. Witschen P.M., Chaffee T.S., Brady N.J., Huggins D.N. et al. Tumor cell associated hyaluronan-CD44 signaling promotes pro-tumor inflammation in breast cancer. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. №5. P. 1325.
283. Senbanjo L. T. and Chellaiiah M.A. CD44: a multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2017. V. 5. P. 18.
284. Gagger A. and Weathington N. Bioactive extracellular matrix fragments in lung health and disease. // *J. Clin. Invest.* 2016. V. 126. P. 3176–3184.
285. Tian X., Azpurua J., Hine C. et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat. // *Nature.* 2013. V. 499. №7458. P. 346–349.
286. Wight T.N. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. // *Matrix Biol.* 2017. V. 60–61. P. 38–56.
287. Avenoso A., D'Ascola A., Scuruchi M., Mandraffino G., Calatroni A., Saitta A., Campo S., Campo G.M. Hyaluronan in experimental injured/inflamed cartilage: *in vivo* studies. // *Life Sci.* 2018. V. 193. P. 132–140.
288. Cortes-Dericks L., Schmid R.A. CD44 and its ligand hyaluronan as potential biomarkers in malignant pleural mesothelioma: evidence and perspectives. // *Respir. Res.* 2017. V. 18. P. 58.
289. Wu R.L., Sedlmeier G., Kyjacova L., Schmaus A., Philipp J., Thiele W., Garvalov B.K., Sleeman J.P. Hyaluronic acid-CD44 interactions promote BMP4/7-dependent Id1/3 expression in melanoma cells. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. №1. P. 14913.
290. Price Z.K., Lokman N.A., Ricciardelli C. Differing Roles of Hyaluronan Molecular Weight on Cancer Cell Behavior and Chemotherapy Resistance. // *Cancers (Basel).* 2018. V. 10. №12. P. 482.
291. Turley E.A. Hyaluronic acid stimulates protein kinase activity in intact cells and in an isolated protein complex. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 8951–8955.
292. Hall C.L., Wang C., Lange L.A. and Turley E.A. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. // *J. Cell Biol.* 1994. V. 126. P. 575–588.
293. Hall C.L., Lange L.A., Prober D.A., Zhang S. and Turley E.A. Pp60 (c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronan receptor RHAMM. // *Oncogene.* 1996. V. 13. P. 2213–22246.

294. Bourguignon L.Y.W., Zhu H., Shao L. and Chen Y.W. CD44 interaction with c-Src kinase promotes cortactin-mediated cytoskeleton function and hyaluronic acid-dependent ovarian tumor cell migration. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. №10. P. 7327–7336.
295. Bourguignon L.Y. W., Zhu H.B., Chu A., Zhang L. and Hung M.C. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. №44. P. 27913–27918.
296. Zhang S., Chang M.C., Zylka D., Turley S., Harrison R. and Turley E.A. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 11342–11348.
297. Lokeshwar V.B. and Selzer M.G. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, micro-vessel, and vein-derived human endothelial cells. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 27641–27649.
298. Schwertfeger K.L., Cowman M.K., Telmer P.G., Turley E.A. and McCarthy J.B. Hyaluronan, inflammation, and breast cancer progression. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 236.
299. Joukov V., Groen A.C., Prokhorova T., Gerson R. et al. The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. // *Cell.* 2006. V. 27. №3. P. 539–552.
300. McCarthy J.B., El-Ashry D., Turley E.A. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. P. 48.
301. Lokeshwar V.B., Rubinowicz D., Schroeder G.L., Forgacs E. et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 11922–11932.
302. Dicker K.T., Gurski L.A., Pradhan-Bhatt S., Witt R.L. et al. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. // *Acta Biomater.* 2014. V. 10. P. 1558–1570.
303. Kato N., Takeda J., Fukase M., Motoyama T. Alternate mucoid and hyalinized stroma in clear cell carcinoma of the ovary: manifestation of serial stromal remodeling. // *Mod. Pathol.* 2010. V. 23. №6. P. 881–888.
304. Solis M.A., Wei Y.H., Chang C.H., Yu C.H., Huang L.H. Hyaluronan Induces a Mitochondrial Functional Switch in Fast-Proliferating Human Mesenchymal Stem. // *Int. J. Stem Cells.* 2020. V. 13. №1. P. 151–162.
305. McAtee C.O., Barycki J.J., Simpson M.A. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy. // *Adv. Cancer Res.* 2014. V. 123. P. 1–34.
306. Bourguignon L.Y.W., Earle C., Shiina M. Activation of matrix hyaluronan-mediated CD44 signaling, epigenetic regulation and chemoresistance in head and neck cancer stem cells. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. №9. pii: E1849.
307. Tan J.X., Wang X.Y., Su X.L., Li H.Y., Shi Y., Wang L., Ren G.S. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e22836.
308. Tan J.X., Wang X.Y., Li H.Y., Su X.L. et al. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. // *Int. J. Cancer.* 2011. V. 128. №6. P. 1303–1315.
309. Wu M., Cao M., He Y., Liu Y. et al. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. // *FASEB. J.* 2015. V. 29. №4. P. 1290–1298.
310. Noble P.W., Lake F.R., Henson P.M., Riches D.W. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-

alpha-dependent mechanism in murine macrophages. // J. Clin. Invest. 1993. V. 91. P. 2368–2377.

311. Kurtzman S. H., Anderson K. H., Wang Y., Miller L. J. et al. Cytokines in human breast cancer: IL-1alpha and IL-1beta expression. // Oncol. Rep. 1999. V. 6. P. 65–70.

312. Patschenko A. G., Pushkar I., Anderson K. H., Wang Y. et al. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. // Int. J. Oncol. 2003. V. 23. № 2. P. 269–284.

313. Nie D. Cyclooxygenases and lipoxygenases in prostate and breast cancers. // Front. Biosci. 2007. V. 12. P. 1574–1585.

314. Bunt S. K., Sinha P., Clements V. K., Leips J., Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. // J. Immunol. 2006. V. 176. P. 284–290.

315. McKee C. M., Lowenstein C. J., Horton M. R., Wu J. et al. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through anuclear factor kappaB-dependent mechanism. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 12. P. 8013–8018.

316. Balkwill F. R. The chemokine system and cancer. // J. Pathol. 2012. V. 226. P. 148–157.

317. Nicolini A., Carpi A., Rossi G. Cytokines in breast cancer. // Cytokine Growth Factor Rev. 2006. V. 17. № 5. P. 325–337.

318. Singh J. K., Farnie G., Bundred N. J., Simoes B. M. et al. Targeting CXCR1/2 significantly reduces breast cancer stem cell activity and increases the efficacy of inhibiting HER2 via HER2-dependent and -independent mechanisms. // Clin. Cancer Res. 2013. V. 19. № 3. P. 643–656.

319. Jiang D., Liang J., Noble P. W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. // Physiol. Rev. 2011. V. 91. P. 221–264.

320. Bohrer L. R., Schwertfeger K. L. Macrophages promote fibroblast growth factor receptor-driven tumor cell migration and invasion in a CXCR2-dependent manner. // Mol. Cancer Res. 2012. V. 10. P. 1294–1305.

321. Fuchs K., Hippe A., Schmaus A., Homey B., Sleeman J. P., Orian-Rousseau V. Opposing effects of high- and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. // Cell Death Dis. 2013. V. 4. P. e819.

322. Burger J. A., Kipps T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. // Blood. 2006. V. 107. P. 1761–1767.

323. Nikitovic D., Kouvidi K., Karamanos N. K., Tzanakakis G. N. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. // Biomed. Res. Int. 2013. V. 2013. P. 929531.

324. Passi A., Vigetti D., Buraschi S., Iozzo R. V. Dissecting the role of hyaluronan synthases in the tumor microenvironment. // FEBS J. 2019. V. 286. № 15. P. 2937–2949.

325. Tolg C., McCarthy J. B., Yazdani A., Turley E. A. Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the “cancerization” of stromal tissues. // Biomed. Res. Int. 2014. V. 2014. P. 103923.

326. How K. N., Yap W. H., Lim C. L. H., Goh B. H., Lai Z. W. Hyaluronic acid-mediated drug delivery system targeting for inflammatory skin diseases: a mini review. // Front. Pharmacol. 2020. V. 11. P. 1105.

327. Hofmann M., Assmann V., Fieber C., Sleeman J. P. et al. Problems with RHAMM: A new link between surface adhesion and oncogenesis? // Cell. 1998. V. 95. P. 591–592.

328. Hardwick C., Hoare K., Owens R., Hohn H. P. et al. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. // J. Cell Biol. 1992. V. 117. P. 1343–1350.

329. Lynn B.D., Li X., Cattini P.A., Turley E.A., Nagy J.I. Identification of sequence, protein isoforms, and distribution of the hyaluronan-binding protein RHAMM in adult and developing rat brain. // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 439. №3. P. 315–330.
330. Choi S., Wang D., Chen X., Tang L.H. et al. Function and clinical relevance of RHAMM isoforms in pancreatic tumor progression. // *Mol. Cancer.* 2019. V. 18. №1. P. 92.
331. Villegas-Ruiz V., Salcedo M., Zentella-Dehesa A., de Oca E.V. et al. A case of cervical cancer expressed three mRNA variant of hyaluronan-mediated motility receptor. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014. V. 7. №5. P. 2256–2264.
332. Stangeland B., Mughal A.A., Grieg Z., Sandberg C. J. et al. Combined expressional analysis, bioinformatics and targeted proteomics identify new potential therapeutic targets in glioblastoma stem cells. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. №28. P. 26192–26215.
333. Zhou H., Wang L., Huang J., Jiang M. et al. High EGFR-1 inside-out activated inflammation-induced motility through SLC2A1-CCNB2-HMMR-KIF11-NUSAP1-PRC1-UBE2C. // *J. Cancer.* 2015. V. 6. №6. P. 519–524.
334. Maxwell C. A., McCarthy J. and Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? // *Journal of Cell Science.* 2008. V. 121. P. 925–932.
335. Nickel W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. // *Traffic.* 2005. V. 6. P. 607–614.
336. Prudovsky I., Tarantini F., Landriscina M., Neivandt D. et al. Secretion without Golgi. // *J. Cell. Biochem.* 2008. V. 103. №5. P. 1327–1343.
337. He Z., Mei L., Connell M., Maxwell C.A. Hyaluronan mediated motility Receptor (HMMR) encodes an evolutionarily conserved homeostasis, mitosis, and meiosis regulator rather than a hyaluronan receptor. // *Cells.* 2020. V. 9. №4. pii: E819.
338. Yang B., Zhang L., Turley E.A. Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. №12. P. 8617–8623.
339. Yang B., Hall C.L., Yang B.L., Savani R.C., Turley E.A. Identification of a novel heparin binding domain in RHAMM and evidence that it modifies HA mediated locomotion of ras-transformed cells. // *J. Cell. Biochem.* 1994. V. 56. P. 455–468.
340. Csoka A.B., Stern R. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ironic acid. // *Glycobiology.* 2013. V. 23. P. 398–411.
341. Assmann V., Jenkinson D., Marshall J.F., Hart I.R. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. P. 3943–3954.
342. Assmann V., Gillett C.E., Poulson R., Ryder K., Hart I.R., Hanby A.M. The pattern of expression of the microtubule-binding protein RHAMM/IHABP in mammary carcinoma suggests a role in the invasive behaviour of tumour cells. // *J. Pathol.* 2001. V. 195. P. 191–196.
343. Maxwell C.A., Keats J.J., Belch A.R., Pilarski L.M., Reiman T. Receptor for hyaluronan-mediated motility correlates with centrosome abnormalities in multiple myeloma and maintains mitotic integrity. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. №3. P. 850–860.
344. Tolg C., Hamilton S.R., Morningstar L., Zhang J. et al. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. №34. P. 26461–26474.
345. Maxwell C.A., Keats J.J., Crainie M., Sun X. et al. RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. // *Mol. Biol. Cell.* 2003. V. 14. P. 2262–2276.
346. Song L., Rape M. Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex. // *Mol. Cell.* 2010. V. 38. P. 369–382.

347. Bulinski J.C., Borisy G.G. Immunofluorescence localization of HeLa cell microtubule-associated proteins on microtubules *in vitro* and *in vivo*. // J. Cell Biol. 1980. V. 87. (3 Pt 1). P. 792–801.
348. Chapin S.J., Bulinski J.C. Cellular microtubules heterogeneous in their content of microtubule-associated protein 4 (MAP4). // Cell Motil. Cytoskeleton. 1994. V. 27. № 2. P. 133–149.
349. Dunsch A.K., Hammond D., Loyd J., Schermelleh L., Gruneberg U., Barr F.A. Dynein light chain 1 and a spindle-associated adaptor promote dynein asymmetry and spindle orientation. // J. Cell Biol. 2012. V. 198. P. 1039–1054.
350. Fulcher L.J., He Z., Mei L., McCartney T. J. et al. FAM83D directs protein kinase CK1 α to the mitotic spindle for proper spindle positioning. // EMBO. Rep. 2019. V. 20. № 9. P. e47495.
351. Li J., Shima H., Nishizawa H., Ikeda M. et al. Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR. // Biochem. J. 2018. V. 475. № 5. P. 981–1002.
352. Chu T.L. H., Connell M., Zhou L., He Z., Won J. et al. Cell cycle-dependent tumor engraftment and migration are enabled by aurora-A. // Mol. Cancer Res. 2018. V. 16. P. 16–31.
353. Silverman-Gavrila R., Silverman-Gavrila L., Hou G., Zhang M., Charlton M., Bendeck M.P. Rear polarization of the microtubule-organizing center in neointimal smooth muscle cells depends on PKC α , ARPC5, and RHAMM. // Am. J. Pathol. 2011. V. 178. № 2. P. 895–910.
354. Nousiainen M., Sillje H.H., Sauer G., Nigg E.A., Korner R. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 5391–5396.
355. Wittmann T., Boleti H., Antony C., Karsenti E., Vernos I. Localization of the kinesin-like protein Xklp² to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. // J. Cell Biol. 1998. V. 143. P. 673–685.
356. Boleti H., Karsenti E., Vernos I. Xklp², a novel *Xenopus* centrosomal kinesin-like protein required for centrosome separation during mitosis. // Cell. 1996. V. 84. P. 49–59.
357. Garrido G., Vernos I. Non-centrosomal TPX2-dependent regulation of the aurora A kinase: functional implications for healthy and pathological cell division. // Front. Oncol. 2016. V. 6. P. 88.
358. Groen A.C., Cameron L.A., Coughlin M., Miyamoto D.T., Mitchison T.J., Ohi R. XRHAMM functions in ran-dependent microtubule nucleation and pole formation during anastral spindle assembly. // Curr. Biol. 2004. V. 14. № 20. P. 1801–1811.
359. Chen H., Mohan, P., Jiang J., Nemirovsky O. et al. Spatial regulation of Aurora A activity during mitotic spindle assembly requires RHAMM to correctly localize TPX2. // Cell Cycle. 2014. V. 13. P. 2248–2261.
360. Scrofani J., Sardon T., Meunier S., Vernos I. Microtubule nucleation in mitosis by a Ran GTP-dependent protein complex. // Curr. Biol. 2015. V. 25. P. 131–140.
361. Chen H., Connell M., Mei L., Reid G.S.D., Maxwell C.A. The non-motor adaptor HMMR dampens Eg5-mediated forces to preserve the kinetics and integrity of chromosome segregation. // Mol. Biol. Cell. 2018. V. 29. P. 786–796.
362. Eibes S., Gallisa-Sune N., Rosas-Salvans M., Martinez-Delgado P., Vernos I., Roig J. Nek9 phosphorylation defines a new role for TPX2 in Eg5-dependent centrosome separation before nuclear envelope breakdown. // Curr. Biol. 2018. V. 28. P. 121–129.
363. Tolg C., Hamilton S.R., Nakrieko K.A., Kooshesh F. et al. Rhamm^{-/-} fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. // J. Cell Biol. 2006. V. 175. P. 1017–1028.

364. Li H., Moll J., Winkler A., Frappart L. et al. RHAMM deficiency disrupts folliculogenesis resulting in female hypofertility. // *Biol. Open*. 2015. V. 4. P. 562–571.
365. Kyykallio H., Oikari S., Bueno Álvez M., Gallardo Dodd C.J., Capra J., Rilla K. The density and length of filopodia associate with the activity of hyaluronan synthesis in tumor cells. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. №7. P. 1908.
366. Toole B. P. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 7462–7468.
367. Chen Y.T., Chen Z., Du Y.N. Immunohistochemical analysis of RHAMM expression in normal and neoplastic human tissues: a cell cycle protein with distinctive expression in mitotic cells and testicular germ cells. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. №30. P. 20941–20952.
368. Mohapatra S., Yang X., Wright J.A., Turley E.A., Greenberg A.H. Soluble hyaluronan receptor RHAMM induces mitotic arrest by suppressing Cdc2 and cyclin B1 expression. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. P. 1663–1668.
369. Sohr S., Engeland K. RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. №21. P. 3448–3460.
370. Akiyama Y., Jung S., Salhia B. et al. Hyaluronate receptors mediating glioma cell migration and proliferation. // *J. Neurooncol.* 2001. V. 53. №2. P. 115–127.
371. Wang C., Thor A. D., Moore D. H., Zhao Y. et al. The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression. // *Clin. Cancer. Res.* 1998. V. 4. №3. P. 567–576.
372. Misra S., Hascall V.C., Markwald R.R., Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 201.
373. Song J.M., Im J., Nho R.S., Han Y.H., Upadhyaya P., Kassie F. Hyaluronan-CD44/RHAMM interaction-dependent cell proliferation and survival in lung cancer cells. // *Mol. Carcinog.* 2019. V. 58. №3. P. 321–333.
374. Manzanares D., Monzon M.-E., Savani R.C., Salathe M. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007. V. 37. №2. P. 160–168.
375. Hamilton S.R., Fard S.F., Paiwand F.F., Tolg C. et al. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. №22. P. 16667–16680.
376. Du Y.C., Lewis B.C., Hanahan D., Varmus H. Assessing tumor progression factors by somatic gene transfer into a mouse model: Bcl-xL promotes islet tumor cell invasion. // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. P. e276.
377. Hatano H., Shigeishi H., Kudo Y., Higashikawa K., Tobiume K., Takata T., Kamata N. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR. // *Lab. Invest.* 2011. V. 91. №3. P. 379–391.
378. Benitez A., Yates T.J., Shamaldevi N., Bowen T., Lokeshwar V.B. Dietary supplement hymecromone and sorafenib: a novel combination for the control of renal cell carcinoma. // *J. Urol.* 2013. V. 190. №1. P. 285–290.
379. Shigeishi H., Higashikawa K., Takechi M. Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2014. V. 140. №10. P. 1629–1640.
380. Tolg C., Hamilton S.R., Morningstar L., Zhang J. et al. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1/2 activity. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. №34. P. 26461–26474.

381. Park D., Kim Y., Kim H., Kim K. et al. Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ . // *Mol. Cells*. 2012. V. 33. №6. P. 563–574.
382. Rozengurt E., Sinnett-Smith J., Eibl G. Yes-associated protein (YAP) in pancreatic cancer: at the epicenter of a targetable signaling network associated with patient survival. // *Signal Transduct. Target Ther.* 2018. V. 3. P. 11.
383. Garantziotis S., Savani R.C. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. // *Matrix Biol.* 2019. V. 78–79. P. 1–10.
384. Mascaró M., Pibuel M.A., Lompardía S.L., Díaz M. et al. Low molecular weight hyaluronan induces migration of human choriocarcinoma JEG-3 cells mediated by RHAMM as well as by PI3K and MAPK pathways. // *Histochem. Cell Biol.* 2017. V. 148. №2. P. 173–187.
385. Ye S., Liu Y., Fuller A.M., Katti R., Ciotti G.E. et al. TGF β and hippo pathways cooperate to enhance sarcomagenesis and metastasis through the hyaluronan-mediated motility receptor (HMMR). // *Mol. Cancer Res.* 2020. V. 18. №4. P. 560–573.
386. Hatano H., Shigeishi H., Kudo Y., Higashikawa K., Tobiume K., Takata T., Kamata N. Overexpression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in MC3T3-E1 cells induces proliferation and differentiation through phosphorylation of ERK1/2. // *J. Bone Miner. Metab.* 2012. V. 30. №3. P. 293–303.
387. Kouvidi K., Berdiaki A., Nikitovic D., Katonis P. et al. Role of receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) in low molecular weight hyaluronan (LMWHA) – mediated fibrosarcoma cell adhesion. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. №44. P. 38509–38520.
388. Du Y.C., Chou C.K., Klimstra D.S., Varmus H. Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. №40. P. 16753–16758.
389. Foley J.P., Lam D., Jiang H., Liao J., Cheong N. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2), transforming growth factor- β , hyaluronan (HA), and receptor for HA-mediated motility (RHAMM) are required for surfactant protein A-stimulated macrophage chemotaxis. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. №44. P. 37406–37419.
390. Qadri M., Almadani S., Jay G.D., Elsaid K.A. Role of CD44 in regulating TLR2 activation of human macrophages and downstream expression of pro-inflammatory cytokines. // *J. Immunol.* 2018. V. 200. №2. P. 758–767.
391. Liang J., Zhang Y., Xie T., Liu N. et al. Hyaluronan and TLR4 promote surfactant-protein-C-positive alveolar progenitor cell renewal and prevent severe pulmonary fibrosis in mice. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. №11. P. 1285–1293.
392. Makkar S., Riehl T.E., Chen B., Yan Y. et al. Hyaluronic acid binding to TLR4 promotes proliferation and blocks apoptosis in colon cancer. // *Mol. Cancer Ther.* 2019. V. 18. №12. P. 2446–2456.
393. Banerji S., Hide B.R., James J.R., Noble M.E., Jackson D.G. Distinctive properties of the hyaluronan-binding domain in the lymphatic endothelial receptor Lyve-1 and their implications for receptor function. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 10724–10735.
394. Bissell M.J., Radisky D.C., Rizki A., Weaver V.M., Petersen O.W. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. // *Differentiation*. 2002. V. 70. P. 537–46.
395. McCarthy J. B., El-Ashry D. and Turley E.A. Hyaluronan, cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in malignant progression. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. P. 48.

396. Gately C.L., Muul L.M., Greenwood M.A., Papazoglou S. et al. *In vitro* studies on the cell-mediated immune response to human brain tumors. II. Leukocyte-induced coats of glycosaminoglycan increase the resistance of glioma cells to cellular immune attack. // *J. Immunol.* 1984. V. 133. №6. P. 3387–3395.
397. Gao F., Yang C.X., Mo W., Liu Y.W., He Y.Q. Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. // *Clin. Invest. Med.* 2008. V. 31. №3. P. E106–E116.
398. Liu N., Gao F., Han Z., Xu X., Underhill C.B., Zhang L. Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 5207–5214.
399. Simpson M.A., Wilson C.M., McCarthy J.B. Inhibition of prostate tumor cell hyaluronan synthesis impairs subcutaneous growth and vascularization in immunocompromised mice. // *Am. J. Pathol.* 2002. V. 161. P. 849–857.
400. Stern R., Jedrzejewski M.J. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. // *Chem. Rev.* 2006. V. 106. P. 818–839.
401. Turley E.A., Tretiak M. Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants *in vivo* and *in vitro*. // *Cancer Res.* 1985. V. 45. P. 5098–5105.
402. Liu M., Tolg C., Turley E. Dissecting the dual nature of hyaluronan in the tumor microenvironment. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 947.
403. Zhang L., Underhill C.B., Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. // *Cancer Res.* 1995. V. 55. P. 428–433.
404. Heldin P., Basu K., Kozlova I., Porsch H. HAS2 and CD44 in breast tumorigenesis. // *Adv. Cancer Res.* 2014. V. 123. P. 211–229.
405. Itano N., Zhuo L., Kimata K. Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. // *Cancer Sci.* 2008. V. 99. P. 1720–1725.
406. Zhu H., Mitsuhashi N., Klein A., Barsky L.W. et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. // *Stem Cells.* 2006. V. 24. №4. P. 928–935.
407. West D.C., Kumar S. Hyaluronan and angiogenesis. // *Ciba Found. Symp.* 1989. V. 143. P. 187–201.
408. Nagy N., Kuipers H.F., Frymoyer A.R., Ishak H.D. et al. 4-Methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 123.
409. Bohrer L.R., Chuntova P., Bade L.K., Beadnell T.C. et al. Activation of the FGFR-STAT3 pathway in breast cancer cells induces a hyaluronan-rich microenvironment that licenses tumor formation. // *Cancer Res.* 2014. V. 74. P. 374–386.
410. Kultti A., Pasonen-Seppanen S., Jauhainen M., Rilla K.J. et al. 4-methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and down regulation of hyaluronan synthase 2 and 3. // *Exp. Cell Res.* 2009. V. 315. №11. P. 1914–1923.
411. Saito T., Tamura D., Nakamura T., Makita Y. et al. 4-methylumbelliferone leads to growth arrest and apoptosis in canine mammary tumor cells. // *Oncol. Rep.* 2013. V. 29. P. 335–342.
412. Lokeshwar V.B., Lopez L.E., Munoz D., Chi A. et al. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-methylumbelliferone in prostate cancer cells. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. №7. P. 2613–2623.
413. Piccioni F., Malvicini M., Garcia M.G., Rodriguez A. et al. Antitumor effects of hyaluronic acid inhibitor 4-methylumbelliferone in an orthotopic hepatocellular carcinoma model in mice. // *Glycobiology.* 2012. V. 22. P. 400–410.
414. Okuda H., Kobayashi A., Xia B., Watabe M. et al. Hyaluronan synthase HAS2 promotes tumor progression in bone by stimulating the interaction of breast cancer

stem-like cells with macrophages and stromal cells. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. №2. P. 537–547.

415. Urakawa H., Nishida Y., Wasa J., Arai E. et al. Inhibition of hyaluronan synthesis in breast cancer cells by 4-methylumbelliferone suppresses tumorigenicity *in vitro* and metastatic lesions of bone *in vivo*. // *Int. J. Cancer.* 2012. V. 130. №2. P. 454–466.

416. Lokeshwar V.B., Mirza S., Jordan A. Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy. // *Adv. Cancer Res.* 2014. V. 123. P. 35–65.

417. Whatcott C.J., Han H., Posner R.G., Hostetter G., Von Hoff D.D. Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look. // *Cancer Discov.* 2011. V. 1. P. 291–296.

418. Provenzano P.P., Cuevas C., Chang A.E., Goel V.K., Von Hoff D.D., Hingorani S.R. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. // *Cancer Cell.* 2012. V. 21. P. 418–429.

419. Jacobetz M.A., Chan D.S., Neesse A., Bapiro T.E. et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. // *Gut.* 2013. V. 62. P. 112–120.

420. Lee J.H., Moore L.D., Kumar S., Pritchard D.G., Ponnazhagan S., Deivanayagam C. Bacteriophage hyaluronidase effectively inhibits growth, migration and invasion by disrupting hyaluronan-mediated Erk1/2 activation and RhoA expression in human breast carcinoma cells. // *Cancer Lett.* 2010. V. 298. P. 238–249.

421. Mummert M.E., Mohamadzadeh M., Mummert D.I., Mizumoto N., Takashima A. Development of a peptide inhibitor of hyaluronan-mediated leukocyte trafficking. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 192. P. 769–779.

422. Khurana S.S., Riehl T.E., Moore B.D., Fassan M. et al. The hyaluronic acid receptor CD44 coordinates normal and metaplastic gastric epithelial progenitor cell proliferation. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. №22. P. 16085–16097.

423. Campo G.M., Avenoso A., D'Ascola A., Nastasi G. et al. Combined treatment with hyaluronan inhibitor Pep-1 and a selective adenosine A2 receptor agonist reduces inflammation in experimental arthritis. // *Innate Immun.* 2013. V. 19. №5. P. 462–478.

424. Campo G.M., Micali A., Avenoso A., D'Ascola A. et al. Inhibition of small HA fragment activity and stimulation of A adenosine receptor pathway limit apoptosis and reduce cartilage damage in experimental arthritis. // *Histochem. Cell Biol.* 2015. V. 143. №5. P. 531–543.

425. Mummert M.E., Mummert D.I., Ellinger L., Takashima A. Functional roles of hyaluronan in B16-F10 melanoma growth and experimental metastasis in mice. // *Mol. Cancer Ther.* 2003. V. 2. P. 295–300.

426. Tolg C., Hamilton S.R., Zalinska E., McCulloch L., Amin R., Akentieva N.P. et al. A RHAMM mimetic peptide blocks hyaluronan signaling and reduces inflammation and fibrogenesis in excisional skin wounds. // *Am. J. Pathol.* 2012. V. 181. №4. P. 1250–1270.

427. Xu X.M., Chen Y., Chen J., Yang S., Gao F., Underhill C.B., Creswell K., Zhang L. A peptide with three hyaluronan binding motifs inhibits tumor growth and induces apoptosis. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 5685–5690.

428. Jiang J., Casalegno-Garduno R., Chen H., Schmitt A., Schmitt M., Maxwell C.A. Multifunctional proteins bridge mitosis with motility and cancer with inflammation and arthritis. // *Scientific World Journal.* 2010. V. 10. P. 1244–1257.

429. Wolf K.J., Kumar S. Hyaluronic Acid: incorporating the bio into the material. // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019. V. 5. №8. P. 3753–3765.

430. Buttermore S.T., Hoffman M.S., Kumar A., Champeaux A., Nicosia S.V., Kruk P.A. Increased RHAMM expression relates to ovarian cancer progression. // *J. Ovarian Res.* 2017. V. 10. №1. P. 66.

431. Song J.M., Molla K., Anandharaj A. et al. Triptolide suppresses the *in vitro* and *in vivo* growth of lung cancer cells by targeting hyaluronan-CD44/RHAMM signaling. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 16. P. 26927–26940.
432. Gust K.M., Hofer M.D., Perner S.R., Kim R. et al. RHAMM (CD168) is overexpressed at the protein level and may constitute an immunogenic antigen in advanced prostate cancer disease. // *Neoplasia*. 2009. V. 11. № 9. P. 956–963.
433. Chi A., Shirodkar S.P., Escudero D.O., Ekwenna O.O. et al. Molecular characterization of kidney cancer: association of hyaluronic acid family with histological subtypes and metastasis. // *Cancer*. 2012. V. 118. № 9. P. 2394–2402.
434. Jordan A.R., Lokeshwar S.D., Lopez L.E. et al. Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid fragments in pre-clinical models of bladder cancer. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 15. P. 24262–24274.
435. Katz B.Z. Adhesion molecules – the lifelines of multiple myeloma cells. // *Semin. Cancer Biol.* 2010. V. 20. № 3. P. 186–195.
436. Snauwaert S., Vanhee S., Goetgeluk G., Verstichel G. et al. RHAMM/HMMR (CD168) is not an ideal target antigen for immunotherapy of acute myeloid leukemia. // *Haematologica*. 2012. V. 97. № 10. P. 1539–1547.
437. Koelzer V.H., Huber B., Mele V., Iezzi G., Trippel M., Karamitopoulou E., Zlobec I., Lugli A. Expression of the hyaluronan-mediated motility receptor RHAMM in tumor budding cells identifies aggressive colorectal cancers. // *Hum. Pathol.* 2015. V. 46. № 11. P. 1573–1581.
438. Li H., Guo L., Li J.W., Liu N., Qi R., Liu J. Expression of hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in stomach cancers: relevance with tumor progression. // *Int. J. Oncol.* 2000. V. 17. № 5. P. 927–932.
439. Sironen R.K., Tammi M., Tammi R., Auvinen P.K., Anttila M., Kosma V.M. Hyaluronan in human malignancies. // *Exp. Cell Res.* 2011. V. 31. № 4. P. 383–391.
440. Midgley A.C., Rogers M., Hallett M.B. et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 21. P. 14824–14838.
441. Kasiński R., Tchórzewski H. Hyaluronan-mediated regulation of inflammation. // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2007. V. 61. P. 683–689.
442. Misra S., Hascall V.C., Markwald R.R., Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 201.
443. Tijink B.M., Buter J., de Bree R., Giaccone G. et al. A phase I dose escalation study with anti-CD44v6 bivatuzumab mertansine in patients with incurable squamous cell carcinoma of the head and neck or esophagus. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. P. 6064–6072.
444. Bilusic M., Madan R.A. Therapeutic cancer vaccines: the latest advancement in targeted therapy. // *Am. J. Ther.* 2012. V. 19 (6). P. e172–181.
445. Weber J.S. The clinical utility of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 abrogation by human antibodies. // *Melanoma Res.* 2006. V. 16. P. 379–383.
446. Saleh F., Renno W., Klepacek I., Ibrahim G. et al. Melanoma immunotherapy: past, present, and future. // *Curr. Pharm. Des.* 2005. V. 11. P. 3461–3473.
447. Lee S.Y., Jeoung D. The reverse proteomics for identification of tumor antigens. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 17. P. 879–890.
448. Wang Y., Gu Q., Liu B., Zhu Z. Perspectives of SEREX-defined antigens in diagnosis and immunotherapy for gastric cancer. // *Cancer Biol. Ther.* 2004. V. 3. P. 806–811.

449. Bergin B.J., Pierce S.W., Bramlage L.R., Stromberg A. Oral hyaluronan gel reduces post operative tarsocrural effusion in the yearling thoroughbred. // *Equine Vet J.* 2006. V. 38. P. 375–378.
450. Greiner J., Ringhoffer M., Taniguchi M., Schmitt A. et al. Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia. // *Exp. Hematol.* 2002. V. 30. P. 1029–1035.
451. Nagel S., Hirschmann P., Dirnhofer S., Günthert U., Tzankov A. Co-expression of CD44 variant isoforms and receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM, CD168) is an international prognostic index and C-MYC gene status-independent predictor of poor outcome in diffuse large B-cell lymphomas. // *Exp. Hematol.* 2010. V. 38. P. 38–45.
452. Maxwell C.A., Rasmussen E., Zhan F., Keats J.J. et al. RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. // *Blood.* 2004. V. 104. P. 1151–1158.
453. Assmann V., Marshall J.F., Fieber C., Hofmann M., Hart I.R. The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells. // *J. Cell Sci.* 1998. V. 111 (Pt 12). P. 1685–1694.
454. Zlobec I., Baker K., Terracciano L., Peter S. et al. Two-marker protein profile predicts poor prognosis in patients with early rectal cancer. // *Br. J. Cancer.* 2008. V. 99. P. 1712–1717.
455. Karamitopoulou E., Lugli A., Panayiotides I., Karakitsos P. et al. Systematic assessment of protein phenotypes characterizing high-grade tumour budding in mismatch repair-proficient colorectal cancer. // *Histopathology.* 2010. V. 57. P. 233–243.
456. Giannopoulos K., Mertens D., Bühler A., Barth T.F. et al. The candidate immune therapeutical target, the receptor for hyaluronin acid-mediated motility, is associated with proliferation and shows prognostic value in B-cell chronic lymphocytic leukemia. // *Leukemia.* 2009. V. 23. P. 519–527.
457. Tzellos T., Kyrgidis A., Vahsevanos K., Triaridis S. et al. Nodular basal cell carcinoma is associated with increased hyaluronan homeostasis. // *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2010. V. 25. P. 679–687.
458. Burnett A., Wetzler M., Lowenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. // *J. Clin. Oncol.* 2011. V. 29. P. 487–494.
459. Van Luijn M.M., van den Ancker W., Chamuleau M.E., Ossenkoppele G.J., van Ham S.M., van de Loosdrecht A.A. Impaired antigen presentation in neoplasia: basic mechanisms and implications for acute myeloid leukemia. // *Immunotherapy.* 2010. V. 2. P. 85–97.
460. Schmitt M., Casalegno-Garduño R., Xu X., Schmitt A. Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia. // *Expert. Rev. Vaccines.* 2009. V. 8. P. 1415–1425.
461. Foster A.E., Okur F.V., Biagi E., Lu A. et al. Selective elimination of a chemoresistant side population of B-CLL cells by cytotoxic T lymphocytes in subjects receiving an autologous hCD40L/IL-2 tumor vaccine. // *Leukemia.* 2010. V. 2. №3. P. 563–572.
462. Greiner J., Schmitt A., Giannopoulos K., Rojewski M.T. et al. High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloidleukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma. // *Haematologica.* 2010. V. 95. №7. P. 1191–1197.
463. Schmitt M., Schmitt A., Rojewski M.T., Chen J. et al. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acutemyeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myelomaelicits immunologic and clinical responses. // *Blood.* 2008. V. 111. P. 1357–1365.

464. Giannopoulos K., Dmoszynska A., Kowal M., Rolinski J. et al. Peptide vaccination elicits leukemia-associated antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T-cell responses in patients with chronic lymphocytic leukemia. // *Leukemia*. 2010. V. 24. P. 798–805.
465. Yang H.S., Zhang D.M., Deng H.X., Peng F., Wei Y.Q. Antitumor and anti-angiogenesis immunity induced by CR-SEREX-identified *Xenopus* RHAMM. // *Cancer Sci*. 2010. V. 101. P. 862–868.
466. Amano T., Kajiwaru K., Yoshikawa K., Morioka J. et al. Antitumor effects of vaccination with dendritic cells transfected with modified receptor for hyaluronan-mediated motility mRNA in a mouse glioma model. // *J. Neurosurg*. 2007. V. 106. P. 638–645.
467. Daniels M.J., Brough D. Unconventional pathways of secretion contribute to inflammation. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18. № 1. P. 102.
468. Otto T., Horn S., Brockmann M., Eilers U. et al. Stabilization of N-Myc is a critical function of aurora A in human neuroblastoma. // *Cancer Cell*. 2009. V. 15. P. 67–78.
469. Capasso M., Devoto M., Hou C., Asgharzadeh S. et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. // *Nat. Genet*. 2009. V. 41. P. 718–723.
470. Matou-Nasri S., Gaffney J., Kumar S., Slevin M. Oligosaccharides of hyaluronan induce angiogenesis through distinct CD44 and RHAMM-mediated signalling pathways involving Cdc² and gamma-adducin. // *Int. J. Oncol*. 2009. V. 35. № 4. P. 761–773.
471. Ziebell M.R., Zhao Z.G., Luo B., Luo Y., Turley E.A., Prestwich G.D. Peptides that mimic glycosaminoglycans: high-affinity ligands for a hyaluronan binding domain. // *Chem. Biol*. 2001. V. 8. P. 1081–1094.
472. Amemiya K., Nakatani T., Saito A., Suzuki A., Munakata H. Hyaluronan-binding motif identified by panning a random peptide display library. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1724. P. 94–99.
473. Toole B.P., Hascall V.C. Hyaluronan and tumor growth. // *Am. J. Pathol*. 2002. V. 161. № 3. P. 745–747.
474. Ziebell M.R., Prestwich G.D. Interactions of peptide mimics of hyaluronic acid with the receptor for hyaluronan mediated motility (RHAMM). // *J. Comput. Aided Mol. Des*. 2004. V. 18. № 10. P. 597–614.
475. Hauser-Kawaguchi A., Luyt L.G., Turley E. Design of peptide mimetics to block pro-inflammatory functions of HA fragments. // *Matrix Biol*. 2019. V. 78–79. P. 346–356.
476. Hauser-Kawaguchi A., Tolg C., Peart T., Milne M., Turley E.A., Luyt L.G. A truncated RHAMM protein for discovering novel therapeutic peptides. // *Bioorg. Med. Chem*. 2018. V. 26 (18). P. 5194–5203.
477. Bourguignon LYW. Matrix hyaluronan-CD44 interaction activates microRNA and lncRNA signaling associated with chemoresistance, invasion, and tumor progression. // *Front. Oncol*. 2019. V. 9. P. 492.
478. Yang B., Yang B.L., Savani R.C. and Turley E.A. Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein. // *EMBO J*. 1994. V. 13. № 2. P. 286–296.
479. Nogales E. Structural insight into microtubule function. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*. 2001. V. 30. P. 397–420.
480. Chau M.F., Radeke M.J., de Ines C., Barasoain I., Kohlstaedt L.A. and Feinstein S.C. The microtubule-associated protein Tau cross-links to two distinct sites on each alpha and beta tubulin monomer via separate domains. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. № 51. P. 17692–17703.

481. Downing K. H. and Nogales E. Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. // *Cell Struct. Funct.* 1999. V. 24. P. 269–275.
482. Sackett D. L., Bhattacharyya B. and Wolff J. Tubulin subunit carboxyl termini determine polymerization efficiency. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 1. P. 43–45.
483. Manning J. and Kumar S. NEDD1: function in microtubule nucleation, spindle assembly and beyond. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007. V. 39. P. 7–11.
484. Inclán Y. F., Nogales E. Structural models for the self-assembly and microtubule interactions of gamma-, delta- and epsilon-tubulin. // *J. Cell Sci.* 2001. V. 114 (Pt 2). P. 413–422.
485. Chen Z., Chen L. H., Akentieva N., Lichti C. F., Darbandi R., Hastings R., Lichti Ch. F., Gross J., Covey D. F., Reichert D. E., Townsend R., Evers A. S. A neurosteroid analogue photolabeling reagent labels the colchicines-binding site on tubulin: a mass spectrometric analysis. // *Electrophoresis.* 2012. V. 33. № 4. P. 666–674.
486. Lopus M. Editorial: tubulin-targeted cancer chemotherapeutics: advances and challenges. // *Curr. Top Med. Chem.* 2017. V. 17. № 22. P. 2522.
487. Duan Y., Liu W., Tian L., Mao Y., Song C. Targeting tubulin-colchicine site for cancer therapy: inhibitors, antibody- drug conjugates and degradation agents. // *Curr. Top Med. Chem.* 2019. V. 19. № 15. P. 1289–1304.
488. Skiniotis G., Cochran J. C., Müller J., Mandelkow E., Gilbert S. P., Hoenger A. Modulation of kinesin binding by the C-termini of tubulin. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 5. P. 989–999.
489. Day A. J. and Prestwich G. D. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 7. P. 4585–4588.
490. Bryan P. N. Protein engineering of subtilisin. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1543. P. 203–222.
491. Perschl A., Lesley J., English N., Trowbridge I., Hyman R. Role of CD44 cytoplasmic domain in hyaluronan binding. // *Eur. J. Immunol.* 1995. V. 25. № 2. P. 495–501.
492. Heldin P., Basu K., Olofsson B., Porsch H., Kozlova I., Kahata K. Deregulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. // *J. Biochem.* 2013. V. 154. № 5. P. 395–408.
493. Bourguignon L. Y., Wong G., Shiina M. Up-regulation of histone methyltransferase, DOT1L, by matrix hyaluronan promotes microRNA-10 expression leading to tumor cell invasion and chemoresistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 20. P. 10571–10585.
494. Montgomery N., Hill A., McFarlane S., Neisen J. et al. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. // *Breast Cancer Res.* 2012. V. 14. № 3. P. R84.
495. Veiseh M. and Turley E. A. Hyaluronan metabolism in remodeling extracellular matrix: probes for imaging and therapy of breast cancer. // *Integr. Biol. (Camb).* 2011. V. 3. № 4. P. 304–315.
496. Kim J. Tumor initiating but differentiated luminal-like breast cancer cells are highly invasive in the absence of basal-like activity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 16. P. 6124–6129.
497. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: A looking glass for cancer? // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. V. 12. № 5. P. 323–334.
498. Moore N. M., Kuhn N. Z., Hanlon S. E. et al. De-convoluting cancer's complexity: using a "physical sciences lens" to provide a different (clearer) perspective of cancer. // Preface. *Phys. Biol.* 2011. V. 8. № 1. P. 23–28.
499. Veiseh M., Kwona D., Borowsky A. et al. Cellular heterogeneity profiling by hyaluronan probes reveals an invasive but slow-growing breast tumor subset. // *PNAS.* 2014. P. 1731–1739.

500. Smith T.C., Fang Z., Luna E.J. Novel interactors and a role for supervillin in early cytokinesis. // *Cytoskeleton* (Hoboken). 2010. V. 67. №6. P. 346–364.
501. Xu L., Cai J., Yang Q., Ding H., Wu L., Li T., Wang Z. Prognostic significance of several biomarkers in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis of published studies. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2013. V. 139. P. 1257–1277.
502. Rizzardi A.E., Vogel R.I., Koopmeiners J.S., Forster C.L., Marston L.O., Rosener N.K., Akentieva N. et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors. // *Cancer*. 2014. V. 120. №12. P. 1800–1809.
503. Efremov R.G., Baradaran R., Sazanov L.A. The architecture of respiratory complex I. // *Nature*. 2010. V. 465. №7297. P. 441–445.
504. Manskikh V.N. Pathways of cell death and their biological importance. // *Tsitologiya*. 2007. V. 49. №11. P. 909–915.
505. Akentieva N.P., Shushanov S.S., Kotelnikov A.I. Effects of RHAMM/HMMR-selective peptides on survival of breast cancer cells. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015. V. 159. №5. P. 618–621.
506. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Inhibitory effect of RHAMM-target peptides on invasion of breast cancer cells. // *Problems in oncology*. 2016. V. 62. №6. P. 831–837.
507. Bröker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. №9. P. 3155–3162.
508. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Visualization of ovarian cancer cells with peptide VEGEGEGEEY. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2018. V. 12. №2. P. 189–198.
509. Akentieva N.P. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells. // *EuroBiotechnology J.* 2017. V. 1. P. 138–148.
510. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Inhibition of cancer cell invasiveness by the synthetic peptides GEGEEGEE and DFGEEAEE. // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2017. V. 11. №1. P. 24–34.
511. Teicher B.A., Andrews P.A. *Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval.* // Second ed. Totowa, New Jersey: Humana Press. 2004. P. 1–250.
512. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* М.: Гриф и К. 2012. С. 642–657.
513. Misra S., Heldin P., Hascall V.C., Karamanos N.K., Skandalis S.S., Markwald R.R. and Ghatak S. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. // *FEBS J*278. 2011. P. 1429–1443.
514. Babasola O., Rees-Milton K. J., Bebe S., Wang J., Anastassiades T. P. Chemically modified N-acylated hyaluronan fragments modulate proinflammatory cytokine production by stimulated human macrophages. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. №36. P. 24779–24791.
515. Toole B.P. and Slomiany M.G. Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. P. 244–250.
516. Toole B.P., Ghatak S. and Misra S. Hyaluronan oligosaccharides as a potential anticancer therapeutic. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9. P. 249–252.
517. Foell D., Wittkowski H., Roth J. Mechanisms of disease: a “DAMP” view of inflammatory arthritis. // *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2007. V. 3. №7. P. 382–390.
518. Turley E.A. and Naor D. RHAMM and CD44 peptides-analytic tools and potential drugs. // *Front. Biosci.* 2010. V. 17. P. 1775–1794.

519. Veiseh M., Leith S.J., Tolg C. et al. Uncovering the dual role of RHAMM as an HA receptor and a regulator of CD44 expression in RHAMM-expressing mesenchymal progenitor cells. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2015. V. 3. P. 63.
520. Zhang J.G., Czabotar P.E., Policheni A.N., Caminschi I. et al. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. // *Immunity*. 2010. V. 36. P. 646–657.
521. Podor T.J., Singh D., Chindemi P., Foulon D.M. et al. Vimentin exposed on activated platelets and platelet microparticles localizes vitronectin and plasminogen activator inhibitor complexes on their surface. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 7529–7539.
522. Takeda M., Ogino S., Umemoto R. et al. Ligand-induced structural changes of the CD44 hyaluronan-binding domain revealed by NMR. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 52. P. 40089–40095.
523. Wong J.W.H., Hogg P.J. Analysis of disulfide bonds in protein structures. // *J. Thromb. Haemost.* 2010. P. 2345–2345.
524. Kellett-Clarke H., Stegmann M., Barclay A.N., Metcalfe C. CD44 Binding to Hyaluronic Acid Is Redox Regulated by a Labile Disulfide Bond in the Hyaluronic Acid Binding Site. // *PLOS ONE*. 2015. P. 1–18.
525. Devred F., Barbier P., Lafitte D., Landrieu I., Lippens G. and Peyrot V. Microtubule and MAPs: thermodynamics of complex formation by AUC, ITC, fluorescence, and NMR. // *Methods Cell Biol.* 2010. V. 95. P. 449–480.
526. Paschal B.M., Obar R.A. and Vallee R.B. Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin. // *Nature*. 1989. V. 342. P. 569–572.
527. Mukhopadhyay R., Kumar S. and Hoh J. H. Molecular mechanisms for organizing the neuronal cytoskeleton. // *Bioessays*. 2004. V. 26. P. 1017–1025.
528. Baryshnikov A. Yu., Shishkin Yu. V. Immunological problems of apoptosis. // *M.: Editorial URSS*. 2002. P. 320.
529. Lewin B. et al. *Cells. M.: BINOM. Lab knowledge*. 2011. P. 951.
530. Gordeeva A.V., Labas Yu.A., Zvyagilskaya R.A. Apoptosis of unicellular organisms: mechanisms and evolution. // *Biochemistry*. 2004. V. 69. № 10. P. 1301–1313.
531. Cory S. Apoptosis. Fascinating death factor. // *Nature*. 1994. V. 367. № 6461. P. 317–318.
532. Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. // *Cell*. 1994. V. 76. № 6. P. 959–962.
533. Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. // *Immunity*. 1995. V. 3. № 6. P. 673–682.
534. Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 22. P. 12687–12690.
535. Nagata S. Apoptosis by death factor. // *Cell*. 1997. V. 88. № 3. P. 355–365.
536. Tartaglia L., Goeddel D. V. Two TNF receptors. // *Immunol. Today*. 1992. V. 13. № 5. P. 151–153.
537. Peter M.E., Heufelder A.E. and Hengartner M.O. Advances in apoptosis research. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 24. P. 12736–7.
538. Alberts B. et al. *Molecular biology of the cell*. // 5th edition. Garland science. 2008. P. 1601.
539. Qian T., Nieminen A.L., Herman B. et al. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 273. № 6. P. C1783–1792.

540. Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N. et al. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. // *FEBS Lett.* 1996. V. 396. № 1. P. 7–13.
541. Lorenzo H.K., Susin S.A. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. // *Drug Resist. Updat.* 2007. V. 10. № 6. P. 235–255.
542. Vicencio J.M., Galluzzi L., Tajeddine N. et al. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path—a mini-review. // *Gerontology.* 2008. V. 54. № 2. P. 92–99.
543. Li H., Chen C., Wang D. Low-frequency ultrasound and microbubbles combined with simvastatin promote the apoptosis of MCF-7 cells by affecting the LATS1/YAP/RHAMM pathway. // *Mol. Med. Rep.* 2018. V. 18. № 3. P. 2724–2732.
544. Fragkos M., Beard P. Mitotic catastrophe occurs in the absence of apoptosis in p53-null cells with a defective G1 checkpoint. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. P. e22946.
545. Tangutoori S., Baldwin P., Sridhar S. PARP inhibitors: A new era of targeted therapy. // *Maturitas.* 2015. V. 81. № 1. P. 5–9.
546. Krętowski R., Stypułkowska A., Cechowska-Pasko M. Efficient apoptosis and necrosis induction by proteasome inhibitor: bortezomib in the DLD-1 human colon cancer cell line. // *Mol. Cell Biochem.* 2015. V. 398. № 1–2. P. 165–173.
547. Mishra A.P., Salehi B., Sharifi-Rad M., Pezzani R. et al. Programmed cell death, from a cancer perspective: an overview. // *Mol. Diagn. Ther.* 2018. V. 22. № 3. P. 281–295.
548. Panda P.K., Mukhopadhyay S., Das D.N. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015. V. 39. P. 43–55.
549. Di Martino J., Henriët E., Ezzoukhry Z., Goetz J.G., Moreau V., Saltel F. The microenvironment controls invadosome plasticity. // *J. Cell Sci.* 2016. V. 129. № 9. P. 1759–1768.
550. Parekh A., Weaver A.M. Regulation of invadopodia by mechanical signaling. // *Exp. Cell Res.* 2016. V. 343. № 1. P. 89–95.
551. Nicolson G.L. Cell membrane fluid-mosaic structure and cancer metastasis. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 7. P. 1169–1176.
552. Génot E., Gligorijević B. Invadosomes in their natural habitat. // *Eur. J. Cell Biol.* 2014. V. 93. № 10–12. P. 367–379.
553. Friedl P. and Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. // *J. Cell. Biol.* 2010. V. 188. P. 11–19.
554. Leong H.S., Robertson A.E., Stoletov K., Leith S.J. et al. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Rep.* 2014. V. 8. № 5. P. 1558–1570.
555. Desai B., Ma T., Chellaiyah M.A. Invadopodia and matrix degradation, a new property of prostate cancer cells during migration and invasion. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 20. P. 13856–13866.
556. Seals D.F., Azucena E.F. Jr., Pass I., Tesfay L. et al. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. // *Cancer Cell.* 2005. V. 7. P. 155–165.
557. Yamaguchi H., Lorenz M., Kempiak S., Sarmiento C. et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp^{2/3} complex pathway and cofilin. // *J. Cell. Biol.* 2005. V. 168. P. 441–452.
558. Weaver A.M. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. // *Clin. Exp. Metastasis.* 2006. V. 23. P. 97–105.
559. Diaz B., Shani G., Pass I., Anderson D., Quintavalle M., Courtneidge S.A. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. // *Sci. Signal.* 2009. V. 2. № 88. P. ra53.
560. Clark E.S. and Weaver A.M. A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. // *Eur. J. Cell Biol.* 2008. V. 87. P. 581–590.

561. Goueffic Y., Guilluy C., Guerin P. et al. Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation. // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 72. P. 339–348.
562. Toole B.P., Slomiany M.G. Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells. // *Semin. Cancer Biol.* 2008. V. 18. P. 244–250.
563. Yi-Chieh N.D., Chen-Kung C. and Harold V. Receptor for hyaluronan-mediated motility isoform B promotes liver metastasis in a mouse model of multistep tumorigenesis and a tail vein assay for metastasis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. №40. P. 16753–16758.
564. Kouvidi K., Berdiaki A., Tzardi M. et al. Receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM) regulates HT1080 fibrosarcoma cell proliferation via a β -catenin/c-myc signaling axis. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1860. №4. P. 814–824.
565. Shigeishi H., Higashikawa K., Takechi M. Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2003. V. 129. №3. P. 161–164.
566. Wang D., Narula N., Azzopardi S. et al. Expression of the receptor for hyaluronic acid mediated motility (RHAMM) is associated with poor prognosis and metastasis in non-small cell lung carcinoma. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. №26. P. 39957–39969.
567. Li H., Li J., Guo L. Characteristics of expression of CD44v and receptor for HA-mediated motility (RHAMM) in multi-step gastroduodenal carcinogenesis. // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 1999. V. 21. №5. P. 329–331.
568. Bose N., Masellis A. M. Role of RHAMM within the hierarchy of well-established prognostic factors in colorectal cancer. // *Gut.* 2008. V. 57. №10. P. 1413–1419.
569. Lou J., Stowers R., Nam S., Xia Y., Chaudhuri O. Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture. // *Biomaterials.* 2018. V. 154. P. 213–222.
570. Si D., Yin F., Peng J., Zhang G. High expression of CD44 predicts a poor prognosis in glioblastomas. // *Cancer Manag. Res.* 2020. V. 12. P. 769–775.
571. Turley E.A. Hyaluronan and cell locomotion. // *Cancer Metastasis Rev.* 1992. V. 11. №1. P. 21–30.
572. Gurski L.A., Xu X., Labrada L.N., Nguyen N.T. et al. 2012. Hyaluronan (HA) interacting proteins RHAMM and hyaluronidase impact prostate cancer cell behavior and invadopodia formation in 3D HA-based hydrogels. // *PLOS One.* 2012. V. 7. №11. P. e50075.
573. Singleton P.A. Hyaluronan regulation of endothelial barrier function in cancer. // *Adv. Cancer Res.* 2014. V. 123. P. 191–209.
574. Meier C., Spitschak A., Abshagen K., Gupta S. et al. Association of RHAMM with E2F1 promotes tumour cell extravasation by transcriptional up-regulation of fibronectin. // *J. Pathol.* 2014. V. 234. №3. P. 351–364.
575. Yamano Y., Uzawa K., Shinozuka K. et al. Hyaluronan-mediated motility: a target in oral squamous cell carcinoma. // *Int. J. Oncol.* 2008. V. 32. №5. P. 1001–1009.
576. Kouvidi K., Nikitovic D., Berdiaki A., Tzanakakis G.N. Hyaluronan/RHAMM interactions in mesenchymal tumor pathogenesis: role of growth factors. // *Adv. Cancer Res.* 2014. V. 12. P. 319–349.
577. Yang C., Li C., Zhang P., Wu W., Jiang X. Redox responsive hyaluronic acid nanogels for treating RHAMM (CD168) over-expressive cancer, both primary and metastatic tumors. // *Theranostics.* 2017. V. 7. №6. P. 1719–1734.

578. McGranahan N., Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. // *Cancer Cell*. 2015. V. 27. № 1. P. 15–26.
579. Roulot A., Héquet D., Guinebretière J.M., Vincent-Salomon A. et al. Tumoral heterogeneity of breast cancer. // *Ann. Biol. Clin.* 2016. V. 74. № 6. P. 653–660.
580. Welch H.G. The heterogeneity of cancer. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2018. V. 169. № 2. P. 207–208.
581. Dagogo-Jack I., Shaw A.T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018. V. 15. № 2. P. 81–94.
582. Chmielik E., Rusinek D., Oczko-Wojciechowska M., Jarzab M. et al. Heterogeneity of thyroid cancer. // *Pathobiology*. 2018. V. 85. № 1–2. P. 117–129.
583. Smith T.C., Fridy P.C., Li Y. et al. Supravillin binding to myosin II and synergism with anillin are required for cytokinesis. // *Mol. Biol. Cell*. 2013. V. 24. № 23. P. 3603–3619.
584. Dominguez R. and Holmes K. C. Actin Structure and Function. // *Annual Review of Biophysics*. 2011. V. 40. № 40. P. 169–186.
585. Kutsuzawa K., Tada S., Hossain S. et al. Disrupting actin filaments promotes efficient transfection of a leukemia cell line using cell adhesive protein-embedded carbonate apatite particles. // *Analytical Biochemistry*. 2009. V. 388. P. 164–166.
586. Sabeh F., Shimizu-Hirota R. and Weiss S.J. Protease-dependent versus-independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. // *Journal of Cell Biology*. 2009. V. 185. P. 11–19.
587. Fukui M., Ueno K., Suehiro Y., Hamanaka Y. et al. Anti-tumor activity of dendritic cells transfected with mRNA for receptor for hyaluronan-mediated motility is mediated by CD4+ T cells. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2006. V. 55. № 5. P. 538–546.
588. Wang Z., Wu Y., Wang H. et al. Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 1. P. 89–98.
589. Evanko S.P., Parks W.T., Wight T.N. Intracellular hyaluronan in arterial smooth muscle cells: association with microtubules, RHAMM, and the mitotic spindle. // *J. Histochem. Cytochem.* 2004. V. 52. № 12. P. 1525–1535.
590. Park S.Y., Oh Y.T., Jung D.C., Cho N.H. et al. Prediction of micrometastasis (< 1 cm) to pelvic lymph nodes in prostate cancer: role of preoperative MRI. // *Am. J. Roentgenol.* 2015. V. 205. № 3. P. W328–334.
591. Gül G., Sendur M.A., Aksoy S., Sever A.R., Altundag K. A comprehensive review of denosumab for bone metastasis in patients with solid tumors. // *Curr. Med. Res. Opin.* 2016. V. 32. № 1. P. 133–145.
592. Koo K. C., Park S. U., Kim K. H., Rha K. H. et al. Prognostic impacts of metastatic site and pain on progression to castrate resistance and mortality in patients with metastatic prostate cancer. // *Yonsei Med. J.* 2015. V. 56. № 5. P. 1206–1212.
593. Juloori A., Shah C., Stephans K., Vassil A., Tendulkar R. Evolving paradigm of radiotherapy for high-risk prostate cancer: current consensus and continuing controversies. // *Prostate Cancer*. 2016. V. 2016. P. 2420786.
594. Seano G., Primo L. Podosomes and invadopodia: tools to breach vascular basement membrane. // *Cell Cycle*. 2015. V. 14. № 9. P. 1370–1374.
595. Veillat V., Spuul P., Daubon T., Egaña I., Kramer I., Génot E. Podosomes: Multipurpose organelles? // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015. V. 65. P. 52–60.
596. Enback J. and Laakkonen P. Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction. // *Biochemical Society Transactions*. 2007. V. 35. № 4. P. 780–783.
597. Aina O.H., Sroka T.C., Chen M.L. and Lam K.S. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*. 2002. V. 66. № 3. P. 184–199.

598. Bidwell G.L. 3rd, Raucher D. Therapeutic peptides for cancer therapy. Part I – peptide inhibitors of signal transduction cascades. // *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2009. V. 6. №10. P. 1033–1047.

599. Korkes F., de Castro M.G., de Cassio Zequi S., Nardi L. et al. Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM) immunohistochemical expression and androgen deprivation in normal peritumoral, hyperplastic and neoplastic prostate tissue. // *BJU Int.* 2014. V. 113. № 5. P. 822–829.

600. Cai J., Xu L., Tang H. et al. The role of the PTEN/PI3K/Akt pathway on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis. // *Oncologist.* 2014. V. 19. № 5. P. 528–535.

601. Залуцкий И.В. Методические и организационные принципы селективного скрининга рака шейки матки, тела матки и яичников. // *Вопросы онкологии.* 2006. Т. 52. № 1. С. 74–77.

602. Бохман Я.В., Максимов С.Я., Бахидзе Е.В. Выявление солитарных и первично-множественных опухолей в женской репродуктивной системе на основании селективного скрининга. В кн.: *Новая медицинская технология.* СПб.: изд-во Н-Л, 2008. С. 40–45.

603. Чиссов В.И., Трахтенберг А.Х. Ошибки в клинической онкологии: руководство для врачей. М.: Медицина, 2001. С. 544.

604. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. // *J. Control Release.* 2000. V. 65. P. 271–284.

605. Weissleder R. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. V. 2. P. 11–18.

606. Yang Y., Yang X., Yang H., Fu H. et al. Synthesis and monkey-PET study of (R)- and (S)-18F-labeled 2-arylbenzoheterocyclic derivatives as amyloid probes with distinctive *in vivo* kinetics. // *Mol. Pharm.* 2016. V. 13. P. 3852–3863.

607. Tzortzakakis A., Gustafsson O., Karlsson M., Ekström-Ehn L. et al. Visual evaluation and differentiation of renal oncocytomas from renal cell carcinomas by means of 99mTc-sestamibi SPECT/CT. // *EJNMMI Res.* 2017. V. 7. P. 1–29.

608. Minchin R.F., Martin D.J. Nanoparticles for molecular imaging-an overview. // *Endocrinology.* 2010. V. 151. P. 474–481.

609. Pinaud F., Michalet X., Bentolila L.A., Tsay J.M. et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 1679–1687.

610. James M.L., Gambhir S.S. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. // *Physiol. Rev.* 2012. V. 92. P. 897–965.

611. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Кост Н.В., Воеводина М.Э., Соколов О.Ю., Козик В.С., Шрам С.И., Азев В.Н., Бочаров Э.В., Богачук А.П., Липкин В.М., Мясоедов Н.Ф. Количественный анализ пептида hldf-6-амида и его метаболитов в тканях лабораторных животных с использованием их меченных тритием и дейтерием производных. // *Биоорганическая химия.* 2015. Т. 41. № 6. С. 644–656.

612. Lee S., Xie J., Chen X. Peptide-based probes for targeted molecular imaging. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. P. 1364–1376.

613. Luyt L.G. The design of radiolabeled peptides for targeting malignancies. (In “Monoclonal antibody and peptide-targeted radiotherapy of cancer”). / Ed. Reilly R.M. Hoboken. N. J.: USA. John Wiley & Sons, Inc., 2010. P. 101–120.

614. Beer A.J., Haubner R., Wolf I., Goebel M. et al. PET-based human dosimetry of 18F-galacto-RGD, a new radiotracer for imaging α v β 3 expression. // *J. Nucl. Med.* 2006. V. 47. P. 763–769.

615. Akhtar M. S., Qaisar A., Irfanullah J., Iqbal J. et al. Antimicrobial peptide 99mTc-ubiquicidin 29–41 as human infection-imaging agent: clinical trial. // *J. Nucl. Med.* 2005. V. 46. P. 567–573.
616. Samuel P., Carter D. R. The diagnostic and prognostic potential of microRNAs in epithelial ovarian carcinoma. // *Mol. Diagn. Ther.* 2017. V. 21. P. 59–73.
617. Kolapalli S. P., Nunna V., Thomas A., Mortha K. K., Banerjee S. D., Boregowda R. K. Detection of a specific pattern of hyaluronan oligosaccharides and their binding proteins in human ovarian tumour. // *Cell Biochem. Funct.* 2016. V. 34. P. 217–225.
618. Bauer J., Nelde A., Bilich T., Walz J. S. Antigen targets for the development of immunotherapies in leukemia. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 6. P. 1397.
619. Turley E. A., Bissell M. J., Winnik F. Rhamm, a co-receptor and its interactions with other receptors in cancer cell motility and the identification of cancer progenitor cell populations. // *International Patent US 20100062000 A16.* 2009.
620. Luyt L. G., Turley E. A., Esguerra K. V. Rhamm binding peptides. // *International Patent WO2011/150495.* 2011.
621. Garcia-Posadas L., Contreras-Ruiz L., Lopez-Garcia A., Alvarez S. V. et al. Hyaluronan receptors in the human ocular surface: a descriptive and comparative study of RHAMM and CD44 in tissues, cell lines and freshly collected samples. // *Histochem. Cell Biol.* 2012. V. 137. P. 165–176.
622. Oldenburg D., Ru Y., Weinhaus B., Cash S., Theodorescu D., Guin S. CD44 and RHAMM are essential for rapid growth of bladder cancer driven by loss of glycogen debranching enzyme (AGL). // *BMC Cancer.* 2016. V. 16. № 1. P. 713.
623. McCourt P. A. G., Smedsrod B. H., Melkko J., Johansson S. Characterization of a hyaluronan receptor on rat sinusoidal liver endothelial cells and its functional relationship to scavenger receptors. // *Hepatology.* 1999. V. 30. P. 1276–1286.
624. Esguerra K. V., Tolg C., Akentieva N., Price M., Cho C. F., Lewis J. D., McCarthy J. B., Turley E. A., Luyt L. G. Identification, design and synthesis of tubulin-derived peptides as novel hyaluronan mimetic ligands for the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM/HMMR). // *Integr. Biol. (Camb).* 2015. V. 7. P. 1547–1560.
625. Акентьева Н. П., Шушанов С. С. RHAMM (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности)-таргет пептиды индуцируют апоптоз клеток рака предстательной железы. // *Вопросы онкологии.* 2016. Т. 62. № 3. С. 512–518.
626. Kimura N., Hoshino Y., Totsukawa K., Sato E. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. // *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007. V. 63. P. 327–342.
627. Volpi N., Schiller J., Stern R., Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. // *Curr. Med. Chem.* 2009. V. 16. № 14. P. 1718–1745.
628. Savani R. C., Wang C., Yang B., Zhang S. et al. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. // *J. Clin. Investigation.* 1995. V. 95. P. 1158–1168.

Для заметок

Для заметок

Роль пептидов в тераностике онкологических заболеваний

Подписано в печать 22.09.2021. Формат 70х100 1/16.
Гарнитура Times. Печ. л. 10,75.
Тираж 100 экз. Заказ № 4590.

Издатель – Российская академия наук

Оригинал-макет подготовлен
ООО «Красногорский полиграфический комбинат»

Публикуется в авторской редакции

Отпечатано в ООО «Красногорский полиграфический комбинат»
115093 г. Москва, Партийный переулок д. 1 корп. 58, стр. 1, эт. 1, пом. 1

Издается в соответствии с постановлением Научно-издательского совета
Российской академии наук (НИСО РАН) от 12 февраля 2021 г. № 01
и распространяется бесплатно